

Original Article

## The study of neurotrophic factor genes expression of human adipose stem cells cultured in serum-containing and serum-free media

Amiri A, Haji-Ghasem-Kashani M\*, Ghorbanian MT

Faculty of Biology and Institute of Biological Sciences, Damghan University, Damghan, I. R. Iran.

Received: 2017/05/22 | Accepted: 2017/12/3

### Abstract:

**Background:** Fetal bovine serum (FBS) is immunogenic for human and may transmit infection in the case of transplantation. So, this study aimed to compare the proliferation and survival rates of human adipose stem cells (hASCs), and their neurotrophic factor genes expression in serum-containing and serum-free media.

**Materials and Methods:** In this experimental study, stem cells were extracted from the abdominal subcutaneous adipose tissue of 15 cesarean women and cultured in  $\alpha$ -MEM containing 10% of FBS or serum-free medium. The stemness of fourth passage of the cells was confirmed using the flow cytometry method, and their differentiation into adipocytes and osteocytes was also confirmed. Cell proliferation and survival were assessed using hemocytometry and MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium bromide] methods, respectively. In addition, the expression of neurotrophic factor genes was analyzed by the real-time polymerase chain reaction method.

**Results:** The cells had positive response to CD44, CD73, CD90, and CD105 markers, while they responded negatively to CD34 and CD45 markers and had the ability to differentiate into adipocytes and osteocytes. The survival and proliferation of the cells cultured in the serum-based medium for 48 hours were significantly increased compared to those cultured in the serum-free medium. Moreover, serum resulted in a significant increase in BDNF and NT-3 genes expression, compared to the cells cultured in the serum-free medium.

**Conclusions:** More suitable cells can be provided for transplantation with serum deletion and culture medium optimization. The results can be matched to find an appropriate replacement for FBS.

**Keywords:** Human adipose stem cells, Neurotrophic factors, Proliferation, Survival, Serum

\* Corresponding Author.

**Email:** kashani@du.ac.ir

**Tel:** 0098 937 454 9803

**Fax:** 0098 233 522 0120

Conflict of Interests: *No*

*Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, April, 2018; Vol. 22, No 1, Pages 83-93*

Please cite this article as: Amiri A, Haji-Ghasem-Kashani M, Ghorbanian MT. The study of neurotrophic factor genes expression of human adipose stem cells cultured in serum-containing and serum-free media. *Feyz* 2018; 22(1): 83-93.

## بررسی بیان ژن های فاکتور نوروتروفیک در سلول های بنیادی چربی انسانی کشت شده در محیط های سرم دار و بدون سرم

آرزو امیری<sup>۱</sup>، مریم حاجی قاسم کاشانی<sup>۱\*</sup>، محمد تقی قربانیان<sup>۱</sup>

### خلاصه:

**سابقه و هدف:** از آنجا که سرم گاوی در انسان ایمونولوژیک بوده و به هنگام پیوند خطر انتقال عفونت را به همراه دارد، در این تحقیق سرعت تکثیر، بقا و بیان ژن های نوروتروفینی در سلول های بنیادی چربی انسانی کشت داده شده در محیط بدون سرم و سرم دار با یکدیگر مقایسه شدند.

**مواد و روش ها:** در این مطالعه تجربی سلول های بنیادی از بافت چربی زیرجلدی ناحیه شکم ۱۵ خانم سزارینی استخراج شده و در محیط کشت  $\alpha$ -MEM حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی یا محیط فاقد سرم کشت داده شدند. بنیادی بودن سلول های پاساژ چهارم با روش فلوسایتومتری و قابلیت تمایزشان به سلول های چربی و استخوان تأیید شد. تکثیر و بقا سلولی، به ترتیب با روش های هموسایتو-متری و MTT بررسی شد. همچنین، میزان بیان ژن های نوروتروفیک با روش RT-PCR ارزیابی گردید.

**نتایج:** سلول ها به نشانگرهای CD44، CD73، CD90، CD105 پاسخ مثبت داده و به نشانگرهای CD34 و CD45 پاسخ منفی دادند و توانایی تمایز به سلول های چربی و استخوان را داشتند. بقا و تکثیر سلول های کشت شده در محیط سرم دار به مدت ۴۸ ساعت نسبت به محیط بدون سرم، به طور معنی داری افزایش یافته بود. سرم باعث افزایش معنی داری در میزان بیان ژن های BDNF و NT-3 نسبت به سلول هایی که در محیط بدون سرم کشت داده شده بودند، گردید.

**نتیجه گیری:** با حذف سرم و بهینه سازی شرایط کشت می توان سلول های مناسب تری برای پیوند فراهم کرد. نتایج به دست آمده را می توان مقیاسی جهت یافتن جایگزین مناسب برای سرم گاوی قرار داد.

**واژگان کلیدی:** سلول های بنیادی چربی انسان، فاکتورهای نوروتروفیک، تکثیر، بقا، سرم

دو ماهنامه علمی- پژوهشی فیض، دوره بیست و دوم، شماره ۱، فروردین و اردیبهشت ۹۷، صفحات ۹۳-۸۳

### مقدمه

چربی قهوه ای در طول رشد انسان دچار تغییرات مورفولوژیک شده و در نهایت هیچ مجموعه ای از آن را نمی توان در انسان بالغ یافت. چربی سفید را می توان در چندین مجموعه جداگانه و متمایز آناتومیکی یافت که دو زیرمجموعه عمده آن بافت های چربی احشایی و شکمی و بافت چربی زیرجلدی است [۲]. سلول های بنیادی چربی را می توان در هر نوع بافت چربی سفید از جمله چربی زیرجلدی و چربی اُمتوم یافت [۳]. باتوجه به مزایای فراوان سلول های بنیادی چربی (Adipose-derived stem cells; ASCs) مطالعات و بررسی های اخیر این سلول ها را برای اهداف خود مناسب دیده اند. این جمعیت سلولی که قابلیت تمایز به چندین رده سلولی را دارند، از استرومای چربی به دست می آید و برای اولین بار توسط Zuk و همکارانش در سال ۲۰۰۱ شرح داده شد. آنها از اصطلاح سلول های جدا شده از آسپیراسیون چربی استفاده کردند. از آنجا که بافت چربی حاوی چندین نوع سلول است، لیپوآسپیره حاصل از آن را می توان با ساترنیفیوژ پردازش نموده و سلول های بنیادی آن را به طور مرتب جدا کرد. پس از ساترنیفیوژ ممکن است بخش زیادی از سلول های چربی در طول پردازش از هم پاشیده شده و بمیرند. بخش دیگر ساترنیفیوژ که بخش عروقی- استرومایی (Stromal-vascular fraction; SVF) نامیده می-

بافت چربی از لایه مزودرم جنینی مشتق شده و در هر دو دوره پیش و پس از تولد تکوین می یابد [۱]. بافت چربی ارگانی پیچیده است که یک سوم آن آدیپوسایت های بالغ و دوسوم دیگر آن ترکیبی از انواع سلول ها است. تکامل در پستانداران دو نوع بافت چربی با کیفیت های مختلف بافت شناسی را حفظ کرده است؛ بافت چربی سفید و بافت چربی قهوه ای که توسط انواع مختلف آدیپوسایت های بالغ ترکیب شده اند و هر کدام نقش های متفاوتی در متابولیسم انرژی دارند. عملکرد اولیه آدیپوسایت های سفید ذخیره انرژی اضافه به صورت چربی و تجهیز آن در پاسخ به نیازهای متابولیکی است. آدیپوسایت های قهوه ای از چربی های انباشته شده به عنوان انرژی آزاد شده در فرم گرما استفاده می کنند.

<sup>۱</sup> دانشکده زیست شناسی و پژوهشکده علوم زیستی، دانشگاه دامغان، دامغان، ایران

\* نشانی نویسنده مسئول:

دامغان، دانشگاه دامغان، دانشکده زیست شناسی

دوره نویسی: ۰۲۳۳۵۲۲۰۱۲۰

تلفن: ۰۹۳۷۴۵۴۹۸۰۳

پست الکترونیک: Kashani@du.ac.ir

تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۶/۹/۱۲

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۳/۱

۲۸ تا ۳۵ ساله در جریان عمل جراحی سزارین در بیمارستان ولایت دامغان و با اخذ اجازه کتبی از بیماران جدا شده و در داخل لوله آزمایش حاوی PBS به آزمایشگاه ارسال گردید. یک گرم از بافت چربی تحت شرایط استریل پس از هضم مکانیکی با استفاده از اسکالپل به قطعات کوچک‌تری تقسیم شد. برای تجزیه بافت آنزیم کلاژناز ۰/۲ درصد به میزان ۱/۵ میلی‌لیتر به ازای هر گرم بافت چربی در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۶۰ دقیقه به کار گرفته شد. کلاژناز با حجمی برابر از محیط  $\alpha$ -MEM غنی شده با ۱۰ درصد سرم جنین گاو (FBS) غیرفعال شده و پس از سانتریفیوژ (۱۲۰۰RPM، ۵ دقیقه و دمای ۳۷°C) سلول‌ها داخل فلاسک ۲۵cm<sup>۲</sup> در معرض محیط  $\alpha$ -MEM غنی شده با ۱۰FBS ۱ درصد و پی‌سیلین-استرپتومایسین ۱ درصد و در انکوباتور (دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۹۵ درصد و CO<sub>2</sub> ۵ درصد) قرار داده شدند. پس از گذشت ۷۲ ساعت محیط رویی تعویض شد. سلول‌های پره‌آدیپوسایت به کف فلاسک چسبیده، باقی‌مانده و سلول‌های خونی با تعویض محیط حذف شدند. پس از رسیدن سلول‌ها به تراکم ۸۰-۷۰ درصد با کمک محلول تریپسین/EDTA سلول‌ها از کف فلاسک جدا و به نسبت ۱:۲ پاساژ داده شدند. در این مطالعه از سلول‌های پاساژ چهارم استفاده شد. گروه‌های مورد مطالعه عبارت بودند: سلول‌های کشت داده شده در محیط کشت حاوی سرم ۱۰ درصد (Medium+FBS) و (ب) سلول‌هایی که در محیط فاقد سرم کشت داده شدند (Medium).

تأیید هویت سلول‌ها با روش فلوسایتومتری

برای تأیید هویت مزانشیمی بیان نشان‌گرهای سطحی CD45، CD34، CD44، CD105، CD73، CD90 با روش فلوسایتومتری در تعداد ۱۰<sup>۶</sup> سلول بررسی شد.

تمایز hASCs به سلول‌های استخوانی

پس از کشت سلول‌های پاساژ چهارم در پلیت ۱۲ خانه و رسیدن به تراکم ۹۰-۸۰ درصد، محیط کشت اختصاصی استخوان‌ساز (Osteogenesis differentiation medium, Life technology) اضافه شد. هر ۳ روز یکبار تعویض محیط انجام شد و پس از گذشت ۲۱ روز تمایز سلول‌ها با روش رنگ-آمیزی آلزارین رد (Sigma, A5533) بررسی شد. ابتدا سلول‌ها با PBS شسته شده و مدت ۱ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در معرض محلول فیکساتیو پارافمالدئید ۴ درصد قرار داده شدند. سپس، سلول‌ها به مدت ۲ دقیقه در معرض محلول رنگی آلزارین

شود، مانند بافت عروقی و استرومایی خواص تقریباً یکسانی از خود نشان می‌دهد [۴]. SVF شامل یک جمعیت ناهمگن از جمله سلول‌های خونی در گردش، فیروبلاست‌ها، پری‌سایت‌ها، سلول‌های اندوتلیال و همچنین پره‌آدیپوسایت‌ها است. گام نهایی، جدا کردن پره‌آدیپوسایت‌های چسبیده به ظروف کشت از دیگر سلول‌های SVF است. ASCs پس از چند پاساژ پی‌درپی در کشت ویژگی چسبندگی، مولکول‌های گیرنده، آنزیم‌های سطحی، پروتئین‌های سیتواسکلتون و ماتریکس خارج سلولی و پروتئین‌های همراه با فنوتیپ سلول استرومایی را بیان می‌کنند [۵]. سلول‌های بنیادی چربی انسانی (hASCs) منبع خوبی از سلول‌های بنیادی بالغ برای سلول‌درمانی هستند. hASCs ویژگی‌های مشابه سلول‌های بنیادی مزانشیمی را نشان می‌دهند و دارای ظرفیت تمایز به استوبلاست، کندروسیت، آدیپوژنیک، میوژنیک و دودمان‌های عصبی هستند [۶]. جمع‌آوری بافت چربی بالغ از لحاظ فنی آسان و ایمن است. علاوه بر این، برداشتن ASCs از لحاظ اخلاقی مشکلی ندارد و تنها مقدار یک گرم از چربی می‌تواند در کشت مؤثر باشد؛ بدین ترتیب، در مقایسه با سلول‌های بنیادی دیگر، ASCs برای کاربردهای بالینی مناسب‌تر هستند [۷]. ASCs در مقایسه با سلول‌های بنیادی مغز استخوان (BMSCs) راحت‌تر کشت شده و سرعت تکثیر بالایی دارند [۸]؛ همچنین، پیش از آن‌که پیر شوند، به مدت طولانی‌تری کشت داده می‌شوند [۹]. نشان داده شده است که hASCs فاکتورهای نوروتروفیک از جمله: فاکتور رشد عصبی (NGF)، فاکتور نوروتروفیک مشتق شده از مغز (BDNF)، و فاکتور نوروتروفیک مشتق شده از سلول‌های گلیال (GDNF) را بیان می‌کنند [۱۰]. همچنین، ممکن است این سلول‌ها مولکول‌های سطحی را برای تنظیم و تمایز عصبی بیان کنند که نشان‌دهنده توانایی آنها در تمایز نوروژنیک است. بنابراین به نظر می‌رسد hASCs در بحث سلول‌درمانی برای بیماری‌های عصبی و آسیب‌های مغزی مؤثر است [۱۱-۱۳]. در این تحقیق پس از بررسی ماهیت بنیادی سلول‌ها، سرعت تکثیر و میزان زنده ماندن سلول‌ها نیز ارزیابی شد. از آنجاکه سرم گاوی در انسان ایمنولوژیک بوده و به‌هنگام پیوند خطر انتقال عفونت را به همراه دارد، در این تحقیق سعی شد سلول‌های کشت داده شده در محیط سرم‌دار و بدون سرم با یکدیگر مقایسه شوند تا حتی‌الامکان با حذف سرم بهینه‌سازی شرایط کشت صورت گرفته و سلول‌های مناسب‌تری برای پیوند و سلول‌درمانی آماده شود.

## مواد و روش‌ها

جداسازی و کشت سلولی

بافت چربی زیرجلدی از ناحیه شکم ۱۵ خانم سزارینی

شده و در نهایت میزان جذب در طول موج ۵۴۰ نانومتر با دستگاه ELISA reader (BioTek) اندازه‌گیری شد [۱۵،۱۴].

بررسی مولکولی بیان ژن‌های اعضای خانواده نوروتروفین به‌منظور بررسی بیان ژن‌های NGF، BDNF، GDNF. نوروتروفین-۳ (NT-3) و نوروتروفین-۴ (NT-4) در hASCs از تکنیک RT-PCR استفاده شد. hASCs در دو گروه به‌مدت ۲۴ ساعت در معرض محیط کشت به‌همراه سرم و محیط فاقد سرم قرار گرفتند. سپس، mRNA از سلول‌ها استخراج شده و با آنزیم کپی‌برداری معکوس به cDNA تبدیل شد. در نهایت cDNA با روش RT-PCR تکثیر شده و مورد بررسی قرار گرفت.

#### استخراج RNA

RNA کل از hASCs به‌دست آمد. استخراج RNA به‌وسیله کیت RNX Plus صورت گرفت. غلظت RNA به‌دست آمده با استفاده از جذب نوری در طول موج ۲۶۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. همچنین، کیفیت RNA نیز با الکتروفورز ژل آگارز بررسی شد.

#### سنتز DNA مکمل (cDNA)

این مرحله با توجه به دستورالعمل کیت ساخت cDNA (Fermentas-K1622) انجام شد. ابتدا یک میکروگرم RNA (معادل ۱۰ میکرولیتر) به همراه یک میکرولیتر الیگوپرایمر در میکروتیوب ریخته شده و به‌مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس، با افزودن بافر واکنش ۵X، dNTP و مهارکننده ریبونوکلاز به محلول فوق به‌مدت ۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. با اضافه کردن آنزیم Reverse transcriptase ۶۰ دقیقه در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد و در نهایت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت.

#### واکنش PCR

واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام شد. برای اطمینان از توزیع یکسان مواد ابتدا مخلوط مستر همه اجزا آماده شد و سپس همراه با الیگوپرایمر و cDNA به میکروتیوب منتقل شد. PCR در دستگاه ترمال سایکلر به این صورت انجام شد: ۲ دقیقه در ۹۴ درجه، و دمای ۹۴، ۵۷-۵۸ و ۷۲ درجه هر کدام ۳۰ ثانیه. پس از اتمام ۳۰ سیکل، ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه قرار گرفت. دمای اتصال بر اساس دمای ذوب پرایمرها تعیین شد؛ دمای ذوب

رد قرار گرفته و در نهایت سلول‌ها با آب مقطر شسته شده و پس از خشک شدن با میکروسکوپ مشاهده و عکس‌برداری گردید.

#### تمایز hASCs به سلول‌های چربی

پس از کشت سلول‌های پاساژ چهارم در پلیت ۱۲ خانه و رسیدن به تراکم ۸۰-۹۰ درصد، محیط کشت اختصاصی چربی-Adipogenesis Differentiation Medium, Life ساز (technology) اضافه شد. هر ۳ روز یک‌بار تعویض محیط انجام شد و پس از گذشت ۲۱ روز تمایز سلول‌ها با روش رنگ‌آمیزی اوایل رد (Sigma, O0625) بررسی شد. ابتدا سلول‌ها با PBS شسته شده و مدت ۱ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در معرض محلول فیکساتیو پارافمالدئید ۴ درصد قرار داده شدند. سپس، سلول‌ها با الکل ۷۰ درصد شسته شده و به‌مدت ۱۵-۱۰ دقیقه در معرض محلول رنگی اوایل رد قرار داده شدند. در مرحله بعد محلول رنگی خارج شده و سلول‌ها ۳ بار با الکل ۷۰ درصد شستشو داده شده و با میکروسکوپ مشاهده شدند.

#### ارزیابی تکثیر سلولی به‌وسیله لام نتوبار و تریپان بلو

ارزیابی میزان حیات و تکثیر سلولی توسط لام نتوبار و رنگ تریپان بلو انجام شد. سلول‌ها با تریپسین از فلاسک کشت جدا شده و سانتریفیوژ شدند. با رسوب به‌دست آمده سوسپانسیون سلولی تهیه شده و به نسبت مساوی تریپان بلو اضافه شد (۱۰ میکرولیتر سوسپانسیون سلولی و ۱۰ میکرولیتر تریپان بلو). شمارش سلولی توسط میکروسکوپ نوری انجام شد. تریپان بلو با تخریب غشاء در سلول‌های مرده نفوذ می‌کند و به‌همین دلیل سلول‌های مرده به رنگ آبی و سلول‌های زنده بی‌رنگ دیده می‌شوند. تکثیر سلولی در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت بررسی شد.

#### ارزیابی حیات و تکثیر سلولی به روش MTT

ارزیابی حیات و سرعت تکثیر hASCs به روش MTT انجام شد. سلول‌های پاساژ چهارم با تراکم  $2 \times 10^4$  سلول در هر خانه پلیت ۹۶ خانه با ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت  $\alpha$ -MEM حاوی سرم ۱۰ درصد کشت شدند. سپس، حیات و تکثیر سلولی در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت مورد بررسی قرار گرفت. محیط قبلی خارج شده و به هر کدام از خانه‌ها ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت به همراه ۱۰ میکرولیتر محلول MTT (Sigma) افزوده شد و به‌مدت ۴ ساعت در شرایط ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. سپس، ۸۵ میکرولیتر از محیط روی برداشته شده و ۵۰ میکرولیتر دی‌متیل سولفوکساید (DMSO) اضافه گردید و به‌مدت ۱۰ دقیقه انکوبه

های آگارز تهیه شده با استفاده از دستگاه نمایشگر ژل بررسی شدند. عکس ژل محصولات PCR با نرم‌افزار ImageJ بررسی شد. توالی پرایمرها در جدول شماره ۱ آمده است [۱۳،۱۲].

پرایمر ژن‌های BDNF, NGF, NTF3 و NTF4 °C ۵۷ و دمای ذوب پرایمر ژن‌های GDNF و GAPDH °C ۵۵ تعیین شد. از ژن GAPDH به‌عنوان ژن کنترل داخلی استفاده شد. برای مشخص شدن تکثیر قطعه مورد نظر و بیان ژن محصول PCR به روش الکتروفورز با ژل آگارز ۱/۵ درصد بررسی شد. تمامی ژل-

جدول شماره ۱- توالی پرایمرهای مورد استفاده در مطالعه حاضر

نام ژن	توالی 5'→3'	اندازه ژن (جفت باز)
F-NGF	ATACAGGCGGAACCACACTCAG	۱۷۴
R-NGF	GTCC ACAGTAATGTTGCGGGTC	
F-BDNF	AGAGGCTTGACATCATTGGCTG	۱۶۷
R-BDNF	CAAAGGCACTTGACTACTGAGCATC	
F- NTF3	GGGAGATCAAAACGGGCAAC	۲۲۲
R- NTF3	ACAAGGCACACACACAGGAC	
F- NTF4	CTGTGTGCGATGCAGTCAGT	۱۴۱
R- NTF4	TGCAGCGGGTTTCAAAGAAGT	
F-GDNF	CACCAGATAAAACAAATGGCAGTGC	۳۳۵
R-GDNF	CGACAGGTCATCATCAAAGGCG	
F- GAPDH	GCTGGGGCTCATTTCAGG	۲۵۸
R- GAPDH	CGGAGGGGCCATCCACAGT	

قابلیت تمایز چندتوانی سلول‌های بنیادی چربی انسانی به چربی و استخوان

برای نشان دادن قابلیت چندظرفیتی hASCs، تمایز آن‌ها به سلول چربی و استخوانی نشان داده شده است. پس از اینکه سلول‌ها در معرض محیط تمایز آدیپوژنیک و استئوژنیک قرار گرفتند، به تدریج مورفولوژی شبیه آدیپوسایت و استئوبلاست ظاهر شده و پس از سه هفته رنگ‌آمیزی اختصاصی انجام شد. تمایز آدیپوژنیک با تجمع قطرات لیپیدی در طول هفته اول آغاز شد که پس از ۲۱ روز با اویل رد رنگ‌آمیزی و مشاهده شد (شکل شماره ۳، D و E). همچنین، تمایز استئوژنیک با تولید فسفات کلسیم و ماتریکس خارج سلولی معدنی پس از ۲۱ روز با رنگ‌آمیزی آلین‌رین رد مشاهده شد (شکل شماره ۳، B و C).

نتایج شمارش سلولی به روش هموسایتومتری در این پژوهش تأثیر محیط کشت بر بقای hASCs مورد بررسی قرار گرفت. شمارش سلول‌ها در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت با روش هموسایتومتری انجام شد. شمارش سلولی و بررسی‌های آماری نشان داد که سرعت تکثیر سلول‌هایی که در محیط حاوی سرم ۱۰ درصد و به مدت ۴۸ ساعت کشت داده شده بودند، افزایش معنی‌داری را در مقایسه با سلول‌هایی که در محیط فاقد سرم بودند دارد. همچنین، سرعت تکثیر سلول‌های بنیادی چربی که مدت ۲۴ ساعت در محیط سرم دار کشت داده شده بودند، کاهش

آنالیز آماری

برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار SPSS ویرایش ۱۶ استفاده شد. پس از حصول اطمینان از توزیع نرمال داده‌ها با استفاده از آزمون کلموگروف، با کمک آزمون t مستقل اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها بررسی گردید. سطح معنی‌داری  $P \leq 0.05$  در نظر گرفته شد.

### نتایج

بررسی مورفولوژیکی سلول‌های بنیادی چربی انسان سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت‌های چربی در کشت اولیه به اشکال مختلف دیده می‌شوند. این سلول‌ها ظاهر دوکی‌شکل و فیبروبلاستی داشته و به کمک زوائد خود به کف فلاسک کشت می‌چسبند. در کشت اولیه مجموعه‌ای از سلول‌های بنیادی مزانشیمی و خون‌ساز مشاهده می‌شود، ولی به دنبال پاساژهای مکرر، از تعداد سلول‌های رده خونی کاسته شده و به سلول‌های استرومایی افزوده شده است (شکل شماره ۱).

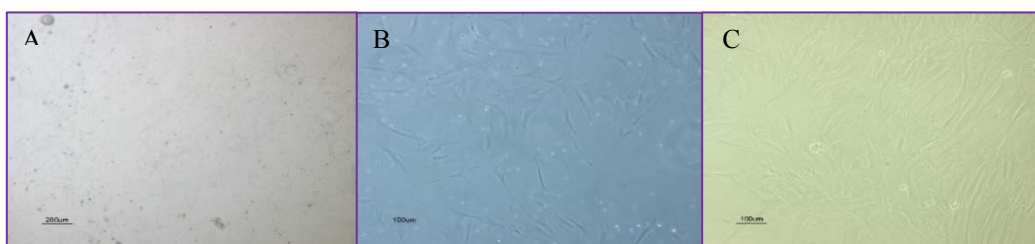
تأیید هویت سلول‌های بنیادی چربی با روش فلوسایتومتری hASCs با آنتی‌بادی علیه آنتی‌ژن نشان‌دار و با فلوسایتومتری مورد بررسی قرار گرفت. سلول‌ها به نشان‌گرهای CD44، CD73، CD90، CD105 پاسخ مثبت و به نشان‌گرهای CD34 و CD45 پاسخ منفی دادند (شکل شماره ۲).

همین شرایط کشت داده شده بودند اختلاف معنی داری را نشان دادند، درحالی که هیچ اختلاف معنی داری بین دو گروه ۲۴ و ۴۸ ساعته که در محیط بدون سرم کشت داده شده بودند، مشاهده نشد (نمودار شماره ۲).

بررسی بیان ژنهای نوروتروفینی با روش RT-PCR در مطالعه حاضر میزان بیان ژنهای نوروتروفینی در hASCs بررسی شد (شکل شماره ۴). محیط سرم دار بیان ژنهای BDNF و NTF-3 را در سلولهای کشت داده شده، به طور معنی داری افزایش داد، درحالی که در میزان بیان ژنهای NTF-4، GDNF و NGF تأثیری نداشت (نمودار شماره ۳).

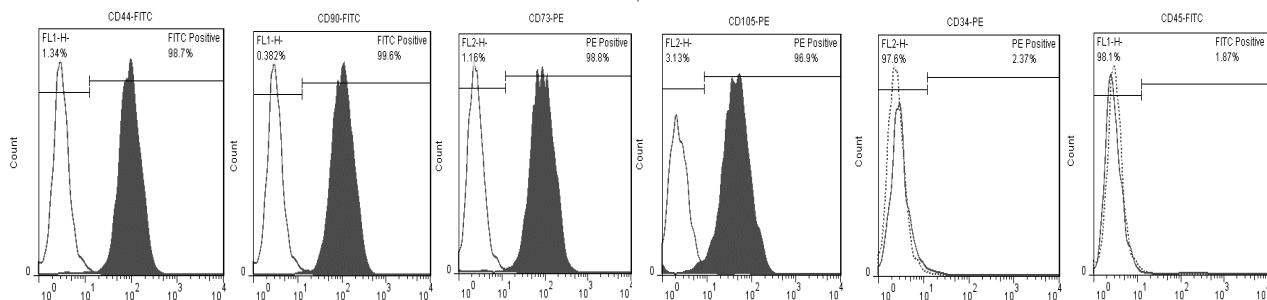
معنی داری نسبت به گروه مشابه در ۴۸ ساعت را نشان داد (نمودار شماره ۱).

نتایج ارزیابی حیات و تکثیر سلولی به روش MTT سرعت تکثیر سلولها در ۲۴ و ۴۸ ساعت با روش MTT بررسی شد. سرعت تکثیر در سلولهایی که به مدت ۲۴ ساعت و همچنین ۴۸ ساعت در محیط و سرم کشت داده شده بودند در مقایسه با گروههای مشابه خود در محیط بدون سرم، افزایش معنی داری را نشان داد. از طرف دیگر نیز سلولهایی که ۴۸ ساعت در محیط سرم دار بودند، نسبت به سلولهایی که به مدت ۲۴ ساعت در



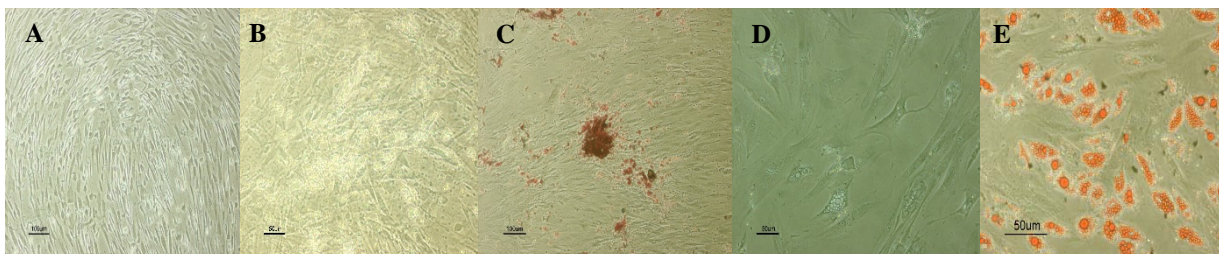
شکل شماره ۱- بررسی مورفولوژیکی سلولهای بنیادی چربی انسان

A: سلولهای بنیادی چربی به شکل دوکی و کشیده، ۹۶ ساعت پس از کشت که در آن سلولهای خونی نیز شناور میباشند. بزرگنمایی ۴× B: همان سلولها با بزرگنمایی ۱۰×، C: سلولها در پاساژ چهارم. بزرگنمایی ۱۰×



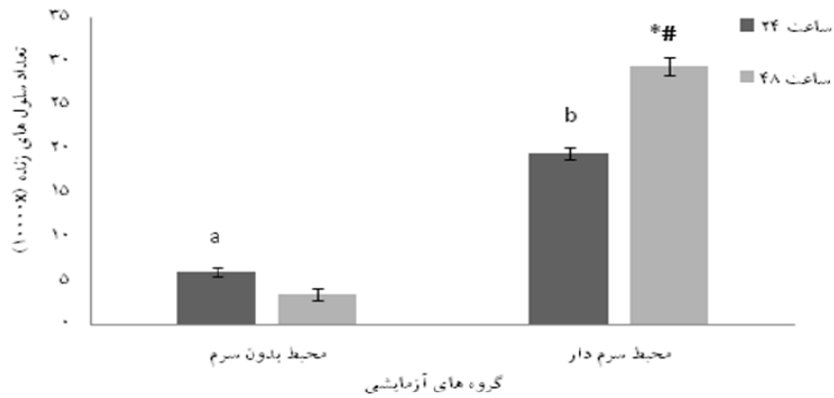
شکل شماره ۲- نشانگرهای سطحی hASCs

hASCs با آنتی بادی علیه آنتی ژن نشان دار شده و با فلوسایتمتری مورد بررسی قرار گرفت. سلولها به نشانگرهای CD105، CD90، CD73، CD44 پاسخ مثبت و به نشانگرهای CD45 و CD34 پاسخ منفی دادند.



شکل شماره ۳- سلولهای بنیادی چربی انسان تمایز یافته به استخوان و چربی در محیط کشت خاص

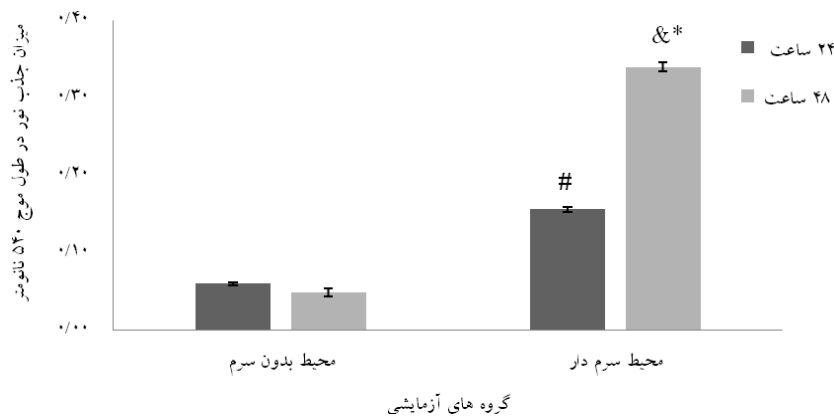
A: کنترل: سلولهای تمایز نیافته ای که در محیط کشت القایی قرار نگرفته اند، بزرگنمایی ۱۰×. B: سلولهای تمایز یافته به استخوان، بزرگنمایی ۱۰×. C: سلولهای تمایز یافته به استخوان پس از رنگ آمیزی با آلزاین رد، رسوب تیغه های استخوانی در فضاهای بین سلولی مشاهده می گردند. بزرگنمایی ۱۰×. D: سلولهای تمایز یافته به چربی قبل از رنگ آمیزی که گرانولهای چربی در سیتوپلاسم قابل مشاهده هستند، بزرگنمایی ۲۰×. E: سلولهای تمایز یافته به چربی پس از رنگ آمیزی با اوایل رد که گرانولهای چربی رنگ شده اند، بزرگنمایی ۲۰×.



نمودار شماره ۱- بررسی درصد سلول‌های زنده با روش هموسایتومتری در hASCs به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت

\* معنی‌دار بودن در مقایسه با گروه سرم‌دار به مدت ۲۴ ساعت

معنی‌داری در مقایسه با گروه مشابه بدون سرم به مدت ۴۸ ساعت

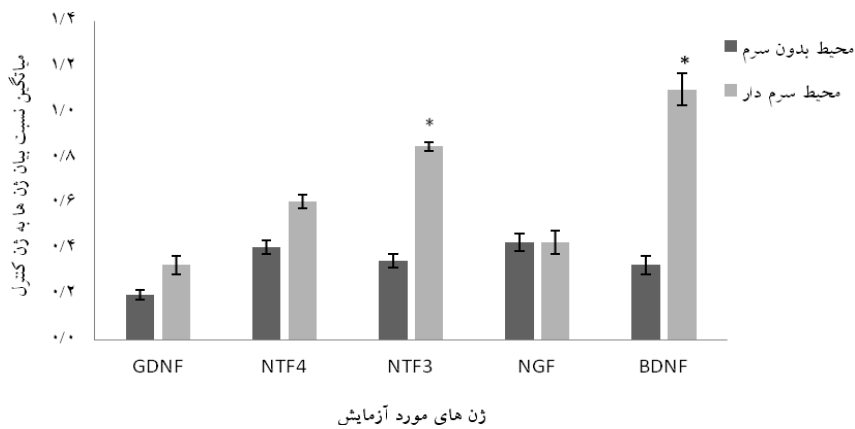


نمودار شماره ۲- بررسی سرعت تکثیر hASCs با روش MTT به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت

# معنی‌داری نسبت به سلول‌های کشت داده شده در محیط بدون سرم به مدت ۲۴ ساعت

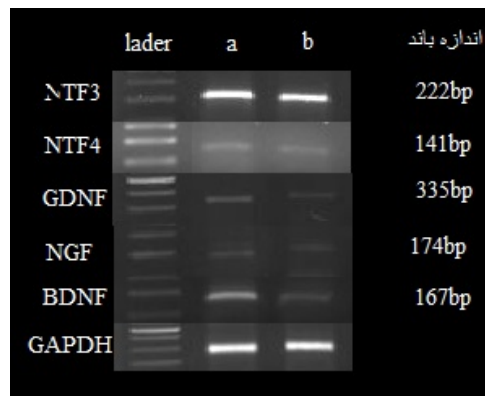
& معنی‌داری نسبت به سلول‌های کشت داده شده در محیط بدون سرم ۴۸ ساعته

\* معنی‌داری در مقایسه با گروه مشابه به مدت ۲۴ ساعت



نمودار شماره ۳- میزان بیان ژن‌های نوروتروفین در hASCs کشت داده شده در محیط سرم‌دار و بدون سرم

\* معنی‌داری در مقایسه با گروه بدون سرم مربوطه



شکل شماره ۴- آنالیز واکنش زنجیره پلیمرز با رونویسی معکوس برای بیان ژن‌های نوروتروفین در hASCs

a: محیط کشت + سرم b: محیط کشت بدون سرم

### بحث

CD73 مثبت بودند. این میزان در مورد CD90 به میزان ۹۹/۶ درصد رسید. همچنین، بیش از ۹۷ درصد از سلول‌ها به نشانگرهای CD34 و CD45 پاسخ منفی دادند. در ادامه بررسی ماهیت بنیادی مزانشیمی hASCs قابلیت تمایز آن‌ها به سلول چربی و استخوان مورد آزمایش قرار گرفت. معمولاً تمایز آدیپوژنیک و استئوژنیک به ترتیب این‌گونه تعریف می‌شود: سلول‌های حاوی قطرات چربی درون‌سلولی که با رنگ‌آمیزی اوایل رد مشخص می‌شوند و سلول‌هایی با افزایش بیان آلکالین فسفاتاز و مینرالیزه شده که با رنگ‌آمیزی آلزارین رد می‌توان معدنی شدن آنها را مشخص کرد [۱۶]. در بیشتر مطالعاتی که روی hASCs انجام می‌شود پتانسیل تمایزی سلول‌ها نیز بررسی می‌شود؛ به طوری که در همه آنها قابلیت تمایز hASCs به آدیپوسایت و استئوبلاست نشان داده شده است [۳۰-۲۸]. در این مطالعه پس از اینکه سلول‌ها در معرض محیط تمایز آدیپوژنیک و استئوژنیک قرار گرفتند، به تدریج مورفولوژی شبیه آدیپوسیت و استئوبلاست ظاهر شده و پس از ۳ هفته رنگ‌آمیزی اختصاصی انجام شد. تمایز آدیپوژنیک با تجمع قطرات لیپیدی در طول هفته اول آغاز شده و پس از ۲۱ روز با اوایل رد رنگ‌آمیزی و مشاهده شد. همچنین، تمایز استئوژنیک با تولید فسفات کلسیم و ماتریکس خارج سلولی معدنی پس از ۲۱ روز با رنگ‌آمیزی آلزالین رد مشاهده شد. در این پژوهش بقاء و سرعت تکثیر hASCs در شرایط کشت محیط سرم-دار و بدون سرم مورد بررسی قرار گرفت. نتایج شمارش سلولی و MTT نشان داد بقاء و تکثیر سلولی hASCs کشت شده با محیط سرم-دار در زمان ۴۸ ساعت نسبت به سلول‌هایی که در محیط فاقد سرم کشت داده شده بودند، به طور معنی‌داری افزایش یافته است. فاکتورهای نوروتروفیک در بقاء، رشد، تمایز و مهاجرت سلول‌های سیستم عصبی نقش مهمی ایفا می‌کنند. علاوه بر این، برخی از آنها برای تنظیم شکل‌پذیری سیناپسی در مغز پس از تولد مورد نیاز

سلول‌های بنیادی چربی زیرجلدی ویژگی چسبندگی به فلاسک‌های کشت را دارند و در آغاز با مورفولوژی دوکی شکل یا ستاره‌ای ظاهر می‌شوند. سپس، از پاساژ دوم یا سوم به بعد، مورفولوژی فیبروبلاستی پهن و کشیده از خود به نمایش می‌گذارد [۱۶، ۱۷]. Zhu و همکاران hASCs را تا بیش از ۲۵ پاساژ کشت دادند و کیتیک رشد و قدرت تمایزی آنها را بررسی کردند [۱۹، ۱۸]. در تحقیق حاضر در طی هفته اول hASCs به دلیل چسبیدن به کف فلاسک کشت از سلول‌های خونی شناور جدا شدند. مورفولوژی فیبروبلاستی و دوکی شکل سلول‌ها مشاهده شده و به تدریج با افزایش پاساژ از سرعت تکثیر کاسته شد. به منظور تأیید هویت بنیادی سلول‌های مزانشیمی ماهیت نشانگرهای سطحی آن‌ها با روش فلوسایتومتری بررسی شد. محققان زیادی ایمونوفنوتیپ‌های سطحی ASCs جداشده از چربی انسان و گونه‌های دیگر را بررسی کرده‌اند [۲۲-۲۰]. با وجود روش‌های یکسان جداسازی و کشت، ایمونوفنوتیپ‌های به دست آمده در آزمایشگاه‌های مختلف نسبتاً مشابه هستند [۲۳، ۲۴]. در واقع ایمونوفنوتیپ‌های سطحی ASCs همانند BMSCs و MSCs است [۲۵]. ایمونوفنوتیپ‌های سطحی ASCs و MSCs در مقایسه با هم ۹۰ درصد یکسان هستند [۸]. در مطالعات متعدد گزارش شده است که hASCs نشانگرهایی از جمله CD106، CD90، CD29، CD73 و CD105 [۱۶، ۲۶] را بیان می‌کنند، در حالی که نشانگرهای سطحی سلول خون‌ساز مثل CD45 و CD34 را بیان نمی‌کنند [۱۶، ۲۷]. در مطالعه حاضر برای اولین بار، سلول‌های بنیادی از چربی زیرجلدی ناحیه شکم خانم‌های سزارینی بیمارستان ولایت دامغان استخراج شد. سلول‌ها پس از پاساژ چهارم یا پنجم برخی از نشانگرهای ذکر شده را بیان کردند؛ به طوری که بیش از ۹۶ درصد از سلول‌ها برای نشانگرهای CD90، CD105، CD44 و



دارد [۴۵]. فعالیت پروتئین GDNF تولید شده از hASCs در آزمایشگاه موجب تحریک و القاء رگ‌زایی می‌شود [۴۶]. محیط به- دست آمده از hASCs حاوی فاکتورهای نوروتروفیک و نوروپروتکتیو مختلف از جمله BDNF، فاکتور رشد اندوتلیالی عروق (VEGF)، فاکتور رشد کبدی (HGF)، NGF و فاکتور رشد شبه انسولینی ۱ (IGF-1) است و در مدل‌های کشت سلولی و حیوانی ضایعه عصبی باعث محافظت نورونی می‌شود [۴۷]. NGF موجود در محیط به‌دست آمده از hASCs نقش مهمی در حفاظت از نورون‌ها در موش مدل جهش یافته سوپراکسید دسموتاز نشان می‌دهد [۴۸]. محققان سرم انسانی را جایگزین سرم گاوی در محیط کشت سلول‌های hASCs کرده و نشان داده‌اند که میزان تراکم فاکتورهای آنژیوژنیک در چنین محیطی افزایش یافته، به‌طوری‌که پس از تزریق به موش‌های مدل ایسکمی باعث بهبودی آنها شده است [۴۹، ۵۰]. در این پژوهش میزان بیان ژن‌های BDNF، NTF-3، GDNF و NTF-4 در hASCs کشت داده شده در دو محیط سرم‌دار و بدون سرم بررسی و با یکدیگر مقایسه شد. میزان بیان ژن‌های BDNF و NTF-3 در hASCs کشت شده در محیط سرم‌دار افزایش معنی‌داری نسبت به محیط بدون سرم نشان داد، ولی در مورد ژن‌های دیگر اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. بنابراین، باتوجه به اینکه سرم گاوی هزینه‌بر است و همچنین در پیوند با آلودگی و ویروسی همراه است، باید در صدد یافتن جایگزین مناسبی برای سرم گاوی بود که همان نقش تروفیک را برای سلول‌های hASCs ایفاء کرده و ژن‌های نوروتروفیک را در آنها القاء کند. در چنین شرایط کشت میزان غلظت فاکتورهای نوروتروفیک که از این سلول‌ها در محیط کشت ترشح می‌شود افزایش یافته و محیط حاصله کاربرد درمانی گسترده‌تری خواهد داشت.

#### نتیجه‌گیری

محیط کشت حاوی سرم گاوی می‌تواند موجب افزایش بقاء و تکثیر سلولی و همچنین افزایش بیان ژن‌های BDNF و NTF-3 در hASCs استخراج شده از چربی زیرجلدی ناحیه شکمی شود.

#### تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل بخشی از پایان‌نامه خانم آرزو امیری برای اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته بافت‌شناسی و جنین‌شناسی در دانشگاه دامغان است. بدین وسیله، از دانشکده زیست‌شناسی دانشگاه دامغان به‌خاطر پرداخت هزینه مواد، وسایل و دراختیار قرار دادن امکانات آزمایشگاهی تشکر و قدردانی می‌گردد.

هستند [۳۱]. NGF و BDNF برای شکل‌پذیری هیپوکمپ لازم هستند و کاهش آنها با تخریب نورون‌های کولینرژیک و اختلالات شناختی در آلزایمر مرتبط است [۳۲]. گزارش شده است که GDNF در نورون‌های باقی‌مانده جسم سیاه در مغز بیماران پارکینسونی کاهش می‌یابد [۳۳]. نوروتروفین‌ها به‌عنوان گزینه‌های درمانی نوروپروتکتیو در بیماری‌های پارکینسون، آلزایمر، هانتینگتون، آمیوتروفیک لترال اسکلروزیس و نوروپاتی محیطی محسوب می‌شوند [۳۴]. شواهد قابل توجهی در جوندگان و پستانداران نشان داده است که تأثیر نوروتروفین‌هایی مانند NGF و BDNF موجب جلوگیری از مرگ نورون‌ها، بهبود سیگنالینگ سلولی، بازگرداندن حافظه و یادگیری و جلوگیری از زوال شناختی وابسته به سن می‌شود [۳۵]. در بررسی‌های مغز افراد پارکینسونی مشخص شده است که سطح پروتئین BDNF در مناطقی همچون جسم سیاه، هسته دمی و پوتامن کاهش می‌یابد [۳۶]. براساس یافته‌های کشت سلول و مدل‌های حیوانی، فاکتورهای نوروتروفیک به‌عنوان عوامل درمانی بالقوه در اختلالات عصبی محسوب می‌شوند [۳۷]. فاکتورهای نوروتروفیک نیمه‌عمر کوتاهی دارند که کاربرد مستقیم آنها را محدود می‌کند. همچنین، وزن مولکولی نسبتاً زیاد این مولکول‌ها نیز مانع عبور آنها از سد خونی مغزی می‌شود [۳۸]. بنابراین، در کنار تزریق داخل مغزی پروتئین‌های نوروتروفیک، روش‌های دیگری برای هدف قرار دادن مکانیسم عمل این فاکتورها در مغز مانند فعال کردن گیرنده آنها با کمک مولکول‌های کوچک آگونیست [۳۹]. استفاده از روش دارودرمانی که ترشح آندوژن فاکتورهای نوروتروفیک را تحریک می‌کند [۴۰] و پیوند سلول‌های ترشح‌کننده فاکتورهای نوروتروفیک [۴۱] وجود دارد. نشان داده شده است که ASCs قادر به ترشح انواع فاکتورهای رشد هستند و به-طور مؤثری از روند تمایز عصبی پشتیبانی می‌کنند [۴۲]. سلول‌های ترشح‌کننده فاکتورهای نوروتروفیک حاصل از ASCs قادر به ترشح بیشتر این فاکتورها هستند، بنابراین می‌توان از این سلول‌ها برای پیوند استفاده کرد [۱۱]. پیوند سلول‌های ترشح‌کننده نوروتروفین موجب بهبود علائم برخی از بیماری‌های نورودژنراتیو می‌شود [۴۳]. مطالعات درون و برون‌تنی نشان داده‌اند که hASCs موجب افزایش بیان ژن‌های BDNF، GDNF و NGF و افزایش سطح پروتئین آنها می‌شوند [۴۴، ۱۲]. ترشح BDNF توسط hASCs باعث تحریک رشد آکسون و بازسازی عصب در مدل حیوانی آسیب مغزی می‌شود [۴۴]. گزارش شده است که میزان بیان BDNF در سلول‌های بنیادی مزانشیمی مختلف انسانی ازجمله hADSCs به شرایط کشت و حضور فاکتورهای مناسب بستگی دارد و hASCs توانایی افزایش ترشح این فاکتور نوروتروفیک را

## References:

- [1] Martin RJ, Hausman GJ, Hausman DB. Regulation of adipose cell development in utero. *Proc Soc Exp Biol Med* 1998; 219(3): 200-10.
- [2] Vindigni V, Giatsidis G, Reho F, Dalla Venezia E, Mammana M, Franco B. Adipose derived stem cells: current state of the art and prospective role in regenerative medicine and tissue engineering. *Regenerative Med Tissue Eng* 2013; 953-78.
- [3] Kitada M, Dezawa M. Parkinson's disease and mesenchymal stem cells: potential for cell-based therapy. *Parkinson's Dis* 2012; 2012: 873706.
- [4] Casteilla L, Planat-Benard V, Laharrague P, Cousin B. Adipose-derived stromal cells: Their identity and uses in clinical trials, an update. *World J Stem Cells* 2011; 3(4): 25-33.
- [5] Gimble JM, Katz AJ, Bunnell BA. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circ Res* 2007; 100(9): 1249-60.
- [6] Guo X, Li S, Ji Q, Lian R, Chen J. Enhanced viability and neural differentiation potential in poor post-thaw hADSCs by agarose multi-well dishes and spheroid culture. *Human Cell* 2015; 28(4): 175-89.
- [7] Egashira Y, Sugitani S, Suzuki Y, Mishiro K, Tsuruma K, Shimazawa M, et al. The conditioned medium of murine and human adipose-derived stem cells exerts neuroprotective effects against experimental stroke model. *Brain Res* 2012; 1461: 87-95.
- [8] Mitchell JB, McIntosh K, Zvonic S, Garrett S, Floyd ZE, Kloster A, et al. Immunophenotype of human adipose-derived cells: temporal changes in stromal-associated and stem cell-associated markers. *Stem Cells* 2006; 24(2): 376-85.
- [9] Kern S, Eichler H, Stoeve J, Kluter H, Bieback K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells* 2006; 24(5): 1294-301.
- [10] Wang X, Zhao Z, Gong J, Zhou S, Peng H, Shataru A, et al. Adipose stem cells-conditioned medium blocks 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity via the IGF-1/PI3K/AKT pathway. *Neurosci Lett* 2014; 581: 98-102.
- [11] Razavi S, Razavi MR, Zarkesh Esfahani H, Kazemi M, Mostafavi FS. Comparing brain-derived neurotrophic factor and ciliary neurotrophic factor secretion of induced neurotrophic factor secreting cells from human adipose and bone marrow-derived stem cells. *Dev Growth Differ* 2013; 55(6): 648-55.
- [12] Kingham PJ, Kolar MK, Novikova LN, Novikov LN, Wiberg M. Stimulating the neurotrophic and angiogenic properties of human adipose-derived stem cells enhances nerve repair. *Stem Cells Dev* 2013; 23(7): 741-54.
- [13] Jones J, Estirado A, Redondo C, Bueno C, Martínez S. Human Adipose Stem Cell-Conditioned Medium Increases Survival of Friedreich's Ataxia Cells Submitted to Oxidative Stress. *Stem Cells Dev* 2012; 21(15): 2817-26.
- [14] Chen HT, Lee MJ, Chen CH, Chuang SC, Chang LF, Ho ML, et al. Proliferation and differentiation potential of human adipose-derived mesenchymal stem cells isolated from elderly patients with osteoporotic fractures. *J Cell Mol Med* 2012; 16(3): 582-93.
- [15] Ogura F, Wakao S, Kuroda Y, Tsuchiyama K, Bagheri M, Heneidi S, et al. Human adipose tissue possesses a unique population of pluripotent stem cells with nontumorigenic and low telomerase activities: potential implications in regenerative medicine. *Stem Cells Dev* 2014; 23(7): 717-28.
- [16] Oliva-Olivera W, Coin-Araguez L, Salas J, Lhamyani S, Gentile AM, Sarria Garcia E, et al. Myocardial Ischemic Subject's Thymus Fat: A Novel Source of Multipotent Stromal Cells. *PLoS One* 2015; 10(12): e0144401.
- [17] Witkowska-Zimny M, Walenko K. Stem cells from adipose tissue. *Cell Mol Biol Lett* 2011; 16(2): 236-57.
- [18] Liu XL, Zhang W, Tang SJ. Intracranial transplantation of human adipose-derived stem cells promotes the expression of neurotrophic factors and nerve repair in rats of cerebral ischemia-reperfusion injury. *Int J Clin Exp Pathol* 2014; 7(1): 174-83.
- [19] Zhu Y, Liu T, Song K, Fan X, Ma X, Cui Z. Adipose-derived stem cell: a better stem cell than BMSC. *Cell Biochemistry Function* 2008; 26(6): 664-75.
- [20] Yoshimura K, Shigeura T, Matsumoto D, Sato T, Takaki Y, Aiba-Kojima E, et al. Characterization of freshly isolated and cultured cells derived from the fatty and fluid portions of liposuction aspirates. *J Cell Physiol* 2006; 208(1): 64-76.
- [21] Aust L, Devlin B, Foster S, Halvorsen Y, Hicok K, Du Laney T, et al. Yield of human adipose-derived adult stem cells from liposuction aspirates. *Cytotherapy* 2004; 6(1): 7-14.
- [22] Nakagami H, Maeda K, Morishita R, Iguchi S, Nishikawa T, Takami Y, et al. Novel autologous cell therapy in ischemic limb disease through growth factor secretion by cultured adipose tissue-derived stromal cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25(12): 2542-7.
- [23] Gronthos S, Franklin DM, Leddy HA, Robey PG, Storms RW, Gimble JM. Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. *J Cell Physiol* 2001; 189(1): 54-63.
- [24] Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 2002; 13(12): 4279-95.
- [25] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284(5411): 143-7.

- [26] Izadpanah R, Trygg C, Patel B, Kriedt C, Dufour J, Gimble JM, et al. Biologic properties of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue. *J Cell Biochem* 2006; 99(5): 1285-97.
- [27] Ribeiro TB, Duarte AS, Longhini AL, Pradella F, Farias AS, Luzo AC, et al. Neuroprotection and immunomodulation by xenografted human mesenchymal stem cells following spinal cord ventral root avulsion. *Sci Rep* 2015; 5: 16167.
- [28] Wystrychowski W, Patlolla B, Zhuge Y, Neofytou E, Robbins RC, Beygui RE. Multipotency and cardiomyogenic potential of human adipose-derived stem cells from epicardium, pericardium, and omentum. *Stem Cell Res Ther* 2016; 7(1): 84.
- [29] Maredziak M, Marycz K, Tomaszewski KA, Kornicka K, Henry BM. The Influence of Aging on the Regenerative Potential of Human Adipose Derived Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells Int* 2016; 2016: 2152435.
- [30] Huang S, Wang S, Bian C, Yang Z, Zhou H, Zeng Y, et al. Upregulation of miR-22 promotes osteogenic differentiation and inhibits adipogenic differentiation of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells by repressing HDAC6 protein expression. *Stem Cells Dev* 2012; 21(13): 2531-40.
- [31] Airaksinen MS, Saarma M. The GDNF family: signalling, biological functions and therapeutic value. *Nat Rev Neurosci* 2002; 3(5): 383-94.
- [32] Conner JM, Franks KM, Titterness AK, Russell K, Merrill DA, Christie BR, et al. NGF is essential for hippocampal plasticity and learning. *J Neurosci* 2009; 29(35): 10883-9.
- [33] Chauhan NB, Siegel GJ, Lee JM. Depletion of glial cell line-derived neurotrophic factor in substantia nigra neurons of Parkinson's disease brain. *J Chem Neuroanat* 2001; 21(4): 277-88.
- [34] Thoenen H, Sendtner M. Neurotrophins: from enthusiastic expectations through sobering experiences to rational therapeutic approaches. *Nat Neurosci* 2002; 5(11s): 1046.
- [35] Deinhardt K, Chao MV. Trk receptors. *Handb Exp Pharmacol* 2014; 220: 103-19.
- [36] Mogi M, Togari A, Kondo T, Mizuno Y, Komure O, Kuno S, et al. Brain-derived growth factor and nerve growth factor concentrations are decreased in the substantia nigra in Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 1999; 270(1): 45-8.
- [37] Gyárfás T, Knuutila J, Lindholm P, Rantamäki T, Castrén E. Regulation of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and cerebral dopamine neurotrophic factor (CDNF) by anti-parkinsonian drug therapy in vivo. *Cell Mol Neurobiol* 2010; 30(3): 361-8.
- [38] Moller JC, Sautter J, Kupsch A. Potential of neurotrophic factors in therapy of Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl* 1996; 48: 103-12.
- [39] Tokugawa K, Yamamoto K, Nishiguchi M, Sekine T, Sakai M, Ueki T, et al. XIB4035, a novel nonpeptidyl small molecule agonist for GFRalpha-1. *Neurochem Int* 2003; 42(1): 81-6.
- [40] Visanji NP, Orsi A, Johnston TH, Howson PA, Dixon K, Callizot N, et al. PYM50028, a novel, orally active, nonpeptide neurotrophic factor inducer, prevents and reverses neuronal damage induced by MPP+ in mesencephalic neurons and by MPTP in a mouse model of Parkinson's disease. *FASEB J* 2008; 22(7): 2488-97.
- [41] Kramer R, Zhang Y, Gehrmann J, Gold R, Thoenen H, Wekerle H. Gene transfer through the blood-nerve barrier: NGF-engineered neuritogenic T lymphocytes attenuate experimental autoimmune neuritis. *Nat Med* 1995; 1(11): 1162-6.
- [42] Ghasemi N, Razavi S. Transdifferentiation potential of adipose-derived stem cells into neural lineage and their application. *J Histol Histopathol* 2014; 1(1): 12.
- [43] Sadan O, Melamed E, Offen D. Intrastratial transplantation of neurotrophic factor-secreting human mesenchymal stem cells improves motor function and extends survival in R6/2 transgenic mouse model for Huntington's disease. *PLOS Curr* 2012.
- [44] Lopatina T, Kalinina N, Karagyaur M, Stambolsky D, Rubina K, Revischin A, et al. Adipose-derived stem cells stimulate regeneration of peripheral nerves: BDNF secreted by these cells promotes nerve healing and axon growth de novo. *PLoS One* 2011; 6(3): e17899.
- [45] Zemel'ko VI, Kozhukharova IB, Alekseenko LL, Domnina AP, Reshetnikova GF, Puzanov MV, et al. Neurogenic potential of human mesenchymal stem cells isolated from bone marrow, adipose tissue and endometrium: a comparative study. *Tsitologiya* 2013; 55(2): 101-10.
- [46] Zhong Z, Gu H, Peng J, Wang W, Johnstone BH, March KL, et al. GDNF secreted from adipose-derived stem cells stimulates VEGF-independent angiogenesis. *Oncotarget* 2016; 7(24): 36829-41.
- [47] Kim IG, Piao S, Lee JY, Hong SH, Hwang T-K, Kim SW, et al. Effect of an adipose-derived stem cell and nerve growth factor-incorporated hydrogel on recovery of erectile function in a rat model of cavernous nerve injury. *Tissue Eng Part A* 2012; 19(1-2): 14-23.
- [48] Fontanilla CV, Gu H, Liu Q, Zhu TZ, Zhou C, Johnstone BH, et al. Corrigendum: Adipose-derived Stem Cell Conditioned Media Extends Survival time of a mouse model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Sci Reports* 2016; 6: 20747.
- [49] Bhang SH, Lee S, Shin JY, Lee TJ, Jang HK. Efficacious and clinically relevant conditioned medium of human adipose-derived stem cells for therapeutic angiogenesis. *Mol Ther* 2014; 22(4): 862-72.
- [50] Chase LG, Lakshmi U, Solchaga LA, Rao MS, Vemuri MC. A novel serum-free medium for the expansion of human mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther* 2010; 1(1): 8.