Effects of a Self-Assembling Peptide Nanofiber Containing Laminin Motif on Survival and Proliferation of Embryonic Rat Neural Stem Cells

Zabihollah Khaksar[1], Sajad Sahab Negah[1*], Shahin Mohammad Sadeghi[2, 3]

[1]Histology Group, Basic Science Department, Faculty of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran
[2]Plastic Surgery Department, Medical Faculty, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[3]Shefa Neuroscience Research Center, Khatam Alanbia Hospital, Tehran, Iran

Article Info:

Received: **29 Mar 2016** ***Accepted*****: 4 May 2016**

ABSTRACT

Introduction: Recent studies have shown the key roles of different sequences and motifs in the extracellular matrix guidance. Biological activities of the macromolecules can be mimicked by the motifs of extracellular matrix. Laminin peptide sequences and motifs can bind the biomaterials of scaffolds, improve the cells mechanical protection, increase the cells growth, and lead to the formation of tissues. ***Materials and Methods:*** Neural stem cells (NSCs) were isolated from embryonic ganglionic eminences of 14 days rats and cultured as neurosphere. The number and diameter of neurospheres on days 3, 7, and 10 were measured. NSCs were cultured by two-dimensional (2D) and 3D cultures. To evaluate cell survival, Live/Dead kit was used on days 1 and 7. The cell proliferation was assessed using the MTS assay on days 1 and 7. ***Results:*** Our finding showed that the cells isolated from ganglionic eminences have a high proliferative capacity. According to the proliferation assay measurements, the number and diameter of neurosphere significantly increased after culturing for 10 days. Cell proliferation and survival in the self-assembling peptide nanofiber containing laminin motif (SAPN-LM) were significantly higher than that of 2D. ***Conclusion:*** SAPN-LM improved cell proliferation and survival and suggest an appropriate models for further investigations.

Key words:

1. Neural Stem Cells
2. Cell Proliferation
3. Survival

***Corresponding Author:** Sajad Sahab Negah

E-mail: *sahabsajad@yahoo.com*

[Downloaded from shefayekhatam.ir on 2026-11-10]

[DOI: 10.18869/acadpub.shefa.4.2.55]

اثرات یک پپتید نانوفیبری خود ساختهٔ حاوی موتیف لامینین بر روی بقاء و تکثیر سلول‌های بنیادی عصبی جنینی موش صحرایی

ذبیح اله خاکسار[۱]، سجاد سحاب نگاه[۱*]، شاهین محمد صادقی[۲،۳]

[۱]بخش بافت شناسی، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

[۲]گروه جراحی پلاستیک، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

[۳]مرکز تحقیقات علوم اعصاب شفا، بیمارستان خاتم‌الانبیاء، تهران، ایران

اطلاعات مقاله:

تاریخ دریافت: ۱۰ فروردین ۱۳۹۵ **تاریخ پذیرش:** ۱۵ اردیبهشت ۱۳۹۵

چکیده

مقدمه: مطالعات اخیر نقش‌های کلیدی توالی‌ها و موتیف‌های مختلف را در هدایت ماتریکس خارج سلولی نشان داده‌اند. فعالیت‌های بیولوژیکی مولکول‌های بزرگ می‌تواند توسط موتیف‌هایی از ماتریکس خارج سلولی تقلید شود. توالی‌های پپتیدی و موتیف‌های لامینین می‌توانند به زیست مواد داربست‌ها متصل شوند، حفاظت مکانیکی سلول‌ها را بهبود بخشند، رشد سلول‌ها را افزایش دهند و منجر به تشکیل بافت‌ها شوند. **مواد و روش‌ها:** سلول‌های بنیادی عصبی از برجستگی‌های عقده‌ای جنین موش‌های صحرایی ۱۴ روزه جدا شدند و به صورت نوروسفر کشت داده شدند. تعداد و قطر نوروسفرها در روزهای ۳، ۷ و ۱۰ اندازه‌گیری شد. سلول‌های بنیادی عصبی توسط محیط‌های کشت دو بعدی و سه بعدی کشت داده شدند. جهت ارزیابی بقاء سلولی، کیت Live/Dead در روزهای ۱ و ۷ استفاده شد. تکثیر سلولی با استفاده از آزمون MTS در روزهای ۱ و ۷ ارزیابی شد. **یافته‌ها:** یافته‌های ما نشان داد که سلول‌های جدا شده از برجستگی‌های عقده‌ای ظرفیت تکثیر بالایی دارند. با توجه به آزمون اندازه‌گیری‌های تکثیر، تعداد و قطر نوروسفر به طور معنی‌داری به مدت ۱۰ روز بعد از کشت افزایش یافت. تکثیر و بقاء سلولی در پپتید نانوفیبر خود ساختهٔ حاوی موتیف لامینین به طور قابل ملاحظه‌ای بیشتر از دو بعدی آن بود. **نتیجه‌گیری:** پپتید نانوفیبر خود ساخته حاوی موتیف لامینین، تکثیر و بقاء سلولی را بهبود بخشیده و مدل‌های مناسب برای تحقیقات بیشتر را پیشنهاد می‌کند.

کلید واژه‌ها:

۱. سلول‌های بنیادی عصبی
۲. تکثیر سلولی
۳. بقاء

***نویسنده مسئول:** سجاد سحاب نگاه

آدرس الکترونیکی: *sahabsajad@yahoo.com*

[Downloaded from shefayekhatam.ir on 2026-11-10]

[DOI: 10.18869/acadpub.shefa.4.2.55]

مقدمه

ضایعات سیستم عصبی مرکزی از تخریب گستردهٔ بافت، مرگ سلول‌های عصبی، گلیالی و تخریب زواید عصبی به دنبال ضربات، خونریزی، ادم و التهاب ناشی می‌شود. مجموعهٔ این اختلالات منجر به عدم هماهنگی در حرکات ارادی و عدم قرینگی در حرکات اندام‌ها می‌گردد (۱). از نظر پاتوفیزیولوژی با توجه به گستردگی و پیچیدگی ضایعات سیستم عصبی مرکزی درمان این اختلالات هنوز به‌عنوان یک مسئلهٔ پیچیده مطرح می‌باشد (۴-۲). از این رو جایگزینی سلول‌های از دست رفته با استفاده از سلول‌های بنیادی یکی از روش‌های جدید به‌منظور درمان ضایعات سیستم عصبی مرکزی است (۵).

در سال‌های اخیر بررسی‌های انجام شده در زمینهٔ سلول درمانی نشان داد که یکی از مشکلات این روش، عدم حضور بستری مناسب برای رشد سلول‌های پیوندی است. به دنبال این مطالعات، مهندسی بافت با عنوان دانش طراحی بافت برای بازیابی عملکرد بافت‌های از دست رفته جهت بر طرف ساختن این محدودیت‌ها مطرح شد (۶). اساس مهندسی بافت بر پایهٔ گسترش زیست‌شناسی سلولی و مولکولی و همچنین درک عملکرد سلول‌ها و ساختار ماتریکس خارج سلولی جهت ساخت داربست مناسب برای چسبندگی و نگهداری سلول‌ها در ناحیهٔ ضایعه دیده می‌باشد (۷). داربست‌های ساخته شده مزایایی نیز دارند که از آن جمله می‌توان آن‌ها را مانند پلی در نظر گرفت که ارتباط از دست رفتهٔ بافت را برقرار می‌کنند. همچنین جایگاه مناسبی برای رشد نوریت‌ها و افزایش طول آکسون‌ها، مهاجرت سلول‌ها و ایجاد مدارهای عصبی می‌باشد (۸).

کاربرد روش‌های مهندسی بافت برای درمان ضایعات سیستم عصبی مرکزی نیاز به سلول‌های بنیادی، فاکتورهای رشد و داربست مناسب برای ایجاد چسبندگی و حفظ عملکرد سلول‌ها دارد (۹). سلول‌های بنیادی از آنجا که توانایی تقسیم به سلول‌های خودی را دارند در روش‌های مهندسی بافت بسیار مناسب می‌باشند ولی در عین حال نیاز به تعداد بالای سلول در این تکنیک یکی از معایب این روش به شمار می‌آید (۱۰).

زیست موادهایی از قبیل PLLA[1]، زیست پلی‌مرهای PGA[2]، مش‌های فسفات کلسیم، ژل‌های PEG[3]، متیل سلولز، آلگینیت و آگاروز به دلیل اندازهٔ بزرگ و فیبرها، اسیدیتهٔ بالا، تراکم بار، میزان کم مواد غذایی و ناتوان بودن در ایجاد ریزمحیط‌های کاربردی توسط سلول موفقیت محدودی داشته‌اند. زیست موادهای مشتق شده از حیوانات، شامل کلاژن، ژلاتین، فیبرونکتین، ریز مخاط روده و ماتریژل ممکن است به ایجاد ریزمحیط‌های واقعی کمک کنند اما جهت انجام تحقیقات پیچیده و درمان به دلیل وجود مواد آلوده کننده مناسب نمی‌باشند (۱۲، ۱۱).

با توجه به مشکلات ذکر شده در مورد استفاده از پلیمرهای زیستی و داربست‌های مشتق شده از بدن حیوانات، داربست‌هایی تحت عنوان داربست‌های خود ساخته طراحی شد که این داربست‌ها برای اولین بار در پروتئین مخمری به نام زوتین یافت شد (۱۳). داربست‌های پپتیدی SAPNS[4] خود ساخته از کنار هم قرار گرفتن و تناوب اسیدهای آمینه ساخته شده‌اند. اسیدهای آمینه آب‌دوست و آب‌گریز به صورت متناوب کنار هم قرار گرفته و پپتیدهایی را می‌سازند که به صورت خودبخودی وارد ساختار دوم پروتئین از نوع صفحات بتا می‌شوند. ساختار بتای پپتیدها دارای نواحی قطبی و غیرقطبی بوده و از این رو توانایی حرکت در سطوح آبی را دارد. این داربست‌ها وقتی در معرض محیط‌های آبی با pH طبیعی قرار می‌گیرند، ساختاری را تشکیل می‌دهند که در اثر تقابل مولکول‌های قطبی و غیرقطبی ایجاد شده است. به این ترتیب که پپتیدهای باردار آن‌ها در کنار اسیدهای آمینه آلانین (بخش‌های غیرقطبی صفحات بتا) قرار می‌گیرند.

در نهایت این شیوهٔ قرارگیری اسیدهای آمینه باعث ایجاد نانوفیبرهای دو لایه از صفحات بتا می‌شود که هر کدام از نانوفیبرها قطری حدود ۱۰ نانومتر دارند. در این حالت پپتیدهای باردار دارای هر دو بار مثبت و منفی هستند که بین آن‌ها تقابل مشترک وجود دارد. این شکل قرارگیری در محیط‌های آبی موجب مقاومت آن‌ها در برابر تغییرات دما، غلظت و pH عوامل تخریب کنندهٔ پروتئین می‌گردد. ارتباط نانوفیبرها با مولکول‌های آب موجب شده که این پپتیدها به راحتی در محیط‌های آبی جابجا شوند (۱۵، ۱۴).

انواع مختلفی از این داربست‌های خود ساخته طراحی شد و در مطالعات مختلف جهت کاربردهای مهندسی بافت به کار برده شد (۲۱-۱۶). Gelain و همکاران در سال ۲۰۰۶ به بررسی اضافه کردن پپتیدهایی (این پپتیدها به طور طبیعی در ماتریکس خارج سلولی حضور دارند مانند پپتیدهایی از لامینین) به هستهٔ خود ساختهٔ RADA16 پرداختند و سلول‌های بنیادی عصبی را در این داربست‌ها کشت دادند (۲۲).

مطالعات مختلفی در این زمینه انجام شده است که نشان داده است با اضافه کردن این پپتیدها به داربست‌های خود ساخته می‌توان رفتار سلولی را بهبود بخشید (۲۴، ۲۳، ۱۱). IKVAV یکی از این توالی‌ها با اسیدهای آمینهٔ ایزولوسین، لیزین، والین، آلانین و والین می‌باشد که بر روی پایانهٔ C از بازوی بزرگ α_1 مولکول لامینین قرار دارد که باعث بهبود اتصال سلولی، رشد آکسونی، مهاجرت،

[1] Poly (L-lactic acid)
[2] Polyglycolic acid
[3] Polyethylene glycol
[4] Self-assembling peptide nanofiber

[Downloaded from shefayekhatam.ir on 2026-11-10]
[DOI: 10.18869/acadpub.shefa.4.2.55]

رگ‌زایی، تولید کلاژن نوع IV و رشد توموری می‌شود (۲۵-۲۷).

در مطالعات گذشته نشان داده شد که زیست موادهای تغییر شکل یافته با IKVAV می‌توانند الگوهای زیست‌شناسی را برای سلول‌های PC12 مهیا کنند. سطوح پلیمری پوشیده شده توسط پپتیدهای IKVAV باعث بهبود اتصال PC12 و بهبود رشد آکسونی آن‌ها می شود (۲۸، ۲۹). در ارتباط با استفاده از IKVAV جهت مطالعهٔ رفتار سلول‌های PC12 در دو محیط دو بعدی و سه بعدی نتایج متفاوتی به دست آمد به طوری که در محیط دو بعدی IKVAV باعث افزایش رشد آکسونی شده است اما در محیط سه بعدی باعث افزایش زنده ماندن سلول‌های PC12 شده است.

در این مطالعه جهت نشان دادن تمایز با استفاده از qPCR[5] از بیان دو ژن MAP2 (نشان دهندهٔ رشد آکسونی) و MeCP2 (نشان دهندهٔ نورون‌های بالغ و تشکیل سیناپس) نشان داده شد که در محیط سه بعدی کمتر رشد آکسونی صورت گرفته و بیشتر تمایز به سمت بالغ شدن نورون‌ها بوده است. همچنین در این مطالعه برای اولین بار نشان داده شد که تمایز نورونی فقط وابسته به ترکیب سیگنال نیست بلکه به ابعاد محیط کشت نیز وابسته است. ابعاد محیط کشت تعیین می‌کند که آیا سلول‌ها توسط یک جهت با سیگنال‌ها در تماس است و یا در تمامی جهت‌ها که خود بر آبشار پیامی تأثیرگذار است (۳۰).

تحقیقات جدید بر روی موتیف IKVAV نشان می‌دهد که تمایز نورونی بهبود پیدا کرده و همچنین ترمیم بافت مغز بعد از ۶ هفته پس از پیوند بهتر صورت گرفته است (۳۱، ۳۲). از این رو در این مطالعه یک داربست خود ساخته حاوی موتیف IKVAV از لامینین به‌عنوان یک داربست طراحی و جهت بررسی تکثیر و بقاء سلول‌های بنیادی عصبی به کار رفته شد.

مواد و روش‌ها

جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی جنینی

در این مطالعه ابتدا جنین‌های ۱۴ روزهٔ موش صحرایی از رحم جدا شدند و سلول‌های بنیادی جنینی موش صحرایی از ناحیهٔ برجستگی‌های عقده‌ای جدا شد (۳۳). سلول‌ها در محیط کشت نوروسفر DMEM/F12[6] که حاوی گلوتامین (Gibco) ۱٪، B27 supplement (Gibco) ۱٪، N2 supplement (Gibco) ۱٪ و فاکتور رشد اپیدرمی (۲۰ نانوگرم/میلی‌لیتر)-(Sigma) در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد، رطوبت ۹۵ درصد و دی‌اکسید کربن ۵ درصد کشت داده شدند. کشت‌های اولیهٔ نوروسفر ۷ تا ۱۰ روز بعد آمادهٔ کشت مجدد یا پاساژ شدند (۳۴).

شمارش تعداد نوروسفر

در روزهای سوم، هفتم و دهم تعداد نوروسفرها در ۵ ناحیه در ۶ خانه از پلیت ۹۶ خانه توسط میکروسکوپ معکوس و با بزرگنمایی X ۲۰ بررسی و یادداشت شد، این کار ۵ بار تکرار شد.

شمارش قطر نوروسفرها

اندازه‌گیری قطر نوروسفرها در روزهای سوم، ششم و دهم بعد از کشت نوروسفر با استفاده از لام نئوبار در زیر میکروسکوپ معکوس انجام شد.

بعد از پاساژ دوم، سلول‌ها در محیط‌های جدید به صورت زیر گروه‌بندی شدند.

گروه کشت دو بعدی (2D-culture): سلول‌ها در محیط کشت دو بعدی (شبیه به محیط کشت اولیه) کشت داده می‌شوند.

گروه پپتید نانوفیبری خود ساخته حاوی موتیف لامینین (SAPN-LM)[7]: سلول‌ها بر روی داربست متشکل از پوراماتریکس حاوی موتیف لامینین کشت داده می‌شوند.

کشت سه بعدی سلول‌ها در پپتید نانوفیبری خود ساخته حاوی موتیف لامینین

SAPN-LM طراحی شد و توسط شرکت GL Biochem چین سنتز گردید، غلظت SAPN-LM ۱٪ بود. جهت آماده‌سازی ابتدا به مدت نیم ساعت ورتکس شد و سپس با آب دیونیزه غلظت ۰/۳٪ تهیه شد. برای دومین بار و به مدت نیم ساعت ورتکس شد. برای گروه‌های مختلف، در هر خانه از ظرف کشت ۹۶ تایی، ۵۰ میکرولیتر از محلول موتیف لامینین ۰/۳٪ ریخته شد. سپس به آرامی با اضافه کردن محیط کشت به آن داربست تشکیل شد. جهت تنظیم کردن pH موتیف لامینین (ماهیت pH موتیف لامینین اسیدی می‌باشد) سه مرتبه در یک تعویض محیط انجام شد. پس از پاساژ تعداد ۵×۱۰^{۳} سلول به ۴ ناحیه از داربست تزریق شد.

بررسی تکثیر سلولی

جهت بررسی تکثیر سلولی از کیت MTS7 (Promega, USA, G3582) استفاده شد. سلول‌ها در روزهای اول و هفتم پس از کشت مورد آزمایش قرار گرفتند. به طور خلاصه ابتدا ۸۰ میکرولیتر از محلول رویی از هر چاهک را برداشته و دور ریخته و ۲۰ میکرولیتر از محلول کار MTS به محیط کشت حاوی سلول اضافه شد. سلول‌ها به مدت سه ساعت در معرض مواجهه با MTS در دمای ۳۷ درجه و به دور از نور قرار گرفته و سپس توسط دستگاه الایزا با طول موج ۴۹۰ نانومتر خوانده شد.

[5] Quantitative PCR
[6] Dulbeccos modified eagles medium
[7] Self-assembling peptide nanofiber containing laminin motif

[Downloaded from shefayekhatam.ir on 2026-11-10]
[DOI: 10.18869/acadpub.shefa.4.2.55]

علاوه بر گروه‌های ذکر شده یک گروه کنترل منفی با تعداد ۵ نمونه قرار داده که گروه کنترل منفی فقط حاوی DMEM/F12 می‌باشد که به آن کیت MTS اضافه می‌شود. سپس داده‌های به دست آمده از گروه‌های دیگر از میانگین گروه کنترل منفی کم می‌شود.

بررسی بقاء سلولی

آزمون بقاء سلولی توسط کیت (Molecular Probe, mp03224 LIVE/DEAD Viability/Cytotoxicity Kit) سنجیده شد. به طور خلاصه سلول‌های کشت شده در روزهای اول و هفتم پس از تزریق در SAPN-LM و همچنین کشت بر روی شرایط دو بعدی (غلظت ۰/۳٪ از داربست‌ها در این آزمایش مورد استفاده قرار گرفت و تعداد ۲×۱۰^{۴} سلول جهت سنجش بقاء سلولی در هر ول ۹۶ تایی به کار برده شد).

جهت سنجش بقاء سلولی فاکتور رشد از محیط حذف گردید و به جای آن ۱٪=FBS استفاده گردید و سپس با PBS شستشو داده شدند (۳۵). در مرحلهٔ بعد، محلولی حاوی ۲ میکرومول Calcein AM و ۴ میکرومول Ethd-1 به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق به سلول‌ها اضافه گردید. سپس با PBS شستشو انجام شد و با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت عکس تهیه شد. سپس تعداد سلول‌های زنده و مرده به کمک نرم افزار Infinity analyze software شمارش گردید.

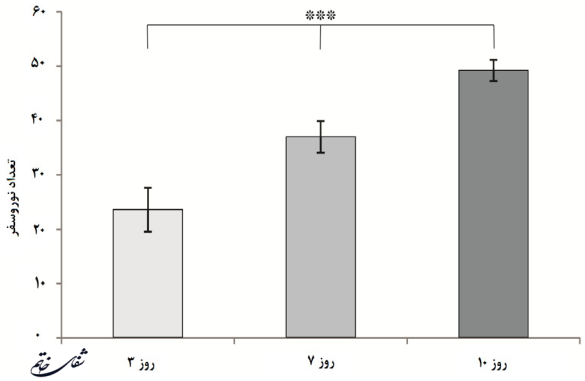
آنالیز آماری

داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار از میانگین نمایش داده شدند. با استفاده از آنالیز واریانس یکطرفه داده‌های مربوط به قطر و میانگین نوروسفر تجزیه و تحلیل شد. جهت بررسی بقاء و تکثیر سلولی بین دو گروه دو بعدی و موتیف لامینین از آزمون تی مستقل استفاده شد. با استفاده از آزمون Repeated Measure شمارش و قطر نوروسفر مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. داده‌ها با نرم افزار SPSS ورژن ۲۱ تجزیه و تحلیل شدند. سطح معنی‌داری $P<۰/۰۵$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

بررسی شمارش نوروسفر

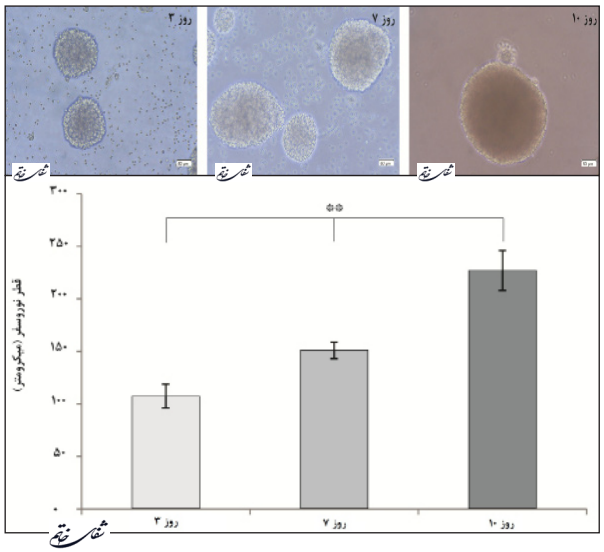
اولین پاساژ سلول‌ها بعد از حدود پنج الی هفت روز که سلول‌ها بیش از ۹۰ درصد کف ظرف کشت را پر کرده بودند، انجام شد (نمودار ۱). سلول‌های بنیادی مشتق شده از برجستگی‌های عقده‌ای موش صحرایی با سرعت زیاد تقسیم می‌شوند به طوری که بعد از اولین پاساژ سلولی زمان دو برابر شدن سلول‌ها تقریباً دو روز است. بررسی تعداد نوروسفرها در روزهای سوم، هفتم و دهم انجام گردید. نتایج نشان داد که میانگین تعداد نوروسفر در روز ۳ (۴/۰۳ ± ۲۳/۶) و در روز ۷ (۲/۹۱ ± ۳۷) بود. میانگین تعداد نوروسفر در روز ۱۰ به (۱/۹۲ ± ۴۹/۲) رسید. مطالعات آماری در مورد میانگین تعداد نوروسفرها نشان داد با گذشت زمان تعداد نوروسفرها افزایش می‌یابد به طوری که در هر روز نسبت به دیگر روزها تفاوت چشمگیری مشاهده شد. در روز سوم کمترین و در روز دهم بیشترین تعداد را داشتند ($P<۰/۰۱$، $F(۲، ۱۲)= ۸۶/۲۹$)-(نمودار ۱).



نمودار ۱- بررسی تعداد نوروسفر را در روزهای مختلف نشان می‌دهد. نتایج نشان داد که تعداد نوروسفر در طول ۱۰ روز به طور معنی‌داری افزایش می‌یابد. *** نشان دهندهٔ اختلاف معنی‌دار بین روزهای مختلف با سطح $P<۰/۰۰۱$ می‌باشد.

بررسی قطر نوروسفر

نتایج قطر نوروسفر در تصویر ۱ نشان داد که میانگین قطر نوروسفر در روز ۳ (میکرومتر ۱۱/۲۹ ± ۱۰۷/۳۶) بود که در روز ۷ به (میکرومتر ۷/۸۸ ± ۱۵۰/۹۱) تغییر یافت. میانگین قطر نوروسفر در روز ۱۰ (میکرومتر ۱۹/۰۳ ± ۲۲۷/۰۸) بود. بررسی آماری میانگین قطر نوروسفرها در روزهای سوم، هفتم و دهم نشان داد با گذشت زمان قطر نوروسفرها افزایش می‌یابد. در هر روز نسبت به دیگر روزها تفاوت چشمگیری مشاهده شد که در روز ۱۰ بیشترین قطر و روز ۳ کمترین قطر را نشان داد ($P<۰/۰۱$، $F(۲، ۱۲)=۹۹/۸۲$).

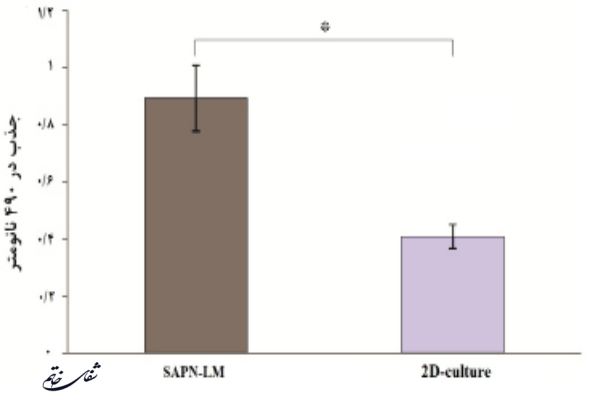


تصویر ۱- بررسی قطر نوروسفر را در روزهای مختلف نشان می‌دهد. نتایج نشان داد که قطر نوروسفر در طول ۱۰ روز به طور معنی‌داری افزایش می‌یابد. ** نشان دهندهٔ اختلاف معنی‌دار بین روزهای مختلف با سطح $P<۰/۰۱$ می‌باشد.

[Downloaded from shefayekhatam.ir on 2026-11-10]
[DOI: 10.18869/acadpub.shefa.4.2.55]

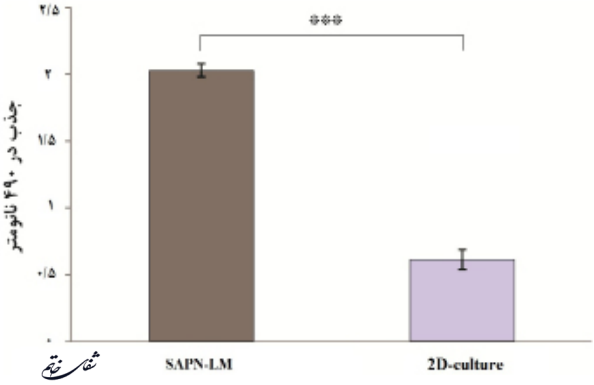
تکثیر سلولی

نتایج نشان داد که تکثیر سلولی در SAPN-LM در طول ۷ روز افزایش می‌یابد. نتایج به دست آمده از روز ۱ نشان داد که تکثیر سلولی به طور چشمگیری در گروه SAPN-LM (۰/۱۷ ± ۰/۸۹) نسبت به گروه دو بعدی (۰/۰۴ ± ۰/۴) افزایش داشت ($P<0/05$، df=۸، t=۲/۶۳-) (نمودار ۲).



نمودار ۲- بررسی تکثیر سلولی را در روز ۱ نشان می‌دهد. علامت * نشان دهندهٔ سطح معنی‌داری با $P<0/05$ می‌باشد.

نتایج به دست آمده از روز ۷ نشان داد که تکثیر سلولی در گروه SAPN-LM (۰/۰۴ ± ۲/۰۲) نسبت به گروه دو بعدی (۰/۰۷ ± ۰/۶۱) افزایش معنی‌داری داشت ($P<0/001$، df=۸، t=۱۵/۹۲-)(نمودار ۳).

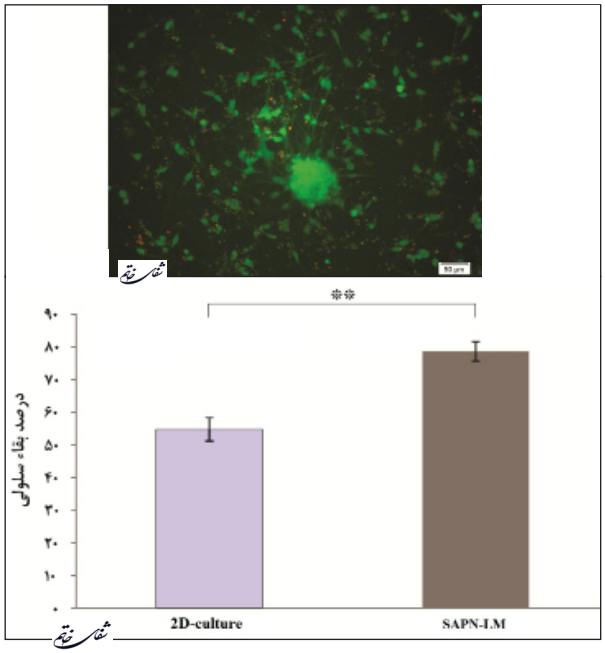


نمودار ۳- بررسی تکثیر سلولی را در روز ۷ نشان می‌دهد. علامت *** نشان دهندهٔ سطح معنی‌داری با $P<0/001$ می‌باشد.

بررسی بقاء سلولی

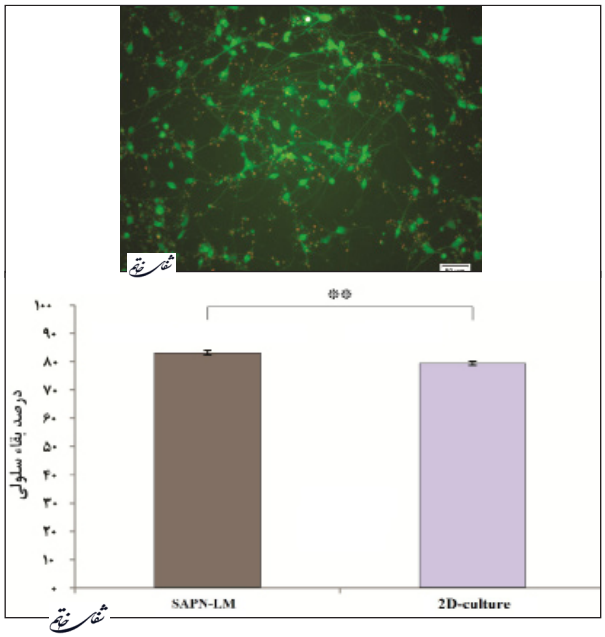
در این مطالعه بقاء سلولی در روزهای ۱ و ۷ اندازه‌گیری شد. درصد سلول‌های زنده در روز ۱ در گروه SAPN-LM (۶/۵۸ ± ۷۸/۶۵) نسبت به گروه‌های دو بعدی (۸ ± ۵۴/۷۳) بیشتر بود. گروه SAPN-LM با گروه دو بعدی در سطح ($P<0/01$، df=۸، t=۵/۱۵) اختلاف معنی‌دار داشت (تصویر ۲).

نتایج به دست آمده از درصد سلول‌های زنده در روز ۷ نشان داد که درصد بقاء سلولی در گروه SAPN-LM (۱/۸۸ ± ۸۳/۱۶) نسبت به دو بعدی (۱/۵۱ ± ۷۹/۴۱) بیشتر بود.



تصویر ۲- بررسی درصد بقاء سلولی را در روز ۱ نشان می‌دهد. علامت ** نشان دهندهٔ سطح معنی‌داری با $P<0/01$ می‌باشد.

درصد بقاء سلولی در گروه SAPN-LM نسبت به گروه دو بعدی نیز اختلاف معنی‌دار داشت ($P<0/01$، df=۸، t=۳/۴۲-) (تصویر ۳).



تصویر ۳- بررسی درصد بقاء سلولی را در روز ۷ نشان می‌دهد. علامت ** نشان دهندهٔ سطح معنی‌داری با $P<0/01$ می‌باشد.

بحث و نتیجه‌گیری

در پستانداران، سلول‌های بنیادی به‌عنوان یک منبعی از سلول‌های تمایز نیافته معرفی می‌شوند. سلول‌های بنیادی می‌توانند در بافت‌های مختلف در طول دورهٔ زندگی خود تجدید شوند. این سلول‌ها توانایی جایگزینی به سلول‌هایی که در اثر بیماری و یا آسیب از دست

[Downloaded from shefayekhatam.ir on 2026-11-10]
[DOI: 10.18869/acadpub.shefa.4.2.55]

رفته‌اند را دارند. سلول‌های بنیادی عصبی برای اولین بار توسط Reynolds و Weiss در سال ۱۹۹۲ در سیستم عصبی مرکزی پستانداران بالغ با استفاده از روش نورسفر توصیف شد (۳۶). با استفاده از این روش، جداسازی و تکثیر سلول‌های بنیادی عصبی از نواحی مختلف سیستم عصبی مرکزی جنین امکان‌پذیر می‌شود. سلول‌های بنیادی عصبی جنینی توانایی تمایز به سه ردهٔ سلولی (آستروسیت، نورون و الیگودندروسیت) را دارند.

آذری و همکاران در سال ۲۰۱۱ سلول‌های بنیادی عصبی جدا شده از برجستگی‌های عقده‌ای موش را با روش نوروسفر کشت دادند. آن‌ها در این مطالعه به معرفی ناحیهٔ برجستگی‌های عقده‌ای و تولید نوروسفر پرداختند (۳۴). در این مطالعه از سلول‌های بنیادی عصبی جدا شده از برجستگی‌های عقده‌ای جنین ۱۴ روزهٔ موش صحرایی برای اولین بار استفاده شد. نتایج به دست آمده از این تحقیق نشان داد که سلول‌های جدا شده از برجستگی‌های عقده‌ای توانایی تکثیر بالایی دارند و همچنین توانایی تشکیل نوروسفر را دارند. دلیل این موفقیت به خاطر جداسازی دقیق برجستگی‌های عقده‌ای به وسیلهٔ میکروسکوپ لوپ می‌باشد. از طرف دیگر در کشت اولیهٔ بسیاری از سلول‌های عصبی از هضم آنزیمی استفاده می‌شود درحالی‌که در روش مطالعهٔ ما فقط از هضم مکانیکی استفاده شد که تا حد زیادی از مرگ سلولی جلوگیری کرد (۱۶).

از آنجایی که توانایی خود بازسازی این سلول‌ها در این روش از کشت پس از پاساژ بالا می‌باشد، در مطالعهٔ حاضر فقط از فاکتور رشد اپیدرمی استفاده شد. از فاکتور رشد فیبروبلاستی نیز جهت رشد سلول‌های بنیادی عصبی در مطالعات پیشین استفاده شده است (۱۶، ۳۷). یکی از مکمل‌های مهم جهت کشت نوروسفر مکمل B27 می‌باشد که بقاء سلولی را در کشت اولیه افزایش می‌دهد و تکثیر سلولی را بیشتر می‌کند (۳۸). یکی دیگر از مکمل‌های کشت نوروسفری مکمل N2 می‌باشد که همراه با B27 حاوی مواد مغذی مانند انسولین، ترانسفرین و پوترسین می‌باشند (۳۷). در مطالعهٔ علیقلی و همکاران مقدار B27 سه برابر مقدار N2 استفاده شد (۱۶).

درحالی‌که در مطالعهٔ حاضر مقدار یک درصد از B27 (دو برابر مقدار N2) در نظر گرفته شد که بقاء و تکثیر قابل قبولی از کشت اولیه به دست آمد. مطالعات گذشته نشان دادند که داربست‌های نانوفیبر تشکیل شده از پپتیدهای خود ساخته سمیت سلولی ندارند و از رشد و اتصال سلولی انواع زیادی از پستانداران در محیط کشت حمایت می‌کند (۱۳، ۳۹). RADA16-I اثرات سمی ندارد و نه تنها از رشد سلول‌ها حمایت می‌کند بلکه در ترمیم بافت نیز شرکت می‌کند (۴۰). Cunha و همکاران در سال ۲۰۱۱ به بررسی سلول‌های بنیادی عصبی جدا شده از ناحیهٔ تحت بطنی موش بالغ در داربست سه بعدی از موتیف‌های کلاژن نوع ۶ (RADA16-RGD) و پپتیدهای هومینگ مغز استخوان (RADA16-BMHP1 and RADA16-BMHP2) پرداختند. نتایج آن‌ها نشان داد که تکثیر سلول‌های بنیادی عصبی به غلظت داربست‌های خود ساخته بستگی دارد به طوری که بیشترین میزان تکثیر در غلظت ۰/۵٪ مشاهده شد (۴۱).

مطالعهٔ Thonhoff و همکاران در سال ۲۰۰۸ نشان داد که غلظت‌های پایین پوراماتریکس محیط بهتری را برای کشت سلول‌های بنیادی عصبی جنین انسان فراهم می‌کنند (۴۲). در مطالعهٔ حاضر از غلظت‌های مختلف (۰/۱٪، ۰/۳٪، ۱۵٪، ۲۵٪) استفاده شد که بهترین غلظت جهت تشکیل داربست و همچنین تکثیر سلولی، غلظت ۰/۳٪ بود. توکل و همکاران با مطالعه بر روی یک داربست خودساخته حاوی موتیف بلند لامینین در سال ۲۰۱۶ نشان دادند که غلظت‌های پایین‌تر از این داربست به طور معنی‌داری بقاء سلولی را افزایش می‌دهند (۲۴). با توجه به نتایج به دست آمده و مقایسهٔ آن با نتایج پیشین می‌توان چنین استنباط نمود که غلظت‌های پایین از داربست‌های خود ساخته نتایج بهتری حاصل می‌شود.

از نتایج به دست آمده از تحقیق Chunha و همکاران می‌توان به تکثیر بیشتر سلول‌های بنیادی عصبی در محیط دو بعدی نسبت به داربست‌های خود ساخته اشاره کرد. آن‌ها علت این امر را چنین توضیح دادند که استفاده از داربست‌های خود ساخته بیشتر شبیه محیط بدن می‌باشد چرا که سلول‌های عصبی در محیط بدن توانایی تکثیر پایینی دارند (۴۱). نتایج به دست آمده از مطالعهٔ حاضر در مقایسهٔ تکثیر سلولی بین گروه دو بعدی و گروه SAPN-LM در روزهای ۱ و ۷ با نتایج Chunha و همکاران مغایرت داشت چرا که در تمامی روزها گروه داربست موتیف لامینین بیشتر از گروه دو بعدی بود.

بقاء سلول‌های بنیادی جدا شده از برجستگی‌های عقده‌ای موش صحرایی با استفاده از کیت Live/Dead انجام شد. نتایج نشان داد که در روز ۱ میزان بقاء سلولی در SAPN-LM به طور معنی‌داری بیشتر از گروه دو بعدی بود. Ortinau و همکاران در سال ۲۰۱۰ به بررسی تأثیر پوراماتریکس بر بقاء سلول‌های پیش‌ساز عصبی انسان پرداختند (۴۳). نتایج آن‌ها نشان داد که میزان بقاء سلولی از روز ۱ تا روز ۷ در پوراماتریکس به طور معنی‌داری بالاتر از شرایط دو بعدی است. آن‌ها نتیجه گرفتند که داربست سه بعدی پوراماتریکس از بقاء سلولی در طول تمایز حمایت می‌کند. در تحقیق دیگری مرادی و همکاران در سال ۲۰۱۲ گزارش کردند

[Downloaded from shefayekhatam.ir on 2026-11-10]
[DOI: 10.18869/acadpub.shefa.4.2.55]

کـه بقـاء سـلول‌های شـوان حاصـل از جنیـن انسـان در پوراماتریکـس بیشـتر از محیـط کشـت دو بعـدی می‌باشـد (۴۴). نتایـج بـه دسـت آمـده از ایـن تحقیـق در میـزان بقـاء سـلولی در روز ۱ در مقایسـه گـروه پوراماتریکـس بـا گـروه دو بعـدی بـا یافته‌هـای مطالعـات پیشـین موافـق بـود.

Ortinau و همـکاران اظهـار داشـتند کـه میـزان بقـاء سـلولی در روزهـای از پیـش تعییـن شـده در سیسـتم کشـت دو بعـدی تـا ۷۰ درصـد کاهـش مییابـد کـه بـا نتایـج مطالعـهٔ حاضـر مغایرت داشـت چـرا کـه افزایـش میـزان بقـاء سـلولی در محیـط دو بعـدی بـا گذشـت زمـان مشـاهده شـد. در مطالعـه‌ای توسـط Cheng و همـکاران در سـال ۲۰۱۳ نشـان دادنـد کـه بقـاء سـلولی در داربسـت پوراماتریکـس رضایـت بخـش بـوده اسـت (۳۵). در مطالعـهٔ حاضـر بقـاء سـلولی در SAPN-LM به‌طـور معنـی‌داری بیشـتر از دو بعـدی بـود کـه ایـن داربسـت می‌توانـد در مطالعـات مربـوط بـه بقـاء سـلولی معرفـی شـود.

Silva و همـکاران اظهـار داشـتند کـه در مقایسـه بقاء سـلولی بیـن سیسـتم کشـت دو بعـدی بـا هیـدروژل IKVAV تفـاوت معنـی‌داری وجـود نـدارد (۴۵)؛ درحالیکـه در مطالعـهٔ مـا در مقایسـهٔ بیـن SAPN-LM کـه در سـاختار آن از IKVAV اسـتفاده شـده اسـت بـا گـروه دو بعـدی در روز ۱ تفـاوت چشـمگیری وجـود داشـت. از طرفـی Silva و همـکاران پیشـنهاد کردنـد کـه پخـش شـدن بهتـر مـواد غذایـی، حضـور فاکتورهـای زیسـت فعـال و اکسـیژن رسـانی بهتـر در شـبکه‌های داربسـت‌های سـه بعـدی بـرای بقـاء سـلولی در زمان‌هـای طولانـی مفیـد می‌باشـد. افزایـش بقـاء سـلولی توسـط Mahoney نیـز در هیـدروژل پلـی اتیلـن گلیکـول توصیـف شـده اسـت (۴۶).

بـه طـور کلـی می‌تـوان چنیـن نتیجـه گرفـت کـه میـزان تکثیـر و بقـاء سـلولی در گـروه SAPN-LM نسـبت بـه دو بعـدی بهبـود پیـدا کـرده اسـت. بـا توجـه بـه نتایـج بـه دسـت آمـده می‌تـوان چنیـن اسـتنباط نمـود کـه SAPN-LM رفتـار سـلولی را بهبـود می‌بخشـد.

منابع

1. Jones LL, Oudega M, Bunge MB, Tuszynski MH. Neurotrophic factors, cellular bridges and gene therapy for spinal cord injury. J Physiol. 2001; 533(1): 83-9.

2. Beattie MS, Li Q, Bresnahan JC. Cell death and plasticity after experimental spinal cord injury. Prog Brain Res. 2000; 128: 9-21.

3. Huber AB, Schwab ME. Nogo-A, a potent inhibitor of neurite outgrowth and regeneration. Biol Chem. 2000; 381(5-6): 407-19.

4. Fawcett JW, Asher RA. The glial scar and central nervous system repair. Brain Res Bull. 1999; 49(6): 377-91.

5. Webb AA, Ngan S, Fowler D. Spinal cord injury II: Prognostic indicators, standards of care, and clinical trials. Can Vet J. 2010; 51(6): 598-604.

6. Alsberg E, Anderson KW, Albeiruti A, Rowley JA, Mooney DJ. Engineering growing tissues. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002; 99(19): 12025-30.

7. Rose FR, Oreffo RO. Bone tissue engineering: hope vs hype. BBRC. 2002; 292(1): 1-7.

8. Avellino AM, Hart D, Dailey AT, Mackinnon M, Ellegala D, Kliot M. Differential macrophage responses in the peripheral and central nervous system during wallerian degeneration of axons. Exp Neurol. 1995; 136(2): 183-98.

9. Blesch A, Tuszynski MH. Cellular GDNF delivery promotes growth of motor and dorsal column sensory axons after partial and complete spinal cord transections and induces remyelination. J Comp Neurol. 2003; 467(3): 403-17.

10. Khojasteh A, Behnia H, Dashti SG, Stevens M. Current trends in mesenchymal stem cell application in bone augmentation: a review of the literature. J Oral Maxillofac Surg. 2012; 70(4): 972-82.

11. Zhang S, Gelain F, Zhao X. Designer self-assembling peptide nanofiber scaffolds for 3D tissue cell cultures. Semin Cancer Biol. 2005; 15(5): 413-20.

12. Mohammad Sadeghi S, Sahab Negah S, Khaksar Z, Kazemi H, Aligholi H. Laminin position as one of the important components of the extracellular matrix in tissue engineering of nervous system. Shefaye Khatam. 2014; 2(1): 69-74.

13. Zhang S, Holmes T, Lockshin C, Rich A. Spontaneous assembly of a self-complementary oligopeptide to form a stable macroscopic membrane. Proc Natl Acad Sci U S A. 1993; 90(8): 3334-8.

14. Beniash E, Hartgerink JD, Storrie H, Stendahl JC, Stupp SI. Self-assembling peptide amphiphile nanofiber matrices for cell entrapment. Acta Biomater. 2005; 1(4): 387-97.

15. Haines-Butterick L, Rajagopal K, Branco M, Salick

[Downloaded from shefayekhatam.ir on 2026-11-10]

[DOI: 10.18869/acadpub.shefa.4.2.55]

D, Rughani R, Pilarz M, et al. Controlling hydrogelation kinetics by peptide design for three-dimensional encapsulation and injectable delivery of cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007; 104(19): 7791-6.

16. Aligholi H, Rezayat SM, Azari H, Ejtemaei Mehr S, Akbari M, Modarres Mousavi SM, et al. Preparing neural stem/progenitor cells in PuraMatrix hydrogel for transplantation after brain injury in rats: A comparative methodological study. Brain Res. 2016. 1642:197-208.

17. Lu T, Chen T, Zhai Y, Ma Y, Xiao Y. Designer functionalized self-assembling peptide scaffolds for adhesion, proliferation, and differentiation of MC3T3-E1. Soft Matter. 2014; 12(1): 79-87.

18. Sun L, Zhao X. A self-assembling peptide RADA16-I integrated with spider fibroin uncrystalline motifs. Int J Nanomedicine. 2012; 7: 571-80.

19. Hamley IW. Self-assembly of amphiphilic peptides. Soft Matter. 2011; 7(9): 4122-38.

20. Guo J, Leung KK, Su H, Yuan Q, Wang L, Chu TH, et al. Self-assembling peptide nanofiber scaffold promotes the reconstruction of acutely injured brain. Nanomedicine. 2009; 5(3): 345-51.

21. Tavakol S, Aligholi H, Eshaghabadi A, Modarres Mousavi SM, Ai J, Rezayat M. Investigation on the motor recovery effect of a self-assembling nanofiber in the spinal cord injury model in rat. Shefaye Khatam. 2014; 2(2): 41-6.

22. Gelain F, Bottai D, Vescovi A, Zhang S. Designer self-assembling peptide nanofiber scaffolds for adult mouse neural stem cell 3-dimensional cultures. PloS one. 2006; 1: e119.

23. Narmoneva DA, Oni O, Sieminski AL, Zhang S, Gertler JP, Kamm RD, et al. Self-assembling short oligopeptides and the promotion of angiogenesis. Biomaterials. 2005; 26(23): 4837-46.

24. Tavakol S, Saber R, Hoveizi E, Tavakol B, Aligholi H, Ai J, et al. Self-assembling peptide nanofiber containing long motif of laminin induces neural differentiation, tubulin polymerization, and neurogenesis: in vitro, ex vivo, and in vivo studies. Mol Neurobiol. 2015: 1-12.

25. Huber M, Heiduschka P, Kienle S, Pavlidis C, Mack J, Walk T, et al. Modification of glassy carbon surfaces with synthetic laminin-derived peptides for nerve cell attachment and neurite growth. J Biomed Mater Res. 1998; 41(2): 278-88.

26. Tashiro K, Sephel GC, Weeks B, Sasaki M, Martin GR, Kleinman HK, et al. A synthetic peptide containing the IKVAV sequence from the A chain of laminin mediates cell attachment, migration, and neurite outgrowth. J Biol Chem. 1989; 264(27): 16174-82.

27. Kleinman HK, Sephel GC, Tashiro K, Weeks BS, Burrous BA, Adler SH, et al. Laminin in neuronal development. Ann N Y Acad Sci. 1990; 580: 302-10.

28. Ranieri JP, Bellamkonda R, Bekos EJ, Gardella Jr JA, Mathieu HJ, Ruiz L, et al. Spatial control of neuronal cell attachment and differentiation on covalently patterned laminin oligopeptide substrates. Int J Dev Neurosci. 1994; 12(8): 725-35.

29. Massia SP, Holecko MM, Ehteshami GR. In vitro assessment of bioactive coatings for neural implant applications. J Biomed Mater Res A. 2004; 68(1): 177-86.

30. Li Q, Chau Y. Neural differentiation directed by self-assembling peptide scaffolds presenting laminin-derived epitopes. J Biomed Mater Res A. 2010; 94(3): 688-99.

31. Stanwood GD, Parlaman JP, Levitt P. Anatomical abnormalities in dopaminoceptive regions of the cerebral cortex of dopamine D1 receptor mutant mice. J Comp Neurol. 2005; 487(3): 270-82.

32. Cheng TY, Chen MH, Chang WH, Huang MY, Wang TW. Neural stem cells encapsulated in a functionalized self-assembling peptide hydrogel for brain tissue engineering. Biomaterials. 2013; 34(8): 16. doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.11.043.

33. Sahab Negah S, Mohammad Sadeghi S, Kazemi H, Modarres Mousavi SM, Aligholi H. Effect of injured brain extract on proliferation of neural stem cells cultured in 3-dimensional environment. Shefaye Khatam. 2015; 3(1): 49-56.

34. Azari H, Sharififar S, Rahman M, Ansari S, Reynolds BA. Establishing embryonic mouse neural stem cell culture using the neurosphere assay. J Vis Exp. 2011; (47): pii: 2457. doi: 10.3791/2457.

35. Cheng TY, Chen MH, Chang WH, Huang MY, Wang TW. Neural stem cells encapsulated in a functionalized self-assembling peptide hydrogel for brain tissue engineering. Biomaterials. 2013; 34(8): 2005-16. doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.11.043.

36. Reynolds BA, Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. Science. 1992; 255(5052): 1707-10.

[Downloaded from shefayekhatam.ir on 2026-11-10]

[DOI: 10.18869/acadpub.shefa.4.2.55]

37. Svendsen CN, Fawcett JW, Bentlage C, Dunnett SB. Increased survival of rat EGF-generated CNS precursor cells using B27 supplemented medium. Exp Brain Res. 1995; 102(3): 407-14.

38. Babu H, Cheung G, Kettenmann H, Palmer TD, Kempermann G. Enriched monolayer precursor cell cultures from micro-dissected adult mouse dentate gyrus yield functional granule cell-like neurons. PLoS One. 2007; 2(4): e388. doi.org/10.1371/journal.pone.0000388.

39. Holmes TC, de Lacalle S, Su X, Liu G, Rich A, Zhang S. Extensive neurite outgrowth and active synapse formation on self-assembling peptide scaffolds. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000; 97(12): 6728-33.

40. Ellis-Behnke RG, Liang YX, You SW, Tay DK, Zhang S, So KF, et al. Nano neuro knitting: peptide nanofiber scaffold for brain repair and axon regeneration with functional return of vision. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006; 103(13): 5054-9.

41. Cunha C, Panseri S, Villa O, Silva D, Gelain F. 3D culture of adult mouse neural stem cells within functionalized self-assembling peptide scaffolds. Int J Nanomedicine. 2011; 6: 943-55.

42. Thonhoff JR, Lou DI, Jordan PM, Zhao X, Wu P. Compatibility of human fetal neural stem cells with hydrogel biomaterials in vitro. Brain Res. 2008; 1187: 42-51.

43. Ortinau S, Schmich J, Block S, Liedmann A, Jonas L, Weiss DG, et al. Effect of 3D-scaffold formation on differentiation and survival in human neural progenitor cells. Biomed Eng Online. 2010; 9: 70. doi: 10.1186/1475-925X-9-70.

44. Moradi F, Bahktiari M, Joghataei MT, Nobakht M, Soleimani M, Hasanzadeh G, et al. BD PuraMatrix peptide hydrogel as a culture system for human fetal Schwann cells in spinal cord regeneration. J Neurosci Res. 2012; 90(12): 2335-48.

45. Silva GA. Neuroscience nanotechnology: progress, opportunities and challenges. Nat. Rev. Neurosci. 2006; 7(1): 65-74.

46. Mahoney MJ, Anseth KS. Three-dimensional growth and function of neural tissue in degradable polyethylene glycol hydrogels. Biomaterials. 2006; 27(10): 2265-74.

[Downloaded from shefayekhatam.ir on 2026-11-10]

[DOI: 10.18869/acadpub.shefa.4.2.55]