مقاله پژوهشی
یافته‌های نوین در علوم زیستی
جلد ۸، شماره ۴، صفحات ۲۶۵ الی ۲۷۸ (۱۴۰۰)
انتشارات دانشگاه خوارزمی

Research Article
Nova Biologica Reperta 8(4): 265-278 (2022)
Print ISSN: 2423-6330/Online ISSN: 2476-7115
https://nbr.khu.ac.ir; Kharazmi University Press; DOI: 10.29252/nbr.8.4.265

اثر اگزوزوم‌های مشتق از مایع مغزی نخاعی بر تمایز عصبی سلول‌های بنیادی مزانشیمی چربی در داربست هیدروژل آلژینات

مجتبی چروی[۱]، جواد بهارآرا[۲]، پریچهره یغمایی[۱] و نسیم حیاتی رودباری[۱]

[۱]گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران؛ [۲]گروه زیست شناسی و مرکز تحقیقات بیولوژی کاربردی تکوین جانوری، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران

مسئول مکاتبات: جواد بهارآرا، baharara@mshdiau.ac.ir

چکیده. امروزه محققین تلاش‌های گسترده‌ای جهت یافتن روش‌های نوین درمانی برای آسیب‌های عصبی انجام داده‌اند. در این بین نقش اگزوزوم‌ها در زمینه ارتباطات سلول – سلول به عنوان مکانیسمی نوین قلمداد می‌شود. اگزوزوم‌ها می‌توانند به عنوان عامل تمایزی مناسب عمل کنند. هدف از این پژوهش، بررسی اثر تمایزی اگزوزوم‌های مشتق از مایع مغزی نخاعی بر سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی در هیدروژل آلژینات است. در این مطالعه اگزوزوم‌ها به روش اولتراسانتریفوژ از مایع مغزی نخاعی استخراج شده و توسط میکروسکوپ اتمی، میکروسکوپ SEM و تکنیک DLS شناسایی شد. همچنین سلول‌های بنیادی چربی قرار گرفته در هیدروژل آلژینات تحت تیمار با غلظت‌های مختلف اگزوزوم قرار گرفت. بقای سلول‌ها توسط روش‌های MTT و اکردین اورنج اتدیوم بروماید مورد ارزیابی قرار گرفت. بررسی فرایند تمایز سلول‌ها نیز توسط تکنیک ایمنوسیتوشیمی و Real Time – PCR انجام شد. بررسی هویت اگزوزوم‌ها وجود اگزوزوم‌ها با اندازه تقریبی ۷۰ نانومتر را تایید کرد. نتایج بقا سلول‌ها نشان دهنده قابلیت بقا و تکثیر سلول‌ها در طی ۱۴ روز است. همچنین بیان پروتئین‌های MAP2 (پروتئینی همراه با میکروتوبول‌ها) و Nestin (پروتئین فیلامنت بینابینی) با استفاده از روش ایمنوسیتوشیمی مورد تایید قرار گرفت. نتایج حاصل از Real Time – PCR نشان داد سطح بیان ژن MAP2 در طی روز هفتم و چهاردم افزایش و بیان ژن Nestin در مقایسه با گروه کنترل کاهش معنی داری را نشان می‌دهد. این مطالعه نشان داد اگزوزوم‌های استخراج شده از مایع مغزی نخاعی می‌توانند سبب تمایز عصبی سلول‌های بنیادی مزانشیمی چربی در داربست‌های هیدروژلی آلژینات شود.

واژه‌های کلیدی. اولتراسانتریفوژ، ایمنوسیتوشیمی، هیدروژل، مهندسی بافت، وزیکول‌های برون سلولی

The effect of cerebrospinal fluid-derived exosomes on neural differentiation of adipose mesenchymal stem cells in alginate hydrogel scaffold

Mojtaba Cheravi[1], Javad Baharara[2], Parichehreh Yaghmaei[1] & Nasim Hayati Roudbari[1]

[1] Department of Biology, faculty of science, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran; [2] Department of Biology and Research Center for Animal Development Applied Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran

Corresponding author: Javad Baharara, baharara@mshdiau.ac.ir

Abstract. Nowadays, researchers have made extensive efforts to find new treatments for nerve damage. Meanwhile, the role of exosomes in cell-cell communication is considered to be a new mechanism. Exosomes can act as suitable differentiating agents. The aim of this study was to investigate the differentiating effect of cerebrospinal fluid-derived exosomes on adipose mesenchymal stem cells in alginate hydrogel. Exosomes were extracted from the cerebrospinal fluid by ultracentrifugation and were then identified by atomic force microscopy (AFM), SEM and DLS technique. In addition, Adipose Mesenchymal Stem cells in alginate hydrogel were treated with different concentrations of exosomes. Cell survival was assessed by MTT and *Acridine Orange/Ethidium* Bromide methods. Cell differentiation was processed by immunocytochemistry and Real-Time PCR. Examinations confirmed the presence of exosomes with an approximate size

Received 28.06.2021/ Revised 11.09.2021/ Accepted 22.04.2019/ Published 20.01.2022
دریافت: ۱۴۰۰/۰۴/۰۷/ اصلاح: ۱۴۰۰/۰۶/۲۰/ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۷/۰۱/ انتشار: ۱۴۰۰/۱۰/۳۰

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2026-11-04]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1400.8.4.4.9]
[DOI: 10.52547/nbr.8.4.265]

of 70 nm. Cell survival results indicate that he ability of cells to survive and proliferate during 14 days. Also, the expression of MAP2 proteins (microtubule-associated protein 2) and Nestin (intermediate filament protein) was confirmed by immunocytochemistry. The results of Real Time - PCR showed that during the seventh and fourteenth days the expression level of MAP2 gene increased and the expression of Nestin gene showed a significant decrease compared to the control group. This study showed that exosomes extracted from cerebrospinal fluid can cause neuronal differentiation of Adipose mesenchymal stem cells in alginate hydrogel scaffolds.

Key words. extracellular vesicles, hydrogel, immunocytochemistry, tissue engineering, ultracentrifugation

مقدمه

اگزوزوم‌ها وزیکول‌های کوچک مشتق از اجسام چند وزیکولی هستند که توسط بسیاری از سلول‌ها به محیط خارج از سلول ترشح شده و از این طریق در ارتباط بین سلولی از طریق انتقال اطلاعات ژنتیکی نظیر RNAهای کدکننده و غیر کدکننده به سلول‌های هدف و تعیین سرنوشت آن‌ها مشارکت دارند (Hamzah et al., 2021). اگزوزوم‌ها دارای ویژگی‌های ساختاری و ظاهری می‌باشند و می‌توان آنها را ذراتی کروی شکل با دو لایه لیپیدی نامید که اندازه‌ای بین ۳۰ الی ۱۰۰ نانومتر دارند (Mathew et al., 2021). در سیستم عصبی، این اگزوزوم‌ها رشد عصبی را هدایت می‌کنند، ارتباطات عصبی را کنترل می‌کنند و به ترمیم اعصاب محیطی کمک می‌کنند. اگزوزوم‌ها به واسطه تعاملات بین نورون‌ها و سلول‌های پشتیبان در رشد و زنده ماندن نورون‌ها نقش دارند (Lizarraga-Valderrama & Sheridan, 2021). یکی از منابع مهم اگزوزوم‌های عصبی مایع مغزی نخاعی (CSF) است که هم در نوع بالغ و هم در نوع جنینی یافت می‌شود (Guha et al., 2019). مایع مغزی نخاعی، مایعی است شفاف و بی رنگ، که در بطن‌های مغزی تولید شده و کل سیستم عصبی مرکزی یعنی مغز و نخاع را احاطه کرده، و محافظت مکانیکی و ایمونولوژیکی مغز را بر عهده دارد (Farivar et al., 2015). امروزه با افزایش بیماری‌های مخرب سیستم عصبی پژوهشگران حوزه مهندسی بافت در صدد ساخت جایگزین‌های زیستی هستند که عملکرد بافت عصبی را ترمیم یا بهبود بخشد. هدف اصلی در مهندسی بافت بازسازی و یا تولید بافت یا اندام سالم برای جایگزینی بافت‌های ناسالم و یا ترمیم بافت‌های آسیب دیده یک بیمار است (Gu et al., 2014).

یک داربست ایده آل برای کابردهای مهندسی بافت باید ریز محیط بافت طبیعی را تقلید کند و ویژگی‌های توپوگرافی و بیوشیمیایی مناسب، همچنین فضایی را برای تکثیر و تمایز سلولی داشته باشد. هیدروژل‌ها یکی از انواع داربست‌ها هستند که شبکه‌های سه بعدی از پلیمرهای هیدروفیلیک با اتصالات عرضی ایجاد می‌کنند (Upadhyay, 2017). نفوذپذیری هیدروژل باعث انتشار مناسب اکسیژن، مواد غذایی و محرک‌های بیوشیمیایی محیط اطراف می‌شود. همچنین سختی قابل کنترل خود هیدروژل نوعی محرک فیزیکی است. فرایندهای سلولی مختلف مثل تکثیر، تمایز و مهاجرت تحت تاثیر هر دو نوع محرک شیمیایی و فیزیکی هستند (Cavo et al., 2016). آلژینات پلی ساکاریدی متشکل از واحدهای مانورونیک اسید و گلوکورونیک اسید است که از جلبک‌های قهوه ای به دست می‌آید شبکه سه بعدی هیدراته آن به سلول‌ها اجازه چسبیدن، پراکنش، مهاجرت و برهم کنش با سایر سلول‌ها را می‌دهد. این مزیت‌ها باعث شده است که این هیدروژل گزینه بسیار مناسبی جهت کشت و تمایز سلول‌ها در محیط سه بعدی باشد (Capeling et al., 2019). سلول بنیادی به سلولی گفته می‌شود که دارای دو ویژگی اساسی توانایی خودنوزایی و توانایی تمایز به انواع سلول‌های دیگر باشد. می‌توان سلول‌های بنیادی را بر اساس منبع جداسازی در کلی ترین شکل دسته بندی، به دو گروه سلول‌های بنیادی بالغ و سلول‌های بنیادی با منشاء جنینی، تقسیم نمود. بافت چربی منبعی در دسترس و غنی از سلول‌های بنیادی است. انسان مقادیر زیادی چربی زیر پوستی دارد که از طریق لیپوساکشن قابل برداشت است. سلول‌های بنیادی مزانشیمی بافت چربی از نظر ریخت شناسی، بیان نشانگرهای اختصاصی، رفتار سلولی در محیط کشت و ویژگی‌های تمایزی تشابه زیادی با سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان دارند (Forcales, 2015). با این حال سلول‌های بنیادی مزانشیمی بافت چربی از تراکم بالاتر و قدرت تکثیر بیشتری در قیاس با سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان برخوردارند که سبب می‌شود برای گسترش در محیط کشت به تعداد سلول اولیه بسیار کمتری نسبت به سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان نیاز باشد (Scioli et al., 2014). در سال‌های اخیر با گسترش علم بین رشته‌ای مهندسی بافت که تلفیقی از به‌کارگیری روش‌های سلولی، مهندسی و علم مواد در ساخت بافت‌های زنده است، روزنه‌ی امیدی برای درمان و ترمیم ضایعات بافتی و نقص عضو پدید آمده است. استفاده از سلول‌های بنیادی و داربست‌ها با ساختاری شبیه به ماتریکس خارج سلولی طبیعی، انتخاب مناسبی برای مهندسی بافت عصبی هستند. هدف از این

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2026-11-04]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1400.8.4.4.9]
[DOI: 10.52547/nbr.8.4.265]

پژوهش این است که با تلفیقی از روش‌های موفق انجام شده در این زمینه بتوانیم تا حدودی تمایز سلول‌های بنیادی را به سلول‌های شبه عصبی انجام دهیم. همچنین هدف دیگری که در این پژوهش مورد توجه قرار گرفته این است که روش‌های مورد استفاده و مواد به کار برده شده به لحاظ دسترسی و هزینه مطلوب باشد تا در صورت لزوم بتوان به صورت کاربردی هم از آن استفاده کرد.

مواد و روش‌ها

استخراج اگزوزوم‌ها از مایع مغزی نخاعی

مایع مغزی نخاعی از افراد جوانی به دست آمد که جهت آزمایشات خود مراجعه کرده بودند. جمع آوری این نمونه‌ها از تعدادی از افراد سالم و پس از اخذ رضایت نامه از آن‌ها انجام شد. نمونه‌های جمع آوری شده مایع مغزی نخاعی پس از انتقال به آزمایشگاه در دمای ۸۰- نگهداری شد. پس از انجماد زدایی مایع مغزی نخاعی، CSF به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۵۰۰۰ در دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتریفوژ (SIGMA 3-30K) شد تا سلول‌های مرده و قطعات بزرگ غشایی حذف شوند. سپس به منظور رسوب دادن اگزوزوم‌ها به مدت ۶۰ دقیقه با دور ۱۰۰۰۰۰ در دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتریفوژ (VS-30000i) شد. بعد از آن رسوب اگزوزومی در PBS حل شده و به منظور حذف آلودگی‌های پروتئینی، سوسپانسیون اگزوزومی به طور مجدد با دور ۱۰۰۰۰۰ در مدت ۶۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. در نهایت رسوب اگزوزومی در PBS حل شده و در دمای ۲۰- نگهداری شد (Stuendl et al., 2016).

بررسی اگزوزوم‌های جداسازی شده توسط سنجش DLS

پراکندگی نور دینامیکی (DLS) روشی فیزیکی است که برای تعیین توزیع ذرات موجود در محلول‌ها و سوسپانسیون استفاده می‌شود. این روش غیر مخرب و سریع برای تعیین اندازه ذرات در محدوده چند نانومتر تا میکرون به کار می‌رود. این روش به برهمکنش نور با ذره بستگی دارد. نور پراکنده شده بوسیله نانوذرات موجود در سوسپانسیون با زمان تغییر می‌کند که می‌تواند به قطر ذره ارتباط داده شود. اندازه اگزوزوم‌ها توسط بررسی DLS توسط دستگاه Horiba- SZ-100-Z انجام شد (Takeda & Xu, 2015).

بررسی اگزوزوم‌های جداسازی شده توسط میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM)

اگزوزوم‌ها ذراتی کروی شکل با دو لایه لیپیدی هستند که اندازه‌ای بین ۳۰ الی ۱۰۰ نانومتر دارند اندازه و شکل ظاهری اگزوزوم‌ها توسط بررسی SEM ارزیابی شد. به منظور بررسی شکل و اندازه، اگزوزوم‌های تخلیص شده توسط گلوتارآلدهید ۲/۵ درصد تثبیت و با PBS شستشو شده و سپس نمونه توسط اتانول آبگیری شده و روی سطح شیشه‌ای خشک با لایه نازکی از طلا پوشانده شد و توسط میکروسکوپ TESCANBRNO- Mira3 LMU بررسی شد (Zhou et al., 2016).

بررسی اگزوزوم‌های جداسازی شده توسط میکروسکوپ نیروی اتمی (AFM)

میکروسکوپ نیروی اتمی دستگاهی است که برای بررسی خواص و ساختار سطحی مواد که در ابعاد نانومتر به کار می رود. جهت آماده سازی نمونه برای میکروسکوپ نیروی اتمی توسط دستگاه JPK-NanoWizard II، اگزوزوم‌های استخراج شده در آب دیونیزه رقیق شده سپس به مدت ۲ دقیقه بر روی ورقه‌های میکا قرار گرفته و تسط جریان ملایم هوا خشک شدند تصاویر با سرعت ۱ هرتز اسکن و توسط نرم افزار JPK پردازش شد (Zlotogorski et al., 2015).

تعیین غلظت اگزوزوم‌ها

سنجش پروتئین به روش BCA روشی است که برای اندازه‌گیری مقدار پروتئین در یک نمونه استفاده می‌شود. اصول روش بدین صورت است که پروتیین می‌تواند در یک محیط قلیایی Cu^{+2} را به Cu^{+1} احیا کند (واکنش بیوره) و در حضور bicinchoninic acid منجر به تولید رنگ ارغوانی شود. رنگ ارغوانی حاصل از کمپلکس Cu^{+1}-BCA در طول موج ۵۶۰ نانومتردارای جذب است. با استفاده از یک گراف استاندارد که همزمان با آزمایش تهیه می‌شود، می‌توان با توجه به میزان جذب قرائت شده مقدار پروتئین یک محلول را گزارش کرد (Martins et al., 2018).

جداسازی سلول‌های بنیادی از بافت چربی

برای انجام این مطالعه، پس از تکمیل فرم رضایت از بیمار جوان، مقداری بافت چربی زیر جلدی تهیه و به آزمایشگاه منتقل شد. بافت چربی بلافاصله پس از عمل جراحی در ظروف حاوی PBS به آزمایشگاه انتقال داده شد. نمونه بافت چربی در آزمایشگاه و در زیر هود لامینار پس از چندبار شستشو با PBS حاوی پنسیلین و استرپتومایسین، عروق خونی آن جدا شده سپس بافت چربی توسط تیغ اسکالپل قطعه قطعه شد. سلول‌های جدا شده از بافت چربی پس از وزن شدن به فالکون‌های استریل ۵۰ میلی لیتر منتقل و آنزیم کلاژناز I با غلظت ۰/۷۵ درصد به آن اضافه گردید پس از مخلوط کردن آنزیم با چربی، فالکون به مدت ۳۰ دقیقه در انکوباتور قرار داده شد. بعد از مرحله تجزیه آنزیمی به اندازه حجم آنزیم محیط کشت به فالکون حاوی چربی جهت خنثی کردن آنزیم اضافه شد و سپس به مدت ۵ دقیقه با دور ۱۶۰۰ rpm سانتریفیوژ شد. محیط روی سلول‌ها به آرامی برداشته و دور ریخته شد محلول

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2026-11-04]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1400.8.4.4.9]
[DOI: 10.52547/nbr.8.4.265]

قسمت پایین لوله که حاوی سلول‌های ته نشین شده چربی است نگه داشته شد. سلول‌ها به داخل فلاسک کشت سلول حاوی DMEM (BIO-IDEA, BI-1003) با ۱۰ درصد سرم جنینی گاوی FBS (Gibco, 10272) و ۱ درصد آنتی بیوتیک پنسیلین و استرپتومایسین (Sigma, USA) منتقل شدند و در نهایت فلاسک حاوی سلول داخل انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد و CO_2 ۵ درصد قرار داده شد. بعد از جداسازی سلول‌های بنیادی هر چهار روز یک بار تعویض محیط انجام گرفت. بدین منظور محلول رویی فلاسک دور ریخته شده و سپس محیط کشت تازه به فلاسک کشت اضافه شد. بعد از این که با تعویض منظم محیط‌های کشت، سلول‌ها به مرحله تراکم رسیدند به منظور انتقال سلول‌ها به فلاسک بزرگ تر، پاساژ سلولی انجام شد بدین منظور محیط کشت سلول‌ها تخلیه شد و سلول‌ها توسط PBS سه مرتبه شسته شدند، سپس با استفاده از محلول تریپسین ۰/۴ درصد سلول‌ها از کف فلاسک جدا شدند. سلول‌های کنده شده از کف ظرف کشت توسط پیپت شیشه‌ای استریل پیپتاژ شدند و سلول‌ها از همدیگر جدا شدند و سوسپانسیون سلولی یکنواخت به دست آمد. سپس ۰/۵ سی‌سی FBS به این سوسپانسیون افزوده شد تا اثر تریپسین خنثی گردد. بعد از این مرحله سوسپانسیون حاوی سلول به لوله فالکون ۱۵ سی‌سی منتقل شد و با دور ۱۵۰۰، به مدت پنج دقیقه سانتریفیوژ گردید. پس از دور ریختن محلول رویی مجددا FBS افزوده شد و سپس پیپتاژ گردید. پس از آن سوسپانسیون سلولی در دو فلاسک کوچک ریخته شد محیط کشت حاوی ۱۰ درصد FBS اضافه شد و فلاسک‌ها به انکوباتور منتقل شد. سلول‌ها بعد از پاساژ سوم به جمعیت یک دست رسیدند و برای ادامه تحقیقات استفاده شدند (Lin et al., 2017).

تهیه داربست‌های آلژینات همراه با سلول‌های بنیادی مزانشیمی چربی

محلول آلژینات با ۳ درصد وزنی با استفاده از پودر آلژینات (W201502-100G, SIGMA-ALDRICH, USA) و محیط کشت DMEM در زیر هود و شرایط استریل با هم مخلوط شده و به آرامی هم زده شد. بعد از آن توسط دستگاه‌هات پلیت مگنت به مدت ۲ ساعت مخلوط شده تا محلولی یکنواخت به دست آید. سپس محلول مورد نظر به مدت ۲۴ ساعت در دمای آزمایشگاه باقی ماند تا حباب‌های ایجاد شده در آن از بین برود. جهت تهیه مهره‌های آلژینات به عنوان داربست‌های سه بعدی برای کشت سلول‌های مزانشیمی، پس از شمارش سلولی و بعد از آن که جدا سازی سلول‌های بنیادی چربی از محیط کشت توسط تریپسین انجام شد، سلول‌ها به فالکون ۱۵ سی‌سی انتقال یافته و با سانتریفیوژ با دور ۱۵۰۰ در مدت ۵ دقیقه آماده قرارگیری در هیدروژل شدند. سپس در شرایط استریل و در زیر هود سلول‌های بنیادی چربی به همراه هیدروژل مخلوط شده که به ازای هر میلی لیتر آلژینات، $۳/۵ \times ۱۰^{۶}$ سلول در نظر گرفته شد. هیدروژل آلژینات به همراه سلول‌های بنیادی چربی قرار گرفته در آن به سرنگ cc ۱۰ انتقال داده شد. محلول آلژینات همراه با سلول‌های بنیادی به وسیله سرنگ ۲۲ درجه در پلیت حاوی کلرید کلسیم ۲ درصد وزنی قطره گذاری شدند. بعد از ۵ دقیقه با PBS شستشو داده شد و بعد از اضافه شدن محیط کشت در انکوباتور گرفت (Rajmohan & Bellmer, 2019).

گروه‌های آزمون

گروه کنترل: سلول‌های بنیادی مزانشیمی چربی انکپسوله شده در هیدروژل آلژینات که در محیط کشت پایه قرار گرفتند. گروه تجربی اول و دوم: سلول‌های بنیادی مزانشیمی چربی که در هیدروژل آلژینات قرار گرفتند به مدت دو هفته تحت تیمار با اگزوزوم‌های استخراج شده از مایع مغزی نخاعی قرار گرفتند (غلظت‌های ۲۰ و ۴۰ میکروگرم بر میلی لیتر). هر دو روز در میان نیمی از محیط سلول‌ها برداشته و با محیط جدید اضافه گردید. محیط کشت (DMEM حاوی ۱۰ درصد FBS و ۱ درصد پنی سلین/ استرپتومایسین).

بررسی کیفی بقای سلول‌های بنیادی مزانشیمی چربی با استفاده از رنگ آکریدین اورنج/ اتیدیوم بروماید

این روش به منظور بررسی تغییرات هسته سلول‌ها صورت می گیرد. در این روش هسته سلول‌های سالم به رنگ سبز است، درحالی که هسته سلول‌های آپوپتوتیک اولیه به رنگ زرد تا نارنجی کمرنگ، هسته سلول‌هایی که دچار آپوپتوز ثانویه شده اند به رنگ نارنجی تیره و هسته سلول‌هایی که دچار نکروز شده اند به رنگ قرمز تبدیل میشود بنابراین از این روش به منظور تعیین نوع مرگ سلولی استفاده می شود. به منظور بررسی اثر اگزوزوم‌ها و داربست هیدروژلی بر روی سلول‌های بنیادی مزانشیمی چربی بر اساس پروتکل موجود سلول‌ها رنگ آمیزی و سپس توسط میکروسکوپ فلوروسنت بررسی و عکس برداری شدند. ابتدا یک محلول ذخیره با اضافه نمودن ۱۰۰ میکرولیتر آکریدین اورنج با غلظت (۱ میلی گرم/ ا میلی لیتر PBS) و ۱۰۰ میکرولیتر اتیدیوم بروماید با غلظت (۱ میلی گرم/ ۱ میلی لیتر PBS) داخل ۸۰۰ میکرولیتر PBS تهیه شد و سپس در دمای ۴ درجه سانتی گراد در یخچال نگهداری شد. در مرحله بعدی ابتدا محیط رویی سلول‌ها تخلیه و با PBS شستشو داده شد. ۱۰۰ میکرولیتر رنگ آکریدین اورنج/ اتیدیوم بروماید بر روی سلول‌ها

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2026-11-04]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1400.8.4.4.9]
[DOI: 10.52547/nbr.8.4.265]

ریخته شد و سریعا توسط میکروسکوپ فلورسنت (OLYMPUS) مشاهده گردید (Billiet et al., 2014).

آزمایش MTT جهت تعیین میزان بقای سلولی

به منظور بررسی تعداد سلول‌های زنده در مهره‌های آلژینات از آزمون ۳-(۴ و ۵-دی متیل تیازول-۲-ایل)-۲ و۵- دی فنیل تترازولیوم برومید استفاده شد. داربست‌ها به مدت ۱۴ روز در محیط DMEM در داخل پلیت در انکوباتور Co_2 دار با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شده و در فواصل زمانی مختلف (۱، ۷ و ۱۴) محیط کشت رویی برداشته شد و سپس محلول استوک MTT-10X با محیط کشت بدون فنول رد تا ۱۰ برابر رقیق شد و به میزان ۱۵۰ میکرولیتر بر روی هر ول ریخته شد و به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد و سپس محلول MTT از روی ول‌ها برداشته شد و بر روی هر ول ۱۰۰ میکرولیتر DMSO ریخته شد، بعد از تبدیل کریستال‌های بنفش رنگ به فرم محلول در DMSOدر کمتر از ۱۰ دقیقه میزان جذب نور توسط دستگاه الایزاریدر و در طول موج ۵۷۰ نانومتر بررسی شد. میزان رشد سلول‌ها بر اساس میانگین جذب نور محاسبه گردید و نمودار آن رسم گردید (Razavi et al., 2014).

بررسی تمایز سلولی توسط تکنیک ایمونوسیتوشیمی

این آزمون به منظور بررسی بیان ژن‌های Nestin (پروتئین فیلامنت بینابینی که توسط سلول‌های پیش ساز عصبی بیان می‌شود) و MAP2 (پروتئینی که همراه با میکروتوبول‌ها است و نشانگر سلول‌های عصبی بالغ است) انجام شد.

محیط رویی سلول‌ها بعد از زمان‌های مقرر تخلیه شد. سپس داربست‌های آلژینات دو بار با بافر Trisشسته شد. در مرحله بعد نمونه‌ها توسط پارافرمالدهید ۴ درصد برای مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه فیکس شدند. پارافرمالدهید از روی نمونه‌ها حذف و با بافر مربوطه شسته شد. سپس به مدت ۳۰ دقیقه با Triton X- 100، نفوذپذیر شدند. بعد از حذف تریتون شستشو نمونه‌ها با بافر انجام شد. سپس به مدت یک ساعت با سرم بز ۱۰ درصد در دمای اتاق انکوبه گردیدند تا از واکنش‌های غیر اختصاصی جلوگیری شود. در ادامه، نمونه‌ها توسط آنتی‌بادی‌های اولیه Nestin (1:100) (Santa Cruz USA, sc-20978) و Map2 (1:100) (Santa Cruz USA sc-20172) به مدت یک شبانه روز در دمای ۴ درجه سانتیگراد انکوبه شدند. سپس شستشوی کامل با بافر انجام شد و با آنتی بادی ثانویه کونژوگه شده با Fluorescein isothiocyanate FITC با غلظت (۱:۵۰۰) به مدت ۲ ساعت انکوبه و سپس شستشو با بافر انجام شد. در مرحله بعد رنگ DAPI با غلظت (۱:۱۰۰۰) به مدت ۲ دقیقه جهت رنگ آمیزی هسته سلول‌ها اضافه شد. شستشو با بافر مربوطه انجام گرفت و سپس با میکروسکوپ فلورسنت (OLYMPUS) اینورت مشاهده شدند (Khosravizadeh et al., 2014).

بررسی بیان ژن توسط Real Time – PCR

استخراج RNA از نمونه‌های داربست آلژینات در روزهای ۷ و ۱۴ به منظور استفاده در Real Time – PCR انجام گرفت. در ابتدا جهت آزادسازی سلول‌های انکپسوله شده در هیدروژل آلژینات، داربست‌ها در محلولی شامل سیترات سدیم ۱۵ میلی مولار و کلرید سدیم ۱۵۰ میلی مولار قرار داده شد. در مرحله بعد با استفاده از کیت Rneasy Mini kit استخراج RNA از سلول‌ها مطابق دستورالعمل ارائه شده توسط شرکت QIAGEN انجام شد. به منظور آزاد سازی RNA، لیز سلولی با افزودن بافر lysis به رسوب سلولی و پپتیداژ آن صورت گرفت پس از قرار دادن ستون DNA-G کیت به منظور حذف DNA بر روی ویال ۲ میلی لیتری تمام محلول فوق بر روی ستون لود شد و به مدت ۲ دقیقه با دور ۸۰۰۰ سانتریفوژ شد. سپس به محلول اتانول ۷۰ درصد هم حجم با محلول عبور کرده از ستون اضافه گردید. پس از قرار دادن ستون free RNAse کیت بر روی ویال ۲ میلی لیتری تمام محلول فوق بر روی ستون لود شد و به مدت ۳۰ ثانیه با دور ۸۰۰۰ سانتریفوژ شد RNA پس از سانتریفوژ روی غشای ستون می‌ماند و مایع عبور می‌کند. پس از دور ریختن محلول عبور کرده از ستون و قرار دادن مجدد آن روی ویال یک دور سانتریفوژ صورت گرفت. سانتریفوژ ستون به مدت ۲ دقیقه با دور ۸۰۰۰ انجام شد. بدین ترتیب سنجش مقدار RNA و تعیین نسبت جذبی نمونه‌ها توسط دستگاه نانودراپ اندازه گیری شد. غلظت RNA استخراج شده با استفاده از دستگاه نانودراپ Wilmington تعیین گردید. پس از آن ۲۰۰ نانوگرم از RNA استخراج شده با استفاده از پرایمرهای الیگونوکلئوتیدی و کیت cDNA Synthesis Kit (Fermentas) نسخه‌برداری معکوس گردید. به منظور بررسی کمی افزایش نسخه‌های ژن مورد نظر از Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2x) و پرایمرهای اختصاصی ژن‌های عصبی استفاده شد. واکنش Real Time–PCR با استفاده از دستگاه Thermal Cycler T100 (Bio-Rad, Germany) انجام شد. در نهایت سطح بیا هر کدام از ژن‌های هدف با استفاده از روش ΔΔCT به دست آمد از GAPDH نیز به عنوان کنترل داخلی استفاده گردید و توسط نرم‌افزار Quantitation Relative Expression Gene محاسبه شد (Razavi et al., 2015).

تحلیل آماری

در این پژوهش داده‌ها توسط نرم افزار SPSS-22 و آزمون‌های آماری t-test در سطح معنی داری ۰/۰۵ تجزیه و تحلیل گردید.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2026-11-04]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1400.8.4.4.9]
[DOI: 10.52547/nbr.8.4.265]

نتایج

بررسی اگزوزوم‌های جداسازی شده توسط میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM)

اگزوزوم‌ها ذراتی کروی شکل با دو لایه لیپیدی هستند که اندازه‌ای بین ۳۰ الی ۱۰۰ نانومتر دارند اندازه و شکل ظاهری اگزوزوم‌ها توسط میکروسکوپ SEM ارزیابی شد و نتایج به گونه‌ای بود که نشان داد اگزوزوم‌های جداسازی شده دارای ظاهری با دامنه اندازه بهینه و شکل کروی هستند (شکل ۱).

بررسی اگزوزوم‌های جداسازی شده توسط سنجش DLS

اندازه اگزوزوم‌ها توسط بررسی DLS انجام شده و نتایج به گونه‌ای بود که نشان داد اگزوزوم‌های جداسازی شده دارای ظاهری با اندازه بهینه هستند (شکل ۲).

بررسی اگزوزوم‌های جداسازی شده توسط میکروسکوپ نیروی اتمی (AFM)

میکروسکوپ روبشی نیروی اتمی یک آنالیز سطحی بوده که به طور گسترده در زمینه توپوگرافی سطوح کاربرد دارد که مهمترین ویژگی آن توانایی بررسی سطح در مقایس نانومتر است. توپوگرافی اگزوزوم‌های استخراج شده از مایع مغزی نخاعی به وسیله میکروسکوپ نیروی اتمی اندازه‌گیری شد و نشان داده شد که اگزوزوم‌های جداسازی شده دارای اندازه‌ای بین ۳۰ الی ۱۰۰ نانومتر هستند (شکل ۳)

تعیین غلظت اگزوزوم‌ها

اندازه‌گیری غلظت اگزوزوم‌های استخراج شده با روش سنجش پروتئین به روش BCA انجام شد . بدین منظور ابتدا نمودار خطی حاصل از غلظت‌های متفاوت BCA توسط نرم افزار اکسل رسم شده و معادله خط برای آن محاسبه شد، با قرار دادن نمونه جذب اگزوزومی در معادله فوق غلظت اگزوزوم‌ها به‌دست آمد. که معادل ۱۳۳/۸ میکروگرم بر میلی لیتر بود.

بررسی مورفولوژی سلول‌ها

نتایج حاصل از کشت سلول‌های بنیادی مشتق از چربی نشان داد که این سلول‌ها ۴۸ ساعت پس از کشت اولیه توانایی اتصال به کف فلاسک را داشته و از نظر ریخت شناسی آرایش تک لایه‌ای و فیبروبلاست شکل دارند. نتایج حاصل از مشاهدات سلولی به منظور بررسی ریخت شناسی سلول با استفاده از میکروسکوپ فازکنتراست نشان داده شده است (شکل ۴).

ساخت هیدروژل آلژینات به همراه سلول‌های بنیادی مزانشیمی

مهره‌های آلژینات به همراه سلول‌های بنیادی مزانشیمی چربی که به روش قطره‌ای ساخته شدند درون محیط کشت قرار گرفتند. در ارتباط با سلول‌های قرار گرفته در هیدروژل آلژینات، این سلول‌ها به صورت گرد و بدون زائده داخل هیدروژل مشاهده شدند (شکل ۵).

بررسی کیفی بقاء سلول‌های بنیادی مزانشیمی چربی با استفاده از رنگ آکریدین‌اورنج / اتیدیوم بروماید

نتایج حاصل از بررسی کیفی بقا سلول‌ها در داربست‌های هیدروژلی چاپ شده ۱۴ روز پس از کشت اولیه نشان داد سلول‌های بنیادی مزانشیمی چربی موجود در داربست تا روز ۱۴ توان بقا خود را حفظ کرده‌اند. سلول‌های زنده به علت حضور رنگ آکریدین اورنج به رنگ سبز دیده شدند و سلول‌های مرده به خاطر وجود اتیدیوم بروماید به رنگ نارنجی مایل به قرمز رویت گردیدند (شکل۶).

آزمایش MTT جهت تعیین میزان تکثیر و بقای سلولی

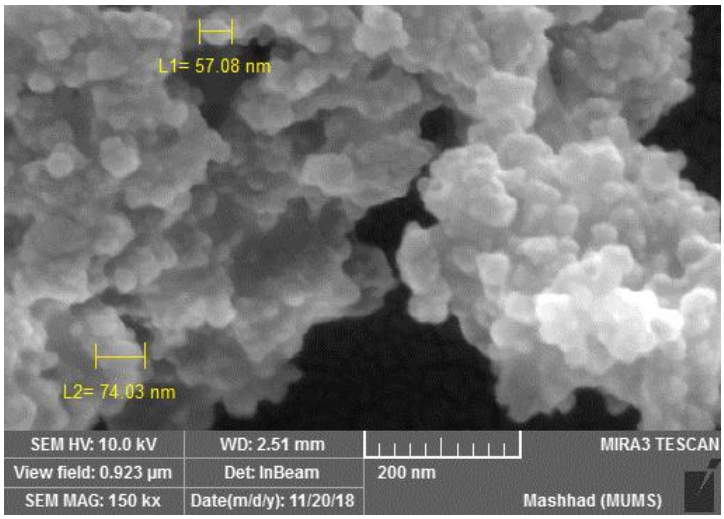
زیست سازگاری داربست‌ها از طریق آزمایش میزان فعالیت متابولیکی میتوکندریایی توسط روش MTT انجام شد. برای بررسی اثر سمیت داربست‌ها بر روی سلول‌های بنیادی چربی، این سلول‌ها به مدت ۱۴ روز با دو غلظت مختلف از اگزوزوم کشت داده شدند. سپس با کمک روش MTT، میزان بقاء سلول‌ها مورد سنجش قرار گرفت. نتایج به دست آمده نشان داد، تفاوت معنی داری بین میزان بقا گروه کنترل و گروه‌های تجربی مشاهده می‌شود. سلول‌های بنیادی چربی روی داربست‌های ساخته شده به خوبی رشد نموده‌اند. همچنین درصد زیست پذیری در روزهای هفتم و چهاردهم نسبت به روز اول، دارای تغییرات بیشتری است (شکل ۷).

بررسی ایمنوسیتوشیمی

جهت بررسی تمایز عصبی و تعیین میانگین درصد سلول‌های MAP2 (نشانگر نورون بالغ) و Nestin (نشانگر پیش ساز عصبی) مثبت در روزهای ۷ و ۱۴ این آزمایش انجام شد و سلول‌های تمایز یافته مورد ارزیابی قرار گرفتند (شکل ۸). در رابطه با Nestin در مقایسه تغییرات درصد سلول‌های مثبت گروه کنترل با گروه‌های تیمار شده در روز هفتم نتایج حاصل نشان می‌دهد که اختلاف معنی داری بین گروه تیمار شده با غلظت ۴۰ میکروگرم بر میلی لیتر و گروه کنترل مشاهده می‌شود. در روز چهاردهم سایر گروه‌ها با هم اختلاف معنی داری ندارند.

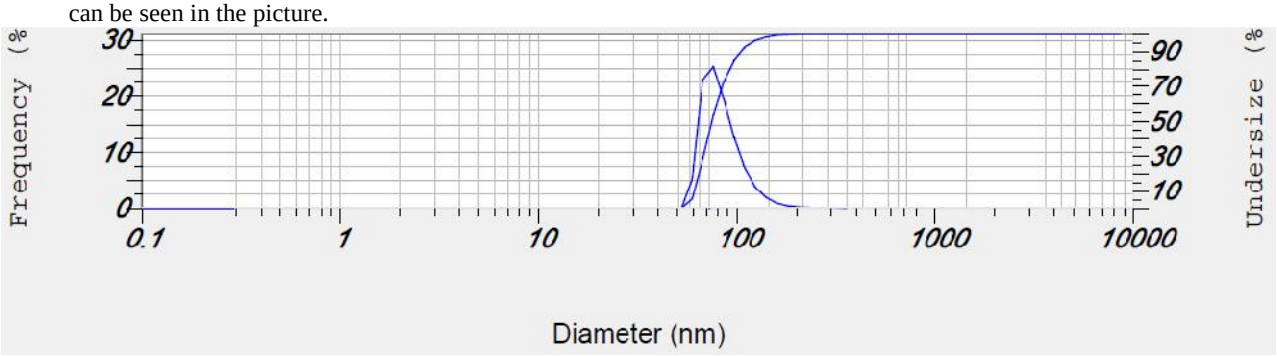
به علاوه در مورد MAP2 در مقایسه تغییرات درصد سلول‌های مثبت گروه کنترل با گروه‌های تیمار شده در روز هفتم نتایج نشان می‌دهد که اختلاف معنی داری بین گروه تیمار شده با غلظت ۴۰ میکروگرم بر میلی لیتر و گروه کنترل مشاهده می‌شود. همچنین در روز چهاردهم اختلاف معنی‌داری در میانگین تغییرات درصد سلول‌های مثبت گروه تیمار شده با غلظت ۲۰ میکروگرم بر میلی لیتر و گروه تیمار شده با غلظت ۴۰ میکروگرم بر میلی لیتر نسبت به گروه کنترل مشاهده می‌شود. این موارد نشان می‌دهند گروه تیمار با غلظت ۴۰ میکروگرم بر میلی لیتر باعث کاهش بیان Nestin

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2026-11-04]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1400.8.4.4.9]
[DOI: 10.52547/nbr.8.4.265]



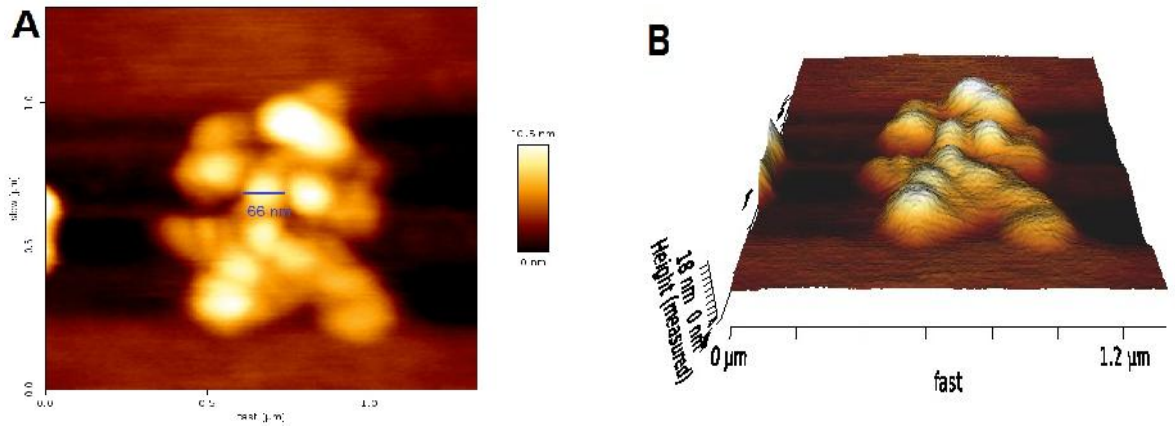
شکل ۱- تصویر به دست آمده با میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) . اندازه اگزوزوم‌ها بین ۳۰ تا ۱۰۰ نانومتر تایید شده است. و همچنین کروی بودن آن‌ها در تصویر دیده می‌شود.

Figure 1. Scanning electron microscopy (SEM) image. Exosomes range from 40 to 100 nm in size, as their sphericity can be seen in the picture.



شکل ۲- سنجش اندازه اگزوزوم توسط DLS. قطر ذرات بین ۳۰ تا ۱۰۰ نانومتر بوده و پیک ذرات در ۷۰ نانومتر مشاهده می‌شود.

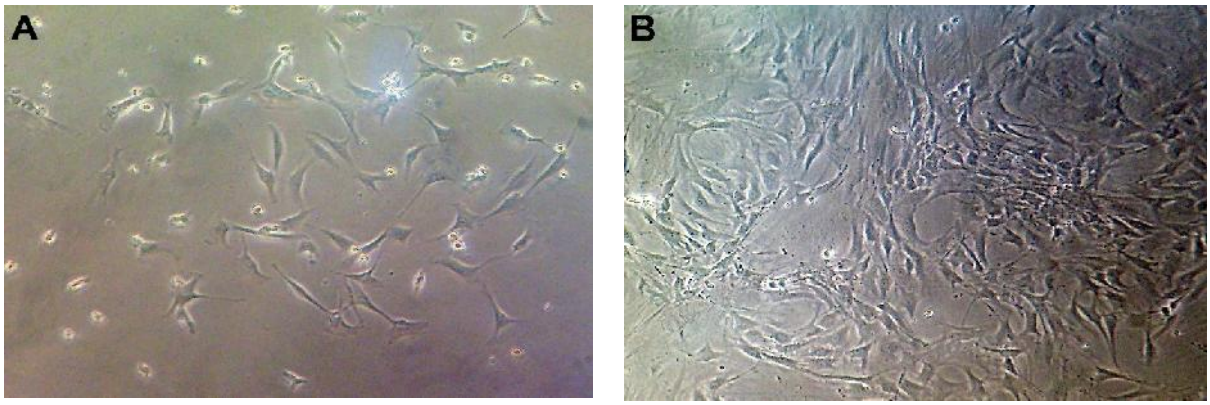
Figure 2. Exosome size analysis by DLS. The particle diameter is between 40 and 100 nm and the particle peak is observed at 70 nm.



شکل ۳- تصویر میکروسکوپ نیروی اتمی. **A** . تصاویر دو بعدی. **B**. تصاویر سه بعدی. تصاویر نشان می‌دهد اگزوزوم‌های جداسازی شده دارای ظاهری با اندازه بهینه و شکل کروی هستند.

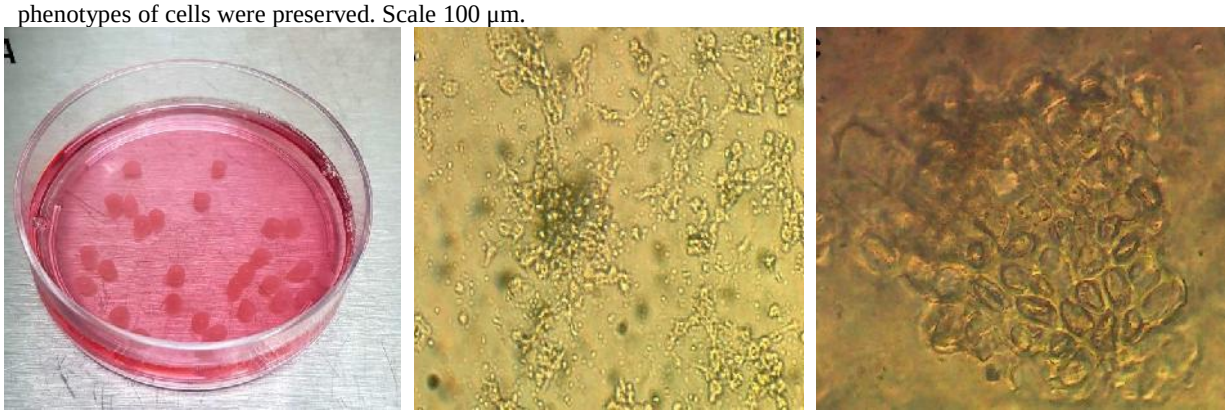
Figure 3. Atomic force microscope image. **A.** 2D images. **B.** 3D images. The images show that the isolated exosomes have an appearance of optimal size and spherical shape.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2026-11-04]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1400.8.4.4.9]
[DOI: 10.52547/nbr.8.4.265]



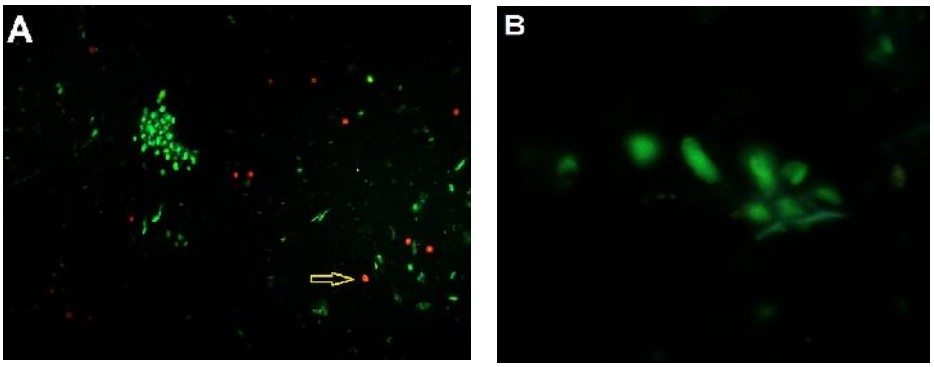
شکل ۴- تصویر میکروسکوپ اختلاف فاز. **A.** سلول‌های بنیادی مزانشیمی چربی طی هفته اول کشت به شکل شبه فیبرو بلاستی و دوکی شکل مشاهده شدند. **B.** پس از پاساژ سوم فنوتیپ شبه فیبروبلاستی و دوکی شکل سلول‌ها حفظ شدند. مقیاس ۱۰۰ میکرومتر.

Figure 4. Phase contrast microscopy image. **A.** Adipose mesenchymal stem cells were observed as fibroblast-like and spindle-shaped during the first week of culture. **B.** After the third passage, fibroblast-like and spindle-shaped phenotypes of cells were preserved. Scale 100 µm.



شکل ۵- **A** . مهره‌های هیدروژل‌های آلژینات تهیه شده به روش قطره‌ای در محیط کشت. **B** و **C** . سلول‌های درون هیدروژل هفت روز پس از کشت. به ترتیب مقیاس ۱۰۰ میکرومتر و ۲۰ میکرومتر توسط میکروسکوپ اختلاف فاز.

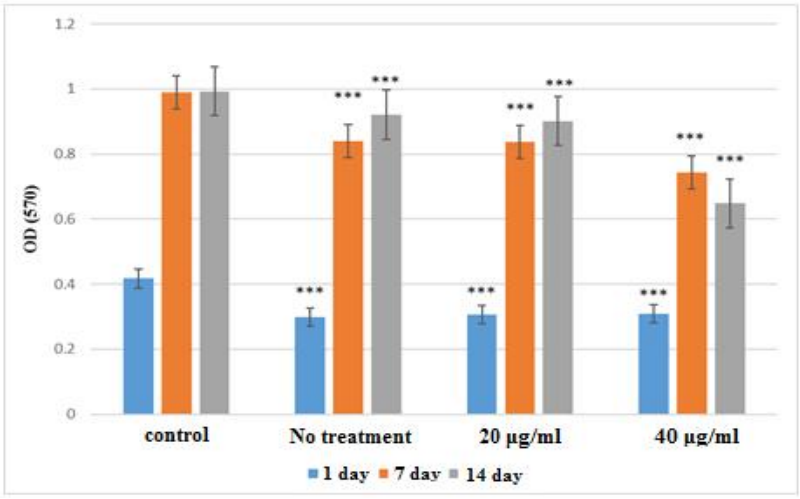
Figure 5. A. Alginate hydrogel beads prepared by drip method in culture medium. **B, C.** Cells in the hydrogel seven days after culture. Scale 100 µm and 20 µm by phase contrast microscopy, respectively.



شکل ۶ – نمونه‌ای از تصاویر میکروسکوپ فلورسنت از داربست‌های هیدروژلی آلژینات به همراه سلول‌های بنیادی مزانشیمی چربی در روز چهاردهم پس از کشت. رنگ آمیزی شده با رنگ آکریدین‌اورنج/اتیدیوم‌بروماید. فلش نشان دهنده سلول‌های دچار مرگ سلولی هستند. **A.** مقیاس ۱۰۰ میکرمتر. **B** . مقیاس ۲۰ میکرو متر.

Figure 6. A sample of fluorescent microscope images of alginate hydrogel scaffolds with Adipose mesenchymal stem cells on the fourteenth day after culture, stained with acridine orange / ethidium bromide. Arrows indicate cells with cell death. A. Scale 100 µm. B. Scale 20 µm.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2026-11-04]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1400.8.4.4.9]
[DOI: 10.52547/nbr.8.4.265]



شکل ۷- نتایج تست MTT در ارزیابی بقا سلول‌های بنیادی مزانشیمی چربی کشت داده شده در هیدروژل‌های آلژینات و تیمار با دو غلظت اگزوزوم (میکروگرم بر میلی لیتر) طی روزهای ۱، ۷ و ۱۴. (*** در سطح p<۰/۰۰۱ معنی دار است).

Figure 7. MTT test results in assessing the survival of Adipose mesenchymal stem cells cultured in alginate hydrogels and treated with two exosome concentrations on days 1, 7 and 14. (*** is significant at the level of p <0.001).

در روز هفتم شده است. همچنین با افزایش غلظت اگزوزوم در گروه‌های تحت تیمار درصد سلول‌های مثبت MAP2 افزایش یافته است (شکل ۹).

بررسی بیان ژن توسط Real Time – PCR

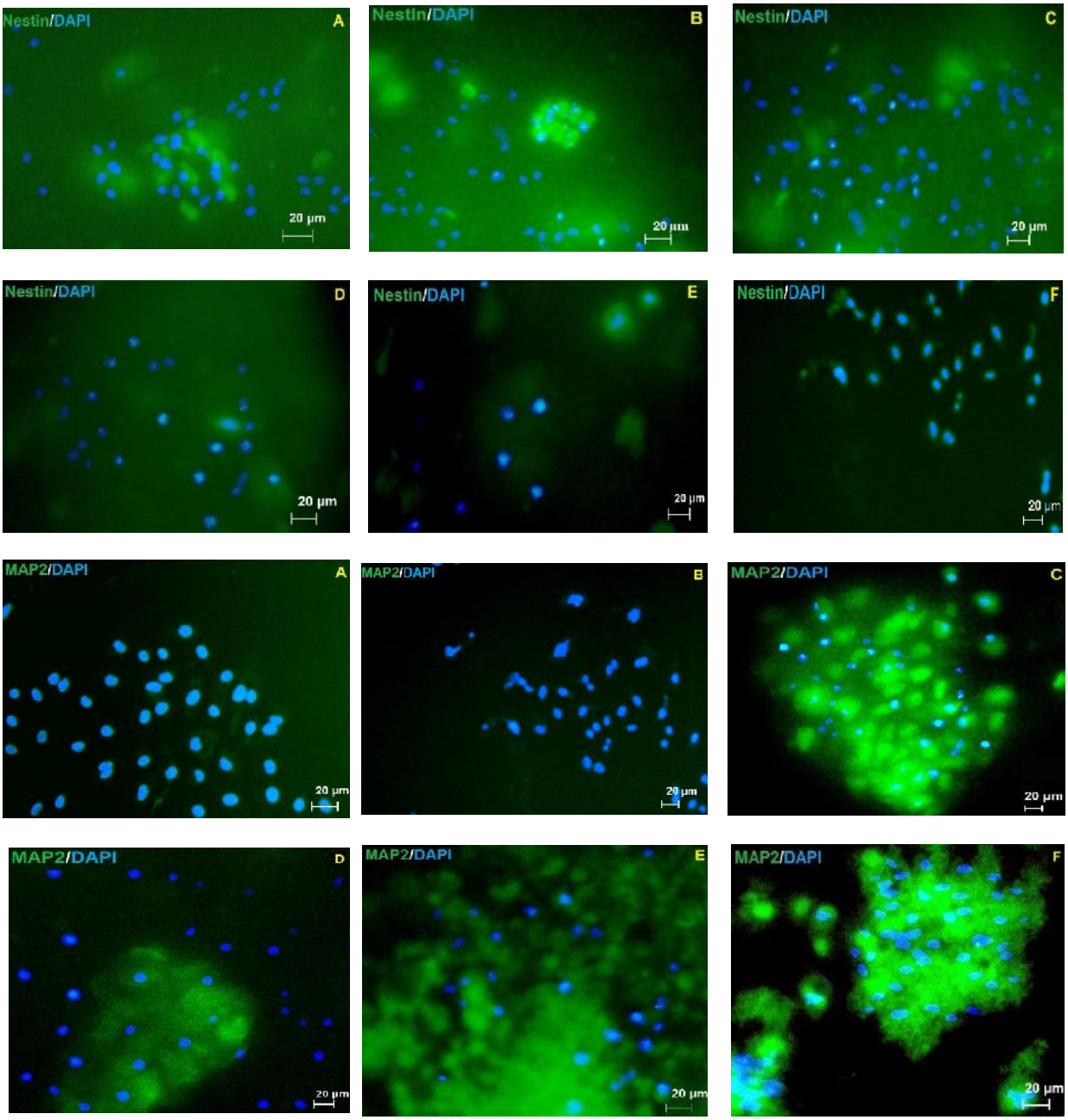
در این مطالعه جهت بررسی بیان کمی ژن‌های عصبی در سلول‌های تمایز یافته از روش Real Time – PCR استفاده شد. سطح بیان ژن‌های Nestin و MAP2 مورد ارزیابی قرار گرفت نتایج نشان داد که بیان ژن Nestin در گروه تیمار با غلظت ۴۰ میکروگرم بر میلی لیتر اگزوزوم در روز هفتم و چهاردهم نسبت به گروه کنترل تفاوت معنی داری دارد و دچار کاهش بیان شده است. سطح بیان ژن MAP2 در گروه تیمار با غلظت ۴۰ میکروگرم بر میلی لیتر اگزوزوم طی روز هفتم و چهاردم افزایش معنی داری را نشان می‌دهد. در حالی که سطح بیان این ژن در گروه تیمار با غلظت ۲۰ میکروگرم بر میلی لیتر تنها در روز چهاردهم دارای افزایش بیان نسبت به گروه کنترل است (شکل ۱۰).

بحث

در بیماری‌های تخریب کننده عصبی با توجه به کم بودن قدرت ترمیم در بافت عصبی، محققان همواره به دنبال راه حل مناسبی برای درمان این بیماری‌ها بوده‌اند. پیشرفت‌های صورت گرفته در زمینه مهندسی بافت راه کارهای جدیدی در زمینه استفاده از فاکتورهای القایی جهت تمایز سلول‌های بنیادی و ساخت داربست ارائه داده است (Gu et al., 2014). محققین به تازگی ثابت کرده‌اند که میکرووزیکول‌های غشایی شامل مولکول‌های زیستی فعالی هستند که در اتباطات سلول – سلول نقش داشته و دامنه وسیعی از فعالیت‌ها را در سلول پذیرنده انجام می‌دهند (Hamzah et al., 2021). اگزوزوم‌ها دسته ویژه‌ای از وزیکول‌های ترشحی با منشا اندوزومی هستند. اگزوزوم‌ها در سیستم عصبی خاصیت حفاظت نورونی دارند و با انتقال miRNAها به سلول هدف سبب بازگرداندن عملکرد نورون‌ها و آستروسیت‌های آسیب دیده می‌شوند. همچنین بیان نشانگرهای عصبی را افزایش می‌دهند (Lizarraga-Valderrama & Sheridan, 2021). از دیگر موارد مهم در مهندسی بافت عصبی آماده سازی داربست مناسب به عنوان بستر و ماتریکسی مناسب برای تکثیر و تمایز سلول‌ها است (Jin et al., 2021). با توجه به ویژگی‌های هیدروژل آلژینات که یک بیوپلیمر طبیعی است امکان طراحی و ساخت داربست مناسب جهت استفاده در مهندسی بافت عصبی وجود دارد. همچنین سلول‌های بنیادی مزانشیمی بافت چربی به علت دارا بودن پتانسیل تمایز به رده‌های سلولی مختلف از جمله سلول‌های شبه نورونی می‌توانند گزینه مناسبی برای استفاده در مهندسی بافت عصبی باشند (Luo et al., 2018).

تا کنون سلول‌های مختلفی در هیدروژل آلژینات مورد بررسی قرار گرفته و نتایج متفاوتی به دست آمده است که می‌تواند مربوط به نوع خاص سلول‌ها در هیدروژل آلژینات، درصد وزنی هیدروژل و روش انکپسوله کردن سلول‌ها در آن باشد. در تحقیقات متعددی نشان داده شده که سلول‌های موجود در هیدروژل آلژینات دچار کاهش تکثیر می‌شوند (Yang et al., 2018). در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۴ انجام شد نشان داده شد که تکثیر سلول‌های بنیادی جدا شده از بافت چربی انسانی و انکپسوله شده در هیدروژل، میزان رشد این سلول‌ها در مقایسه با کشت تک لایه کاهش یافته است.

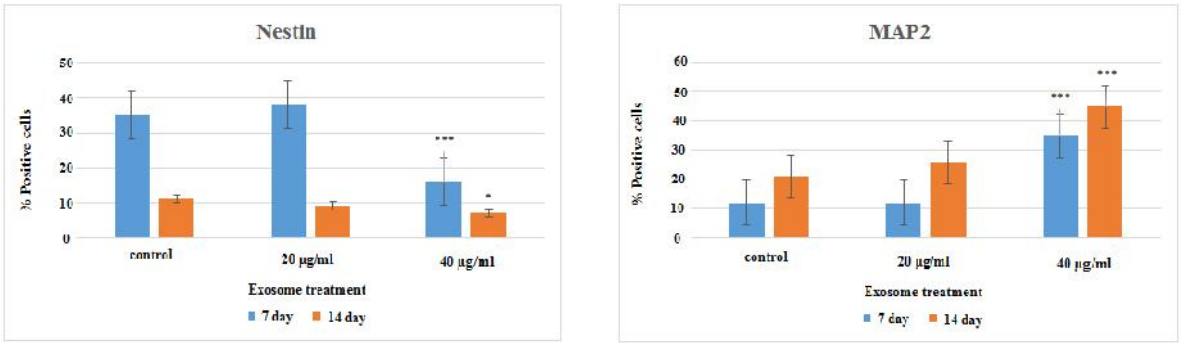
[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2026-11-04]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1400.8.4.4.9]
[DOI: 10.52547/nbr.8.4.265]



شکل ۸- رنگ آمیزی ایمنو فلورسنت برای نشانگر Nestin و MAP2 در سلول‌های بنیادی مزانشیمی چربی تمایز یافته بر روی هیدروژل‌های آلژینات. **A**، **B** و **C** به ترتیب داربست بدون تیمار، تیمار با غلظت ۲۰ و تیمار با غلظت ۴۰ میکروگرم بر میلی لیتر اگزوزوم در روز هفتم و **D**، **E** و **F** به ترتیب داربست‌های بدون تیمار، غلظت ۲۰ و غلظت ۴۰ میکروگرم بر میلی لیتر اگزوزوم در روز چهاردهم. مقیاس ۲۰ میکرومتر.

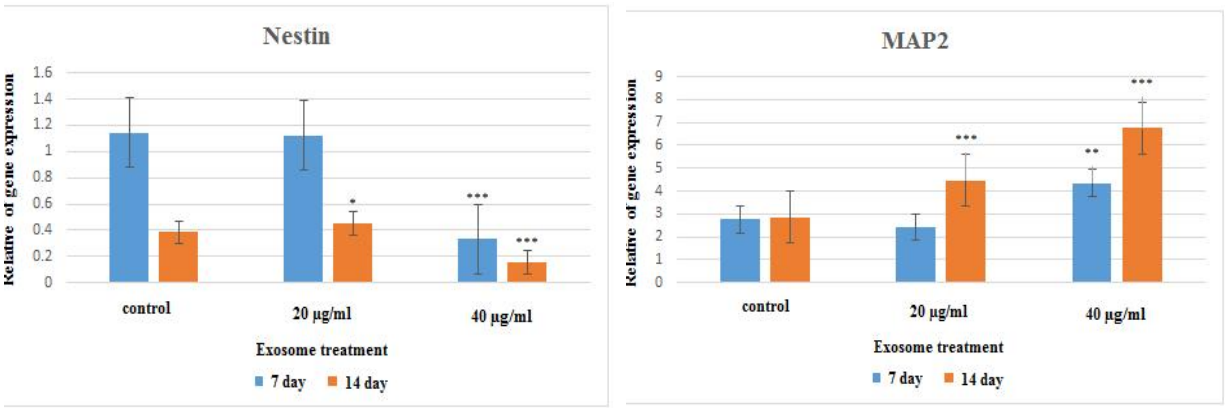
Figure 8. Immunofluorescent staining for Nestin and MAP2 markers in differentiated fat mesenchymal stem cells on alginate hydrogels. A, B and C were scaffolds without treatment, treatment with concentration of 20 and treatment with concentration of 40 µg/ml exosome on the seventh day, respectively, and D, E and F were scaffolds without treatment, concentration of 20 and concentration of 40 µg / ml Exosome on the fourteenth day, respectively.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2026-11-04]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1400.8.4.4.9]
[DOI: 10.52547/nbr.8.4.265]



شکل ۹- مقایسه میانگین درصد سلول‌های Nestin و MAP2 مثبت در روز هفتم و چهاردهم. افزایش غلظت اگزوزوم (میکروگرم بر میلی لیتر) باعث کاهش درصد سلول‌های مثبت Nestin در روزهای هفتم و چهاردم شده است. افزایش درصد سلول‌های مثبت MAP2 در گروه تحت تیمار با غلظت ۲۰ در روز هفتم مشاهده می‌شود. همچنین این افزایش درصد سلول‌های مثبت MAP2 در گروه تحت تیمار با غلظت ۴۰ در روز هفتم و چهاردم دیده می‌شود که نسبت به گروه کنترل اختلاف معنی‌داری دارند. (*در سطح $p<۰/۰۵$ معنی دار است. *** در سطح $p<۰/۰۰۱$ معنی دار است).

Figure 9. Comparison of the mean percentage of Nestin and MAP2 positive cells on the seventh and fourteenth days. Increasing the concentration of exosomes decreased the percentage of Nestin positive cells on the seventh and fourteenth days. An increase in the percentage of MAP2 positive cells was observed in the treated group with a concentration of 20 µg/ml on the seventh day. Also, this increase in the percentage of MAP2 positive cells is seen in the treated group with a concentration of 40 on the seventh and fourteenth day, which are significantly different from the control group. (* significant at the level of $p <0.05$. *** significant at the level of $p <0.001$).



شکل ۱۰- نمودارهای فوق مقایسه تغییرات بیان ژن را در دو روز هفتم و چهاردهم در داربست‌های هیدرژلی تحت تیمار با اگزوزوم (میکروگرم بر میلی لیتر) را نشان می‌دهد. (*در سطح $p<۰/۰۵$ معنی دار است. *** در سطح $p<۰/۰۰۱$ معنی دار است).

Figure 9. The diagrams above show a comparison of changes in gene expression on the seventh and fourteenth days in exosome-treated hydrogel scaffolds. (*significant at the level of $p <0.05$. *** significant at the level of $p <0.001$).

اگر چه بیان نشانگرهای Nestin و MAP2 افزایش معنی داری داشته‌اند (Khosravizadeh et al., 2014). همچنین در سال ۲۰۱۴ مطالعه‌ای که بر روی هیدروژل آلژینات انجام شد نشان داده شد که هیدروژل آلژینات که سلول‌های بنیادی جنینی موشی درون آن انکپسوله شده‌اند می‌تواند تمایز عصبی را نسبت به محیط کشت دو بعدی افزایش دهد. همچنین نتایج حاصل از ایمنوسیتوشیمی در این تحیق مشخص کرد که هیدروژل آلژینات چه به صورت اصلاح شده با هیالورنیک اسید و فیبرونکتین و چه به صورت تنها با درصد وزنی ۲ نسبت به درصد وزنی ۱ عملکرد بهتری در جهت تمایز عصبی دارد (Bozza et al., 2014). نتایج مطالعات دیگری در سال ۲۰۱۴ انجام شد نشان داد که هیدروژل آلژینات محیط سه بعدی مناسب برای کشت و تمایز عصبی سلول‌های بنیادی جدا شده از بافت چربی انسانی فراهم می‌کند و افزایش معنی داری در بیان ژن‌های

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2026-11-04]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1400.8.4.4.9]
[DOI: 10.52547/nbr.8.4.265]

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2026-11-04]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1400.8.4.4.9]
[DOI: 10.52547/nbr.8.4.265]

Nestin، MAP2 و GFAP چهارده روز پس از تمایز عصبی نشان می‌دهد (Razavi et al., 2015). بیان ژن Nestin طبق نتایج برخی محققین در سلول‌های بنیادی مزانشیمی صورت می‌گیرد ولی بیان Nestin به میزان کم می‌تواند نشان‌دهنده حضور سلول‌های شبه عصبی باشد. افزایش بیان پروتئین Nestin به منزله آغاز فرایند تبدیل شدن سلول‌های پیش ساز به سمت سلول‌های عصبی است. از Nestin به عنوان مارکر اولیه تمایز عصبی یاد می‌شود. این امر از آن جهت قابل توجه است که سلول‌های پیش ساز ممکن است بدون القا تمایز عصبی، بیان Nestin را داشته باشند (Bernal & Arranz, 2018).

در نتایج به دست آمده از تحقیق حاضر هم نشان داده شد که داربست‌های ساخته شده از هیدروژل آلژینات با استفاده از روش قطره گذاری، می‌تواند ۱۴روز پس کشت قابلیت بقا و تکثیر سلول‌ها را داشته باشد. هر چند نسبت به کشت دو بعدی تکثیر سلول‌ها کاهش پیدا کرده است. این موضوع می‌تواند ناشی از فرایند انکپسوله کردن سلول‌ها در هیدروژل آلژینات و یا استفاده از کلرید کلسیم برای ژلاسیون باشد. در این تحقیق سعی شد برای دستیابی به دوام بیشتر سلول‌ها از غلظت بهینه کلرید کلسیم (۲ درصد وزنی) استفاده شود. همچنین نشان داده شد سلول‌های انکپسوله شده در هیدروژل آلژینات دارای ظاهری کروی هستند. همچنین در این تحقیق از حضور اگزوزوم‌های استخراج شده از مایع مغزی نخاعی به عنوان یک عامل تمایزی نسبت به محیط بدون اگزوزوم استفاده شد.

یکی از منابع مهم اگزوزوم‌های عصبی مایع مغزی نخاعی (CSF) است. تحقیقات قبلی نشان دادند که اگزوزوم‌های مایع مغزی نخاعی ساختارهایی با اندازه ۳۰ تا ۱۰۰ نانومتر با شکل گرد هستند (Stuendl et al., 2016). مطالعه حاضر نیز در تایید این نتایج نشان داد اگزوزوم‌ها ذراتی با اندازه ۳۰ تا ۱۰۰ نانومتر و شکل گرد هستند. مطالعات اخیر نشان داده است که اگزوزوم‌ها حاوی مولکول‌های متنوعی مانند پروتئین‌ها، mRNA و miRNA هستند و به واسطه آن باعث تبادل اطلاعات بین سلول‌ها می‌شوند. از این میان miRNAها بیشتر مورد توجه هستند زیرا نقش تنظیم بیان ژن را دارند (Giorgi Silveira et al., 2020). همچنین مشخص شده است که مغز منبعی برای miRNA اگزوزومی مایع مغزی نخاعی است (Waller et al., 2018). از آنجایی که اگزوزوم‌ها منبع غنی از miRNA به شمار می‌آید به نظر می‌رسد این تاثیر miRNAهای اگزوزومی می‌تواند باعث تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی شود.

نشان داده شده است که اگزوزوم‌ها نقش مهمی در فرایند نوروژنز دارند. اگزوزوم‌های استخراج شده از سلول‌های بنیادی عصبی موش مورد بررسی قرار گرفته‌اند و مشخص شده که این اگزوزوم‌ها تمایز و بلوغ سلول‌های عصبی و گلیال را تسهیل می‌کنند. مطالعات ایمنوسیتوشیمی در این تحقیق نشان از افزایش بیان MAP2 و GFAP در سلول‌های بنیادی عصبی دارد. همچنین مشخص شد که اگزوزوم‌ها mir-9 را به سلول‌های گیرنده آزاد می‌کنند که منجر به سرکوب ژن سرکوبگر تمایز Hes1 می‌شود و این عامل نقش مهمی در تمایز و بلوغ سلول‌های بنیادی دارد (Yuan et al., 2021).

در مطالعه‌ای که در رابطه با محتویات مایعات بدن از جمله CSF و سرم در افراد سالم انجام شده، تفاوت‌های قابل توجهی در اگزوزوم‌های مایع مغزی نخاعی و سرم مشاهده شده است. این داده‌ها حاکی از آن است که مغز نقش مهمی در تشکیل محتویات مایع CSF دارد. از آن جمله می‌توان به انواع miRNAها شامل Lethal-7 (let-7)، mir-9، mir-124، mir-125 و پروتئین‌ها اشاره کرد(Yagi et al., 2017). همچنین در تحقیقی دیگر در سال ۲۰۱۵ نشان داده شد که اگزوزوم‌ها باعث فعال شدن سیگنال‌های مربوط به نوروژنز در سلول‌های بنیادی مزانشیمی چربی می‌شوند (Farinazzo et al., 2015).

در مطالعه‌ای که در ارتباط با تاثیر اگزوزوم‌ها بر روی تمایز عصبی انجام شد، تاثیر اگزوزوم‌های مشتق از سلول‌های PC12 بر روی سلول‌های بنیادی مزانشیمی به مدت یک هفته مورد بررسی قرار گرفت و بیان مارکرهای عصبی MAP2 و NSE neuron-specific enolase مشاهده شد. و نشان داده شد که این اگزوزوم‌ها، در تمایز عصبی نقش دارند (Takeda & Xu, 2015). در سایر بررسی‌ها بر روی اگزوزوم‌ها و محتویات آن مشخص شده است که اگزوزوم‌ها با انتقال پروتئین‌ها به سایر سلول‌ها می‌توانند سبب ایجاد تغییر شکل و تمایز عصبی شوند و نورون‌های بالغ ایجاد کنند (Luo et al., 2018). در تحقیقی که بر روی سلول‌های بنیادی عصبی انجام شده است نشان داده شده که انتقال اگزوزوم‌ها به سلول هدف باعث مهار تکثیر سلول‌های بنیادی شده و از طرف دیگر تمایز عصبی را افزایش می‌دهد. در این پژوهش عنوان شده است که اگزوزوم‌ها میزان Nestin را در هر دو سطح mRNA و پروتئین کاهش می‌دهد (Cui et al., 2012).

در تحقیق حاضر بیان ژن Nestin در روز هفتم نسبت به گروه تیمار با غلظت ۲۰ تفاوت معنی داری نداشت ولی نسبت به غلظت ۴۰ کاهش معنی داری پیدا کرده است. همچنین در رو چهاردهم بیان این ژن کاهش معنی‌داری نسبت به روز هفتم نشان می‌دهد. کاهش بیان Nestin می‌تواند مرتبط با گذر از حالت پایه و بیان بیشتر ژن‌های تخصصی نورون تحت تاثیر القا توسط اگزوزوم و القای مکانیکی داربست باشد. در مرحله بعدی

بیان ژن MAP2 به عنوان شاخص نورون‌های بالغ بررسی شد. در روز هفتم گروه کنترل نسبت به گروه تیمار با غلظت ۲۰ تفاوتی نداشت ولی نسبت به گروه تیمار با غلظت ۴۰ دارای تفاوت معنی داری است. همچنین نشان داده شد که بیان ژن MAP2 در روز چهاردهم افزایش دارد.

بر اساس نتایج به دست آمده از این مطالعه اگزوزوم‌های استخراج شده از مایع مغزی نخاعی قادر به تمایز عصبی سلول‌های بنیادی مزانشیمی چربی در هیدروژل آلژینات است. لذا با توجه به مشکلات مربوط به درمان بیماری‌های عصبی و با توجه به ویژگی‌های اگزوزوم‌ها، امید است شناخت بهتر اگزوزوم‌ها، راهی نوین و کاربردی در جهت درمان این بیماری‌ها به وجود آورد. بدیهی در این راستا مطالعات بیشتر بویژه ارزیابی‌های کلینیکی کاملا ضرورت دارد.

سپاسگزاری

در نهایت از همکاری و مساعدت‌های مرکز تحقیقات بیولوژی کاربردی تکوین جانوری دانشگاه آزاد اسلامی مشهد که در جهت انجام این تحقیق نقش بسزایی ایفا نمودند سپاسگزاری می‌شود.

REFERENCES

Bernal, A. & Arranz, L. 2018. Nestin-expressing progenitor cells: function, identity and therapeutic implications. Cellular and Molecular Life Sciences 75: 2177-2195.

Billiet, T., Gevaert, E., De Schryver, T., Cornelissen, M. & Dubruel, P. 2014. The 3D printing of gelatin methacrylamide cell-laden tissue-engineered constructs with high cell viability. Biomaterials 35: 49-62.

Bozza, A., Coates, E.E., Incitti, T., Ferlin, K.M., Messina, A., Menna, E., Bozzi, Y., Fisher, J.P. & Casarosa, S. 2014. Neural differentiation of pluripotent cells in 3D alginate-based cultures. Biomaterials 35: 4636-4645.

Capeling, M.M., Czerwinski, M., Huang, S., Tsai, Y.H., Wu, A., Nagy, M.S., Juliar, B., Sundaram, N., Song, Y., Han, W.M., Takayama, S., Alsberg, E., Garcia, A.J., Helmrath, M., Putnam, A.J. & Spence, J.R. 2019. Nonadhesive alginate hydrogels support growth of pluripotent stem cell-derived intestinal organoids. Stem Cell Reports 12: 381-394.

Cavo, M., Fato, M., Penuela, L., Beltrame, F., Raiteri, R. & Scaglione, S. 2016. Microenvironment complexity and matrix stiffness regulate breast cancer cell activity in a 3D in vitro model. Scientific Reports 6: 1-13.

Cui, Y., Xiao, Z., Han, J., Sun, J., Ding, W., Zhao, Y., Chen, B., Li, X. & Dai, J. 2012. MiR-125b orchestrates cell proliferation, differentiation and migration in neural stem/progenitor cells by targeting nestin. BMC Neuroscience 116: 1-13.

Farinazzo, A., Turano, E., Marconi, S., Bistaffa, E., Bazzoli, E. & Bonetti, B. 2015. Murine adipose-derived mesenchymal stromal cell vesicles: in vitro clues for neuroprotective and neuroregenerative approaches. Cytotherapy 17: 571-578.

Farivar, S., Mohamadzade, Z., Shiari, R. & Fahimzad, A. 2015. Neural differentiation of human umbilical cord mesenchymal stem cells by cerebrospinal fluid. Iranian Journal of Child Neurology 9: 87-93.

Forcales, S.V. 2015. Potential of adipose-derived stem cells in muscular regenerative therapies. Frontiers in Aging Neuroscience 7: 1-12.

Giorgi Silveira, R., Perello Ferrua, C., do Amaral, C.C., Fernandez Garcia, T., de Souza, K.B. & Nedel, F. 2020. MicroRNAs expressed in neuronal differentiation and their associated pathways: Systematic review and bioinformatics analysis. Brain Research Bulletin 157: 140-148.

Gu, X., Ding, F. & Williams, DF. 2014. Neural tissue engineering options for peripheral nerve regeneration. Biomaterials 35: 6143-6156.

Guha, D., Lorenz, D.R., Misra, V., Chettimada, S., Morgello, S. & Gabuzda, D. 2019. Proteomic analysis of cerebrospinal fluid extracellular vesicles reveals synaptic injury, inflammation, and stress response markers in HIV patients with cognitive impairment. Journal of Neuroinflammation 16: 1-19.

Hamzah, R.N., Alghazali, K.M., Biris, A.S. & Griffin, R.J. 2021. Exosome traceability and cell source dependence on composition and Cell-Cell Cross Talk. International Journal of Molecular Sciences 22: 1-17 (5346).

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2026-11-04]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1400.8.4.4.9]
[DOI: 10.52547/nbr.8.4.265]

Jin, Q., Wu, P., Zhou, X., Qian, H. & Xu, W. 2021. Extracellular vesicles: novel roles in neurological disorders. Stem Cells International 2021: 1-16.

Khosravizadeh, Z., Razavi, S., Bahramian, H. & Kazemi, M. 2014. The beneficial effect of encapsulated human adipose-derived stem cells in alginate hydrogel on neural differentiation. Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials 102: 749-755.

Lin, H.R, Heish, C.W, Liu, C.H, Muduli, S., Li, H.F., Higuchi, A., Kumar, S.S., Alarfaj, A.A., Munusamy, M.A., Hsu, S.T., Chen, D.C., Benelli, G., Murugan, K., Cheng, N.C., Wang, H.C. & Wu, G.J. 2017. Purification and differentiation of human adipose-derived stem cells by membrane filtration and membrane migration methods. Scientific Reports 7: 1-13.

Lizarraga-Valderrama, L.R. & Sheridan, G.K. 2021. Extracellular vesicles and intercellular communication in the central nervous system. FEBS Letters 595: 1391-1410.

Luo, L., Hu, D.H, Yin, J.Q. & Xu, R.X. 2018. Molecular mechanisms of transdifferentiation of adipose-derived stem cells into neural cells: Current status and perspectives. Stem Cells International 8: 1-14.

Martins, T.S., Catita, J., Rosa, I.M., Da Cruz e Silva, O.A.B. & Henriques, AG. 2018. Exosome isolation from distinct biofluids using precipitation and column-based approaches. PLoS ONE 13: 1-16.

Mathew, B., Mansuri, M.S., Williams, K.R. & Nairn, AC. 2021. Exosomes as emerging biomarker tools in neurodegenerative and neuropsychiatric disorders—a proteomics perspective. Brain Sciences 11: 1-18.

Rajmohan, D. & Bellmer, D. 2019. Characterization of spirulina-alginate beads formed using ionic gelation. International Journal of Food Science 219: 1-7.

Razavi, S., Jahromi, M., Amirpour, N. & Khosravizadeh, Z. 2014. Effect of sertraline on proliferation and neurogenic differentiation of human adipose-derived stem cells. Advanced Biomedical Research 3: 97-102.

Razavi, S., Khosravizadeh, Z., Bahramian, H. & Kazemi, M. 2015. Time-dependent effect of encapsulating alginate hydrogel on neurogenic potential. Cell Journal 17: 304-311.

Scioli, M.G., Bielli, A., Gentile, P., Mazzaglia, D., Cervelli, V. & Orlandi, A. 2014. The biomolecular basis of adipogenic differentiation of adipose-derived stem cells. International Journal of Molecular Sciences 15: 6517-6526.

Stuendl, A., Kunadt, M., Kruse, N., Bartels, C., Moebius, W., Danzer, K.M., Mollenhauer, B. & Schneider, A. 2016. Induction of α-synuclein aggregate formation by CSF exosomes from patients with parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. Brain 139: 481-494.

Takeda, Y.S. & Xu, Q. 2015. Neuronal differentiation of human mesenchymal stem cells using exosomes derived from differentiating neuronal cells. PLoS ONE 10: 1-15

Upadhyay, R.K. 2017. Role of biological scaffolds, hydro gels and stem cells in tissue regeneration therapy. Advances in Tissue Engineering & Regenerative Medicine 2: 1-15.

Waller, R., Wyles, M., Heath, P.R., Kazoka, M., Wollff, H., Shaw, P.J. & Kirby, J. 2018. Small RNA sequencing of sporadic amyotrophic lateral sclerosis cerebrospinal fluid reveals differentially expressed miRNAs related to neural and glial activity. Frontiers in Neuroscience 11: 1-13.

Yagi, Y., Ohkubo, T., Kawaji, H., Machida, A., Miyata, H., Goda, S., Roy, S., Hayashizaki, Y., Suzuki, H. & Yokota, T. 2017. Next-generation sequencing-based small RNA profiling of cerebrospinal fluid exosomes. Neuroscience Letters 636: 48-57.

Yang, X., Lu, Z., Wu, H., Li, W., Zheng, L. & Zhao, J. 2018. Collagen-alginate as bioink for three-dimensional (3D) cell printing based cartilage tissue engineering. Materials Science and Engineering C 83: 195-201.

Yuan, P., Ding, L., Chen, H., Wang, Y., Li, C., Zhao, S., Yang, X., Ma, Y., Zhu, J., Qi, X., Zhang, Y., Xia, X. & Zheng, J.C. 2021. Neural stem cell-derived exosomes regulate neural stem cell differentiation through miR-9-hes1 axis. Frontiers in Cell and Developmental Biology 9: 1-17.

Zhou, J., Ghoroghi, S., Benito-martin, A., Wu, H., Unachukwu, U.J., Einbond, L.S., Guariglia, S., Peinado, H. & Redenti, S. 2016. Characterization of induced pluripotent stem cell microvesicle genesis, morphology and pluripotent content. Nature Publishing Group 6: 1-10.

Zlotogorski, A., Dan, H., Gavriel, D. & Tuula, C. 2015. Morphological and molecular features of oral fluid - derived exosomes : oral cancer patients versus healthy individuals. Journal of Cancer Research and Clinical Oncology 5: 1-10.

*****

How to cite this article:

Cheravi, M., Baharara, J., Yaghmaei, P., Hayati Roudbar, N. 2022. The effect of cerebrospinal fluid-derived exosomes on neural differentiation of adipose mesenchymal stem cells in alginate hydrogel scaffold. Nova Biologica Reperta 8: 265-278. (In Persian).

چروی، م.، بهارآرا، ج.، یغمایی،پ.، حیاتی رودباری، ن. ۱۴۰۰. اثر اگزوزوم‌های مشتق از مایع مغزی نخاعی بر تمایز عصبی سلول‌های بنیادی مزانشیمی چربی در داربست هیدروژل آلژینات. یافته‌های نوین در علوم زیستی ۸: ۲۷۸-۲۶۵.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2026-11-04]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1400.8.4.4.9]
[DOI: 10.52547/nbr.8.4.265]