

بررسی اثر نوروتروفیک عصاره هیپوکامپ مغز جنین موش بر روی تکثیر و تمایز سلول‌های مزانشیمی کشت داده شده بر روی هیدروژل کلاژنی

روژین حاجی سیدجوادی^۱، ناهید حسن‌زاده نعمتی^۲، محمد نوری فعله‌کری^{۳*}

- ۱- کارشناسی ارشد مهندسی بافت، دانشکده علوم و فناوری‌های پزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۲- دانشیار، گروه مهندسی پزشکی (مهندسی بافت و بیومواد)، دانشکده علوم و فناوری‌های پزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۳- استادیار، گروه مهندسی پزشکی (مهندسی بافت و بیومواد)، دانشکده علوم و فناوری‌های پزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

* صندوق پستی ۱۴۷۷۸۹۳۸۵۵، تهران، ایران
mohamad.aban@gmail.com

پذیرش: ۱۴۰۴/۰۹/۱۲

دریافت: ۱۴۰۳/۰۸/۲۸

چکیده

سلول‌های بنیادی مزانشیمی از پرکاربردترین رده‌های سلولی بنیادی و بالغ در مطالعات مربوط به مهندسی بافت، سلول‌درمانی و پزشکی بازساختی هستند. تأمین شرایط و محیط لازم برای تکثیر مناسب و همچنین هدایت رفتار تمایزی این سلول‌ها به سمت سلول‌های هدف و بالاخص سلول‌های بافت‌هایی که توانایی ترمیم محدودی دارند (مانند سلول‌های عصبی)، در مطالعات متعددی بررسی شده است. در مطالعه حاضر نیز رفتار سلول‌های مزانشیمی مستخرج از مغز استخوان موش در مجاورت هیدروژل کلاژنی و غلظت‌های متفاوتی از عصاره هیپوکامپ به دست آمده از مغز جنین موش، بررسی شد. نتایج تست‌های سلولی مانند MTT، زیست‌سازگاری بالای هیدروژل کلاژنی و اثر مثبت عصاره هیپوکامپ بر رشد سلول‌ها را تأیید کرد. میزان بیان پروتئین‌های نستین و GFAP و تصاویر میکروسکوپ فلورسنت، نشان داد که وجود عصاره هیپوکامپ در کنار هیدروژل کلاژنی نه تنها سبب ایجاد سلول‌های پیش‌ساز و اجزای عصبی می‌شود، بلکه ضمن حفظ خاصیت بنیادی این سلول‌ها، سبب ترغیب آنها به رشد و تکثیر بیشتر نیز می‌شود.

کپی‌رایت © ۲۰۲۵، انتشارات دانشگاه تربیت مدرس (TMU Press). این مقاله به صورت دسترسی آزاد منتشر شده و تحت مجوز بین‌المللی Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 قرار دارد. بر اساس این مجوز، شما می‌توانید این مطلب را در هر قالب و رسانه‌ای کپی، بازنشر و بازآفرینی کنید و یا آن را ویرایش و بازسازی نمایید، به شرط آنکه نام نویسنده را ذکر کرده و از آن برای مقاصد غیرتجاری استفاده کنید.

در مجموع، به نظر می‌رسد هیدروژل کلاژنی و اثر نوروتروفیک عصاره هیپوکامپ می‌تواند شرایط مناسبی برای تولید سلول‌های پیش‌ساز و اجدادی عصبی را فراهم کند.

کلید واژگان: سلول‌های بنیادی مزانشیمی، عصاره هیپوکامپ، نوروتروفیک، سلول‌های پیش‌ساز عصبی، فیلامان‌های واسط سلولی

۱- مقدمه

مهندسی بافت به‌عنوان راه‌کاری نوین برای ترمیم، بازسازی و جایگزینی بافت‌های آسیب‌دیده بدن مطرح شده است. این حوزه از دانش، به‌عنوان شاخه‌ای از علوم میان‌رشته‌ای بر سه رکن اصلی داربست، سلول و فاکتورهای رشد استوار است [۱-۳]. در این بین، داربست‌ها به‌عنوان ساختارهای زیست‌سازگار و زیست‌تخریب پذیر که بستر موقت تشکیل بافت طبیعی جدید هستند، محل تمرکز تحقیقات و به نوعی به کارگیری مستقیم اصول مهندسی می‌باشند. مهندسان پزشکی و همچنین مهندسان حوزه مواد و شیمی ضمن تعامل و همکاری با یکدیگر، در تلاش برای یافتن بهترین بیومواد و مناسب‌ترین طراحی‌ها و ساختارها به‌منظور تهیه داربست‌ها هستند. یک داربست ایده‌آل، ضمن ارائه خواص زیستی مناسب، باید ویژگی‌های ساختاری، فیزیکی، شیمیایی و حتی تخریب‌پذیری متناسب با کاربرد و بافت هدف را دارا باشد [۴ و ۵].

تاکنون مواد بسیار متنوعی در اشکال و ساختارهای مختلف به‌عنوان داربست در کاربردهای مهندسی بافت استفاده شده‌اند. در میان مواد مورد اشاره، هیدروژل‌ها توانسته‌اند به پاسخ‌های زیستی بسیار مطلوبی بالاخص در کاربردهای جایگزینی و ترمیم بافت نرم منجر شوند [۲، ۶ و ۷]. هیدروژل‌ها را می‌توان به‌عنوان ساختارهای پلیمری شبکه‌ای و آبدوست تلقی کرد که ضمن اجازه نفوذ مولکول‌های آب به داخل ساختار و شبکه خود، متورم

شده و ساختاری ژل‌گونه را ایجاد می‌کنند. اولین هیدروژل سنتزی توسط Wichterle و Lim در اواسط دهه پنجاه میلادی به‌عنوان ماده‌ای با پتانسیل کاربرد زیستی معرفی شد. این هیدروژل بر پایه پلیمر پلی ۲-هیدروکسی اتیل متاکریلات^۱ یا به اختصار PHEMA تهیه شد [۸]. خواص مطلوب این پلیمر باعث شده است که همچنان در هیدروژل‌های امروزی و در کاربردهای مرتبط، استفاده شود. غالب هیدروژل‌ها ضمن برخورداری از تعداد فراوان گروه‌های عاملی شیمیایی آبدوست مانند گروه‌های هیدروکسیل (OH)، کربوکسیل (COOH)، آمینو (NH₂) و موارد مشابه در ساختار خود، آبدوستی قابل توجهی را ارائه می‌دهند. چنین مسأله‌ای همان‌طور که پیشتر اشاره شد اجازه تورم و تشکیل ژل را می‌دهد. از سوی دیگر، ساختار هیدروفیل، منعطف، نرم و زیست‌سازگار هیدروژل‌ها که شباهت قابل توجهی با ماتریکس خارج سلولی (ECM)^۲ دارد، بستر بسیار مناسبی برای لانه‌گزینی سلول‌ها و تشکیل بافت جدید است [۹ و ۱۰].

البته که با وجود تنوع بسیار بالای هیدروژل‌ها و مکانیسم‌های مختلف تشکیل ژل، کاربرد این ساختارها فقط محدود به حوزه مهندسی بافت نمی‌باشد. استفاده به‌عنوان حامل دارو، محلی برای کپسوله کردن سلول‌ها، سامانه‌های تصفیه و حذف مواد و فلزات سنگین و کاربرد در مواد هوشمند از دیگر زمینه‌های مطرح برای به کارگیری هیدروژل‌ها می‌باشند [۱۱]. با این حال، استفاده از هیدروژل‌ها در مهندسی بافت و بالاخص در ترمیم بافت‌های نرم به دلیل خواص مطلوب مورد اشاره، بسیار مورد توجه قرار

^۲ extracellular matrix

^۱ poly-2-hydroxyethyl methacrylate

بیشترین کاربرد در حوزه‌های مورد اشاره را دارند [۱۳] و [۱۴].

بنابراین آنچه گفته شد، استفاده از هیدروژل‌ها به‌ویژه از نوع کلاژنی می‌تواند گزینه مناسبی برای تحقیقات حوزه مهندسی بافت و بالاحص ترمیم بافت‌های حساسی همچون بافت عصبی باشد. استفاده از سلول‌های بنیادی در کنار ساختارهای هیدروژلی می‌تواند منجر به پاسخ‌های به مراتب مطلوب‌تری در حوزه مورد اشاره شود. در واقع سلول‌های بنیادی با قابلیت خودنوسازی^۱ و توانایی تمایز^۲ به انواع سلول‌های بافت‌های بدن، مزیت فوق‌العاده‌ای برای استفاده در مجاورت ساختارهای هیدروژلی حوزه مهندسی بافت دارند [۱۵ و ۱۶]. در این بین، سلول‌های بنیادی مزانشیمی^۳ (MSCs) به دلیل خواص مطلوبی از جمله قابلیت تهیه و کشت مناسب، منابع استخراج متنوع در بدن (مانند مغز استخوان، بافت چربی، خون بند ناف و پالپ دندان) و شناخته بودن پروتکل‌ها و مسیرهای کشت و تمایز بسیار مورد توجه هستند. این سلول‌ها همچنین قابلیت بالایی در تمایز به انواع رده‌های سلولی از جمله سلول‌های بافت‌های هم‌بند (استخوان، غضروف، تاندون و لیگامان)، چربی، عضلانی و حتی برخی سلول‌های عصبی را دارند [۱۷-۱۹].

در نتیجه، تاکنون در مطالعات متعددی از MSCها در مجاورت هیدروژل‌ها برای کاربردهای متعددی از جمله ترمیم غضروف [۲۰]، التیام زخم [۲۱ و ۲۲]، بهبود بیماری‌های مفاصل و استخوان [۲۳]، بیماری‌های عروقی [۲۴ و ۲۵] و البته بهبود مشکلات بافت عصبی [۲۶ و ۲۷] استفاده شده است. در مطالعه حاضر نیز، پتانسیل تکثیر و رفتار تمایزی این سلول‌ها (MSCهای مستخرج از مغز استخوان موش) بر روی یک هیدروژل کلاژنی بررسی شد. با این تفاوت که در یک رویکرد نوین، به محیط سلول‌های مورد اشاره، عصاره هیپوکامپ^۴ به دست آمده از

گرفته است. در این میان، بافت عصبی به دلیل حساسیت عملکردی و قابلیت ترمیم بسیار محدود خود، گزینه مناسبی برای انجام تحقیقات مهندسی بافت ضمن استفاده از ساختارهای هیدروژلی می‌باشد [۱۰ و ۱۲].

همان‌طور که پیشتر اشاره شد، هیدروژل‌ها ساختارهایی بر پایه ترکیبات پلیمری (سنتزی یا طبیعی) هستند. از جمله پلیمرهای سنتزی مورد استفاده در هیدروژل‌ها برای کاربردهای زیستی و مهندسی بافت می‌توان به پلی‌وینیل الکل (PVA)، پلی‌اتین گلیکول (PEG)، پلی‌هیدروکسی اتیل متاکریلات (pHEMA) و پلی‌ان ایزوپروپیل اکریل‌امید (pNIPAM) اشاره کرد. چنین هیدروژل‌هایی معمولاً قابلیت مهندسی شدن، تنظیم و کنترل خواص، تنوع ویژگی‌ها و فرایندهای ساخت استاندارد با خواص قابل تنظیم ارائه می‌دهند. با این حال، مهم‌ترین نقیصه و مشکل چنین ساختارهایی، ضعف خواص بیولوژیک و زیست سازگاری محدودتر و پایین‌تر این هیدروژل‌ها در مقایسه با هیدروژل‌هایی است که از منابع طبیعی یا در واقع از بیوپلیمرها به دست می‌آیند [۷ و ۱۱].

استفاده از هیدروژل‌ها بر پایه بیوپلیمرهایی همچون آلجینات، هیالورونیک اسید، کیتوسان و کلاژن در مجاورت ساختارهای زنده و سلولی، معمولاً به پاسخ‌های زیستی بسیار مطلوب‌تری منجر می‌شود [۷].

در میان بیوپلیمرهای مورد اشاره، کلاژن به‌عنوان فراوان‌ترین پروتئین موجود در بدن که دارای نقش‌های متعددی از جمله عملکرد ساختاری در ECM بسیاری از بافت‌های بدن است، یکی از بهترین گزینه‌ها برای تهیه هیدروژل‌های حوزه سلول‌درمانی و مهندسی بافت است. زیست سازگاری فوق‌العاده، قابلیت جذب آب بالا، انعطاف‌پذیری مناسب و زیست تخریب‌پذیری (عمدتاً با مکانیسم آنزیمی) قابل کنترل از جمله مزایای هیدروژل‌های کلاژنی در کاربردهای مرتبط آنها می‌باشد. کلاژن نوع I و II

³ Mesenchymal stem cells

⁴ hippocampal extract

¹ self-renewal

² differentiation

مغز جنین موش نیز اضافه شد. در واقع برخی مطالعات صورت گرفته نشان داده‌اند که عصاره مذکور پتانسیل بالایی در بهبود فعالیت و رشد سلول‌ها و همچنین ایجاد جهت‌گیری در سلول‌های اولیه به سمت تمایز به سلول‌های عصبی را دارد [۳۱-۲۸]. در مجموع، رفتار سلول‌های مزانشیمی در محیط مورد اشاره و بالاخص اثر نوروتروفیک عصاره هیپوکامپ روی جنین سلول‌هایی در پژوهش جاری بررسی شد و یافته‌های مربوطه نیز ارائه شد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- استخراج و جداسازی سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان

برای تهیه سلول‌های مزانشیمی از ۶ عدد موش نر نژاد ویستار (Wistar) در سن ۴ تا ۶ هفتهگی استفاده شد. در چنین سنی، احتمال منشعب شدن استخوان‌های بلند موش‌ها کمتر است و همچنین میزان سلول بنیادی بیشتری در قسمت مغز استخوان قابل استخراج می‌باشد. تمام فعالیت‌ها و مراحل کار حیوانی نیز بر اساس دستورالعمل‌های تدوین شده توسط کمیته اخلاق (با شناسه IR.IAU.SRB.REC.1401.328) انجام شد.

در ابتدا، موش‌ها با قرار گرفتن در معرض گاز دی‌اکسیدکربن دچار مرگ آرام^۱ شدند و در ادامه به کمک اتانول ۷۰ درصد، لاشه آنها استریل شد. با ایجاد برش‌های لازم در اطراف اندام‌های عقبی و در جایی که به تنه می‌چسبند، پوست این ناحیه کشیده و جدا شد. این کار از تماس بیشتر اندام‌های عقبی با مو و پوست جانور جلوگیری کرده و احتمال آلودگی را نیز کاهش می‌دهد. در مرحله بعد، اندام‌های عقبی موش با برش ایجاد شده در امتداد طناب نخاعی، از تنه بدن جدا شد. تشریح اندام‌های عقبی و برداشتن بافت‌های هم‌بند و عضلانی اطراف

استخوان‌ها در یک هود استریل انجام شد. به‌منظور خارج کردن مغز استخوان، دو سر انتهایی استخوان ران موش با دقت و بدون اینکه خرد شد، برش داده شد. مغز استخوان به کمک یک سرنگ ۱۰ سی‌سی که حاوی ۰/۵ میلی‌لیتر محیط کشت کامل بود شسته و سپس خارج شد و به یک فالکون ۱۵ سی‌سی منتقل شد. سپس، این سوپانسیون سلولی از یک فیلتر ۷۰ میکرومتری عبور داده شد تا هرگونه ضایعه درشت و استخوانی، در صورت وجود حذف شود. سلول‌های به‌دست آمده به کمک هموسایتومتر^۲ مورد شمارش قرار گرفتند و سلول‌های اولیه با تراکم حدود 5×10^6 سلول در میلی‌لیتر به‌دست آمدند. سپس، این سلول‌ها به فلاسک‌های دیگر کشت سلولی برای انجام تست‌های مورد نظر منتقل شدند. نگهداری سلول‌ها نیز در انکوباتور استاندارد کشت سلولی در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۹۵ درصد و کربن دی‌اکسید ۵ درصد انجام شد.

۲-۲- تهیه عصاره هیپوکامپ جنین موش

از جنین ۶ روزه موش نر به منظور تهیه عصاره هیپوکامپ استفاده شد. در ابتدا، جنین موش‌ها با قرار گرفتن در معرض دی‌اکسیدکربن، مرگ آرام را تجربه کردند. سپس، به کمک اتانول ۷۰ درصد، لاشه موش‌ها استریل شد. ضمن نگهداری سر جنین موش با یک پنس، یک برش در ناحیه پس‌سری و استخوان آکسیپیتال^۳ در راستای ساژیتال^۴ ایجاد شد. در ادامه با برش‌های دقیق کرونال، استخوان پس‌سری و ساختارهای جانبی آن جدا شد و ضمن ادامه برش در راستای ساژیتال، استخوان‌های جداری و پیشانی هم خارج شدند تا قسمت پشتی مغز هر جنین به صورت کامل نمایان شود.

پس از خارج کردن، مغز به یک پتری دیش استریل منتقل شد و به قطعات کوچکتر از ۰/۵ میلی‌متر مکعب برش داده

³ occipital

⁴ sagittal

¹ euthanasia

² hemocytometer

کلاژن نوع I، ابتدا تاندون‌های خارج شده از دم موش به خوبی با PBS سرد شسته شد و سپس به قطعات کوچکتري برش داده شد. برای استخراج کلاژن، این قطعات در محلول استیک اسید ۰/۵ مولار غوطه‌ور شده و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به هم زده شدند. در مرحله بعدی، مخلوط مورد اشاره با سرعت ۱۰۰۰۰ به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ شد تا ذرات ناخواسته از قسمت روئین^۲ حاوی کلاژن محلول جدا گردد. به منظور جدا کردن و رسوب‌دهی کلاژن محلول، مقدار مناسبی از NaCl با غلظت نهایی حدود ۰/۸ مولار به محلول مورد نظر اضافه شد و به مدت ۲ ساعت و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد مجدداً به آرامی هم زده شد. پس از شکل‌گیری رسوبات کلاژنی، جدایش آنها با فرایند سانتریفیوژ (۱۰۰۰۰ g) و به مدت ۳۰ دقیقه انجام شد. در انتها، برای خالص‌سازی کلاژن به‌دست آمده، رسوبات کلاژنی در استیک اسید ۰/۵ مولار قرار گرفتند و به مدت ۴۸ ساعت و در همان دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در مقابل محلول PBS، دیالیز شدند تا نمک‌ها و ناخالصی‌های احتمالی موجود حذف شوند. برای جلوگیری از دنا توره شدن، کلاژن به‌دست آمده پس از خالص‌سازی در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

به هر حال در شرایط اسیدی، معمولاً پدیده تولید فیبریل^۳ در کلاژن اتفاق نمی‌افتد و در نتیجه نمی‌توان در چنین pHی، ژل به‌دست آورد. بنابراین، نیاز است که ابتدا اسیدیته محلول به سطح فیزیولوژیک (۷/۴) و خنثی برسد تا شرایط برای تشکیل شبکه فیبریلی^۴ کلاژن و ایجاد ژل، مهیا شود. در این راستا، یک محلول خنثی‌کننده^۵ مت‌شکل از محیط کشت 10×DMEM حاوی FBS و سدیم هیدروکسید ۰/۲۵ مولار تهیه شد. محلول مورد اشاره به تدریج به محلول کلاژنی اضافه شد تا pH به محدوده ۷/۴

شد. سپس، آنزیم جداکننده بافتی (تریپسین ۰/۲۵ در صد وزنی/حجمی) و DNase I (۱۰۰ U/ml) به ساختارهای قبلی اضافه شد و به مدت حدود ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. در نهایت حدود یک میلی‌لیتر محیط کشت DMEM حاوی FBS ۱۰ درصد، برای کاهش فعالیت آنزیم اضافه شد. برای به‌دست آمدن ساختاری همگن، سوپانسیون مورد نظر چندین بار پیپتاژ شد و در ادامه به یک لوله سانتریفیوژ ۱۵ میلی‌لیتری منتقل شد. عمل سانتریفیوژ با سرعت ۱۰۰۰ دور در دقیقه و به مدت ۵ دقیقه انجام شد. سپس مایع رویی برداشته و حدود ۴ تا ۵ میلی‌لیتر از محیط کشت DMEM برای پیپتاژ مجدد داخل ظرف استفاده شد. در نهایت سوپانسیون‌های به دست آمده، از فیلتر استریل ۷۰ میکرومتری عبور داده شدند تا هرگونه قطعه بزرگ بافتی در صورت وجود حذف شود و عصاره به‌دست آمده برای تست‌های بعدی و قرارگیری در مجاورت سلول‌های مزانشیمی استفاده شد.

۳-۲- کشت سلول‌های مزانشیمی بر روی هیدروژل‌های

کلاژنی در مجاورت عصاره‌های هیپوکامپ موش

روش‌های متعدد و مختلفی برای تهیه ژل‌های کلاژنی وجود دارد [۳۲-۳۴]. با این حال، در مطالعه جاری برای جلوگیری از متأثر شدن خواص زیستی کلاژن و کاهش ریسک ایجاد سمیت سلولی، از روش‌های شیمیایی و کراس‌لینک‌های^۱ مرتبط این فرایندها استفاده نشد. در عوض، ژل‌های کلاژنی بر اساس یک روش فیزیکی شناخته شده [۳۵] و طبق مراحل بیان می‌شود، تهیه شدند.

برای تهیه ژل‌های کلاژنی، ابتدا کلاژن نوع I (۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) به‌دست آمده از تاندون دم موش، در اسید استیک ۰/۲ درصد (وزنی/وزنی) با pH اولیه^۳ ۳ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد حل شد. قابل ذکر است که برای تهیه

^۴ fibrillar network

^۵ neutralizing

^۱ crosslinkers

^۲ supernatant

^۳ fibrillogenesis

غلظت دوم (Ext. 2): ۲۵۰ میکرولیتر از عصاره بافت به علاوه ۷۵۰ میکرولیتر از محیط کشت کامل.
 غلظت سوم (Ext. 3): ۵۰۰ میکرولیتر از عصاره بافت به علاوه ۵۰۰ میکرولیتر از محیط کشت کامل.
 جدول ۱ داده‌های طراحی گروه‌های آزمایش در مطالعه حاضر را نشان می‌دهد.

۴-۲ بررسی رفتار تکثیر و زنده‌مانی سلول‌های مزانشیمی (به کمک تست MTT)

تست MTT، یکی از رایج‌ترین روش‌های سنجش زیست‌سازگاری ترکیبات و مواد مختلف می‌باشد. در این تست از نوعی نمک تترازولیوم زرد رنگ^۱ استفاده می‌شود که توسط آنزیم‌های دهیدروژنازی موجود در سلول‌های زنده به ترکیبی به نام فورمازان^۲ با رنگ آبی-ارغوانی تبدیل می‌شود. بنابراین، میزان شدت رنگ آبی-ارغوانی ایجاد شده، می‌تواند معیاری از میزان زنده‌مانی سلول‌ها باشد. عدد مربوط به شدت رنگ مذکور نیز توسط دستگاه اسپکتروفتومتری و در طول موج ۵۷۰ نانومتر اندازه‌گیری و گزارش می‌شود.

برسد. خاطر نشان می‌شود تمامی این فرایندها در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انجام شدند. سپس، مقادیر یک‌سانی از محلول به‌دست آمده به چاهک‌های یک پلیت کشت سلولی ۲۴ خانه‌ای منتقل شد تا ضمن گرم شدن در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، ژل‌های مربوطه پس از حدود یک ساعت تشکیل شوند. ضمناً برای جلوگیری از تبخیر آب ژل‌ها، سطح چاهک‌ها با پارافیلیم پوشانده شد.

در ادامه و پیش از اضافه کردن سلول‌های مزانشیمی، مقدار یک‌سانی محیط کشت کامل به هر یک از چاهک‌ها اضافه شد به گونه‌ای که سطح ژل‌ها کاملاً با محیط کشت پوشیده شود. سپس، حجم یکسان از سوسپانسیون اولیه سلول‌های مزانشیمی به چاهک‌های مربوطه اضافه شد. در نهایت، برای بررسی اثر وجود عصاره هیپوکامپ و البته غلظت آن بر روی رشد و تمایز سلول‌های مزانشیمی، عصاره‌های مربوطه در ۳ غلظت مختلف تهیه شده و به چاهک‌ها برای تست‌های ۳ تکرار اضافه شدند. غلظت عصاره‌های هیپوکامپ و همچنین طراحی آزمایش این مطالعه به قرار زیر تعیین شد:

غلظت اول (Ext. 1): ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره بافت به علاوه ۹۰۰ میکرولیتر از محیط کشت کامل.

جدول ۱ طراحی گروه‌های آزمایش در مطالعه حاضر

| گروه‌های آزمایش | کدگذاری نمونه‌ها | اجزاء تشکیل دهنده نمونه | |
|-----------------|---------------------|-------------------------------------|-------------------------------|
| | | ترکیب اصلی | نوع عصاره هیپوکامپ افزوده شده |
| ۱ | MSC | فقط سلول‌های مزانشیمی (نمونه کنترل) | - |
| ۲ | MSC+Gel-Coll | هیدروژل کلاژنی + سلول‌های مزانشیمی | - |
| ۳ | MSC+Gel-Coll+Ext. 1 | هیدروژل کلاژنی + سلول‌های مزانشیمی | غلظت اول |
| ۴ | MSC+Gel-Coll+Ext. 2 | هیدروژل کلاژنی + سلول‌های مزانشیمی | غلظت دوم |
| ۵ | MSC+Gel-Coll+Ext. 3 | هیدروژل کلاژنی + سلول‌های مزانشیمی | غلظت سوم |

² Formazan

¹ 3-(4,5-di methyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

قرار گرفتند تا نفوذپذیری غشاء سلول‌ها برای ورود آنتی بادی‌ها افزایش یابد. سپس، نمونه‌ها شسته شده و آنتی بادی‌های اولیه^۴ رقیق شده با نسبت ۱ به ۱۰۰ برای پروتئین نستین^۵ و GFAP^۶ بر روی نمونه‌ها اضافه شد و فرایند مربوطه به مدت یک شب در داخل محیط یخچال ادامه پیدا کرد. پس از مدت مورد اشاره، نمونه‌ها از یخچال خارج شده و چندین مرتبه مجدداً با PBS شسته شو داده شدند. در ادامه، آنتی‌بادی ثانویه با رقت ۱ به ۱۵۰ اضافه شده و نمونه‌ها به مدت حدود ۲ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد و در محیط تاریک قرار گرفتند. نمونه‌ها از انکوباتور خارج شده و مجدداً^۳ مرتبه با PBS شسته شو شده و DAPI (D9542-Sigma) نیز به آنها اضافه شد تا برای رنگ‌آمیزی متقابل^۷ یا مشخص کردن هسته‌های سلولی به رنگ آبی مورد استفاده قرار گیرد. پس از یک شسته‌شوی نهایی با PBS، در نهایت نمونه‌های روی لامل در زیر میکروسکوپ نوری Olympus با قابلیت دریافت طیف فلوروسنت قرار گرفتند و تصاویر به دست آمده، در تفسیر نتایج این مطالعه مورد استفاده قرار گرفت. به کمک نرم‌افزار ImageJ و شدت نور فلوروسنت دریافتی نیز، میزان بیان پروتئین‌های هدف در این پژوهش نیز مشخص شد. همچنین، شایان ذکر است که برای بررسی اثر غلظت عصاره هیپوکامپ بر روی رفتار سلول‌های بنیادی مزانشیمی، از نمونه‌ای که دارای بالاترین غلظت این عصاره (MSC+Gel-Coll+Ext. 3) بود استفاده شد تا اثر عصاره به خوبی در تست‌های این بخش نمایان شود.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- زنده‌مانی سلول‌ها

نتایج تست MTT و درصد‌های زنده‌مانی سلول‌های مزانشیمی کشت شده در مجاورت نمونه‌های این مطالعه،

سرانجام با مقایسه این عدد با عدد مربوط به نمونه کنترل (نمونه‌ای که فقط حاوی سلول‌ها است) می‌توان میزان زنده‌مانی سلول‌ها را به صورت کمی و طبق رابطه ۱ گزارش کرد:

$$= (\%) \text{ درصد زنده‌مانی سلول‌ها}$$

$100 \times (\text{عدد جذب نمونه کنترل} / \text{عدد جذب نمونه مورد نظر})$
در مطالعه حاضر نیز، گروه‌های آزمایش همان‌طور که در جدول ۱ مشخص شده، در مجاورت مقادیر یکسانی از سلول‌های مزانشیمی در چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفتند. در ادامه محلول رویین چاهک‌ها برداشته شد و سپس مقدار ۱۰ میکرولیتر از محلول استوک MTT به همراه ۹۰ میکرولیتر از محیط کشت به هر چاهک اضافه شد. در مرحله بعد، پلیت مربوطه به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. در اثر فعالیت آنزیم‌های دهیدروژناز موجود در میتوکندری سلول‌های زنده، MTT به گرانول‌های نامحلول آبی-ارغوانی فورمازان تبدیل شد. سپس، محلول رویین چاهک‌ها خارج شد و حلال DMSO^۱ به چاهک‌ها اضافه شد تا گرانول‌های فورمازان را حل کند. در نهایت عدد جذب تمام نمونه‌های چاهک‌ها در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد و درصد زنده‌مانی نیز بر اساس رابطه ۱ محاسبه و گزارش شد.

۲-۵- سنجش رفتار تمایزی سلول‌های مزانشیمی به عصبی (به کمک روش ایمونوفلوروسنت و میزان بیان پروتئین‌های Nestin و GFAP)

نمونه‌ها پس از تثبیت شدن^۲ به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق و در پارافرمالدهید ۴ درصد، سه مرتبه با محلول بافر فسفات سالین (PBS)^۳ شسته شدند. سپس، نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در مجاورت تریتون (Triton) ۰/۳ درصد

^۵ Nestin

^۶ Glial Fibrillar Acidic protein

^۷ counter-staining

^۱ Dimethylsulfoxide

^۲ fixation

^۳ Phosphate-buffered Saline

^۴ primary

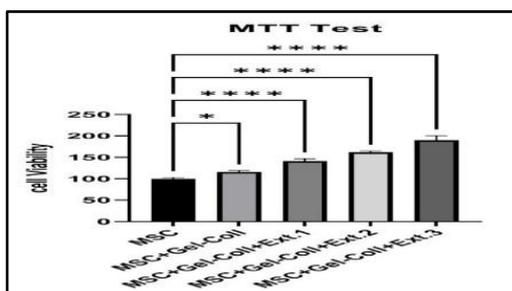
ترین پروتئین موجود در بدن نیز می باشد، کاربردهای بسیار گسترده‌ی در حوزه مهندسی بافت، پزشکی ترمیمی و البته حوزه‌های مختلف سلول‌درمانی داشته‌اند [۱۱ و ۱۳ و ۳۶]. با توجه به مزایای مورد اشاره، در این پژوهش نیز از هیدروژل کلاژنی برای کاربرد مورد نظر استفاده شد که عملکرد مثبت آن به شکل واضحی حتی در تست MTT نیز مشاهده شد.

نکته دیگر قابل اشاره این است که وجود عصاره هیپوکامپ مغز موش، همان‌گونه که در برخی مطالعات قبلی نشان داده است [۳۱-۲۸]، به وضوح اثر مثبتی در رشد و تکثیر سلول‌ها دارد. به این صورت که در نمونه حاوی بالاترین غلظت عصاره هیپوکامپ مغز موش، درصد زنده‌مانی سلول‌های مزانشیمی حدوداً به عدد قابل توجه ۱۹۰ درصد رسیده است.

به ترتیب در شکل ۱ و جدول ۲ به نمایش گذاشته شده اند.

همان‌گونه که در شکل ۱ قابل مشاهده است، هیدروژل کلاژنی نه تنها سمیتی برای سلول‌های مزانشیمی ایجاد نکرده است بلکه اثر مثبت و ترغیبی در رشد و تکثیر این سلول‌ها داشته است. این یافته خود تأییدی بر این فرضیه است که معمولاً هیدروژل‌ها و ساختارهای تهیه شده از منابع طبیعی که عمدتاً شامل بیوپلیمرها می‌شوند، می‌توانند خواص زیستی مناسب‌تری در مقایسه با ساختارهای تهیه شده از مواد سنتزی ارائه دهند. چنین مسأله‌ای در تعداد قابل توجهی از مطالعات و تحقیقات قبلی مربوط به این حوزه نیز مورد تأکید بوده است [۱ و ۹-۷ و ۱۴].

در این بین، هیدروژل‌های تهیه شده از کلاژن به دلیل زیست‌سازگاری فوق‌العاده این بیوپلیمر که در واقع فراوان



شکل ۱ نمودار میزان زنده‌مانی سلول‌های مزانشیمی در مجاورت هیدروژل کلاژنی با و بدون عصاره هیپوکامپ مغز موش در ۳ غلظت متفاوت (سلول‌های بنیادی مزانشیمی به تنهایی به عنوان نمونه کنترل انتخاب شدند).

جدول ۲ درصد زنده‌مانی سلول‌های مزانشیمی در مجاورت هیدروژل کلاژنی با و بدون عصاره هیپوکامپ مغز موش در ۳ غلظت متفاوت (سلول‌های بنیادی مزانشیمی به تنهایی به عنوان نمونه کنترل انتخاب شدند).

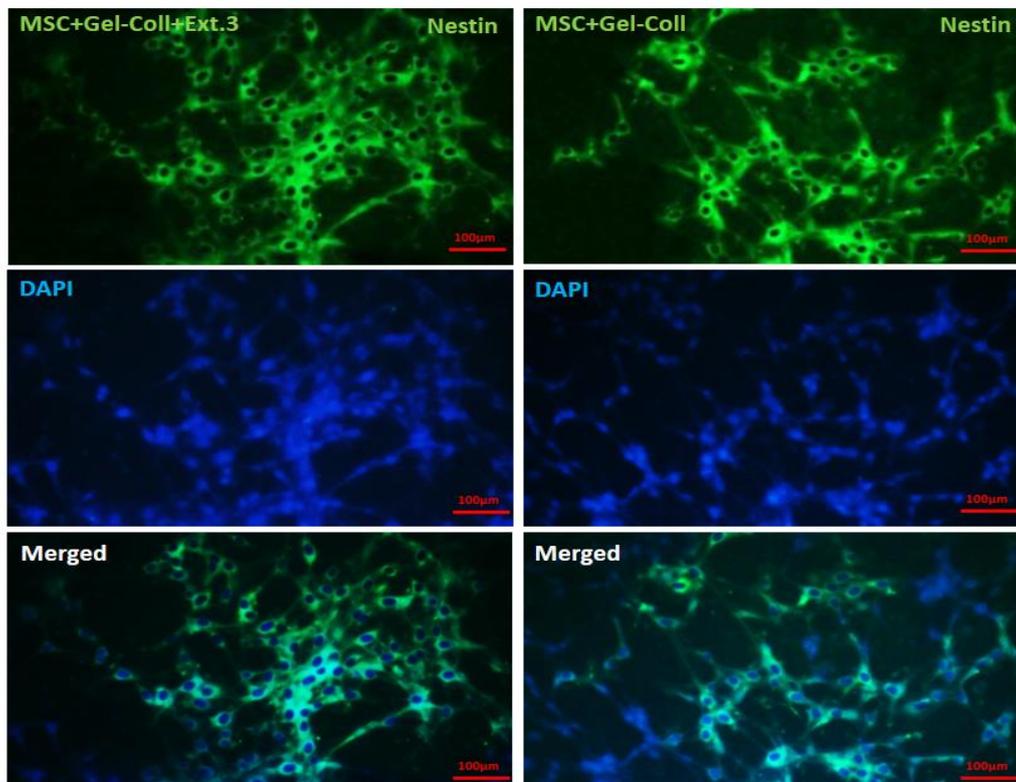
| نمونه نتیجه | MSC | MSC+Gel-Coll | MSC+Gel-Coll+Ext. 1 | MSC+Gel-Coll+Ext. 2 | MSC+Gel-Coll+Ext. 3 |
|----------------|-------|--------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| مقدار میانگین | ۱۰۰ | ۱۱۵/۹ | ۱۴۱/۳ | ۱۶۱/۹ | ۱۸۹/۹ |
| انحراف معیار | ۲/۸۱۹ | ۳/۰۹۶ | ۵/۴۳۵ | ۲/۹۵۶ | ۱۰/۴۱ |
| خطای استاندارد | ۱/۶۲۸ | ۱/۷۸۷ | ۳/۱۳۸ | ۱/۷۰۷ | ۶/۰۱۳ |

همانگونه که در شکل ۲ مشاهده می شود، وجود عصاره هیپوکامپ مغز موش با بالاترین غلظت در محیط سلولها، سبب افزایش قابل توجه بیان پروتئین نستین در مقایسه با نمونه بدون عصاره هیپوکامپ شده است. با این حال، در خصوص پروتئین GFAP، رفتار کاملاً متفاوتی مشاهده شد (شکل ۳). به عبارت دیگر، برخلاف نستین که میزان بیانش وابستگی مثبت با وجود عصاره هیپوکامپ داشت، میزان بیان GFAP در نمونه‌ای که حاوی عصاره هیپوکامپ بود کاهش یافت. پیش از تفسیر نتایج مشاهده شده در شکل ۲ و ۳، بهینه است مختصری در خصوص اهمیت پروتئین‌های نستین و GFAP و همچنین عملکرد آنها در این حوزه، توضیح ارائه کرد. پروتئین‌های نستین و GFAP از ترکیبات کلیدی مؤثر در ساختار و عملکرد سلول‌های سیستم عصبی هستند [۳۷-۳۹].

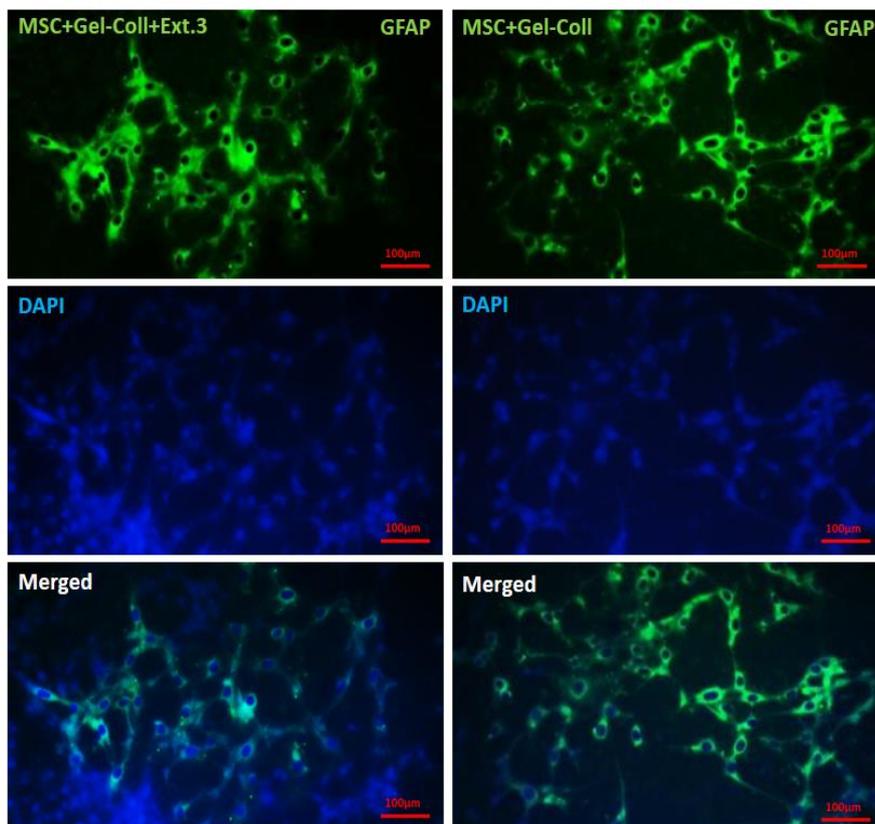
در نتیجه، عوامل و ترکیبات مورد استفاده در این مطالعه (هیدروژل کلاژنی و عصاره هیپوکامپ مغز موش) در مجاورت سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان موش، نه تنها اثر سمیت سلولی ندارند، بلکه خود عامل محرک و ترغیب کننده در افزایش زنده‌مانی و همچنین رشد سلول‌ها هستند.

۲-۳- تمایز سلول‌های مزانشیمی

تصاویر میکرو سکوپ فلوئور سنت مربوط به سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان موش که در مجاورت هیدروژل کلاژنی بدون عصاره هیپوکامپ و همچنین با بالاترین غلظت عصاره هیپوکامپ قرار گرفتند؛ در شکل ۲ و ۳ نمایش داده شده است که به ترتیب بیانگر کیفی میزان بیان پروتئین‌های نستین و GFAP توسط سلول‌ها می‌باشند.



شکل ۲ تصویر میکرو سکوپ فلوئور سنت سلول‌های مزانشیمی در مجاورت هیدروژل کلاژنی با و بدون عصاره هیپوکامپ جنین موش برای ردیابی پروتئین نستین (از DAPI برای مشخص کردن بهتر زمینه و آبی رنگ کردن هسته سلول‌ها استفاده شده است).



شکل ۳ تصویر میکروسکوپ فلوروسنت سلول‌های مزانشیمی در مجاورت هیدروژل کلاژنی با و بدون عصاره هیپوکامپ جنین موش به منظور ردیابی پروتئین GFAP (از DAPI برای مشخص کردن زمینه و آبی رنگ کردن هسته سلول‌ها استفاده شده است).

نستین نیز به‌عنوان یکی از انواع اصلی پروتئین‌های رشته ای میانی (کلاس VI) با وزن مولکولی حدود ۲۲۰ کیلودالتون، به شکل قابل توجهی در سلول‌های اجدادی یا پیش‌ساز^۶ و بنیادی اولیه مربوط به سیستم عصبی هم بیان می‌شود. این پروتئین همچنین در فعالیت‌های اولیه سلولی که منجر به تولید انواع مختلفی از سلول‌های عصبی مانند نورون‌ها، آستروسیت‌ها و الیگودندروسیت‌ها^۹ می‌شود، به میزان بالایی بیان می‌شود [۴۳ و ۴۴]. به عبارت دیگر، نستین می‌تواند به‌عنوان نشانگری برای وجود سلول‌های اجدادی و بنیادی اولیه مربوط به سلول‌های عصبی، مورد

این پروتئین‌ها، همچنین به‌عنوان نشانگرهایی^۱ مهم در بررسی رفتار تکثیر و تمایز این نوع از سلول‌ها استفاده دارند [۳۸، ۴۰ و ۴۱]. در واقع، در مجموع چیزی حدود ۵ نوع اصلی از رشته‌های میانی^۲ در اسکلت سلول‌های پشتیبان عصبی یا گلیال^۳ و به‌طور خاص در آستروسیت‌ها^۴ شناسایی شده است که شامل ویمنتین^۵، ساینمین^۶، لامین^۷ و البته نستین و GFAP می‌شود. همانطور که اشاره شد، این پروتئین‌ها هم در حفظ ساختار و عملکرد صحیح سیستم عصبی و هم در شناسایی این نوع از سلول‌ها استفاده دارند [۳۹ و ۴۲].

⁶ synemin
⁷ lamin
⁸ progenitor
⁹ oligodendrocytes

¹ markers
² intermediate filaments
³ glial
⁴ astrocytes
⁵ vimentin

نشاندگی از مراحل اولیه و حالت بنیادی سلول‌های عصبی است، GFAP معمولاً در سلول‌های تمایز یافته تر بافت عصبی و همچنین در شرایط نامساعد و پاتولوژیک برای سلول‌های عصبی مشاهده می‌شود [۴۰ و ۵۱].

در اینجا، بهینه است که برای مشخص تر شدن اثر هیدروژل کلاژنی و عصاره هیپوکامپ بر روی رفتار سلول‌های بنیادی مغز استخوان موش، توضیحاتی در خصوص برهم‌کنش‌ها و تعاملات این اجزاء با یکدیگر داده شود. عصاره هیپوکامپ شامل مخلوط پیچیده‌ای از انواع پروتئین‌های محلول همچون فاکتورهای نوروتروفیک، سایتوکین‌ها، آنزیم‌ها و مولکول‌های ECM است [۲۸،۵۴ و ۵۵]. در مجاورت یک هیدروژل کلاژنی، بیومولکول‌های موجود در این عصاره می‌توانند وارد فضای بین‌فیبریلا کلاژن شده و یا به این رشته‌ها متصل شوند. بنابراین، ساختار هیدروژل کلاژنی می‌تواند به‌عنوان محلی برای ذخیره یا تجمع برخی عوامل نوروتروفیک و پروتئین‌های عصاره هیپوکامپ عمل کرده و به تدریج آنها را مجدداً رهاسازی کرده و در اختیار سیستم مورد نظر قرار دهد [۵۴ و ۵۶].

عصاره هیپوکامپ همچنین حاوی آنزیم‌هایی مانند، آنزیم‌های ماتریکس متالوپروتیناز (MMP)^۳ و کلاژناز می‌باشد. چنین آنزیم‌هایی توانایی تجزیه و همچنین بازآرایی^۴ یک ساختار کلاژنی را دارند. به‌عنوان مثال، شبکه PNN (perineuronal net) که در اطراف نوروها و در ECM بخش اعصاب مرکزی (CNS) یافت می‌شود، در ساختار خود حاوی رشته‌های کلاژنی است که پیوسته توسط آنزیم‌های MMP بازآرایی می‌شوند [۵۷]. در نتیجه، وجود چنین آنزیم‌هایی در عصاره هیپوکامپ که عمدتاً بر پایه پلی‌پپتیدهای پروتئینی هستند، خود می‌تواند در تنظیم زیست تخریب‌پذیری هیدروژل کلاژنی، بازآرایی ساختار آن و حتی رهایش فاکتورها یا عوامل محبوس‌شده در آن

استفاده قرار گیرد [۴۵]. برخی مطالعات دیگر نیز نشان داده است که بیان نستین در محیط حاوی سلول‌های بنیادی، خود می‌تواند علامتی برای حرکت این سلول‌ها به سمت تمایز به رده‌های مختلف سلول‌های عصبی باشد [۴۵ و ۴۶]. نستین همچنین به‌عنوان نشاندگی برای توان تکثیر سلول‌های عصبی اولیه استفاده می‌شود. بدین معنی که وقتی این سلول‌های پیش‌ساز و بنیادی اولیه عصبی در فاز تکثیری^۱ خود هستند، این پروتئین از بیان بالایی برخوردار است و با حرکت بیشتر این سلول‌های اجدادی و عصبی بنیادی به سمت ساختارهای تمایز یافته‌تر، معمولاً بیان نستین کاهش می‌یابد [۴۷ و ۴۸]. در یک مطالعه اولیه که توسط Gendebien و همکاران [۴۶]، بر روی قابلیت و شرایط تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سلول‌های عصبی انجام شد، مشخص شد که بیان نستین به نوبه خود تأییدیه‌ای برای شکل‌گیری سلول‌های اجدادی یا پیش‌ساز مربوط به سلول‌های عصبی است و در صورت ورود سلول‌های اولیه به فرایندهای تکمیلی تمایز، بیان نستین کاهش یافته و در عوض نشانگر GFAP به میزان بالاتری در ادامه کار بیان خواهد شد.

از سوی دیگر، GFAP نیز به‌عنوان یک پروتئین رشته‌ای میانی از کلاس III و با وزن مولکولی حدود ۵۰ کیلو دالتون، در انواع مختلفی از سلول‌های پشتیبان سیستم عصبی یا همان سلول‌های گلیال و به‌طور خاص در آستروسیت‌ها یافت می‌شود [۴۹-۵۱]. در برخی بیماری‌ها مانند آلزایمر، پارکینسون، گلیوما و یا در صورت آسیب به سیستم عصبی نیز میزان بیان این پروتئین به شکل قابل توجهی افزایش پیدا می‌کند [۴۹،۵۲ و ۵۳]. چنین شرایط پاتولوژیکی که معمولاً همراه با پاسخی موسوم به گلیوز واکنشی^۲ است، می‌تواند در ادامه به بیان و تولید قابل‌وجه پروتئین‌های رشته‌ای میانی اسکلت سلولی و بالخصوص GFAP بیانجامد [۴۴]. برخلاف نستین که به نوعی

³ Matrix Metalloproteinase

⁴ remodeling

¹ proliferative

² reactive gliosis

کمک نماید. از سوی دیگر، سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان نیز می‌توانند تعاملات قابل توجهی با محیط تعبیه شده در این مطالعه داشته باشند. در اولین مرحله، این سلول‌ها این امکان را دارند تا از طریق گیرنده‌های اینتگرینی^۱ به ماتریکس کلاژنی متصل شوند. در واقع مشخص شده است که سلول‌های MSC می‌توانند اینتگرین‌های متصل‌شونده به کلاژن همچون $\alpha 2\beta 1$ را تولید کنند که به شکل قابل توجهی قابلیت تشخیص موتیف‌های پپتیدی^۲ در ساختار کلاژن را دارند [۵۸ و ۵۹]. در اثر اتصال این اینتگرین‌های سلول‌های MSC به فیبریل‌های کلاژنی، نه تنها سیگنال‌های درون‌سلولی مربوط به چسبندگی سلولی و بقای سلول^۳ تولید می‌شوند، بلکه دیده شده است که ضمن فعال شدن مسیر سیگنالی PI3K-Akt، این سلول‌ها به سمت تمایز به سلول‌های عصبی حرکت می‌کنند [۶۰]. علاوه بر این، به دلیل شباهت ساختار هیدروژل کلاژنی با ECM طبیعی بافتی، MSC‌ها می‌توانند با حرکت درون هیدروژل در این ساختار توزیع شده، تکثیر شوند و همچنین فاکتورهای رشد و سایتوکین‌های مرتبط با خود را در این محیط ترشح کنند. نکته دیگر اینکه این سلول‌ها با تولید و رهایش آنزیم‌های MMP، می‌توانند ضمن بازآرایی ساختار هیدروژل، به رهاسازی فاکتورهای هیپوکامپی که بعضاً در ساختار هیدروژل محبوس شده‌اند کمک کنند [۵۹ و ۶۰]. سلول‌های MSC، همچنین می‌توانند از فاکتورهای موجود در عصاره هیپوکامپ متأثر شوند. در واقع، این عصاره حاوی پلی‌پپتیدهای نوروتروفیک است که بر روی رفتار سلول‌های MSC و مسیر تمایزی آنها تأثیر می‌گذارد. به عنوان مثال، مشاهده شده است که با قرارگیری MSC‌ها در هیدروژل‌های کلاژنی و در مجاورت فاکتورهای نوروتروفیک، تمایز این سلول‌ها به سمت سلول‌های عصبی^۴ انجام شده

است [۶۰]. به علاوه، ترکیب شدن ترشحات سلولی^۵ MSC‌ها که شامل سایتوکین‌ها و فاکتورهای رشد مخصوص این سلول‌ها است با فاکتورهای عصاره، می‌تواند در تنظیم وقایع التهابی و فعالیت‌های سلولی به‌طور مؤثری نقش ایفا کند [۵۹ و ۶۰].

بنابر آنچه گفته شد، می‌توان نتیجه‌گیری کرد که وجود عصاره هیپوکامپ مغز موش در مجاورت سلول‌های مزانشیمی کشت شده روی هیدروژل کلاژنی، سبب تحریک این سلول‌ها برای شروع تمایز به سمت رده‌های عصبی و بالخصوص تولید سلول‌های پیش‌ساز و اجدادی مربوط به سلول‌های عصبی شده است. افزایش بیان پروتئین نستین، خود تأییدی بر این مسأله است. در واقع افزایش بیان نستین ضمن اینکه مؤیدی بر ایجاد سلول‌های پیش‌ساز و بنیادی اولیه عصبی است، همچنین نشان می‌دهد که این سلول‌ها به شکل فعالی در وضعیت تکثیری و رشد خود هستند. به عبارت دیگر، عصاره هیپوکامپ سبب تولید تعداد قابل توجهی از سلول‌های پیش‌ساز عصبی شده و در ضمن با حفظ خاصیت بنیادی این سلول‌ها، فرایندهای تکثیری مربوط به آنها را در مقایسه با فرایندهای تمایزی، بیشتر ترغیب کرده است. کاهش بیان پروتئین GFAP در نمونه‌ای که در مجاورت عصاره هیپوکامپ مغز موش قرار گرفته مجدداً بر این یافته صحه می‌گذارد که وجود این عصاره، سلول‌های کمتری را به سمت تمایز کامل به سمت سلول‌های گلیال هدایت می‌کند. در واقع می‌توان نتیجه گرفت که عصاره هیپوکامپ اولاً گزینه مناسبی برای تولید سلول‌های بنیادی اولیه و اجدادی عصبی است و ثانیاً محرکی قوی جهت حفظ قابلیت بنیادی این سلول‌های عصبی و افزایش میزان رشد و تکثیر آنها است.

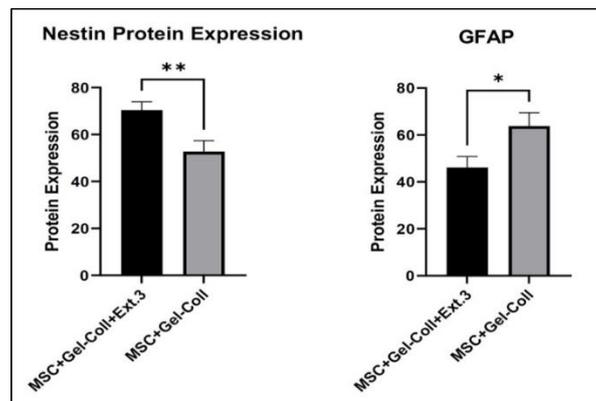
⁴ neuronal differentiation

⁵ secretome

¹ integrin receptors

² peptide motifs

³ survival



شکل ۴ مقایسه میزان بیان پروتئین‌های نستین و GFAP در نمونه‌های کشت داده شده با و بدون عصاره هیپوکامپ مغز جنین موش.

نشان‌گرهای عصبی مانند GAP-43 به شکل قابل توجهی بیان شدند، اما نشان‌گرهای گلیال و آستروسیتی مانند GFAP ردیابی نشدند. همچنین، در مطالعه‌ای دیگر [۶۲]، سلول‌های MSC مستخرج از ژل وارتن (Wharton's jelly) یا ژل بند ناف در مجاورت عصاره هیپوکامپ و یک محیط اثناء عصبی^۲ متشکل از فاکتور BDNF^۳ قرار گرفتند. در محیطی که تنها فاکتور BDNF وجود داشت، نشان‌گر MAP2 مربوط به سلول‌های عصبی شبه‌نورونی^۴ ردیابی شد. در حالی که، در نمونه‌هایی که علاوه بر فاکتور BDNF حاوی عصاره هیپوکامپ نیز بودند، نشان‌گر ChAT^۵ مشاهده شد که نشان‌دهنده سلول‌های عصبی کولینرژیک^۶ است. طبیعتاً به دلیل یکسان نبودن شرایط دقیق کشت سلول‌ها و محیط مربوطه و حتی نوع سلول‌های مورد استفاده، مسیرهای تمایزی کاملاً مشابهی در چنین مطالعاتی معمولاً دیده نمی‌شود، اما قابل توجه است که به هر حال عصاره هیپوکامپ، اثر نوروتروفیک و نوروژنیک^۷ قابل توجهی ارائه می‌دهد و گویا سلول‌های بنیادی اولیه را بیشتر به سمت سلول‌های neuronal هدایت می‌کند و بیان نشان‌گرهای سلول‌های گلیال و به

برای نمایش بهتر تفاوت میزان بیان پروتئین‌های نستین و GFAP در نمونه‌های مورد استفاده در این مطالعه، همانگونه که در بخش ۵-۲ بیان شد، به کمک نرم‌افزار ImageJ و شدت رنگ فلئوئورسنت، میزان بیان پروتئین‌های مورد اشاره به صورت کمی نیز استخراج شد و در شکل ۴ به نمایش گذاشته شد.

در برخی مطالعات مرتبط قبلی نیز رفتار سلول‌های بنیادی و به‌ویژه از نوع MSC در مجاورت عصاره هیپوکامپ بررسی شده است [۶۳-۶۱]. با اینکه در این مطالعات، بعضاً نشان‌گرهای عصبی^۱ متفاوتی نسبت به پژوهش جاری مورد مطالعه قرار گرفته است، اما یافته‌های آنها نیز اثر نوروتروفیک این عصاره روی سلول‌های بنیادی را تأیید می‌کند و از منظر تمایزی نیز نشان می‌دهد که نشان‌گرهای سلول‌های گلیال در چنین محیطی بسیار کمتر بیان می‌شوند و این سلول‌ها تمایل پایین‌تری برای تبدیل شدن به سلول‌های گلیال از خود نشان می‌دهند.

به‌عنوان مثال، در یک مطالعه [۶۱]، سلول‌های MSC مستخرج از مغز استخوان موش در مجاورت عصاره هیپوکامپ موش بالغ قرار گرفتند. در ادامه مشاهده شد که

⁵ Choline acetyltransferase

⁶ cholinergic

⁷ neurogenic

¹ neural markers

² neural induction medium

³ Brain-derived neurotrophic factor

⁴ neuron-like

به سمت تمایز به رده‌های سلولی عصبی نسبت به سایر انواع سلولی معمولاً چالش برانگیزتر است، معرفی شرایط، مواد و محیطی که زمینه را برای تحقق این هدف فراهم کند، می‌تواند ایده‌بخش و عاملی راهگشا و کمک‌کننده برای سایر محققین فعال در این زمینه باشد. با انجام مطالعات بیشتر و در بازه‌های زمانی بلندمدت‌تر، می‌توان حتی شرایط و پروتکل‌های دقیق‌تر برای تولید رده‌های مختلف عصبی کاملاً تمایز یافته را نیز در آینده تعیین کرد.

۵-منابع

- [1] M. U. A. Khan, M. A. Aslam, M. F. B. Abdullah, A. Hasan, S. A. Shah, and G. M. Stojanović, "Recent perspective of polymeric biomaterial in tissue engineering—a review," *Materials Today Chemistry*, vol. 34, p. 101818, 2023.
- [2] M. U. A. Khan, G. M. Stojanović, M. F. B. Abdullah, A. Dolatshahi-Pirouz, H. E. Marei, N. Ashammakhi, et al., "Fundamental properties of smart hydrogels for tissue engineering applications: A review," *International Journal of Biological Macromolecules*, p. 127882, 2023.
- [3] F. J. Maksoud, M. F. V. de la Paz, A. J. Hann, J. Thanarak, G. C. Reilly, F. Claeysens, et al., "Porous biomaterials for tissue engineering: a review," *Journal of Materials Chemistry B*, vol. 10, pp. 8111-8165, 2022.
- [4] M. S. Flores-Jiménez, A. Garcia-Gonzalez, and R. Q. Fuentes-Aguilar, "Review on porous scaffolds generation process: A tissue engineering approach," *ACS Applied Bio Materials*, vol. 6, pp. 1-23, 2023.
- [5] Z. Zhang, Y. Feng, L. Wang, D. Liu, C. Qin, and Y. Shi, "A review of preparation methods of porous skin tissue engineering scaffolds," *Materials Today Communications*, vol. 32, p. 104109, 2022.
- [6] J. Lou and D. J. Mooney, "Chemical strategies to engineer hydrogels for cell culture," *Nature Reviews Chemistry*, vol. 6, pp. 726-744, 2022.
- [7] D.-M. Radulescu, I. A. Neacsu, A.-M. Grumezescu, and E. Andronescu, "New insights

طور خاص GFAP در این مطالعات، بسیار کم گزارش شده است. اثر نوروتروفیک و نوروژنیک عصاره هیپوکامپ حتی به صورت درون‌تن نیز تأیید شده است در جایی که سلول‌های پیش‌ساز عصبی از نوع SVZ¹ مستقیماً در بخش هیپوکامپ موش‌ها قرار گرفتند و سپس بیان قابل توجه نشان‌گرهای neuronal، مجدداً در سلول‌های مستخرج از این بخش نیز مشاهده شد. عصاره هیپوکامپ همچنین شرایط بسیار مساعدی را برای زنده‌مانی² و رشد سلول‌های پیش‌ساز عصبی فراهم کرد [۶۳].

۴- نتیجه‌گیری

در پژوهش حاضر، اثر عوامل و مواد محیطی همچون هیدروژل کلاژنی و عصاره هیپوکامپ مستخرج از مغز جنین موش بر روی رفتار تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی، مطالعه شد. استخراج سلول‌های مزانشیمی از مغز استخوان موش و تهیه عصاره هیپوکامپ، همگی بر اساس ضوابط استاندارد و قواعد مربوط به کمیته اخلاق در خصوص کار با حیوانات آزمایشگاهی انجام شد. نتایج به‌دست آمده از تست‌های سلولی مختلف همچون MTT، میزان بیان پروتئین‌های نستین و GFAP و همچنین تصاویر میکروسکوپ فلوروسنت، در وهله اول نشان دادند که هیدروژل کلاژنی، محیط مناسبی را برای رشد و تکثیر این نوع از سلول‌ها فراهم می‌کند. از سوی دیگر، عصاره هیپوکامپ مغز جنین موش نیز اثری نوروتروفیک بر روی این سلول‌ها اعمال می‌کند. این عصاره ابتدا سبب هدایت تمایز سلول‌های مزانشیمی اولیه به سلول‌های اجدادی عصبی می‌شود و سپس با ترغیب این سلول‌ها به تکثیر بیشتر، خاصیت بنیادی آنها را نیز حفظ می‌کند. در مجموع، به نظر می‌رسد هیدروژل کلاژنی و اثر نوروتروفیک عصاره هیپوکامپ می‌تواند شرایط مناسبی برای تولید سلول‌های پیش‌ساز و اجدادی عصبی را فراهم کند. به هر حال، از آنجا که هدایت سلول‌های مزانشیمی

² survival

¹ subventricular zone neural progenitors

- [19] P. Khayambashi, J. Iyer, S. Pillai, A. Upadhyay, Y. Zhang, and S. D. Tran, "Hydrogel encapsulation of mesenchymal stem cells and their derived exosomes for tissue engineering," *International journal of molecular sciences*, vol. 22, p. 684, 2021.
- [20] H. Le, W. Xu, X. Zhuang, F. Chang, Y. Wang, and J. Ding, "Mesenchymal stem cells for cartilage regeneration," *Journal of Tissue Engineering*, vol. 11, p. 2041731420943839, 2020.
- [21] K. Tanaka, R. Ogino, S. Yamakawa, S. Suda, and K. Hayashida, "Role and function of mesenchymal stem cells on fibroblast in cutaneous wound healing," *Biomedicines*, vol. 10, p. 1391, 2022.
- [22] B. Lopes, P. Sousa, R. Alvites, M. Branquinho, A. Sousa, C. Mendonça, *et al.*, "The application of mesenchymal stem cells on wound repair and regeneration," *Applied Sciences*, vol. 11, p. 3000, 2021.
- [23] F. Shang, Y. Yu, S. Liu, L. Ming, Y. Zhang, Z. Zhou, *et al.*, "Advancing application of mesenchymal stem cell-based bone tissue regeneration," *Bioactive materials*, vol. 6, pp. 666-683, 2021.
- [24] J. Lee, K. Henderson, M. W. Massidda, M. Armenta-Ochoa, B. G. Im, A. Veith, *et al.*, "Mechanobiological conditioning of mesenchymal stem cells for enhanced vascular regeneration," *Nature biomedical engineering*, vol. 5, pp. 89-102, 2021.
- [25] Y. Guo, Y. Yu, S. Hu, Y. Chen, and Z. Shen, "The therapeutic potential of mesenchymal stem cells for cardiovascular diseases," *Cell Death & Disease*, vol. 11, p. 349, 2020.
- [26] A. Lavorato, S. Raimondo, M. Boido, L. Muratori, G. Durante, F. Cofano, *et al.*, "Mesenchymal stem cell treatment perspectives in peripheral nerve regeneration: systematic review," *International journal of molecular sciences*, vol. 22, p. 572, 2021.
- [27] B. Badyra, M. Sułkowski, O. Milczarek, and M. Majka, "Mesenchymal stem cells as a multimodal treatment for nervous system diseases," *Stem Cells Translational Medicine*, vol. 9, pp. 1174-1189, 2020.
- [28] K. Ojika and S. H. Appel, "Neurotrophic effects of hippocampal extracts on medial septal nucleus in vitro," *Proceedings of the National* of scaffolds based on hydrogels in tissue engineering," *Polymers*, vol. 14, p. 799, 2022.
- [8] O. Wichterle and D. Lim, "Hydrophilic gels for biological use," *Nature*, vol. 185, pp.117-118, 1960.
- [9] H. Fan and J. P. Gong, "Fabrication of bioinspired hydrogels: challenges and opportunities," *Macromolecules*, vol. 53, pp. 2769-2782, 2020.
- [10] T.-C. Ho, C.-C. Chang, H.-P. Chan, T.-W. Chung, C.-W. Shu, K.-P. Chuang, *et al.*, "Hydrogels :properties and applications in biomedicine," *Molecules*, vol. 27, p. 2902, 2022.
- [11] D. Yang, "Recent advances in hydrogels," vol. 34, Ed: ACS Publications, 2022, pp. 1987-1989.
- [12] P. Madhusudanan, G. Raju, and S. Shankarappa, "Hydrogel systems and their role in neural tissue engineering," *Journal of the Royal Society Interface*, vol. 17, p. 20190505, 2020.
- [13] X. Wang, D. Zhao, Y. Li, X. Zhou, Z. Hui, X. Lei, *et al.*, "Collagen hydrogel with multiple antimicrobial mechanisms as anti-bacterial wound dressing," *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 232, p. 123413, 2023.
- [14] K. Guillén-Carvajal, B. Valdez-Salas, E. Beltrán-Partida, J. Salomón-Carlos, and N. Cheng, "Chitosan, gelatin, and collagen hydrogels for bone regeneration," *Polymers*, vol. 15, p. 2762, 2023.
- [15] S. Yin and Y. Cao, "Hydrogels for large-scale expansion of stem cells," *Acta biomaterialia*, vol. 128, pp. 1-20, 2021.
- [16] Z. Yang, P. Yi, Z. Liu, W. Zhang, L. Mei, C. Feng, *et al.*, "Stem cell-laden hydrogel-based 3D bioprinting for bone and cartilage tissue engineering," *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, vol. 10, p. 865770, 2022.
- [17] R. Margiana, A. Markov, A. O. Zekiy, M. U. Hamza, K. A. Al-Dabbagh, S. H. Al-Zubaidi, *et al.*, "Clinical application of mesenchymal stem cell in regenerative medicine: a narrative review," *Stem Cell Research & Therapy*, vol. 13, p. 366, 2022.
- [18] J. Liu, J. Gao, Z. Liang, C. Gao, Q. Niu, F. Wu, *et al.*, "Mesenchymal stem cells and their microenvironment," *Stem Cell Research & Therapy*, vol. 13, p. 429, 2022.

- stem cell lineage markers in canine brains, gliomas, and a glioma cell line," *Veterinary Pathology*, vol. 60, pp. 35-46, 2023.
- [39] A. M. Jurga, M. Paleczna, J. Kadluczka, and K. Z. Kuter, "Beyond the GFAP-astrocyte protein markers in the brain," *Biomolecules*, vol. 11, p. 1361, 2021.
- [40] C. V. Wenceslau, D. A. D. Câmara, D. P. de Oliveira, R. A. Pinheiro, and I. Kerkis, "Differential expression of markers of pluripotency and neural/progenitor cells throughout embryonic brain development in mice," *Studies on Stem Cells Research and Therapy*, vol. 9, pp. 001-010, 2023.
- [41] D. Tsyba, O. Kirik, M. Kolpakova, A. Yakovleva, and D. Korzhevskii, "Expression of Nestin and Glial Fibrillary Acidic Protein in the Marginal Ischemic Zone of the Brain in SHR Rats," *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, vol. 169, pp. 576-581, 2020.
- [42] M. Potokar, M. Morita, G. Wiche, and J. Jorgačevski, "The diversity of intermediate filaments in astrocytes," *Cells*, vol. 9, p. 1604, 2020.
- [43] U. Wilhelmsson, M. Kalm, M. Pekna, and M. Pekny, "Nestin null mice show improved reversal place learning," *Neurochemical Research*, vol. 45, pp. 215-220, 2020.
- [44] I. Tamagno and D. Schiffer, "Nestin expression in reactive astrocytes of human pathology," *Journal of neuro-oncology*, vol. 80, pp. 227-233, 2006.
- [45] S. R. Bornstein, I. Berger, and C. Steenblock, "Are Nestin-positive cells responsive to stress?" *Stress*, vol. 23, pp. 662-666, 2020.
- [46] S. Wislet-Gendebien, P. Leprince, G. Moonen, and B. Rogister, "Regulation of neural markers nestin and GFAP expression by cultivated bone marrow stromal cells," *Journal of Cell Science*, vol. 116, pp. 3295-3302, 2003.
- [47] P. E. F. Stricker, D. de Souza Dobuchak, A. C. Irioda, B. F. Mogharbel, C. R. C. Franco, J. R. de Souza Almeida Leite, *et al.*, "Human mesenchymal stem cells seeded on the natural membrane to neurospheres for cholinergic-like neurons," *Membranes*, vol. 11, p. 598, 2021.
- [48] J.-S. Kim, J. Kim, Y. Kim, M. Yang, H. Jang, S. Kang, *et al.*, "Differential patterns of nestin and glial fibrillary acidic protein expression in mouse hippocampus during *Academy of Sciences*, vol. 81, pp. 2567-2571, 1984.
- [29] E. Azmitia, P. Lama, M. Segal, P. Whitaker-Azmitia, R. Murphy, and F. Zhou, "Activity of hippocampal extract on development of [3H] 5-HT high-affinity uptake in dissociated microcultures," *International journal of developmental neuroscience*, vol. 9, pp. 251-258, 1991.
- [30] T. Numakawa, H. Odaka, and N. Adachi, "Actions of brain-derived neurotrophic factor and glucocorticoid stress in neurogenesis," *International journal of molecular sciences*, vol. 18, p. 2312, 2017.
- [31] S. L. Gourley, D. D. Kiraly, J. L. Howell, P. Olausson, and J. R. Taylor, "Acute hippocampal brain-derived neurotrophic factor restores motivational and forced swim performance after corticosterone," *Biological psychiatry*, vol. 64, pp. 884-890, 2008.
- [32] L. Sun, Y. Xu, Y. Han, J. Cui, Z. Jing, D. Li, *et al.*, "Collagen-Based Hydrogels for Cartilage Regeneration," *Orthopaedic Surgery*, vol. 15, pp. 3026-3045, 2023.
- [33] Y. Zhang, Y. Wang, Y. Li, Y. Yang, M. Jin, X. Lin, *et al.*, "Application of collagen-based hydrogel in skin wound healing," *Gels*, vol. 9, p. 185, 2023.
- [34] X. Yang, K. Ahmad, T. Yang, Y. Fan, F. Zhao, S. Jiang, *et al.*, "Collagen-based hydrogel sol-gel phase transition mechanism and their applications," *Advances in Colloid and Interface Science*, p. 103456, 2025.
- [35] A. Holder, N. Badiei, K. Hawkins, C. Wright, P. Williams, and D. Curtis, "Control of collagen gel mechanical properties through manipulation of gelation conditions near the sol-gel transition," *Soft matter*, vol. 14, pp. 574-580, 2018.
- [36] Y. Wang, Z. Wang, and Y. Dong, "Collagen-based biomaterials for tissue engineering," *ACS Biomaterials Science & Engineering*, vol. 9, pp. 1132-1150, 2023.
- [37] M. Rehfeld, J. Matschke, C. Hagel, K. Willenborg, M. Glatzel, and C. Bernreuther, "Differential expression of stem cell markers in proliferating cells in glioma," *Journal of cancer research and clinical oncology*, vol. 147, pp. 2969-2982, 2021.
- [38] K. Yoshida, J. K. Chambers, and K. Uchida, "Immunohistochemical study of neural

- proliferation of neural stem cells in a collagen hydrogel incorporating engineered epidermal growth factor," *Biomaterials*, vol. 32, pp. 4737-4743, 2011.
- [57] N. Cui, M. Hu, and R. A. Khalil, "Biochemical and biological attributes of matrix metalloproteinases," *Progress in molecular biology and translational science*, vol. 147, pp. 1-73, 2017.
- [58] S. Hamaia and R. W. Farndale, "Integrin recognition motifs in the human collagens," *I Domain Integrins*, pp. 127-142, 2014.
- [59] R. Komsa-Penkova, A. Alexandrova-Watanabe, S. Todinova, V. Ivanova, S. Stoycheva, P. Temnishki, *et al.*, "Adhesion of Mesenchymal Stem Cells to Glycated Collagen—Comparative Analysis of Dynamic and Static Conditions," *Polymers*, vol. 17, p. 821, 2025.
- [60] J. He, N. Zhang, Y. Zhu, R. Jin, and F. Wu, "MSC spheroids-loaded collagen hydrogels simultaneously promote neuronal differentiation and suppress inflammatory reaction through PI3K-Akt signaling pathway," *Biomaterials*, vol. 265, p. 120448, 2021.
- [61] F. J. Rivera, W. D. Sierralta, J. J. Minguell, and L. Aigner, "Adult hippocampus derived soluble factors induce a neuronal-like phenotype in mesenchymal stem cells," *Neuroscience letters*, vol. 406, pp. 49-54, 2006.
- [62] L. Zhang, X. Tan, C. Dong, L. Zou, H. Zhao, X. Zhang, *et al.*, "In vitro differentiation of human umbilical cord mesenchymal stem cells (hUCMSCs), derived from Wharton's jelly, into choline acetyltransferase (ChAT)-positive cells," *International Journal of Developmental Neuroscience*, vol. 30, pp. 471-477, 2012.
- [63] X. Zhang, G. Jin, M. Tian, J. Qin, and Z. Huang, "The denervated hippocampus provides proper microenvironment for the survival and differentiation of neural progenitors," *Neuroscience Letters*, vol. 414, pp. 115-120, 2007.
- postnatal development," *Journal of Veterinary Science*, vol. 12, p. 1, 2011.
- [49] J. V. van Asperen, D. M. Fedorushkova, P. A. Robe, and E. M. Hol, "Investigation of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in body fluids as a potential biomarker for glioma: a systematic review and meta-analysis," *Biomarkers*, vol. 27, pp. 1-12, 2022.
- [50] S. Sergent-Tanguy, D. C. Michel, I. Neveu, and P. Naveilhan, "Long-lasting coexpression of nestin and glial fibrillary acidic protein in primary cultures of astroglial cells with a major participation of nestin+/GFAP- cells in cell proliferation," *Journal of neuroscience research*, vol. 83, pp. 1515-1524, 2006.
- [51] A. J. de Reus, O. Basak, W. Dykstra, J. V. van Asperen, E. J. van Bodegraven, and E. M. Hol, "GFAP-isoforms in the nervous system: Understanding the need for diversity," *Current Opinion in Cell Biology*, vol. 87, p. 102340, 2024.
- [52] J. Middeldorp and E. Hol, "GFAP in health and disease," *Progress in neurobiology*, vol. 93, pp. 421-443, 2011.
- [53] F. M. Brehar, D. Arsene, L. A. Brinduse, and M. R. Gorgan, "Immunohistochemical analysis of GFAP- δ and nestin in cerebral astrocytomas," *Brain tumor pathology*, vol. 3, pp. 90-98, 2015.
- [54] V. A. Kornev, E. A. Grebenik, A. B. Solovieva, R. I. Dmitriev, and P. S. Timashev, "Hydrogel-assisted neuroregeneration approaches towards brain injury therapy: A state-of-the-art review," *Computational and structural biotechnology journal*, vol. 16, pp. 488-502, 2018.
- [55] B. D. Drever, W. G. Anderson, G. Riedel, D. H. Kim, J. H. Ryu, D.-Y. Choi, *et al.*, "The seed extract of *Cassia obtusifolia* offers neuroprotection to mouse hippocampal cultures," *Journal of pharmacological sciences*, vol. 107, pp. 380-392, 2008.
- [56] E. Y. Egawa, K. Kato, M. Hiraoka, T. Nakaji-Hirabayashi, and H. Iwata, "Enhanced

Investigation of the neurotrophic effect of fetal mouse hippocampal extract on the proliferation and differentiation of mesenchymal stem cells cultured on a collagen hydrogel

Rozhin Haji Seyed Javadi¹, Nahid Hassanzadeh Nemati², Mohammad Nouri-Felekori^{3*}

1. MSc of Tissue Engineering, Department of Biomedical Engineering, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2. Associate Professor at Department of Biomedical Engineering, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
3. Assistant Professor at Department of Biomedical Engineering, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Receipt: 2024/11/18

Accepted: 2025/12/03

Abstract

Mesenchymal stem cells (MSCs) are among the most widely used types of adult stem cells in studies related to tissue engineering, cell therapy, and regenerative medicine. Ensuring the appropriate conditions and medium for the proliferation of these cells, as well as guiding their differentiation towards target cells, particularly for tissues with limited self-repair capabilities (e.g., neural cells), has been a focus in numerous studies. In the present study, the proliferative and differentiative behavior of MSCs derived from the bone marrow of mice was examined in proximity to a collagen hydrogel and different concentrations of hippocampal extract obtained from fetal mouse brain tissue. Results from cellular assays, including the MTT test, confirmed the high biocompatibility of collagen hydrogel and the positive effect of hippocampal extract on cell growth. The expression levels of proteins such as Nestin and GFAP, as well as fluorescence microscopy images, indicated that the presence of hippocampal extract along with collagen hydrogel not only promotes the formation of neural progenitor cells, but also encourages these cells to retain their stemness and enhances their growth and proliferation. Overall, it appears that collagen hydrogel and the neurotrophic effects of hippocampal extract can create suitable conditions for the production of neural progenitor cells.

Keywords: Mesenchymal stem cells, Hippocampal extract, Neurotrophic, Neural progenitor cells, Intermediate filaments