

## Investigation of bone marrow stem cells differentiation to neurons on magnetic nanoparticles gelatin/polylactic-co-glycolic acid scaffolds by freezed casting and freezed drying methods

Alireza Shams, Atefeh Shamosi\*

Department of Anatomy, School of Medicine, Alborz University of Medical Sciences, Karaj, Iran

\* Corresponding author e-mail: a.shamosi@gmail.com

Citation: Shams A, Shamosi A. Investigation of bone marrow stem cells differentiation to neurons on magnetic nanoparticles gelatin/polylactic-co-glycolic acid scaffolds by freezed casting and freezed drying methods. Daneshvar Medicine 2021; 29(5):93-105. doi: 10.22070/DANESHMED.2021.15051.1117

### Abstract

**Background and Objective:** Differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells (BMMSC) has studied in different cell lines. Variety of biochemical and topographic signaling could influence and change cells differentiation and proliferation of a special cell line. The aim of this study was to evaluate potential differentiating of BMMSC to neuronal-like cells.

**Materials and Methods:** Freezed casting and freezed drying scaffolds of gelatin/polylactic-co-glycolic acid (PLGA) with iron nanoparticles (MNPs) and without iron nanoparticles (MNPs-free) was used as a three-dimensional topographic structure. BMMSC differentiation to neuronal-like cells by neurogenic culture was done in 20 days. BMMSC proliferation was studied by MTT assay. Gene expression of specific neuronal markers was studied by immunohistochemistry methods. In this study, one-way ANOVA, post hoc Tukey and Mann-Whitney nonparametric tests were used.

**Results:** Gelatin PLGA- MNP freezed casting scaffold containing Fe nanoparticles provides a suitable structure for differentiation into neuron-like cells. The results of cell survival (Mean 0.7600 and standard deviation 0.02000 after 72 hours) and gene expression (Mean 79.00 and standard deviation 1.000) showed that the rate of cell proliferation on freezed casting scaffolds containing nanoparticles is higher than that of freezed drying scaffolds ( $P < 0.001$ ).

**Conclusion:** Freezed casting gelatin PLGA-MNP scaffold could be an appropriate choice for repair and regeneration of nervous system.

**Keywords:** Bone marrow mesenchymal stem cells, Differentiation, Freezed casting, Freezed drying

Received: 21 Jul 2021  
Last revised: 07 Nov 2021  
Accepted: 21 Nov 2021

# بررسی تمایز سلولهای بنیادی مغز استخوان به نوروها بر روی داربست های نانو ماگنتیک ژلاتین پلی لاکتیک کوگلیکولیک اسید سنتز شده با دو روش ریخته گری انجمادی و خشک انجمادی

نویسندگان: علیرضا شمس، عاطفه شموسی

گروه آناتومی، دانشگاه علوم پزشکی البرز، کرج، ایران

Email: a.shamosi@gmail.com

\*نویسنده مسئول: عاطفه شموسی

## مقاله پژوهشی

### چکیده

**مقدمه و هدف:** تمایز سلولهای بنیادین مزانشیمی مغز استخوان BMMSC (bone marrow mesenchymal stem cell) به رده های مختلف سلولی بررسی شده است. سیگنال های مختلف بیوشیمیایی و توپوگرافیک می توانند در تکثیر و تمایز سلولهای بنیادین به یک رده سلولی خاص تأثیر بگذارند. هدف از این مطالعه ارزیابی توانایی BMMSC برای تمایز به سلولهای شبه نرونی است.

**مواد و روش ها:** از داربست ریخته گری انجمادی و خشک انجمادی ژلاتین/ پلی لاکتیک-کو-گلیکولیک اسید (PLGA) با نانوذرات آهن (MNPs) و بدون نانوذرات آهن (MNPs-free) به عنوان یک ساختار توپوگرافی سه بعدی استفاده شد. تمایز BMMSC به سلولهای شبه نرون تحت اثر محیط های نوروژنیک به مدت ۲۰ روز انجام شد. میزان تکثیر BMMSC با تست MTT و بیان مارکرهای خاص نرون با روش ایمونوهیستوشیمی بررسی شد. در این مطالعه، روش آماری آنالیز واریانس یک طرفه ANOVA، Post Hoc Tukey و آزمون نان پارامتریک Mann-Whitney استفاده شد.

**نتایج:** داربست ریخته گری انجمادی ژلاتین-NPs-PLGA حاوی نانوذرات آهن ساختار مناسبی برای تمایز به سلولهای شبه نرونی فراهم می کند. نتایج بقا سلولی (میانگین ۰/۷۶۰۰ و انحراف معیار ۰/۰۲۰۰۰ بعد از ۷۲ ساعت) و بیان ژنها (میانگین ۷۹/۰۰ و انحراف معیار ۱/۰۰۰) نشان می دهد که میزان تکثیر سلول ها بر روی داربستهای فریز کست شده حاوی نانوذرات بیشتر از داربستهای فریزداری شده می باشد ( $P < 0/001$ ).

**نتیجه گیری:** داربست ریخته گری انجمادی ژلاتین-PLGA حاوی نانوذرات آهن می تواند انتخاب مناسبی برای ترمیم و بازسازی سیستم عصبی باشد.

**واژه های کلیدی:** تمایز، سلولهای بنیادی مغز استخوان، داربست، ریخته گری انجمادی، خشک انجمادی

دریافت: ۱۴۰۰/۰۴/۳۰  
آخرین اصلاح ها: ۱۴۰۰/۰۸/۱۶  
پذیرش: ۱۴۰۰/۰۸/۳۰

## مقدمه

پس از آسیبهای بزرگ، بازسازی طبیعی اعصاب آسیب دیده همچنان یک چالش قابل توجه محسوب می شود (۱،۲). یکی از رویکردهای امیدوار کننده، مهندسی بافت است که در جایگزینی سلولهای آسیب دیده، فراهم نمودن ماتریکس خارج سلولی (داربست سلولی) و فاکتورهای رشد مؤثر می باشد (۳). از منابع سلولی مورد استفاده در مهندسی بافت، به سلولهای بنیادی مزانشیمی مغز استخوان (BMMSC)<sup>۱</sup> می توان اشاره نمود که دسترسی آسان (۴)، حجم بالای سلول های بنیادی در نمونه گیری (۵)، حفظ پتانسیل طولانی مدت بنیادی بودن و استفاده در سلول درمانی اتولوگ (۶) از مزایای این سلول ها بشمار می رود. مطالعات نشان می دهد که BMMSC توانایی تکثیر و تمایز به نورون را دارند (۷) و مناسب ترین انتخاب برای درمان بیماری های تخریب عصبی<sup>۲</sup> می باشند (۸). ریخته‌گری انجمادی<sup>۳</sup> یک روش مناسب برای ساخت داربست های پلیمری یا سرامیکی متخلخل شبکه ای است که پلیمر مایع در قالب ریخته شده و سپس منجمد می گردد. پس از آن، نمونه در معرض خشک شدن قرار می گیرد تا حلال در شرایط خلا از بین برود و از تنش های چروک شدن و خشک شدن که ممکن است در هنگام خشک شدن طبیعی منجر به تاب خوردگی و ترک گردد، جلوگیری شود (۹). مواد زیستی مانند ژلاتین (۱۰) و PLGA<sup>۴</sup> (۱۱) به دلیل زیست تخریب پذیری و زیست سازگاری با ایجاد ساختاری متخلخل می توانند چسبندگی، تکثیر و تمایز سلول های بنیادی آندومتر رحم (۱۲)، سلولهای استرومایی مغز استخوان (۱۳)، سلول های بنیادی مزانشیمی ژله وار تون (۱۴) به عصب را حمایت نمایند (۱۵،۱۶). نانوذرات مگنتیک (MNP)<sup>۵</sup> به دلیل سمیت سلولی کم، ویژگی های مغناطیسی و سطح وسیع، به عنوان داربستهای سلولی، حامل، کنترل کننده انتقال دارو و در تشخیص بیماری ها مورد مطالعه قرار گرفته اند (۱۷). در این مطالعه، تمایز BMMSC بر روی کشت دوبعدی

(TCP)<sup>۶</sup> و کشت سه بعدی ریخته گری انجمادی (Freezed casting) و خشک انجمادی (Freezed drying) ژلاتین/PLGA همراه با نانوذرات آهن (MNPs) و بدون نانوذرات آهن (MNPs-free)، به سلول های عصبی در حضور فاکتورهای رشد نورونژنیک ارزیابی شد.

## مواد و روشها

### تهیه MNP و آماده سازی محلول gelatin-PLGA- MNPs

#### و فرآیند خشک انجمادی و ریخته گری انجمادی

۲ گرم کلرید آهن (II) و ۳/۲۵ گرم کلرید آهن (III) در ۱۰۰ میلی لیتر اسید کلریدریک ۰/۱۶۷ M حل شد (HCl، Merck، Kenilworth، NJ). سپس به آن ۱۰۰ میلی لیتر هیدروکسید سدیم ۱ مولار اضافه شد (NaOH، Merck، Kenilworth، NJ). MNPs سیاه از طریق اتانول رسوب کرده و در ۸۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند و ۲ بار با اتانول شستشو داده شدند (۱۸). به منظور آماده سازی محلول های کامپوزیتی پلیمری در سنتز داربست های خشک انجمادی و ریخته گری انجمادی، با حل کردن ژلاتین A (Sigma, porcine Skin) و PLGA (sigma) در ۱۰ میلی لیتر اسید استیک آبی (۸۰٪ v/v) در دمای ۴۰ درجه سانتیگراد، یک محلول ژلاتین ۱۰٪ (w/v) و یک محلول PLGA ۵٪ (w/v) تهیه شد. پلیمرهای ژلاتین و PLGA با نسبت ۲:۸ (وزنی/وزنی) مخلوط شده و در دمای ۴۰ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت هم زده شدند تا محلول ترکیبی همگن حاصل شود (۱۹). سپس ۲٪ (وزنی/وزنی) MNP به محلول های تهیه شده اضافه شد. به منظور تهیه داربست خشک انجمادی، محلول به مدت ۸ ساعت در دستگاه فریز درایر قرار گرفت. در تهیه داربست ریخته گری انجمادی مخلوط تازه سنتز شده داخل قالب با قطر ۲ سانتی متر و ارتفاع ۵ سانتی متر ریخته شد و سپس در نیتروژن مایع غوطه ور شد تا بلافاصله مخلوط منجمد شود. مخلوط جامد در دستگاه فریزدرایر (Christ Alpha 1-2 LD plus) در دمای ۰°C -58 قرار گرفت. نمونه ها به مدت ۲ روز در ۰/۵ Torr به صورت یخ خشک شدند تا حلال به طور کامل حذف

6. Tissue Culture Plate

1. Bone marrow mesenchymal stem cells  
2. Neurodegenerative diseases  
3. Freezed casting  
4. poly (lactic-co-glycolic acid)  
5. Magnetic Nano Particle

شود (۲۰).

**استخراج سلول های بنیادی مغز استخوان**

مطابق با دستورالعمل های تأیید شده در مورد کار بر روی حیوانات آزمایشگاهی، BMMSC از هفت موش صحرایی نر نژاد ویستار ۲ ماهه به وزن ۲۰۰-۲۵۰ گرم برداشت شد. موشها با استنشاق بیش از حد کلروفرم (Avertin) قربانی شدند و سلولهای بنیادی با تزریق محیط کشت Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM/F12; Invitrogen, Carlsbad) به تکنیک فلاشینگ از استخوان ران جدا شدند. سوسپانسیون بدست آمده از BMMSC در فلاسک کشت بافت ۷۵ سانتی متر مربع حاوی ۲۵ میلی لیتر DMEM/F12 همراه با ۱۰٪ (v/v) سرم جنین گاو (FBS; Invitrogen) ۱۰۰ IU/ml پنی سیلین و ۱۰۰ IU/ml استرپتومایسین در داخل انکوباتور (پنج درصد CO2) کشت داده شدند. پس از ۲۴ ساعت، سلولهای غیر چسبنده برداشته شدند و محیط کشت هر ۳ روز تعویض شد.

**چسبندگی سلول های کشت شده بر روی داربست**

داربست خشک انجمادی همراه با نانوذرات آهن و داربست ریخته گری انجمادی همراه با نانوذرات آهن توسط غوطه وری در ۷۰٪ (v/v) اتانول به مدت ۴۰ دقیقه استریل شدند و به مدت ۲ ساعت تحت اشعه UV قرار گرفتند. به منظور دانه گذاری BMMSC بر روی داربستها، BMMSC با استفاده از محلول trypsin-EDTA (0.25% trypsin and 0.1% EDTA) به مدت ۵ دقیقه در ۳۷ درجه سانتیگراد تریپسینه شدند. سوسپانسیون تک سلولی بدست آمده در ۱۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. BMMSC ها با تراکم  $1 \times 10^4$  سلول بر روی داربست ها کاشته و سپس در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد با ۵٪ CO2 به مدت ۲ روز انکوبه شدند. داربست های حاوی سلول در محلول گلوتارآلدئید ۲/۵٪ به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق فیکس شدند. پس از آن، نمونه ها در الکل های تدریجی ۳۰٪ تا ۱۰۰٪ در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه خشک شدند. سرانجام نمونه ها با طلا پوشانده شده و تصاویر فراساختاری آنها با استفاده از SEM با ولتاژ 15 keV مطالعه گردید.

ارزیابی میزان بقا سلول ها (Viability assay) بر روی داربست های فریز درای و فریز کست شده ژلاتین/PLGA همراه با نانوذرات آهن و بدون نانوذرات آهن و مقایسه آن با کشت دوبعدی با استفاده از روش MTT

میزان بقای سلول های بنیادی مغز استخوان بر روی داربست های خشک انجمادی و ریخته گری انجمادی ژلاتین/PLGA همراه با نانوذرات آهن و بدون نانوذرات آهن با استفاده از (4,5-dimethylthiazoyl-2-yl)-3-2,5- با غلظت 5 mg/ml بررسی شد. این ارزیابی در روزهای ۱، ۲ و ۳ بعد از قرار دادن سلول ها در محیط کشت سه بعدی انجام گرفت. در زمان های ذکر شده، بعد از کشت سلول ها در پلیت های ۱۲ خانه، محیط کشت خارج و به هر خانه حدود ۳۰ میکرولیتر از محلول MTT اضافه شد. بعد از ۲ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷°C، رنگ محیط به دلیل تولید کریستال های فورمازان به رنگ بنفش در آمد. سپس به هر خانه ۲۰۰ میکرولیتر DMSO<sup>۲</sup> اضافه و جذب نوری نمونه ها در طول موج ۵۷۰ نانومتر با استفاده از دستگاه الیزا ریدر اندازه گیری شد.

**بررسی تمایز سلول های بنیادی مغز استخوان به نوروب (سلول عصبی) بر روی داربست های خشک انجمادی و ریخته گری انجمادی ژلاتین/PLGA همراه با نانوذرات آهن**

داربست های خشک انجمادی و ریخته گری انجمادی ژلاتین/PLGA همراه با نانوذرات آهن به پلیت ۱۲ خانه انتقال داده شدند. سپس تحت اشعه UV بمدت ۱ ساعت استریل شدند. سپس برای تمایز به سلول نوروب، سلول های بنیادی مغز استخوان بر روی داربست های خشک انجمادی و ریخته گری انجمادی ژلاتین/PLGA همراه با نانوذرات آهن و یا بدون نانوذرات آهن و محیط کشت دو بعدی با تراکم cell/well  $5 \times 10^4$  دانه گذاری شدند. سلولها بمدت ۱ روز در محیط کشت 10% DMEM/F12+ FBS و 1% penicillin/streptomycin کشت داده شدند. سپس به هر گروه آزمایشی محیط کشت تمایز عصبی، شامل رتینوئیک اسید ۵ میکرومولار، ۱۰ نانوگرم در میلی لیتر فاکتور رشد اپیدرمال، فاکتور رشد فیروبلاستی و فاکتور رشد عصبی، ۰/۵ میلی مولار ایزوبوتیل متیل گزانتین

## تجزیه و تحلیل آماری

تمام آزمایش ها حداقل با سه بار تکرار انجام شدند و داده ها به صورت میانگین انحراف معیار (Mean±SD) گزارش گردید. آنالیز داده ها با استفاده از نرم افزار SPSS (verdion 18) انجام شدند و آزمونهای آنالیز واریانس یک طرفه ANOVA و تکمیلی Post Hock Tukey و آزمون نان پارامتریک Mann-Whitney برای سنجش تفاوت میان نمونه ها و رتبه بندی و Kruskal-Wallis test جهت توانایی مقایسه ی دو گروه نمونه استفاده شد. P-value کمتر از  $p < 0.05$ ،  $p < 0.01$  و  $p < 0.001$  به عنوان داده های معنی دار گزارش گردید.

## نتایج

### ارزیابی میکروسکوپ الکترونی SEM از داربست های ریخته گری انجمادی و خشک انجمادی و ارزیابی میزان چسبندگی سلول بر روی داربستها

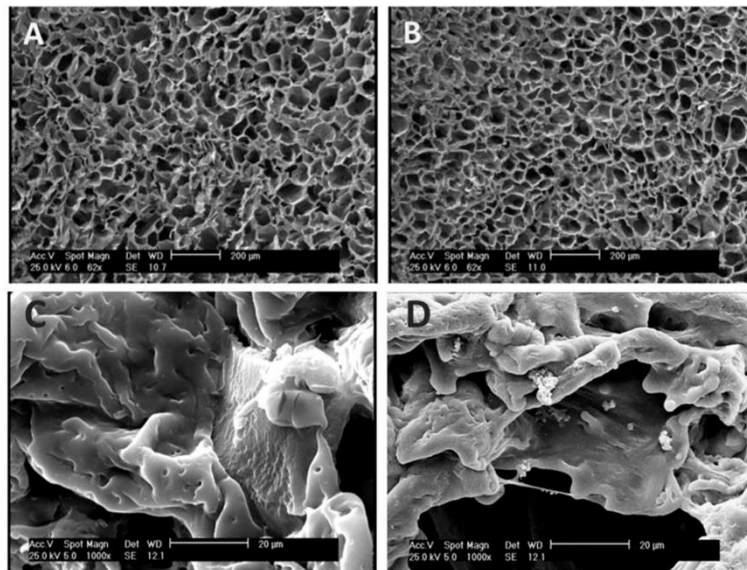
ساختار میکروسکوپی داربست های ریخته گری انجمادی و خشک انجمادی با استفاده از میکروسکوپ روبشی SEM مورد مطالعه قرار گرفت. داربست های تهیه شده به روش ریخته گری انجمادی و خشک انجمادی دارای تخلخل و متشکل از منافذ بسیار بهم پیوسته می باشند (شکل ۱ قسمت A و B). کشت سلول های بنیادی بر روی داربست های خشک انجمادی همراه با نانوذرات آهن و ریخته گری انجمادی همراه با نانوذرات آهن پس از ۲ روز، بیانگر این مطلب است که سلول ها به خوبی بر روی این داربست ها چسبیده، تکثیر و گسترده شده اند اما سلول های بنیادی بیشتری بر روی داربست ریخته گری انجمادی در مقایسه با داربست خشک انجمادی چسبیده و تکثیر یافته اند. نتایج نشان می دهد که داربست ریخته گری انجمادی تعامل مناسب تری با سلول برقرار کرد (شکل ۱ قسمت C و D).

و ۱۰۰ میکرومولار آسکوربیک اسید افزوده شد. سلول ها به مدت ۲۰ روز در محیط کشت تمایز رشد یافتند و این محیط هر ۳ روز یکبار تعویض شد. در زمان های مختلف مورفولوژی سلول ها به منظور تایید تمایز آنها بررسی شد. در نهایت بیان ژنهای اختصاصی عصب با روش ایمنو هیستوشیمی مورد بررسی قرار گرفت.

### بررسی ایمنو هیستوشیمی

به منظور بررسی بیان ژنها، بررسی ایمنو هیستوشیمی انجام شد. داربست ها در محلول ۴٪ پارافرمالدهید در ۱۰۰ میلی مولار بافر سدیم کاکودیلات (PH 7.4) یک شبانه روز در ۴ درجه سانتیگراد فیکس و با استفاده از الکلهای ۳۰٪، ۵۰٪، ۷۰٪، ۸۰٪ و ۱۰۰٪ آبگیری شده و در پارافین قالب گیری شدند. نمونه ها تا دمای ۶۰ درجه سانتیگراد گرما داده شدند تا دیپارافینه شوند. سپس با استفاده از Triton X-100 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفتند. برش ها با استفاده از PBS شستشو داده شدند و بمدت ۴۵ دقیقه در ۱٪ BSA و ۲٪ BSA بعنوان بلاکر انکوبه شدند. سپس با استفاده از آنتی بادی اولیه Nestin Monoclonal Antibody (Invitrogen, 1:500) (Rat-401 4D4), eBioscience™ به مدت ۸ ساعت در دمای ۴ درجه سانتیگراد قرار گرفتند. سپس سه بار با PBS شستشو و با استفاده از آنتی بادی ثانویه فلورسنت Donkey Anti-Rat IgG H&L (Biotin) (Abcam, ) 1:500 (ab102180) به مدت ۳ ساعت در دمای اتاق در شرایط تاریکی انکوبه شدند. سلول ها در TSA Kit (PerkinElmer, USA) تیمار شدند. برای شمارش سلولها، حداقل چهار میدان میکروسکوپی به طور تصادفی برای هر چاه مورد مطالعه قرار گرفت. تعداد هسته های رنگ آمیزی شده با رنگ DAPI و آنتی بادی ثانویه Donkey Anti-Rat IgG H&L (Biotin) شمارش شدند. نسبت سلولهای مثبت (سلولهای رنگ آمیزی شده با آنتی بادی ثانویه) با تقسیم تعداد سلولهای مثبت بر تعداد کل سلولها (هسته رنگ آمیزی DAPI) محاسبه شد. در هر گروه به منظور تعیین میانگین و انحراف معیار هر آزمایش سه بار تکرار شد و نتایج به عنوان درصد سلولهای رنگ آمیزی مثبت در هر گروه تعیین گردید.

1. Normal goat serum
2. Bovine serum albumin



شکل ۱. تصاویر میکروسکوپ الکترونی از داربستهای سنتز شده با استفاده از روش (a) خشک انجمادی و (b) ریخته گری انجمادی تصویر میکروسکوپ الکترونی پس از ۲ روز کشت سلول های بنیادی مغز استخوان بر روی داربست های (C) خشک انجمادی و (D) ریخته گری انجمادی

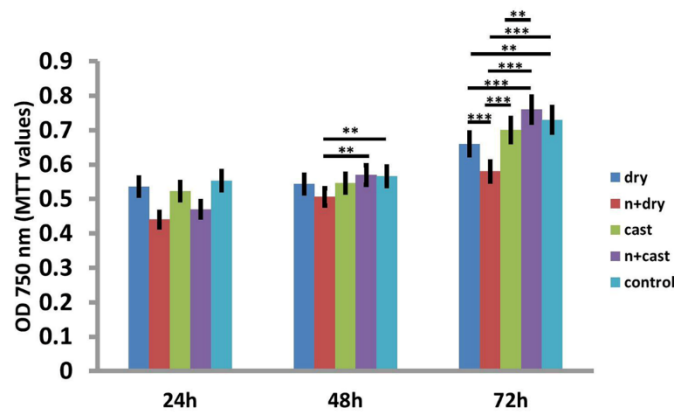
است. مقایسه میزان بقای سلول ها در دو گروه کنترل و سه بعدی بعد از گذشت یک روز، تفاوت معناداری را نشان نداد اما در دومین و سومین روز بعد از کشت سلول ها بر روی داربست ها، افزایش بقای سلول ها بر روی داربست ریخته گری انجمادی ژلاتین/PLGA همراه با نانوذرات آهن در مقایسه با سایر گروه ها، معنی دار بود (نمودار ۱ و جدول ۱) ( $p < 0.01$  و  $p < 0.001$ ).

#### بررسی زیست سازگاری داربست ها

بررسی میزان بقای سلول های بنیادی مغز استخوان بر روی داربست های خشک انجمادی و ریخته گری انجمادی ژلاتین/PLGA همراه با نانوذرات آهن و بدون نانوذرات آهن، در ۲۴، ۴۸، و ۷۲ ساعت بعد از کشت انجام گرفت. نتایج حاصله نشان دهنده افزایش میزان بقای سلول های بنیادی مغز استخوان بر روی داربست ریخته گری انجمادی ژلاتین/PLGA همراه با نانوذرات آهن در مقایسه با کشت دوبعدی (گروه کنترل) این سلول ها در طی دوره ۳ روزه

جدول ۱. میانگین و انحراف معیار بقای سلول های بنیادی مغز استخوان بر روی داربست های خشک انجمادی و ریخته گری انجمادی ژلاتین/PLGA همراه با نانوذرات آهن (n+dry و n+cast)، در ۲۴، ۴۸، و ۷۲ ساعت بعد از کشت (هر گروه با سه بار تکرار) (M: Mean و SD: Std. Deviation)

متغیر	control		n+cast		cast		n+dry		dry		گروهها
	SD	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD	M	
۲۴ ساعت	۰/۱۱۵۵	۰/۵۵۳	۰/۱۰۰۰	۰/۴۷	۰/۱۱۵۵	۰/۵۲۳	۰/۱۰۰۰	۰/۴۴	۰/۱۳۲۰	۰/۵۳۶	
۴۸ ساعت	۰/۱۱۵۵	۰/۵۶۶	۰/۱۰۰۰	۰/۵۷	۰/۱۵۲۸	۰/۵۴۶	۰/۰۵۷۷۴	۰/۵۰۶	۰/۲۵۱۷	۰/۵۴۳	
۷۲ ساعت	۰/۱۵۲۸	۰/۷۳	۰/۲۰۰۰	۰/۷۶	۰/۱۷۳۲	۰/۷	۰/۱۰۰۰	۰/۵۸	۰/۱۰۰۰	۰/۶۶	



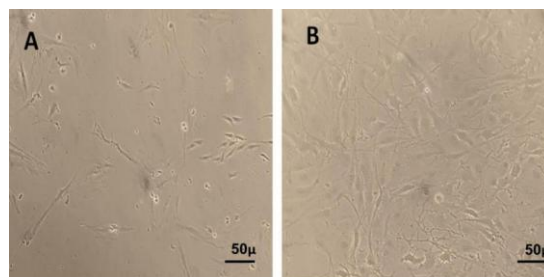
نمودار ۱. مقایسه میزان بقای سلول های بنیادی مغز استخوان بر روی داربست های خشک انجمادی و ریخته گری انجمادی ژلاتین/ PLGA همراه با نانوذرات آهن (n+dry و n+cast)، در ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از کشت. داده ها به صورت میانگین (Mean±SD) گزارش گردید (\*\*p<۰/۰۱ و \*\*\*p<۰/۰۰۱)

### بررسی ایمنوهِستوشیمی

بررسی بیان مارکر سطحی سلول های نورونی تمایز یافته از سلول های بنیادی مغز استخوان با استفاده از آنتی بادی اختصاصی علیه Nestin (مارکرهای اختصاصی سلول های نورونی) بر روی سلول های کشت سه بعدی (داربست ها) انجام شد. نتایج ایمنوهِستوشیمی مارکر Nestin، ۲۰ روز بعد از القاء سلول های بنیادی مغز استخوان به نورونی در شکل ۳ نشان داده شده است. نتایج ایمنوهِستوشیمی نشان دهنده بیان بیشتر این مارکر نورونی در سلول های تمایز یافته بر روی داربست ریخته گری انجمادی همراه با نانوذرات آهن در مقایسه با گروه های دیگر بود که می تواند تاییدی بر چسبندگی بیشتر سلولهای تمایز یافته بر سطح این نمونه باشد (جدول ۲، نمودار ۲).

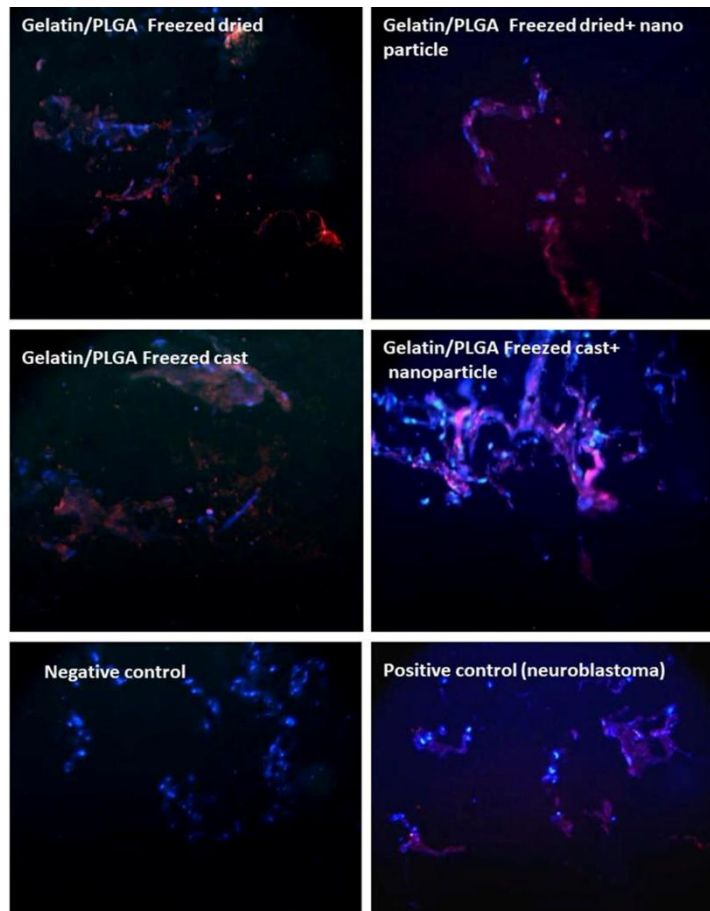
### نتایج تمایز سلول های بنیادی مغز استخوان به نورون بر روی داربست ریخته گری انجمادی ژلاتین/PLGA همراه با نانوذرات آهن

جهت القاء سلول های بنیادی مغز استخوان به نورون در محیط کشت دوبعدی و سه بعدی (بر روی داربست ریخته گری انجمادی ژلاتین/PLGA همراه با نانوذرات آهن) از فاکتورهای رشد رتینوئیک اسید، فاکتور رشد اپیدرمال، فاکتور رشد قیروبلاستی و فاکتور رشد عصبی، ایزوبوتیل متیل گزانتین و آسکوربیک اسید به مدت ۲۰ روز استفاده شد. تغییرات مرفولوژی سلول ها در حین القاء نورونی، روزانه سلول های کشت دو بعدی توسط میکروسکوپ فاز کتراسست مشاهده شد (شکل ۲). سلول های استرومال مزانشیمی مغز استخوان پس از تمایز عصبی، کم کم مرفولوژی شبه فیبروبلاستی خود را از دست دادند دارای سیتوپلاسم کشیده با جسم سلولی کوچک و دارای یک یا چند زوائد سیتوپلاسمی گردیدند.



شکل ۲. بررسی مرفولوژیکی سلول در حین تمایز

تصاویر فاز کتراسست سلول های بنیادی مغز استخوان قبل (A) و بعد از القاء نورونی (B) در محیط کشت دوبعدی. تمایز به رده عصبی که از طریق زوائد دندریتی شکل، سیتوپلاسم کشیده و جسم سلولی کوچک مشخص شده است.

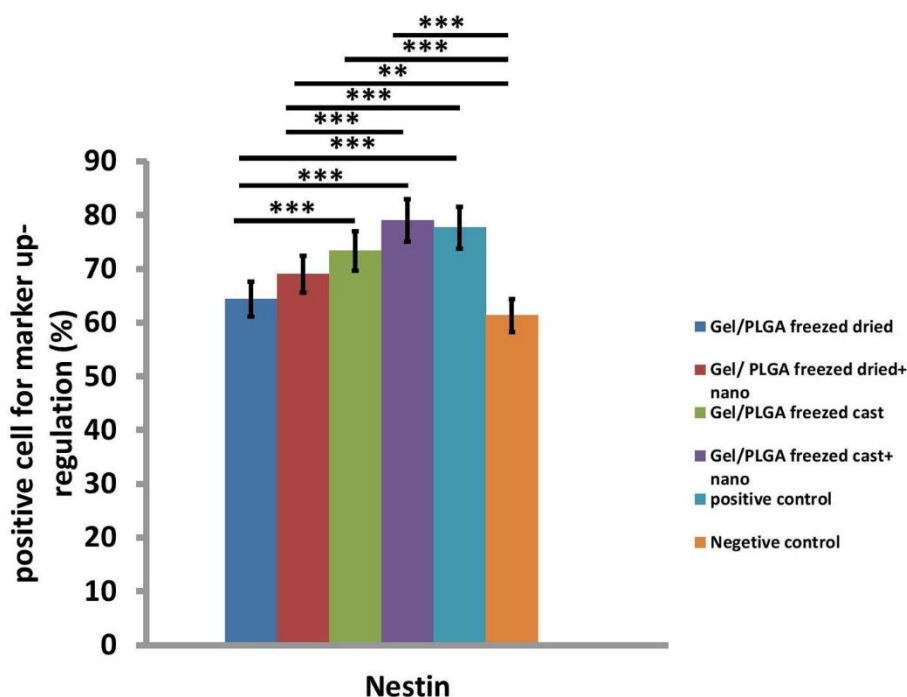


شکل ۳. نتایج ایمنوهیستوشیمی سلول های نورونی مشتق شده از سلول های بنیادی مغز استخوان بر روی داربست خشک انجمادی و ریخته گری انجمادی همراه با نانوذرات آهن. آنالیز ایمنوهیستوشیمی نشان می دهد که مارکر نورونی Nestin بعد از ۲۰ روز القاء در تمامی گروه ها (به جز کنترل منفی) بیان شدند.

جدول ۲. میانگین و انحراف معیار ایمنوهیستوشیمی سلول های نورونی مشتق شده از سلول های بنیادی مغز استخوان بر روی داربست خشک انجمادی و ریخته گری انجمادی همراه با نانوذرات آهن ( M: Mean و SD: Std. Deviation)

Negative control		Positive control		Gel/PLGA freezed cast+nano		Gel/PLGA freezed cast		Gel/PLGA freezed drier+nano		Gel/PLGA freezed dried		گروهها
SD	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD	M	
۱/۵۲۸	۶۱/۳۳	۱/۵۲۸	۷۷/۶۷	۱/۰۰۰	۷۹/۰۰	۱/۵۲۸	۷۳/۳۳	۲/۰۰۰	۶۹/۰۰	۲/۰۸۲	۶۴/۳۳	Nestin زن





نمودار ۲. ارزیابی کمی نتایج ایمنوهیستوشیمی سلول های نورونی مشتق شده از سلول های بنیادی مغز استخوان بر روی داربست خشک انجمادی و ریخته گری انجمادی همراه با نانوذرات آهن. نتایج نشان می دهد که بیان مارکر نستین در داربست ریخته گری انجمادی ژلاتین/PLGA حاوی نانوذرات آهن (Gel/PLGA freezed cast+nano) در مقایسه با سایر داربست ها بیشتر می باشد. داده ها به صورت میانگین (Mean±SD) گزارش گردید (\*\*\*)  $p < 0.001$ .

## بحث

تمایز سلول های BMMSCs گردید. این مطالعه اهمیت نانو ذرات آهن (MNPs) در تمایز سلول های BMMSCs را به سلول های عصبی را نشان می دهد (۲۱). پیشنهاد می شود داربست های ژلاتین/PLGA همراه با نانو ذرات آهن (MNPs) برای درمان آسیب های محیطی عصبی و جبران کاهش سلول های عصبی بکار رود. البته این یافته ها باید توسط نتایج آزمایش های حیوانی نیز مورد تایید قرار گیرد. تعدادی از محققین به تمایز سلول های بنیادین مزانشیمی به انواع بافت های مختلف و حفظ ویژگی های اختصاصی این سلول ها بعد از نگهداری با روش انجمادی اشاره کرده اند. به طوریکه هنگامی که در مدل های حیوانی سلول های بنیادین بر روی داربست ها قرار گیرند به بافت های استخوان مانند تمایز یافته اند و در هنگام انجام پیوند های بافتی در انسان موجب ترمیم بافتی شده اند (۲۲). کشت سلول های BMMSCs بر روی ساختار هایی که تحت تاثیر میدان های مغناطیسی قرار دارند نقش حمایتی نانو ذرات آهن را در یک ماتریکس هیبریدی جهت گسترش و مهاجرت سلولی نشان می دهد. در

مشاهدات تحقیق حاضر نشان داد که تیمار با نانوذرات آهن دارای تاثیر زیادی بر روی رشد و میزان بقای سلول های BMMSCs داشت. داربست های ژلاتین/PLGA که در مطالعه حاضر بررسی شد دارای نانو ذرات آهن (MNPs) بود. مشاهده تصاویر میکروگراف الکترونی SEM، وجود منافذ به هم پیوسته در داربست های فریز کست باعث افزایش و گسترش ماتریکس خارج سلولی می شود که به نوبه خود میتواند موجب چسبندگی سلول های کشت شده در این داربست و همچنین مهاجرت سلول ها در نواحی مختلف داربست گردید. بر اساس یافته های تحقیق حاضر اضافه کردن نانو ذرات آهن (MNPs) به ماتریکس موجب پیدایش و گسترش منافذ یک سو به و دارای یک جهت گردید هرچند که موجب کاهش اندازه این منافذ نیز می شود. منافذ یک سو به یکنواخت باعث تخریب و جذب سلولی ماتریکس کشتی می شود. همچنین این منافذ شکل گرفته با نانو ذرات آهن (MNPs) موجب افزایش تکثیر و چسبندگی سلول ها و

داربست ها و یکنواخت و همگن بودن قطر و ابعاد منافذ و ساختمان جهت دار داربست های ریخته گری انجمادی می تواند در حفظ یکپارچگی داربست در زمان شکل گیری یک بافت جدید و حمایت و افزایش رفتار های سلولی برای تکثیر مهاجرت و تمایز موثر باشد (۲۶،۲۷). در تایید تحقیقات حاضر، یافته های Schemed و عده ای دیگر از محققین نشان می دهد که اگر سلول های عصبی تمایز یافته با داربست ها با جنس و مواد مناسب سنتز شوند مهندسی بافت می تواند روش جدیدی برای ترمیم سیستم عصبی باشد (۲۸). همچنین استفاده از نانوذرات مغناطیسی به همراه سلول، در مهندسی بافت می تواند باعث پیشرفت و توسعه انواع پیوند های عصبی در بیماری های مربوطه گردد (۲۹،۳۰).

### نتیجه گیری

داربست ریخته گری انجمادی ژلاتین/PLGA حاوی نانوذرات آهن می تواند انتخاب مناسبی برای تقویت، ترمیم و بازسازی در سیستم عصبی باشد.

### تشکر و قدردانی

نتایج تحقیق حاضر مصوب طرح تحقیقاتی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی البرز مصوب شماره ۲۴۲۷۶۲۶ است. بدین وسیله از مساعدت معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی البرز و مشارکت آقای دکتر علی زمانیان و خانم دکتر فرناز قربانی از پژوهشکده مواد و انرژی کرج تشکر و قدردانی می گردد.

### تعارض منافع

تعارض منافع وجود ندارد.

تحقیق حاضر میزان قطر هیدروداینامیک نانوذرات کاربردی حدود ۵۰ نانومتر بود. نتایج حاصل از میزان بقا سلولی، مشابه با تحقیقی است که توسط Sahu و همکاران انجام شد. میزان سمیت و سمیت ذرات نانویی معنی دار نبود و حتی تا روزهای بعد از تیمار، تعداد و میزان بقا سلول ها قابل مقایسه با گروه کنترل بود. قابل دسترس بودن، آسیب پذیری اندک و اختصاصی بودن ویژگی سلولی برای این نانوذرات این رهنمود را می دهد که در درمان آسیب های عصبی و یا بیماری های سیستمیک عصبی زمانی که سلولهای بنیادین همراه با یک داربست مناسب بکار روند، این ذرات نانو قادر به کمک برای شکل گیری یک بافت عصبی جدید در ناحیه می باشند (۲۳). Hyung-Mun و همکاران در تحقیقات خود اظهار داشتند که نتایج و آنالیز یافته های بافت شناسی و اسکن مجسمه موش های گروه آزمایشی نشان داد که استفاده و پیوند داربست های مغناطیسی برای آسیب های ایجاد شده در مجسمه به صورت معنی داری موجب تشکیل بافت استخوانی جدید در طی ۶ هفته می شود. یافته ها نشان می دهد که کاربرد ترکیبی از داربست ها به عنوان یک روش و ابزار جدید می تواند در ترمیم های مهندسی شده بافت استخوان و یا دیگر بافتها مانند بافت عصبی کاربرد داشته باشند (۲۴،۲۵). ساختار مورد استفاده در داربست ها یکی از موارد و نکات بسیار مهمی است که در مهندسی بافت و کاربرد این پیوندها باید مورد توجه قرار گیرد. ساختار جهت دار میکرونی، یکنواختی و درصد مناسب اندازه منافذ داربست های ریخته گری انجمادی می تواند باعث ایجاد استحکام مناسب در داربست و ایجاد ویژگی های مناسب فیزیکی و شیمیایی در هنگام کشت سلول برای تکثیر، مهاجرت و تمایز سلولی باشد. بنابراین در مقایسه با مطالعات Führmann و همکاران منافذ به هم پیوسته

### منابع

1. Dinda SC, Pattnaik G. Nanobiotechnology-based drug delivery in brain targeting. Current Pharmaceutical Biotechnology 2013;14(15):1264-74. doi: 10.2174/1389201015666140608143719.
2. Lambert C, Cisternas P, Inestrosa NC. Role of Wnt Signaling in Central Nervous System Injury. Molecular Neurobiology

- 2016;53(4):2297-311. doi: 10.1007/s12035-015-9138-x.
3. Tam RY, Fuehrmann T, Mitrousis N, Shoichet MS. Regenerative therapies for central nervous system diseases: a biomaterials approach. *Neuropsychopharmacology* 2014;39(1):169-88. doi: 10.1038/npp.2013.237.
  4. Moroz A, Bittencourt RA, Almeida RP, Felisbino SL, Deffune E. Platelet lysate 3D scaffold supports mesenchymal stem cell chondrogenesis: an improved approach in cartilage tissue engineering. *Platelets* 2013;24(3):219-25. doi: 10.3109/09537104.2012.686255.
  5. Rodriguez J, Boucher F, Lequeux C, Josset-Lamaugarny A, Rouyer O, Ardisson O, et al. Intradermal injection of human adipose-derived stem cells accelerates skin wound healing in nude mice. *Stem Cell Research & Therapy* 2015;6:241. doi: 10.1186/s13287-015-0238-3.
  6. Santamaria X, Cabanillas S, Cervelló I, Arbona C, Raga F, Ferro J, et al. Autologous cell therapy with CD133+ bone marrow-derived stem cells for refractory Asherman's syndrome and endometrial atrophy: a pilot cohort study. *Human Reproduction* 2016;31(5):1087-96. doi: 10.1093/humrep/dew042.
  7. Wu R, Tang Y, Zang W, Wang Y, Li M, Du Y, et al. MicroRNA-128 regulates the differentiation of rat bone mesenchymal stem cells into neuron-like cells by Wnt signaling. *Molecular and Cellular Biochemistry* 2014;387(1-2):151-160. doi: 10.1007/s12035-014-2893-1.
  8. Yan F, Yue W, Zhang YL, Mao GC, Gao K, Zuo ZX, et al. Chitosan-collagen porous scaffold and bone marrow mesenchymal stem cell transplantation for ischemic stroke. *Neural Regeneration Research* 2015;10(9):1421-6. doi: 10.4103/1673-5374.163466.
  9. Dulski M, Peszke J, Wodarczyk J, Suowicz S, Piotrowska-Seget Z, Dudek K, et al. Physicochemical and structural features of heat treated silver-silica nanocomposite and their impact on biological properties. *Materials Science & Engineering. C, Materials for Biological Applications* 2019;103:109790. doi: 10.1016/j.msec.2019.109790.
  10. Phillips JB, Bunting SC, Hall SM, Brown RA. Neural tissue engineering: a self-organizing collagen guidance conduit. *Tissue Engineering* 2005;11(9-10):1611-7. doi: 10.1089/ten.2005.11.1611.
  11. Lee JY, Bashur CA, Goldstein AS, Schmidt CE. Biomaterials. Polypyrrole-coated electrospun PLGA nanofibers for neural tissue applications. *Biomaterials* 2009;30(26):4325-35. doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.04.042.
  12. Ebrahimi-Barough S, Norouzi Javidan A, Saberi H, Joghataei MT, Rahbarghazi R, Mirzaei E, et al. Evaluation of Motor Neuron-Like Cell Differentiation of hEnSCs on Biodegradable PLGA Nanofiber Scaffolds. *Molecular Neurobiology* 2015;52(3):1704-1713. doi: 10.1007/s12035-014-8931-2.

13. DiBartola AC, Everhart JS, Magnussen RA, Carey JL, Brophy RH, Schmitt LC, et al. Correlation between histological outcome and surgical cartilage repair technique in the knee: A meta-analysis. *Knee* 2016;23(3):344-9. doi: 10.1016/j.knee.2016.01.017
14. Tsai MJ, Tsai YH, Kuo YM. Characterization of the pattern of ischemic stroke induced by artificial particle embolization in the rat brain. *Biomaterials* 2011;32(27):6381-8. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.05.051
15. Orr MB, Gensel JC. Spinal Cord Injury Scarring and Inflammation: Therapies Targeting Glial and Inflammatory Responses. *Neurotherapeutics* 2018;15(3):541-553. doi: 10.1007/s13311-018-0631-6
16. Tonietto L, Vasquez AF, Dos Santos LA, Weber JB. Histological and structural evaluation of growth hormone and PLGA incorporation in macroporous scaffold of  $\alpha$ -tricalcium phosphate cement. *Journal of Biomaterials Applications* 2019;33(6):866-875. doi: 10.1177/0885328218812173
17. Nooris M, Aparna D, Radha S. Synthesis and characterization of  $MFe_2O_4$  (M = Co, Ni, Mn) magnetic nanoparticles for modulation of angiogenesis in chick chorioallantoic membrane (CAM). *European Biophysics Journal* 2016;45(2):139-48. doi: 10.1007/s00249-015-1083-0
18. Kapat K, Srivas PK, Rameshbabu AP, Maity PP, Jana S, Dutta J, et al. Influence of Porosity and Pore-Size Distribution in Ti6Al4 V Foam on Physicomechanical Properties, Osteogenesis, and Quantitative Validation of Bone Ingrowth by Micro-Computed Tomography. *ACS Applied Materials & Interfaces* 2017;9(45):39235-39248. doi: 10.1021/acsami.7b13960
19. Araque-Monrós MC, García-Cruz DM, Escobar-Ivirico JL, Gil-Santos L, Monleón-Pradas M, Más-Estellés J. Regenerative and Resorbable PLA/HA Hybrid Construct for Tendon/Ligament Tissue Engineering. *Annals of Biomedical Engineering* 2020;48(2):757-767. doi: 10.1007/s10439-019-02403-0
20. Wang Y, Wakisaka M. Chitosan nanofibers fabricated by combined ultrasonic atomization and freeze casting. *Carbohydrate Polymers* 2015;122:18-25. doi: 10.1016/j.carbpol.2014.12.080
21. Deville S, Saiz E, Tomsia AP. Freeze casting of hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2006;27(32):5480-9. doi: 10.1016/j.biomaterials.2006.06.028
22. La Noce M, Paino F, Spina A, Naddeo P, Montella R, Desiderio V, et al. Dental pulp stem cells: state of the art and suggestions for a true translation of research into therapy. *Journal of Dentistry* 2014;42(7):761-8. doi: 10.1016/j.jdent.2014.02.018
23. Sahu D, Kannan GM, Vijayaraghavan R. Carbon black particle exhibits size dependent toxicity in human monocytes. *International Journal of Inflammation* 2014;2014:827019. doi: 10.1155/2014/827019

24. Yun HM, Lee ES, Kim MJ, Kim JJ, Lee JH, Lee HH, et al. Magnetic Nanocomposite Scaffold-Induced Stimulation of Migration and Odontogenesis of Human Dental Pulp Cells through Integrin Signaling Pathways. *PLoS One* 2015;10(9):e0138614. doi: 10.1371/journal.pone.0138614.
25. Yun HM, Ahn SJ, Park KR, Kim MJ, Kim JJ, Jin GZ, et al. Magnetic nanocomposite scaffolds combined with static magnetic field in the stimulation of osteoblastic differentiation and bone formation. *Biomaterials* 2016;85:88-98. doi: 10.1016/j.biomaterials.2016.01.035.
26. Führmann T, Anandakumaran PN, Shoichet MS. Combinatorial Therapies After Spinal Cord Injury: How Can Biomaterials Help?. *Advanced Healthcare Materials* 2017;6(10). doi: 10.1002/adhm.201601130.
27. Tam RY, Smith LJ, Shoichet MS. Engineering Cellular Microenvironments with Photo- and Enzymatically Responsive Hydrogels: Toward Biomimetic 3D Cell Culture Models. *Accounts of Chemical Research* 2017;50(4):703-713. doi: 10.1021/acs.accounts.6b00543.
28. Schmidt CE, Leach JB. Neural tissue engineering: strategies for repair and regeneration. *Annual Review of Biomedical Engineering* 2003;5:293-347. doi: 10.1146/annurev.bioeng.5.011303.120731.
29. Liu B, Cai SX, Ma KW, Xu ZL, Dai XZ, Yang L, et al. Fabrication of a PLGA-collagen peripheral nerve scaffold and investigation of its sustained release property in vitro. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 2008;19(3):1127-32. doi: 10.1007/s10856-007-3224-1.
30. Qi Y, Feng G, Huang Z, Yan W. The application of super paramagnetic iron oxide-labeled mesenchymal stem cells in cell-based therapy. *Molecular Biology Reports* 2013;40(3):2733-40. doi: 10.1007/s11033-012-2364-7.