مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی
دوره ۲۵، شماره ۱، بهار ۹۴، صفحات ۳۹ تا ۴۵

Original Article

تمایز عصبی سلول‌های PC12 با استفاده از داربست نانوفیبری PCL/gelatin

الهام حویزی[۱]، کاظم پریور[۲]

[۱] دکتری زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران مرکزی؛ باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان تهران
[۲] استاد، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران

چکیده

سابقه و هدف: *رده سلولی فئوکروسیتوما (PC12) در شرایط کشت آزمایشگاهی و تحت تاثیر فاکتورهای القایی به سلول‌هایی با مورفولوژی شبه عصبی تبدیل می‌شود. محققین نشان دادند که فاکتورهای رشد از جمله فاکتور رشد عصبی (NGF) و فاکتور رشد فیبروبلاستی (bFGF) در فرایندهای مختلفی از جمله تکثیر، بقا و تمایز این سلول ها موثر می باشند. بررسی‌ها نشان می‌دهد که داربست های منفذدار قابل تخریب با تشکیل بستری مناسب در روند تمایز سلول‌های PC12 موثر می‌باشند. هدف از تحقیق حاضر بررسی نقش داربست نانوفیبر PCL/gelatin (پلی کاپرولاکتون/ژلاتین) در تمایز عصبی سلول های PC12 بود.*

روش بررسی: *در این مطالعه بنیادی-کاربردی، سلول‌های PC12 بر داربست نانوفیبر ساخته شده از PCL/gelatin با نسبت ۷:۳ تحت تاثیر محیط تمایز عصبی همراه با فاکتورهای رشد کشت داده شدند. بیان ژن‌های عصبی از جمله Nestin و Map2 (Microtubule-associated protein 2) با استفاده از تست‌های RT-PCR و ایمونوسیتوشیمی مورد بررسی قرار گرفتند. تغییرات مورفولوژی با میکروسکوپ نوری و بررسی های فراساختاری با میکروسکوپ الکترونی انجام گرفت.*

یافته‌ها: *سلول‌های PC12 توانستند به طور کارامدی به سلول‌های شبه عصبی در شرایط کشت بر داربست PCL/gelatin تمایز یابند و این داربست هیچ گونه اثر منفی و سمیتی بر سلول‌های PC12 نداشت.*

نتیجه‌گیری: *استفاده از مهندسی بافت گامی موثر در جهت یافتن روش‌های نوین و کارامد در تولید سلول‌های عصبی با کارایی بالا به منظور درمان بیماری‌های عصبی از جمله پارکینسون، ضایعات نخاعی و گلوکوما محسوب می‌شود.*

واژگان کلیدی: *تمایز عصبی، PC12، NGF ، داربست، PCL.*

مقدمه

سیستم عصبی نقش مرکزی و پیچیده‌ای در تعامل فرآیندهای زیستی انسان با فرآیندهای فیزیولوژیکی مانند شناخت و عملکرد سلول‌های انفرادی دارد. آسیب سیستم عصبی مرکزی، به دلیل ناتوانی نورون‌ها برای ترمیم مجدد یک بیماری مخرب محسوب می‌شود. پیامد این آسیب‌ها تنها به قطع ارتباط بین نورون‌های سالم محدود نمی‌شود، بلکه آبشاری از وقایع رخ می‌دهد که سبب تخریب و مرگ بسیاری از نورون‌ها می‌گردد. آمارها نشان می‌دهند که بیماری‌ها و اختلالات مغزی- نخاعی که بعد از آسیب هایی مثل سکته مغزی و یا بیماری‌هایی مثل Multiple sclerosis ایجاد می‌گردند، در چند سال اخیر در حال افزایش هستند (۱, ۲). اعتقاد بر این است که با دستیابی به دانش فنی تولید سلول‌های عصبی و با فراهم آوردن امکان تمایز آنها، می توان این سلول‌ها را در جهت بررسی روش‌های سلول درمانی و پیوند سلولی به کار بست (۳).

بقا، تکثیر و تمایز نورون‌ها در سیستم عصبی مرکزی و محیطی به وسیله فاکتورهای نوروتروفیک تنظیم می‌شود. این فاکتورها شامل خانواده نوروتوروفین‌ها، فاکتورهای رشد فیبروبلاستی و اینترلوکین‌ها هستند. خانواده نوروتوروفین‌ها خود شامل فاکتور رشد عصبی، فاکتور نوروتروفین مشتق شده از مغز، نوروتروفین-۳

آدرس نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران مرکزی، الهام حویزی
(**email**: e.hoveizi@yahoo.com)

تاریخ دریافت مقاله: ۹۳/۷/۲۰
تاریخ پذیرش مقاله: ۹۳/۱۱/۱۱

و نوروتروفین-۴ می باشند که پیش برنده تمایز نورون‌ها هستند. گیرنده نوروتروفین‌ها (tyrosine kinases) TRK نام دارد که جزء خانواده رسپتورهای تیروزین کینازی محسوب می‌شوند. مهم ترین نوروتروفین‌ها NGF است که برای تمایز و بقا نورونهای سمپاتیکی و حسی در سیستم عصبی محیطی و برای نورون‌های کولینرژیک در مغز مورد نیاز است. NGF همچنین سبب تمایز عصبی در سلول‌های PC12 می‌شود (۴).

سلول‌های PC12 مدل مناسبی برای بررسی اثرات تمایزی فاکتورهای مختلف به شمار می‌روند. سلول‌های PC12 تحت تیمار با فاکتورهای مختلف مثل FGF و یا NGF با گسترش نوریت‌ها، به سلول‌هایی با مورفولوژی شبه عصبی تبدیل می‌شوند و به طور وسیعی در سلول درمانی برای بیماری‌های عصبی از جمله پارکینسون و آلزایمر مورد استفاده قرار می‌گیرند (۵).

در سال‌های اخیر استفاده از مهندسی بافت در زمینه‌های مختلف پزشکی به سرعت در حال توسعه است (۶). تحقیقات در سیستم‌های زنده روشن ساخته است که ماده زمینه خارج سلولی که محتوی انواع فاکتورهای رونویسی، ماکرومولکول‌ها و انواع فراوان سیگنال‌های مولکولی است تاثیر حیاتی و ضروری در فرایندهای مختلف رفتار سلولی دارد. بنابراین فراهم کردن سیستم‌های کشت بر داربست‌های نانوفیبر که با تشابهات زیاد می‌توانند جایگزینی برای ماده زمینه خارج سلولی گردند، مهم‌ترین اصول مطرح شده در استفاده از مهندسی بافت به حساب می‌آید. اخیرا استفاده از داربست‌های مصنوعی به دلیل کارایی بالا، سرعت تخریب پذیری، توان انعطاف پذیری و قیمت مناسب به طور چشم‌گیری افزایش یافته است (۷). مطالعات فراوانی با استفاده از سیستم کشت بر داربست‌های نانوفیبر انجام گرفته است و نتایج حاصله تایید کننده نقش قابل توجه استفاده از داربست در تمایز انواع سلول‌ها از جمله سلول‌های استخوانی، عصبی، قلبی و آندودرمی می‌باشد. همچنین افزایش قابل توجه بقا و تکثیر سلول‌ها با استفاده از کشت بر داربست‌های نانوفیبر در مقایسه با کشت در پلیت در بسیاری از آزمایشات گزارش گردیده است (۸, ۹). هدف از انجام این تحقیق، بررسی اثرات کشت بر داربست های نانوفیبر و استفاده از داربست نانوالیاف PCL/gelatin در تمایز عصبی سلول های PC12 با استفاده از سیگنالینک مولکولی بود.

مواد و روشها

در این مطالعه بنیادی-کاربردی، سلول‌های PC12 و داربست PCL/gelatin به عنوان متغییرهای مستقل و بیان مارکرهای عصبی در سطح mRNA و پروتیین در طی تمایز به عنوان متغیر وابسته در نظر گرفته شد.

سلول‌های PC12 از موسسه پاستور تهران خریداری شدند. سلول‌های PC12 در محیط کشت RPMI 1640 (Gibco) با ۱۰٪ FBS (Gibco) در انکوباتور حاوی ۵ درصد CO_2 با ۹۰ درصد رطوبت و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. بعد از اینکه حدود ۸۰٪ فلاسک پر شد، سلول‌ها پاساژ و حدود 5×10^4 cells/cm^2 سلول در ظروف کشت باکتریایی(bacterial petri dishes) شش خانه به مدت ۲ تا ۴ روز همراه با محیط کشت کامل قرار داده شد تا اجسام جنینی (Embryoid Body=EB) تشکیل گردد. سپس سلول‌ها بر روی داربست قرار داده شدند و ۲۴ ساعت بعد این محیط با محیط تمایزی RPMI 1640 حاوی NGF (Sigma) با غلظت ۵۰ng/ml و bFGF (Sigma) با غلظت ۲۰ ng/ml و غلظت ۱٪ سرم تعویض شد. محیط تمایزی هر ۴۸ ساعت یک بار تعویض و سلول‌ها به مدت دو هفته در این شرایط نگهداری شدند.

برای تهیه داربست، ابتدا پلیمر PCL (polycaprolactone, Sigma) و ژلاتین (Sigma) با غلظت wt ۱۰٪ در حلال کلروفورم در دمای اتاق به مدت ۲۴ ساعت حل شد تا محلولی شفاف حاصل شد. سپس محلول در سرنگ پلاستیکی ۵ میلی لیتری قرار داده و در دستگاه الکتروریسی جا سازی گشت. برای ریسیدن این محلول از سوزن gauge ۲۲ استفاده شد. ولتاژ بین ۱۲ تا ۱۴ کیلوولت، سرعت تزریق ۰/۵ میلی لیتر در ساعت، فاصله سر سوزن تا غلطک ۱۰ سانتی‌متر و سرعت چرخش غلتک rpm ۱۰۰۰ تنظیم گشت. این محلول به مدت ۱۵ ساعت روی ورقه الومینیومی بافته شد و سپس داربست حاصل به مدت ۲۴ ساعت در شرایط خلا خشک گردید.

برای کشت سلول‌های PC12 بر داربست PCL/gelatin، داربست به قطعاتی با قطر ۱۶ میلی‌متر تقسیم و برای استریل شدن به مدت ۲۴ ساعت در مقابل تابش امواج UV قرار داده شد. سپس در پلیت ۲۴ خانه تعبیه و به مدت ۲۴ ساعت در PBS محتوی غلظت بالای پنی سلین-استرپتومایسین قرار داده شد. سپس تعداد 5×10^4 cell/well سلول در هر خانه ریخته و برای افزایش چسبندگی سلولی از غلظت ۱٪ ماتریژل استفاده گردید و ۲۴ ساعت بعد محیط تمایزی اضافه گردید.

مورفولوژی، قطر و منافذ الیاف تهیه شده و همچنین چگونگی آرایش سلولی بر داربست با میکروسکوپ الکترونیSEM مورد بررسی قرار گرفت. برای آماده سازی داربست‌های دارای سلول، ابتدا نمونه‌ها با PBS به مدت پنج دقیقه شسته و با گلوتاردهید ۲/۵٪ به مدت یک ساعت تثبیت و سپس آبگیری

جدول ۱- پرایمرهای استفاده شده برای انجام RT-PCR

Gene	Sequence	annealing temperature (°C)	Length (bp)
Nestin	F 5' - AGCAGCACTCTTAACTTACG- 3'	55	259
	R 5' -CTGACTTAGCCTATGAGATGG - 3'		
Map2	F 5' - TGAAGAATGGCAGATGAAC- 3'	56	214
	R 5' -AGAAGGAGGCAGATTAGC - 3'		
HPRT	F 5' - AGCCAGACTTTGTTGGATTTGA- 3'	55-60	145
	R 5' -GAACTCTCATCTTAGGCTTTGT - 3'		

با الکل‌های ۳۰٪، ۵۰٪، ۷۰٪، ۸۰٪، ۹۰٪ و ۱۰۰٪ به صورت صعودی هر کدام به مدت پانزده دقیقه انجام گرفت. سپس با ذرات طلا پوشانده و عکس برداری توسط میکروسکوپ الکترونی انجام گرفت. قطر الیاف واندازه منافذ با استفاده از نرم افزار measurement اندازه گیری گردید.

جهت بررسی ایمونوسیتوشیمی، دو هفته بعد از تیمار، سلول‌های تمایز یافته با پارافرمالدهید ۴٪ (PFA, Sigma-Aldrich) به مدت ۳۰ دقیقه تثبیت شده و سپس با PBS شستشو و بوسیله 0.1% TX-100 in PBS (TBST) نفوذ پذیر و سپس به مدت ۱ ساعت در محلول 5% BSA (Bovine serum albumin) قرار داده شدند. سپس به مدت ۱۲ ساعت در معرض آنتی بادی های اولیه شامل anti-MAP2 (1:100, Ab cam) و anti-Nestin (1:200, Ab cam) قرار گرفتند. در مرحله بعد سلول‌ها شستشو و سپس به مدت ۱ ساعت در مجاورت آنتی‌بادی ثانویه شامل Alexa fluor 488 donkey anti-goat (1:200, Gibco) قرار گرفتند و بعد از شستشو، برای رنگ آمیزی هسته‌ها، با رنگ DAPI به مدت ۵ دقیقه رنگ آمیزی شدند.

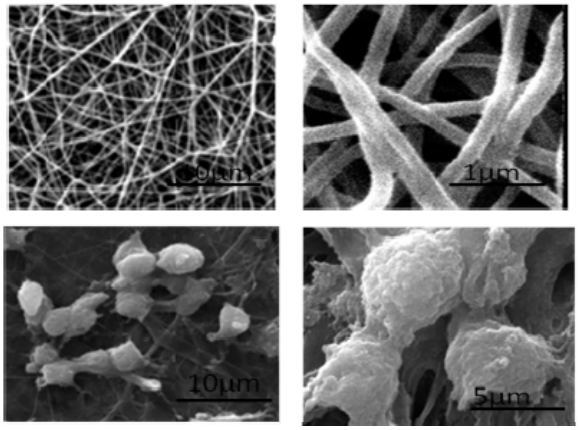
الگوی بیان mRNA ژن های مختلف درگیر در تمایز سلول های عصبی با استفاده از qRT-PCR انجام شد. برای استخراج RNA سلول‌ها با استفاده از QIAzol لیز شدند و برای سنتز cDNA از TaqMan Reverse Transcription Kit استفاده شد. برای هر نمونه ۴۰ نانوگرم از cDNA سنتز شده با ۱۰ میکرولیتر از Power SYBER Green master mix و ۰/۵ میکرولیتر از هر پرایمر (جدول ۱) مخلوط گشت. Ct هر نمونه با استفاده از نرم افزار StepOne محاسبه و از ژن HPRT به عنوان ژن کنترل درونی استفاده گشت و هر آزمایش سه بار تکرار گردید.

نتایج به صورت میانگین ± خطای معیار ارائه شد و با استفاده از نرم افزار SPSS(Ver.16) و آزمون‌های آماری ANOVA و Tukey به صورت مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج real time PCR با استفاده از نرم افزار rest تحلیل شد. $P<0/05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

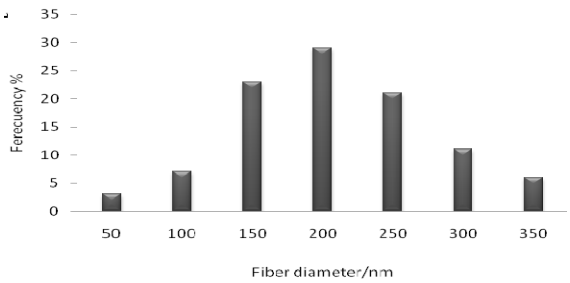
یافته‌ها

بررسی مورفولوژی سلول های PC12 کشت داده شده بر داربست PCL/gelatin

بررسی مورفولوژی داربست PCL و چگونگی استقرار سلول‌های PC12 بر داربست به وسیله عکسبرداری با میکروسکوپ الکترونی SEM انجام گرفت. میکروگراف الکترونی داربست نانوفیبر PCL/gelatin در شکل ۱ نشان داده شده است و متوسط قطر الیاف با نرم افزارmeasurment حدود ۲۰۰ نانومتر تخمین زده شد (شکل ۲). شکل ۱ همچنین نشان دهنده چگونگی اسقرار سلول های PC12 بر داربست PCL/gelatin می‌باشد که نشان دهنده استقرار و بقای سلول‌ها بر داربست است.



شکل ۱. فتومیکروگراف میکروسکوپ الکترونی SEM. نانوفیبرهای داربست الکتروریسی شده PCL/gelatin و فتومیکروگراف سلول های PC12 کشت داده شده بر داربست نانوفیبر PCL/gelatin

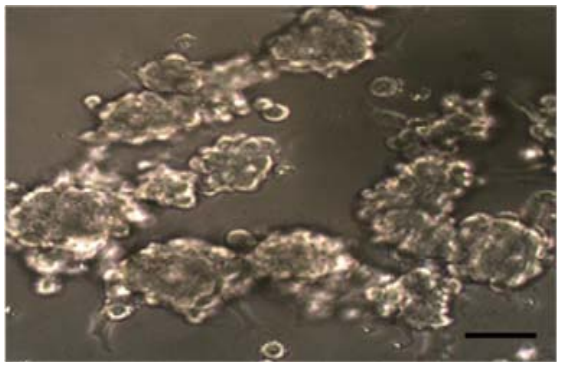


شکل ۲. نمودار میانگین قطر فیبر داربست نانوالیاف

توان تمایزی سلول‌های PC12 به سلول‌های عصبی بر داربست PCL/gelatin با استفاده از رنگ آمیزی ایمونوسیتوشیمی

مطالعات قبلی نشان می‌دهد که NGF و bFGF در غلظت‌های مناسب سبب تمایز سلول‌های PC12 به سلول های عصبی می‌شود. در تحقیق حاضر برای بررسی توان تمایزی سلول‌های PC12 در شرایط کشت بر داربست نانوفیبر با کارایی بالا، اجسام جنینی حاصل از کشت سوسپانسیون (شکل ۳) بر روی داربست نانوفیبر قرار داده و در مجاورت محیط تمایزی به مدت دو هفته تیمار شدند.

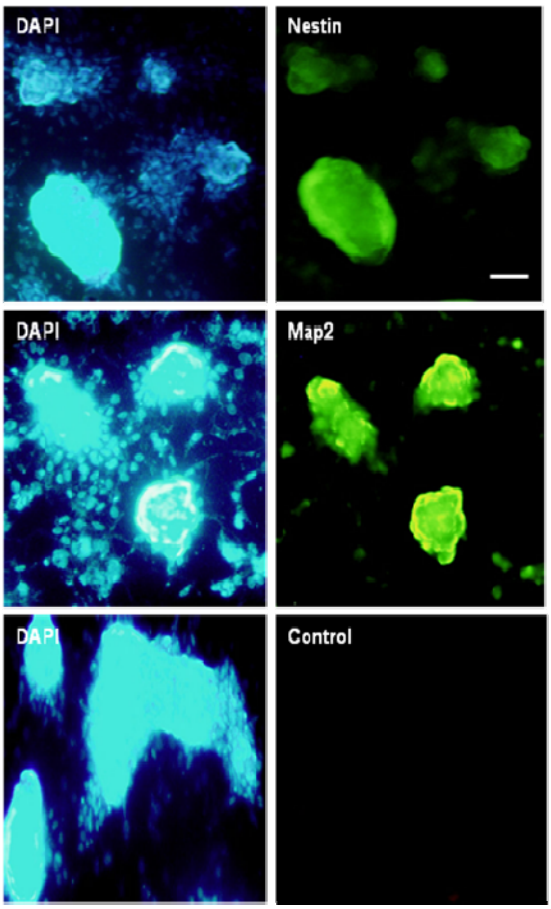
برای تعیین تمایز سلول‌های عصبی از اجسام جنینی حاصل از سلول‌های PC12 در شرایط کشت بر داربست نانوفیبر، بیان مارکرهای عصبی شامل Nestin و Map2 بررسی شد. رنگ آمیزی ایمونوسیتوشیمی سلول‌های شبه عصبی تمایز یافته برای این ژن‌ها در روز چهاردهم بعد از تمایز مثبت ارزیابی شد (شکل ۴).



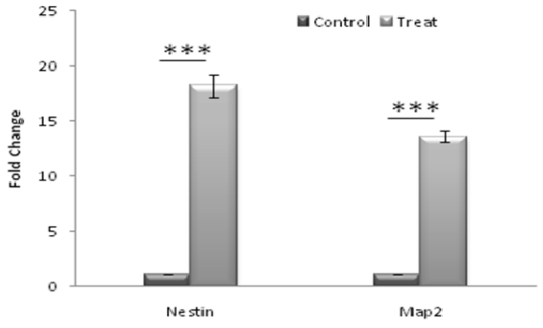
شکل ۳. مورفولوژی اجسام جنینی حاصل از سلول‌های PC12 تمایز نیافته (Scale bar= 100µm)

بررسی بیان mRNA مارکر های عصبی در سلول های تمایز یافته با استفاده از qRT-PCR

بیان mRNA ویژه سلول‌های عصبی شامل Nestin و Map2، که در سطح پروتیین با روش ایمونوسیتوشیمی مشاهده گشت، در روز چهاردهم بعد از تمایز در سلول های تمایز یافته در کشت بر داربست نانوفیبر ارزیابی شد. همان طور که در شکل ۵ مشاهده می‌شود، بیان مارکرهای عصبی در سلولهای تمایز یافته در محیط کشت بر داربست نانوفیبر به طور معنی داری نسبت به نمونه کنترل افزایش یافته است که نشان دهنده اثر گذاری قابل توجه استفاده از داربست در طی مسیر تمایزی سلول های PC12 به سلول های شبه عصبی است.



شکل ۴. رنگ آمیزی ایمونوفلوروسانس برای مارکرهای سلول‌های عصبی شامل Nestin و Map2 دو هفته بعد از تیمار با NGF و bFGF بر داربست نانوفیبر PCL/gelatin (Scale bar= 100µm)



شکل ۵. پروفایل بیان ژن های سلول های عصبی مشتق شده از سلول های PC12 کشت داده شده بر داربست PCL/gelatin با روش Real-time quantitative PCR (Q-PCR) شامل Nestin و Map2 دو هفته بعد از تیمار

بحث

موفقیت در مهندسی بافت عصبی، به طور عمده بر پایه تنظیم رفتار سلولی و پیشرفت بافت از طریق توسعه یک داربست مشابه با ماده زمینه خارج سلولی طبیعی که بتواند کشت سلولی را حمایت نماید، می‌باشد. همان‌طور که یک ماده زمینه خارج سلولی طبیعی، یک محیط ایده‌آل از نظر شیمیایی، الکتریکی و توپوگرافی را برای چسبندگی و تکثیر سلول‌های عصبی فراهم می‌نماید، مهندسی بافت نیز نیاز به یک داربست زیست‌سازگار، خنثی از نظر ایمونولوژیکی، هدایت کننده، زیست تخریب‌پذیر برای حمایت رشد و ترمیم سیستم عصبی دارد (۱۰, ۱۱). مطالعات ما نشان داد که داربست نانوفیبر PCL/gelatin دارای این خصوصیات برای تمایز سلول‌های عصبی بوده و سلول های PC12 براحتی بر روی این داربست قرار گرفته و تکثیر و تمایز یافته و هیچ گونه ناسازگاری با این داربست را نشان نمی‌دهند. نتایج حاصل از این تحقیق تایید کننده تمایز با بازده بالای سلول‌های PC12 بر داربست PCL/gelatin به سلول‌هایی با مورفولوژی عصبی می‌باشد که نشان دهنده استفاده موثر داربست‌های نانوفیبر و مهندسی بافت در تمایز سلول‌های عصبی بوده و به عنوان گامی مهم در پیشبرد تمایز سلول های عصبی برای درمان انواع بیماری‌های سیستم عصبی محسوب می‌شود.

ترمیم سیستم عصبی پدیده زیستی پیچیده‌ای است، به طوری که ضایعات کوچک در سیستم عصبی محیطی قابلیت ترمیم داشته، درحالی که جراحات بزرگ‌تر باید از طریق جراحی و پیوند اعصاب محیطی سایر نقاط بدن، ترمیم شود که به دلیل دسترسی محدود به بافت‌های دهنده و شدت درد موضعی ایجاد شده در محل برداشت بافت دهنده، این نوع درمان‌ها همچنان با محدودیت‌های زیادی همراه می‌باشد. در این میان توسعه مواد زیست سازگار برای حمل و دربرگرفتن سلول‌های بنیادی به عنوان منبعی مناسب و هم ارز با بافت‌های طبیعی، محیطی مطلوب برای ترمیم بافت را فراهم نموده است (۱۲, ۱۳). در سال‌های اخیر استفاده از سلول‌های بنیادی به عنوان یکی از راه‌های درمان بر پایه سلول در مهندسی بافت عصب حائز اهمیت شده است. در سال ۲۰۰۹ Xie و در سال ۲۰۱۰ Soleimani و همکارانشان موفق به تمایز عصبی سلول‌های بنیادی جنینی با استفاده از داربست نانوفیبر گشتند (۱۴, ۱۵). در سال ۲۰۱۱، Bakhshande و همکارانش تایید کردند که داربست نانوفیبر PCL رشد، تکثیر و مهاجرت انواعی از سلول‌ها را حمایت می‌کند (۱۶). در سال ۲۰۱۲ Kabiri و در سال ۲۰۱۳ Low و همکارانشان اعلام کردند که موفق به تولید سلول‌های عصبی با کارایی بالا با استفاده از کشت سلول‌های بنیادی بر داربست نانوفیبر شدند (۱۷, ۱۸). بنابراین این تحقیقات نشان دهنده استفاده رایج از تکنیک‌های مهندسی بافت به عنوان یک استراتژی سودمند در تولید هرچه بیشتر سلول‌های عصبی می‌باشد که نتایج حاصل از این تحقیق نیز تایید کننده اثرات مثبت استفاده از داربست در جهت تولید سلول های عصبی با کارایی بالا می‌باشد.

کلاژن فراوان‌ترین پروتیین فیبری در ماتریکس خارج سلولی محسوب می‌شود، اما به دلیل قیمت بالا استفاده از آن به عنوان داربست در مهندسی بافت مقرون به صرفه نیست. بنابراین ژلاتین به عنوان پروتیینی که دارای خواص مکانیکی مشابه با کلاژن است و از طرفی از اقتصادی نیز استفاده از آن مقرون به صرفه است، در مهندسی بافت می‌تواند جایگزین مناسبی محسوب شود (۱۹). بنابراین در این مطالعه برای تعدیل و بهبود داربست PCL از ژلاتین استفاده نمودیم.

Cooke و همکارانش نشان دادند که توالی‌های پپتیدی مشتق از ماده زمینه خارج سلولی در همراهی با شرایط محیطی مناسب تمایز سلول‌های پیش‌ساز را به سلول‌های عصبی افزایش می‌دهد (۲۰).

منابع سلولی متنوعی برای تولید سلول‌های عصبی وجود دارد. این سلول‌ها با ترشح مولکول‌های حمایتی و یا فاکتورهای رشد به ترمیم اعصاب صدمه دیده کمک می‌کنند. هم‌زمان با توسعه دانش سلول‌های بنیادی در جهات مختلف، امکان استفاده از آنها به عنوان سلول‌های حمایتی مورد مطالعه قرارگرفته است (۲۱).

از آنجایی که رده سلولی فئوکروموسایتوما (PC12) در محیط کشت مناسب و تحت تاثیر عوامل القاء کننده تمایز عصبی می‌توانند به سلول‌هایی با فنوتیپ عصبی تبدیل شوند، اعتقاد بر این است که با دستیابی به دانش فنی تولید سلول‌های عصبی با استفاده از داربست‌های مناسب و با فراهم آوردن امکان تمایز آنها، می‌توان این سلول‌ها را در جهت سلول درمانی و یا پیوند سلولی به کار بست. رده سلولی PC12 به عنوان یکی از انواع سلول‌های چند توانه به عنوان یک مدل بسیار مناسب برای مطالعات نوروبیولوژیک و نوروشیمیایی مورد استفاده قرار می‌گیرد (۲۲, ۲۳). در طی سال‌های اخیر محققین دیگری از جمله Ferrari, Park و Chung با استفاده از سلول‌های PC12 و در شرایط کشت بر داربست‌های نانوفیبر موفق به تولید سلول‌های عصبی با بازده بالا شدند که تایید کننده توان تمایز این سلول‌ها در شرایط کشت بر داربست‌های

نانوفیبر می‌باشد و تحقیق حاضر نیز تایید کننده تمایز عصبی سلول‌های PC12 بر داربست PCL/gelatin می‌باشد (۲۴-۲۶).

مطالعات نشان داده است که رشد، تکثیر و تمایز سلول‌ها در شرایط کشت بر داربست های نانوفیبر نسبت به کشت در پلیت افزایش قابل توجهی نشان می‌دهد. از سوی دیگر Lin, Willeth و Arien-Zaki در مطالعاتی به طور جداگانه در سال های ۲۰۰۵ و ۲۰۰۶ و ۲۰۰۸ کشت سلول‌های پیش ساز عصبی بر داربست های نانوفیبر را همراه با فاکتور های رشد روشی مناسب برای استفاده در طب ترمیمی معرفی کردند (۲۷, ۲۸). پس از تایید کارایی مدل‌های سلول‌های پیش‌ساز عصبی برای استفاده در طب ترمیمی، دانشمندان به دنبال بهینه سازی شرایط کشت بر داربست های نانوفیبر با مدل‌ها و مواد متفاوت برای سلول‌های مختلف هستند. در این راستا، Xu , Xiong و Prabhakarah دانشمندانی بودند که بررسی های خود را بر کشت سلول‌های عصبی و سلول‌های بنیادی بر داربست نانوفیبر متمرکز کردند. آنان شرایط کشت بر داربست های نانوفیبر برای بررسی‌های سلولی و بافتی قبل از مطالعات بالینی را به عنوان مدلی مناسب پیشنهاد می‌کنند (۲۹, ۳۰). امروزه محققان درصددند که با تقلید هر چه بیشتر از شرایط in vivo کارایی در شرایط in vitro را ارتقا بخشند. علم مهندسی بافت با ارائه انواع داربست‌ها در محیط کشت سلولی که می‌تواند تقلیدی از فضای خارج سلولی در بدن باشد، برای رسیدن به این مقصود از اهمیت خاصی برخوردار است (۱۲).

پیشرفت‌های اخیر در روش الکتروریسی امکان تولید الیافی پیوسته و جامد با قطرهایی در محدوده چندین نانومتر را به همراه کنترل ساختار بین مولکولی سطحی ایجاد نموده است. طبق بررسی‌های انجام شده مشخص شده که استفاده از فرایند الکتروریسی بهترین روش تولید نانوالیاف از مواد پلیمری می‌باشد که در آن تولید نانوالیاف به صورت مداوم انجام می‌گیرد (۸, ۹). بنابراین ما در تحقیق حاضر از روش الکتروریسی برای تهیه داربست نانوفیبر PCL/gelatin استفاده نمودیم. نتایج حاصل از این تحقیق نشان می‌دهد که کشت سلول‌های PC12، به عنوان سلول‌های بنیادی که توان تمایز بالایی به سلول‌های عصبی دارند، بر داربست نانوفیبر PCL/gelatin، به عنوان داربستی مناسب برای چسبندگی، تکثیر و تمایز سلول‌های PC12، در محیط تمایزی مناسب روشی نوین و موثر در جهت تولید سلول‌های عصبی می‌باشد، اگرچه برای رسیدن به تولید ایده‌آل سلول‌های عصبی به منظور درمان بیماری‌ها هنوز انجام تحقیقات بسیاری در پیش است.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله مراتب سپاس و تشکر خود را از کلیه دوستان و همکاران در دانشگاه خوارزمی به واسطه حمایت‌هایشان در انجام این پروژه اعلام می‌دارند.

REFERENCES

1. Fujita T, Maturana AD, Ikuta J, Hamada J, Walchli S, Suzuki T, et al. Axonal guidance protein FEZ1 associates with tubulin and kinesin motor protein to transport mitochondria in neurites of NGF-stimulated PC12 cells. Biochem Biophys Res Commun 2007;36: 605-10.
2. Das KP, Freudenrich TM, Mundy WR. Assessment of PC12 cell differentiation and neurite growth: a comparison of morphological and neurochemical measures. Neurotoxicol Teratol 2004;26:397-406.
3. Arioka M, Cheon SH, Ikeno Y, Nakashima S, Kitamoto K. A novel neurotrophic role of secretory phospholipases A2 for cerebellar granule neurons. FEBS Lett 2005;579:2693-701.
4. Beaujean D, Rosenbaum C, Muller HW, Willemsen JJ, Lenders J, Bornstein SR. Combinatorial code of growth factors and neuropeptides define neuroendocrine differentiation in PC12 cells. Experiment Neurol 2003;184:348-58.
5. Kamata H, Oka S, Shibukawa Y, Kakuta J, Hirata H. Redox regulation of nerve growth factor-induced neuronal differentiation of PC12 cells through modulation of the nerve growth factor receptor, TrkA. Arch Biochem Biophys 2005;434:16-25.
6. Tedeschi G, Cappelletti G, Negri A, Pagliato L, Maggioni MG, Maci R, et al. Characterization of nitroproteome in neuron-like PC12 cells differentiated with nerve growth factor: identification of two nitration sites in alpha-tubulin. Proteomics 2005;5:2422-32.
7. Liu T, Zhang S, Chen X, Li G, Wang Y. Hepatic differentiation of mouse embryonic stem cells in three-dimensional polymer scaffolds. Tissue Eng 2009;16:1115-22.
8. Meng ZX, Wang YS, Ma C, Zheng W, Li L, Zheng YF. Electrospinning of PLGA/gelatin randomly-oriented and aligned nanofibers as potential scaffold in tissue engineering. Materials Science and Engineering 2010;30:1204-10.

9. Reed CR, Han L, Andrady A, Caballero M, Jack MC, Collins JB, et al. Composite tissue engineering on polycaprolactone nanofiber scaffolds. Ann Plast Surg 2009;62:505-12.

10. Calegari F, Haubensak W, Haffner C, Huttner WB. Selective lengthening of the cell cycle in the neurogenic subpopulation of neural progenitor cells during mouse brain development. J Neurosc 2005;25:6533-38.

11. Malaspina A, Turkheimer F. A review of the functional role and of the expression profile of retinoid signaling and of nuclear receptors in human spinal cord. Brain Res Bull 2007;71:437-46.

12. Schmidt CE, Leach JB. Neural tissue engineering: strategies for repair and regeneration. Ann Rev Biomed Engineer 2003;5:293-347.

13. Wang L, Wang ZH, Shen CY, You ML, Xiao JF, Chen GQ. Differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells grown in terpolyesters of 3-hydroxyalkanoates scaffolds into nerve cells. Biomaterials 2010;31:1691-98.

14. Xie J, Willerth SM, Li X, Macewan MR, Rader A, Sakiyama-Elbert SE, et al. The differentiation of embryonic stem cells seeded on electrospun nanofibers into neural lineages. Biomaterials 2009;30:354-62.

15. Soleimani M, Nadri S, Shabani I. Neurogenic differentiation of human conjunctiva mesenchymal stem cells on a nanofibrous scaffold. Int J Dev Biol 2010;54:1295-300.

16. Bakhshandeh B, Soleimani M, Ghaemi N, Shabani I. Effective combination of aligned nanocomposite nanofibers and human unrestricted somatic stem cells for bone tissue engineering. Acta pharmacologica Sinica 2011;32:626-36.

17. Kabiri M, Soleimani M, Shabani I, Futrega K, Ghaemi N, Ahvaz HH, et al. Neural differentiation of mouse embryonic stem cells on conductive nanofiber scaffolds. Biotechnol Lett 2012;34:1357-65.

18. Low WC, Rujitanaroj PO, Lee DK, Messersmith PB, Stanton LW, Goh E, et al. Nanofibrous scaffold-mediated REST knockdown to enhance neuronal differentiation of stem cells. Biomaterials 2013;34:3581-90.

19. Massumi M, Abasi M, Babaloo H, Terraf P, Safi M, Saeed M, et al. The effect of topography on differentiation fates of matrigel-coated mouse embryonic stem cells cultured on PLGA nanofibrous scaffolds. Tissue Eng 2011;18:609-20.

20. Cooke DL, Levitt M, Kim LJ, Hallam DK, Ghodke B. Intraorbital access using fluoroscopic flat panel detector CT navigation and three-dimensional MRI overlay. J Neurointerven Surg 2010;2:249-51.

21. Novitch BG, Wichterle H, Jessell TM, Sockanathan S. A requirement for retinoic acid-mediated transcriptional activation in ventral neural patterning and motor neuron specification. Neuron 2003;40:81-95.

22. Green SH, Rydel RE, Connolly JL, Greene LA. PC12 cell mutants that possess low- but not high-affinity nerve growth factor receptors neither respond to nor internalize nerve growth factor. J Cell Biol 1986;102: 830-43.

23. Foley JD, Grunwald EW, Nealey PF, Murphy CJ. Cooperative modulation of neuritogenesis by PC12 cells by topography and nerve growth factor. Biomaterials 2005;26:3639-44.

24. Park KH, Kim H, Na K. Neuronal differentiation of PC12 cells cultured on growth factor-loaded nanoparticles coated on PLGA microspheres. J Microbiol Biotechnol 2009;19:1490-95.

25. Chung TW, Lai DM, Chen SD, Lin YI. Poly (epsilon-caprolactone (scaffolds functionalized by grafting NGF and GRGD promote growth and differentiation of PC12 cells. J Biomed Mater Res A 2014;102:315-23.

26. Ferrari A, Faraci P, Cecchini M, Beltram F. The effect of alternative neuronal differentiation pathways on PC12 cell adhesion and neurite alignment to nanogratings. Biomaterials 2010;31:2565-73.

27. Lin HY, Kuo YJ, Chang SH, Ni TS. Characterization of electrospun nanofiber matrices made of collagen blends as potential skin substitutes. Biomed Mater 2013;8:025009.

28. Willerth SM, Arendas KJ, Gottlieb DI, Sakiyama-Elbert SE. Optimization of fibrin scaffolds for differentiation of murine embryonic stem cells into neural lineage cells. Biomaterials 2006;27:5990-60.

29. Hayman MW, Smith KH, Cameron NR, Przyborski SA. Growth of human stem cell-derived neurons on solid three-dimensional polymers. J Biochem Biophys Methods 2005;62:231-40.

30. Liu H, Roy K. Biomimetic three-dimensional cultures significantly increase hematopoietic differentiation efficacy of embryonic stem cells. Tissue Eng 2005;11:319-30.