Effect of Injured Brain Extract on Proliferation of Neural Stem Cells Cultured in 3-Dimensional Environment

Sajad Sahab Negah[1, 2], Shahin Mohammad Sadeghi[3], Hadi Kazemi[1, 4], Sayed Mostafa Modarres Mousavi[1], Hadi Aligholi[1, 5*]

[1]Shefa Neuroscience Research Center, Khatam Alanbia Hospital, Tehran, Iran.

[2]Histology and Embryology Group, Basic Science Department, Faculty of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran.

[3]Department of Plastic and Reconstructive Surgery, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

[4]Pediatric Department, Medical Faculty, Shahed University, Tehran, Iran.

[5] Neuroscience Group, School of Advanced Technologies in Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Article Info:

Received: 27 Oct 2014 *Accepted*: 29 Nov 2014

ABSTRACT

Introduction: After primary brain injury, secondary mechanisms are activated and lead to releasing of various supportive and neurotrophic factors in injured tissues. The effect of the new environment on neurogenesis, proliferation, and survival of stem cells needs more investigations. The aim of the present study was to evaluate the effect of injured brain extract on proliferation of embryonic rat neural stem cells (NSCs). ***Materials and Methods:*** NSCs were isolated from ganglionic eminences of embryonic rat then cultured as neurospheres. Next, cells were seeded in PuraMatrix scaffold as 3-dimension culture. Based on the medium content, cells were divided into 4 groups: with growth factor, without growth factor, without growth factor + intact brain extract, and without growth factor + injured brain extract. Proliferation assay was done by evaluation of the DiI labeled cells and the survival assay was carried out by MTS test 10 days later. For preparation of the injured brain extract, a rat brain injury model was utilized and the extract was collected 48 hours after brain injury. ***Results:*** The results showed that NSCs derived ganglionic eminence of embryonic rat had high proliferation ability. DiI-positive cells and MTS test showed a higher tendency of the proliferation and survival of NSCs in the without growth factor + injured brain extract and growth factor groups compared to the without growth factor and without growth factor + intact brain extract groups. ***Conclusion:*** Our results indicated a possible positive impact of injured brain extract on survival and proliferation of rat embryonic neural stem cells. Further studies are needed to investigate our preliminary findings in details.

Key words:

1. Neural Stem Cells
2. Brain Injuries
3. Tissue Extracts
4. RADA16-I

*** *Corresponding Author:*** Hadi Aligholi

E-mail: *hadialigholi@yahoo.com*

اثر عصارهٔ مغز آسیب دیده بر روی تکثیر سلول‌های بنیادی عصبی کشت شده در محیط سه بعدی

سجاد سحاب نگاه[۱،۲]، شاهین محمد صادقی[۳]، هادی کاظمی[۱،۴]، سید مصطفی مدرس موسوی[۱]، هادی علیقلی[۱،۵*]

[۱]مرکز تحقیقات علوم اعصاب شفا، بیمارستان خاتم الانبیاء، تهران، ایران.
[۲]بخش بافت شناسی و جنین شناسی، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران.
[۳]گروه جراحی پلاستیک و ترمیمی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.
[۴]بخش اطفال، دانشکده پزشکی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران.
[۵]گروه علوم اعصاب، دانشکده فن آوری‌های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

اطلاعات مقاله:
تاریخ دریافت: ۵ آبان ۱۳۹۳
تاریخ پذیرش: ۸ آذر ۱۳۹۳

چکیده

مقدمه: پس از آسیب اولیهٔ بافت مغز، مکانیسم‌های ثانویه‌ای فعال می‌شوند و منجر به آزادسازی فاکتورهای حمایتی و نوروتروفیک مختلف در بافت‌های آسیب دیده می‌گردند. تأثیر این محیط جدید بر نورون‌زایی، تکثیر و بقاء سلول‌های بنیادی نیاز به بررسی‌های بیشتری دارد. هدف از مطالعهٔ حاضر بررسی تأثیر عصارهٔ مغز آسیب دیده بر تکثیر سلول‌های بنیادی عصبی جنینی موش صحرایی بود. **مواد و روش‌ها:** سلول‌های بنیادی عصبی از برجستگی‌های عقده‌ای جنین موش صحرایی جدا شدند، سپس به عنوان نوروسفر کشت داده شدند. در مرحلهٔ بعد، سلول‌ها در داربست پوراماتریکس به عنوان کشت سه بعدی، کشت داده شدند. بر اساس محتوای محیط کشت، سلول‌ها به ۴ گروه: با فاکتور رشد، فاقد فاکتور رشد، فاقد فاکتور رشد + عصارهٔ مغز سالم و فاقد فاکتور رشد + عصارهٔ مغز آسیب دیده، تقسیم شدند. ارزیابی تکثیر توسط مشاهدهٔ سلول‌های مشخص شده با DiI انجام شد و سنجش بقاء توسط آزمایش MTS پس از ۱۰ روز انجام گردید. جهت آماده سازی عصارهٔ مغز آسیب دیده، از یک مدل آسیب مغزی موش صحرایی استفاده گردید و عصاره ۴۸ ساعت پس از آسیب مغزی جمع آوری شد. **یافته‌ها:** نتایج نشان دادند که سلول‌های بنیادی عصبی مشتق شده از برجستگی‌های عقده‌ای جنینی موش صحرایی، توانایی تکثیر بالایی دارند. سلول‌های DiI مثبت و آزمایش MTS تمایل بالاتری را به تکثیر و بقاء سلول‌های بنیادی عصبی در گروه‌های فاقد فاکتور رشد + عصارهٔ مغز آسیب دیده و حاوی فاکتور رشد نسبت به گروه‌های فاقد فاکتور رشد و فاقد فاکتور رشد + عصارهٔ مغز سالم، نشان دادند. **نتیجه گیری:** نتایج ما یک اثر مثبت احتمالی عصارهٔ مغز آسیب دیده را بر روی بقاء و تکثیر سلول‌های بنیادی عصبی جنینی موش صحرایی نشان داد. مطالعات بیشتر به منظور بررسی جزئیات یافته‌های اولیهٔ ما مورد نیاز است.

کلید واژه‌ها:
۱. سلول‌های بنیادی عصبی
۲. آسیب‌های مغزی
۳. عصاره‌های بافتی
۴. پوراماتریکس

* **نویسنده مسئول:** هادی علیقلی
آدرس الکترونیکی: *hadialigholi@yahoo.com*

مقدمه

آسیب مغزی پس از ضربه[1] در اثر یک ضربهٔ بیرونی و ناگهانی رخ می‌هد و در اکثر مواقع منجر به اختلالات حرکتی و شناختی می‌شود (۲ ،۱). ضربه‌های فیزیکی به بافت مغز منجر به مرگ سلول‌های از بین رفته در بافت زیرین می‌شوند و متعاقب آن نیز مرگ سلول‌های آپوپتوتیک[2] در اطراف بافت در اثر چندین رویداد مانند ادم، ایسکمی و افزایش رادیکال‌های آزاد رخ می‌دهد (۳).

در آسیب اولیه و ثانویه پاسخ گلیالی آغاز می‌شود، به طوری‌که باقی ماندهٔ بافت و سلول را در محل آسیب به طور کامل پاک می‌کند. اجزای سلولی جوشگای گلیالی[3] شامل آستروسیت‌های واکنشی[4] و میکروگلیاهای فعال شده[5] می‌باشد. آستروسیت‌های واکنشی، فاکتورهای تغذیه‌ای ترشح می‌کنند و میکروگلیاهای فعال شده همراه با ماکروفاژهای مشتق شده از مونوسیت بافت‌های مرده را پاک می‌کنند. هر چند، اجزای خارج سلولی جوشگای گلیالی از قبیل پروتئوگلیکان‌های کندروئتین سولفات[6] و پروتئین نوگو[7] در اطراف محل آسیب تشکیل می‌شوند و منجر به مهار گسترش رشد زواید نورونی می‌شوند، بنابراین محدودیت در ترمیم مشاهده می‌شود (۴). از طرفی تحقیقات مختلفی نشان داده‌اند که در مغز، فرایندهای نورون‌زایی و عروق‌زایی بعد از ضربه به سر اتفاق می‌افتد (۶ ،۵).

نگهداری وضعیت تمایزی و تکثیر سلول‌های بنیادی به ریز محیطی که سلول‌های بنیادی در آن قرار دارند بستگی دارد. بنابراین برداشتن عوامل ریز محیطی خاص ممکن است سلول‌ها را به سمت تمایز سوق دهد و یا بالعکس قرار گرفتن سلول در ریز محیط خاص منجر به تکثیر آن بدون تمایز یافتن شود. فراهم کردن محیطی جهت رشد سلول‌های بنیادی با استفاده از فاکتورهای رشد، پروتئین‌های ماتریکس، عصاره‌های بافتی و غیره، از موفقیت‌های چشمگیر در توانایی بازسازی سلول‌ها می‌باشد.

در بعضی از مواقع نگهداری ارتباط بین سلول‌ها با همدیگر جهت رشد انواع سلول‌های تمایز نیافته اقدامی حیاتی است. استفاده از عصاره‌های بافتی مانند عصارهٔ هیپوفیز گاوی یا عصارهٔ جنین جوجه، در بیشتر مواقع به عنوان مکمل‌های رشد به عنوان یک استراتژی جدید جهت رشد و بقاء سلولی کاربرد دارد (۷).

در چند دههٔ اخیر، پیوند سلول‌های بنیادی یک روش امیدوار کننده برای ترمیم بافت مغز آسیب‌دیده محسوب می‌شود. سلول‌های بنیادی عصبی از مناطق مختلف سیستم عصبی جنینی و بالغ جدا می‌شوند. این سلول‌ها توانایی تمایز به انواع سلول‌های عصبی مانند نورون، آستروسیت و الیگودندروست را دارند (۹ ،۸). در طول رشد و نمو[8] در قسمت شکمی تلنسفالون[9]، برجستگی‌های عقده‌ای میانی، جانبی و خلفی[10] قرار دارند که تکثیر در این نواحی صورت می‌گیرد (۱۰). کشت و جداسازی سلول‌های بنیادی عصبی مشتق شده از برجستگی‌های عقده‌ای موش توسط آذری و همکاران پیش از این معرفی شده است (۱۱). لازم به ذکر است که در این مطالعه از برجستگی‌های عقده‌ای جنین موش صحرایی ۱۴ روزه استفاده گردید.

به علاوه سیستم عصبی مرکزی دارای شبکه‌هایی از نورون‌ها و سلول‌های گلیال می‌باشد که علاوه بر این ساختارها حاوی یک ماتریکس سه بعدی خارج سلولی نیز می‌باشد. علی‌رغم اینکه ماتریکس خارج سلولی ۱۰ الی ۲۰ درصد حجم مغز را تشکیل می‌دهد، کمتر مورد توجه قرار گرفته است. ماتریکس خارج سلولی از لحاظ شیمیایی منبع انواع مولکول‌های پیام رسان است که رشد، فعالیت و بقاء سلولی را تنظیم می‌کنند (۱۳ ،۱۲).

بنابراین در مطالعات In vitro جهت نزدیک شدن به حالت طبیعی بهتر است که سلول‌ها در محیط سه بعدی کشت داده شوند. در این زمینه، مهندسی بافت با معرفی و به کارگیری انواع داربست‌ها می‌تواند کمک کننده باشد. استفاده از داربست‌ها به همراه سلول یا بدون سلول چالش‌ها و موفقیت‌هایی را در تحقیقات به همراه داشته است (۱۵ ،۱۴).

مواد زیادی جهت تولید ماتریکس خارج سلولی به کار می‌رود که از آن جمله می‌توان به پلی‌مرهای طبیعی مانند کلاژن، فیبرین، آگاروز و پلی‌مرهای سنتزی مانند پلی‌هیدروکسیل اسید و پلی وینیل کلراید و غیره اشاره نمود (۱۷ ،۱۶). پپتیدهای خودساخته[11] می‌توانند ساختارهای سه بعدی در مقیاس نانو تشکیل دهند. از مزیت‌های این داربست‌ها عدم تحریک پاسخ ایمنی از سوی میزبان، پس از پیوند است (۱۹ ،۱۸).

یکی از داربست‌های خودساخته، پوراماتریکس[12] (RADA16-I) می‌باشد؛ این داربست یک پپتید ۱۶ اسیدآمینه‌ای است که پس از مواجهه با محیط‌های یونی توانایی بسیار خوبی در تشکیل داربست سه بعدی (شبیه به ماتریکس خارج سلولی طبیعی بدن) دارد، که قطر فیبرهای آن در حدود ۱۰ نانومتر است و اندازهٔ منافذ بین فیبرها در حدود ۱۰۰ نانومتر است (۲۱ ،۲۰). در این مطالعه با هدف بررسی پاسخ سلول‌ها به عصاره‌های بافتی در محیطی شبیه به محیط بدن، از پوراماتریکس استفاده گردید.

بنابراین با توجه به اینکه پس از آسیب مغزی یکسری فاکتورهای رشد در محل آسیب ترشح می‌شود و همچنین ماتریکس خارج سلولی، خود دارای عوامل رشد و بقاء می‌باشد، این تحقیق به بررسی اثر عصارهٔ مغز[13] آسیب‌دیده بر تکثیر سلول‌های بنیادی عصبی جنینی در داربست سه بعدی می‌پردازد.

[1] Traumatic brain injury
[2] Apoptotic cells
[3] Glial scar
[4] Reactive Astrocytes
[5] Activated microglia
[6] Chondroitin sulphate proteoglycans (CSPGs)
[7] Nogo protein
[8] Development
[9] Ventral telencephalon
[10] the medial (MGE), lateral (LGE) and caudal (CGE) ganglionic eminences
[11] Self-assembling peptides (SAP)
[12] Puramatrix
[13] Brain tissue extract

مواد و روش‌ها

طراحی مطالعه

در این مطالعه ابتدا سلول‌های بنیادی جنینی موش صحرایی جداسازی و به روش کشت نوروسفر در محیط دو بعدی تخلیص شدند سپس سلول‌ها وارد محیط سه بعدی شده و در یکی از ۴ گروه زیر قرار گرفتند (۴ کشت در هر گروه):

- **گروه محیط کشت حاوی فاکتور رشد:** محیط این گروه، محیط کشت نوروسفر حاوی فاکتور رشد اپیدرمی[14] (۲۰ نانوگرم/میلی‌لیتر) بود.
- **گروه محیط کشت فاقد فاکتور رشد:** محیط این گروه، محیط کشت نوروسفر فاقد فاکتور رشد اپیدرمی بود.
- **گروه محیط کشت فاقد فاکتور رشد + عصارهٔ مغز سالم:** محیط این گروه، محیط کشت نوروسفر فاقد فاکتور رشد اپیدرمی و حاوی عصارهٔ مغز سالم به میزان ۲ درصد بود.
- **گروه محیط کشت فاقد فاکتور رشد + عصارهٔ مغز آسیب‌دیده:** محیط این گروه، محیط کشت نوروسفر فاقد فاکتور رشد اپیدرمی و حاوی عصارهٔ مغز آسیب‌دیده به میزان ۲ درصد بود.

جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی جنینی

جنین‌های ۱۴ روزهٔ موش صحرایی از رحم جدا شدند و مغز آن‌ها به طور کامل جدا گردید. سپس در زیر میکروسکوپ، ناحیهٔ برجستگی‌های عقده‌ای[15] جدا شد و به میکروتیوب حاوی فسفات بافر سالین[16] سرد منتقل شد. نمونه‌ها توسط تیغ بیستوری و پیپتاژ هضم مکانیکی شدند. سلول‌ها در محیط‌کشت نوروسفر DMEM/F12[17] (Gibco) که حاوی گلوتامین (Gibco) ۱٪، B27 supplement (Gibco) ۱٪، N2 supplement (Gibco) ۱٪ و فاکتور رشد اپیدرمی (۲۰ نانوگرم/میلی‌لیتر)-(Sigma) بود در درون انکوباتور با دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد، رطوبت ۹۵ درصد و دی اکسید کربن ۵ درصد کشت داده شدند.

رنگ آمیزی DiI

به منظور تشخیص دقیق تر تعداد سلول‌ها در کشت سه بعدی، سلول‌ها با رنگ حیاتی DiI[18] رنگ شدند و سپس از آن‌ها در ۳، ۷ و ۱۰ روز پس از کشت، به وسیلهٔ میکروسکوپ فلورسنت عکس تهیه گردید. جهت رنگ آمیزی با DiI، سلول‌ها پس از تشکیل نوروسفر در روز ۷ پاساژ داده شدند و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد با ۳ میکروگرم/میلی‌لیتر رنگ حیاتی DiI انکوبه شدند. سپس سلول‌ها با فسفات بافر سالین شستشو و در محیط کشت نوروسفر قرار گرفتند و آمادهٔ کشت سه بعدی شدند.

کشت سه بعدی سلول‌ها در پوراماتریکس

ابتدا پوراماتریکس ۱٪ را به مدت نیم ساعت ورتکس کرده و سپس با آب دیونیزه از آن غلظت ۰/۳٪ تهیه کرده و به مدت نیم ساعت ورتکس شد. برای گروه‌های مختلف، در هر خانه از ظرف کشت ۹۶ تایی، ۵۰ میکرولیتر از محلول پوراماتریکس ۰/۳٪ ریخته شد. سپس به آرامی با اضافه کردن محیط کشت به آن، داربست تشکیل شد. جهت تنظیم کردن pH پوراماتریکس (ماهیت pH پوراماتریکس اسیدی می‌باشد) سه مرتبه در یک ساعت تعویض محیط انجام شد. پس از پاساژ و مواجههٔ سلول با رنگ DiI با استفاده از سرنگ هامیلتون تعداد ۵×۱۰۳ سلول به ۴ ناحیه از داربست تزریق شد. عکس‌های فلوروسنت از سلول‌های تزریق شده در روزهای ۱ و ۱۰ گرفته شدند.

تهیه عصارهٔ مغز

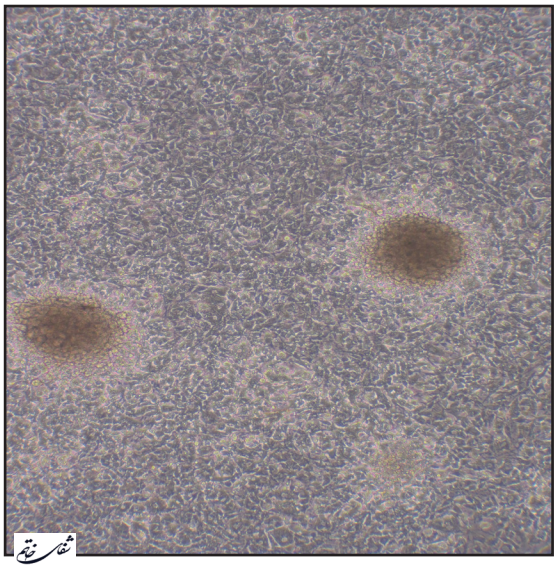
عصارهٔ بافتی از مغز موش‌های صحرایی سالم[19] و آسیب‌دیده[20] گرفته شد. جهت ایجاد آسیب مغزی موش‌های صحرایی بالغ نژاد ویستار با وزن ۲۵۰ گرم با استفاده از کتامین هیدروکلراید (۷۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) و زایلازین (۵ میلی‌گرم/کیلوگرم) بیهوش شدند. سپس پوست سر از خط وسط برش داده شد و در مختصات (ML=-۱/۵ mm[21]، AP=۰ mm[22]) طبق اطلس پاکسینوس (۲۲) توسط متهٔ دندان‌پزشکی سوراخی در جمجمه ایجاد شد. بعد از آن با استفاده از سرسوزن[23] (شمارهٔ ۲۲)، به عمق ۲ میلی‌متر آسیب از نوع نفوذی[24]، ایجاد گردید. سپس پوست سر حیوان بخیه زده شد و حیوان به قفسش برگردانده شد. ۴۸ ساعت بعد، حیوان بیهوش شد و پس از خارج کردن کامل مغز، ناحیهٔ قشر صدمه دیده برداشته شد و به یک میکروتیوب حاوی بید استریل منتقل گردید. بافت‌ها به مدت نیم ساعت ورتکس شدند و سپس ۱ سی سی محیط حاوی ۲ درصد آنتی بیوتیک پنی‌سیلین/استرپتومایسین به آن‌ها اضافه شد و تا یکنواخت شدن کامل، بافت‌ها ورتکس شدند و سپس در دور ۱۰۰۰۰ rpm در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردیدند. پس از آن، محلول رویی حاوی عصارهٔ مغز به دمای ۲۰- درجهٔ سانتی‌گراد انتقال یافت (۲۳).

جهت تهیهٔ عصارهٔ مغز سالم، موش‌های صحرایی سالم بیهوش و کشته شدند و پس از درآوردن مغز آن‌ها، ناحیهٔ مشابه ناحیهٔ آسیب دیده در موش‌های دچار آسیب مغزی، جداسازی شد و به روش ذکر شده در بالا عصاره تهیه گردید.

بررسی بقاء سلولی

بقاء سلولی به وسیلهٔ اندازه‌گیری فورمازان تولید شده از احیای MTS[25] محاسبه شد. ۱۰ روز پس از کشت سه بعدی سلول‌ها و درمان آن‌ها متناسب با گروه مربوطه، ۲۰ میکرولیتر محلول MTS (براساس دستورالعمل شرکت سازنده استفاده گردید) به محیط کشت اضافه گردید و سپس به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجهٔ

[14] Epidermal growth factor
[15] Ganglionic Eminences
[16] Phosphate buffered saline (PBS)
[17] Dulbeccos Modified Eagles Medium
[18] 1,1′-Dioctadecyl-3,3,3′,3′-tetramethylindocarbocyanine perchlorate
[19] Intact
[20] Injured
[21] Middle-lateral
[22] Anterior-posterior
[23] Needle
[24] Penetrating injury
[25] The MaxSignal Methyltestosterone



تصویـر ۱- بررسـی میـزان تکثیر سـلولی. نوروسـفرهای مشـتق شـده از برجسـتگی‌های عقـده‌ای جنیـن مـوش صحرایـی ۱۴ روزه در ۷ روز پـس از کشـت (۱۰x).

سانتی‌گراد، دور از نور انکوبه شد. سپس نتایج به دست آمده با قرائت‌گر الایزا در طول موج ۴۹۰ نانومتر ثبت گردید.

آنالیز آماری

با استفاده از آنالیز واریانس یکطرفه، داده‌ها مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار بیان شدند و میزان $P<۰/۰۵$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

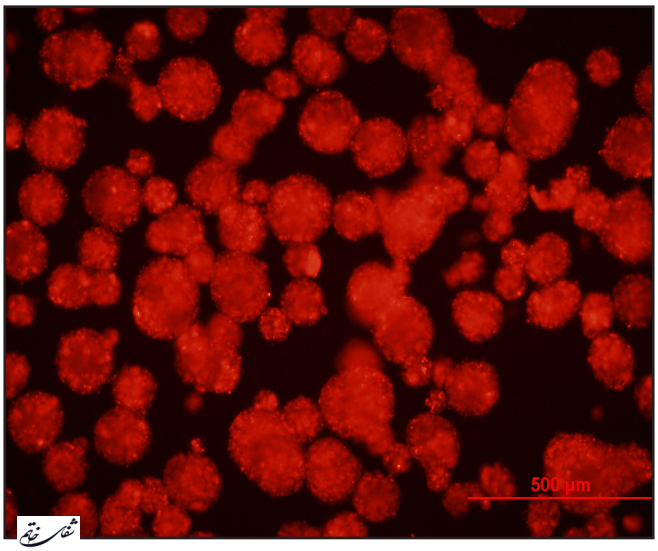
کشت اولیهٔ سلول‌های بنیادی عصبی جنینی

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که سلول‌های جدا شده از برجستگی‌های عقده‌ای از توانایی رشد خوبی برخوردار می‌باشند، به طوری‌که در ۷ روز پس از کشت اولیه، میزان قابل توجهی نوروسفر تشکیل شد (تصویر ۱).

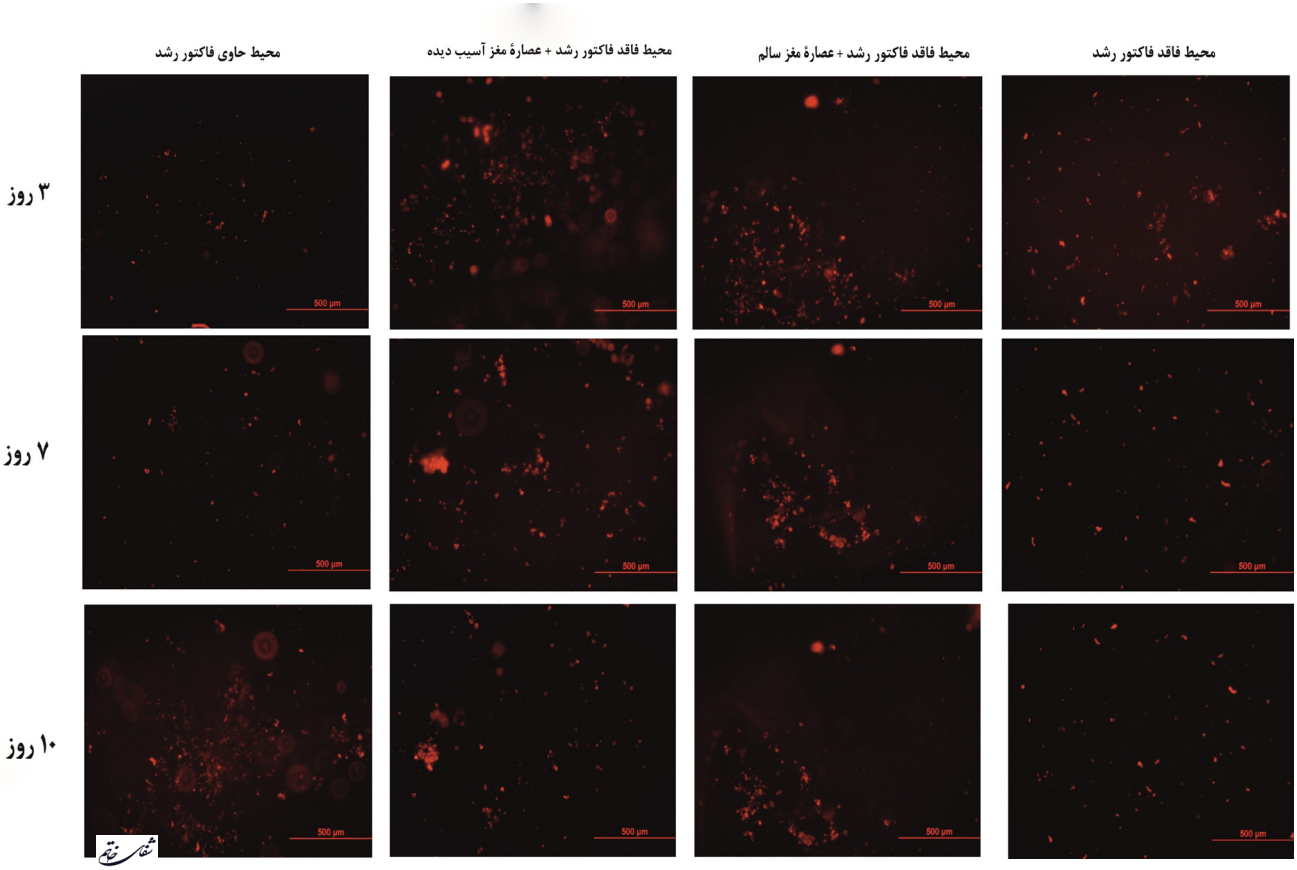
همان طور که در تصویر ۲ نشان داده شده است، نتایج حاصل از رنگ آمیزی DiI نشان داد که در ابتدا تمامی سلول‌ها و نوروسفرها به میزان بالایی رنگ DiI را به خود گرفته‌اند. مطابق تصویر ۳، عکس‌های فلورسنت از کشت‌های مختلف در روزهای ۳، ۷ و ۱۰ نشان دهندهٔ افزایش تکثیر سلولی در گروه محیط کشت فاقد فاکتور رشد + عصارهٔ مغز آسیب‌دیده و همچنین گروه محیط کشت حاوی فاکتور رشد نسبت به گروه محیط کشت فاقد فاکتور رشد و گروه محیط کشت فاقد فاکتور رشد + عصارهٔ مغز سالم می‌باشند (تصویر ۲ و ۳).

بررسی میزان بقاء سلولی

در بررسی میزان بقاء با استفاده از روش MTS، نشان داده شد که این شاخص در محیط کشت فاقد فاکتور رشد + عصارهٔ مغز آسیب‌دیده (۰/۰۳ ± ۰/۲) با گروه محیط کشت حاوی فاکتور



تصویـر ۲- نوروسـفرهای مشـتق شـده از برجسـتگی‌های عقـده‌ای جنیـن مـوش صحرایـی ۱۴ روزه (رنـگ آمیـزی DiI).

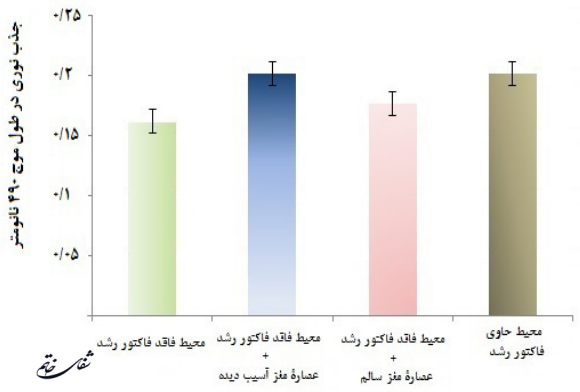


تصویر ۳- تصاویر فلوروسنت از سلول‌های DiI شده در داربست سه بعدی پوراماتریکس در روزهای ۳، ۷ و ۱۰ در گروه‌های مورد آزمایش. افزایش تکثیر سلولی در گروه‌های محیط کشت حاوی فاکتور رشد و محیط کشت فاقد فاکتور رشد + عصارهٔ مغز آسیب‌دیده قابل مشاهده است.

رشد (۰/۰۸ ± ۰/۲) تقریباً برابر بود. در گروه‌های محیط کشت فاقد فاکتور رشد + عصارهٔ مغز سالم (۰/۰۵ ± ۰/۱۷) و محیط کشت فاقد فاکتور رشد (۰/۰۲ ± ۰/۱۶) میزان بقاء سلولی نسبت به گروه‌های دریافت کنندهٔ محیط کشت حاوی فاکتور رشد و محیط کشت فاقد فاکتور رشد + عصارهٔ مغز آسیب‌دیده کاهش معنی‌داری نداشت (نمودار ۱).

بحث و نتیجه گیری

در مطالعهٔ حاضر با استفاده از یک داربست سه بعدی سعی بر نزدیک شدن به حالت سه بعدی طبیعی مغز داشتیم. در مطالعات گذشته نشان داده‌اند که نورون‌زایی می‌تواند در مغزهای آسیب دیده در اثر آسپیره شدن، سکته و غیره رخ دهد (۲۴). مطالعات همچنین نشان داده‌اند که در مدل‌های حیوانی دچار آسیب



نمودار ۱- نتایج تست MTS جهت نشان دادن بقاء سلول‌های کشت داده شده در داربست پوراماتریکس در گروه‌های مختلف. میزان جذب در گروه‌های محیط کشت حاوی فاکتور رشد و محیط کشت فاقد فاکتور رشد + عصارهٔ مغز آسیب‌دیده نسبت به گروه‌های محیط کشت فاقد فاکتور رشد + عصارهٔ مغز سالم و محیط کشت فاقد فاکتور رشد افزایش غیر معنی‌داری داشت.

مغزی، تکثیر سلولی در نواحی هیپوکامپ، اطراف ناحیهٔ آسیب دیدهٔ قشر و در ناحیهٔ تحت بطنی از بطن‌های جانبی رخ می‌دهد (۵). با توجه به تحقیقات گذشته، در این مطالعه عصارهٔ بافتی ۴۸ ساعت پس از ضربه، از نواحی قشر مغز دچار آسیب تهیه گردید. Yin و همکاران طی تحقیقی با بررسی اثرات عصاره‌های سالم مغز جنین جوجه ۱۶ روزه و عصارهٔ ماهیچه نشان دادند که این عصاره‌ها از مرگ نورون‌های حرکتی جلوگیری می‌کنند و در بقاء آن‌ها تأثیر دارند (۲۵). در این مطالعه، عصارهٔ مغز سالم تأثیر چندانی بر بقاء و تکثیر سلول‌های بنیادی نداشت که با مطالعهٔ Yin و همکاران در تضاد است، البته باید به این نکته توجه داشت که نوع سلول‌های کشت داده شده متفاوت است که این نیز می‌تواند بر پاسخ سلولی تأثیر داشته باشد.

Dash و همکاران نشان دادند که متعاقب آسیب مغزی پس از ضربه، تعداد سلول‌های نشان گذاری شده با BrdU در شکنج دندانه‌ای هیپوکامپ افزایش می‌یابد به طوری‌که بیشترین میزان تکثیر در روز سوم پس از ضربه مشاهده می‌شود (۶). در مطالعهٔ حاضر ۴۸ ساعت پس از ضربه جهت تأثیر عصاره از مغز استفاده شد و نشان داده شد که عصارهٔ مغز آسیب‌دیده بر بقاء و تکثیر سلول‌های بنیادی تأثیر می‌گذارد، هر چند باید این نکته را در نظر گرفت که شرایط دو مطالعه با هم متفاوت است به طوری‌که مطالعهٔ Dash و همکاران در شرایط In vivo بر روی همان سلول‌هایی که دچار آسیب شده‌اند انجام شده است، اما در این مطالعه، اثر عصارهٔ سلول‌های آسیب دیده در شرایط In vitro بر یک ردهٔ سلولی دیگر بررسی شده است.

Huang و همکاران به بررسی اثرات عصارهٔ مغز موش صحرایی بر بقاء و تمایز استئوبلاست‌ها پرداختند. جهت بررسی بقاء استئوبلاست‌ها در روز ۶ کشت از کیت MTT[۲۶] استفاده نمودند. آن‌ها در مطالعهٔ خود گزارش کردند که عصارهٔ مغز سالم از مادهٔ خاکستری و مادهٔ سفید منجر به افزایش بقاء استئوبلاست‌ها می‌شود (۲۶). در این مطالعه از کیت MTS که اساس کار آن مشابه با MTT می‌باشد، در روز ۱۰ کشت استفاده شد. در این تحقیق نشان داده شد که عصارهٔ مغز آسیب‌دیده منجر به افزایش بقاء و تکثیر سلول‌های بنیادی جنین مغز موش صحرایی می‌شود، در حالی‌که عصارهٔ مغز سالم بر میزان بقاء و تکثیر سلول‌های بنیادی عصبی تأثیر نداشته است که این نتایج با تحقیق Huang و همکاران در تضاد است، هر چند دوباره باید تفاوت در ردهٔ سلولی را نیز لحاظ کرد.

با توجه به اینکه در مطالعهٔ ما تفاوت‌ها از لحاظ آماری معنی‌دار نبود می‌توان مطالعهٔ دیگری با تعداد کشت بیشتر در هر گروه پیشنهاد داد. از طرفی مقدار عصارهٔ مصرفی در مطالعهٔ ما ۲٪ بود که می‌توان مقدارهای دیگر را نیز مورد بررسی قرار داد، چرا که در صورت استفاده از غلظت‌های بیشتر شاید بتوان گفت که نتایج بهتر و امیدوار کننده‌تری حاصل می‌شد. علاوه بر این به تحقیقات بیشتری در زمینهٔ اثر استفاده از عصاره‌های بافتی بر تمایز سلول‌های بنیادی نیاز می‌باشد.

در مجموع، علی‌رغم اینکه نتایج مطالعهٔ ما از لحاظ آماری معنی‌دار نبود ولی نشان دهندهٔ احتمال تأثیر مثبت عصارهٔ مغز آسیب‌دیده بر بقاء و تکثیر سلول‌های بنیادی عصبی جنین موش صحرایی بود. بررسی‌های بیشتر در این زمینه می‌تواند در فهم مکانیسم‌های دخیل در ترمیم بافت مغز صدمه دیده و همچنین در برنامه‌های سلول درمانی سیستم عصبی مرکزی کمک کننده باشد.

منابع

1. Tate CC. The role of extracellular matrix proteins in traumatic brain injury and cell transplantation. Georgia Institute of Technology. 2007.

2. Leker RR, Shohami E. Cerebral ischemia and trauma-different etiologies yet similar mechanisms: neuroprotective opportunities. Brain Res Brain Res Rev. 2002; 39(1): 55-73.

3. Verma A. Opportunities for neuroprotection in traumatic brain injury. J Head Trauma Rehabil. 2000; 15(5): 1149-61.

4. Properzi F, Asher R, Fawcett J. Chondroitin sulphate proteoglycans in the central nervous system: changes and synthesis after injury. Biochem Soc Trans. 2003; 31(2): 335-6.

5. Ramaswamy S, Goings GE, Soderstrom KE, Szele FG, Kozlowski DA. Cellular proliferation and migration following a controlled cortical impact in the mouse. Brain Res. 2005; 1053(1): 38-53.

6. Dash P, Mach S, Moore A. Enhanced neurogenesis in the rodent hippocampus following traumatic brain injury. J Neurosci Res. 2001; 63(4): 313-9.

7. Li R, Mather JP. Culture of pluripotent neural epithelial progenitor cells from E9 rat embryo. Methods Cell Biol. 2008; 86: 227-40.

8. Gage FH. Mammalian neural stem cells. Science. 2000; 287(5457): 1433-8.

9. Ourednik V, Ourednik J, Flax JD, Zawada WM, Hutt C, Yang C, et al. Segregation of human neural stem cells in the developing primate forebrain. Science. 2001; 293(5536): 1820-4.

[26] 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay

10. Nery S, Fishell G, Corbin JG. The caudal ganglionic eminence is a source of distinct cortical and subcortical cell populations. Nat Neurosci. 2002; 5(12): 1279-87.

11. 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; 11;(47). pii: 2457. doi: 10.3791/2457.

12. Lau LW, Cua R, Keough MB, Haylock-Jacobs S, Yong VW. Pathophysiology of the brain extracellular matrix: a new target for remyelination. Nat Rev Neurosci. 2013; 14(10): 722-9.

13. Fitch MT, Silver J. CNS injury, glial scars, and inflammation: Inhibitory extracellular matrices and regeneration failure. Exp Neurol. 2008; 209(2): 294-301.

14. Ai J, Kiasat-Dolatabadi A, Ebrahimi-Barough S, Ai A, Lotfibakhshaiesh N, Norouzi-Javidan A, et al. Polymeric scaffolds in neural tissue engineering: A review. Arch Neurosci. 2013; 1(1): 15-20.

15. Iwasaki M, Wilcox JT, Nishimura Y, Zweckberger K, Suzuki H, Wang J, et al. Synergistic effects of self-assembling peptide and neural stem/progenitor cells to promote tissue repair and forelimb functional recovery in cervical spinal cord injury. Biomaterials. 2014; 35(9): 2617-29.

16. Tysseling-Mattiace VM, Sahni V, Niece KL, Birch D, Czeisler C, Fehlings MG, et al. Self-assembling nanofibers inhibit glial scar formation and promote axon elongation after spinal cord injury. J Neurosci. 2008; 28(14): 3814-23.

17. Straley KS, Foo CWP, Heilshorn SC. Biomaterial design strategies for the treatment of spinal cord injuries. J Neurotrauma. 2010; 27(1): 1-19.

18. Leung G, Wang YC, Wu W. Peptide nanofiber scaffold for brain tissue reconstruction. Methods Enzymol. 2012; 508: 177-90.

19. Matson JB, Stupp SI. Self-assembling peptide scaffolds for regenerative medicine. Chem Commun (Camb). 2012; 48(1): 26-33.

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

21. Gelain F, Horii A, Zhang S. Designer Self-Assembling Peptide Scaffolds for 3-D Tissue Cell Cultures and Regenerative Medicine. Macromol Biosci. 2007; 7(5): 544-51.

22. Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 6nd ed. Academic Press, New York. 2008.

23. Uchida Y, Ihara Y, Tomonaga M. Alzheimer's disease brain extract stimulates the survival of cerebral cortical neurons from neonatal rats. Biochem Biophys Res Commun. 1988; 150(3): 1263-7.

24. Szele FG, Chesselet MF. Cortical lesions induce an increase in cell number and PSA-NCAM expression in the subventricular zone of adult rats. J Comp Neurol. 1996; 368(3): 439-54.

25. Yin QW, Johnson J, Prevette D, Oppenheim RW. Cell death of spinal motoneurons in the chick embryo following deafferentation: rescue effects of tissue extracts, soluble proteins, and neurotrophic agents. J Neurosci. 1994; 14(12): 7629-40.

26. Huang GY, Ma X, Xia XL, Jiang JY, Jin WF, Gao JJ, et al. Effect of rat brain tissue extracts on osteoblast proliferation and differentiation. Int Orthop. 2012; 36(4): 887-93.