

## 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 neurotropic 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 α-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-Dimethyltiazol-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 بهنگام پیوند خطر انتقال عفونت را به همراه دارد، در این تحقیق سرعت تکثیر، بقاء 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 α-MEM حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی یا محیط فاقد سرم کشت داده شدند. بنیادی بودن سلول های پاساز چهارم با روش فلوسایتو متری و قابلیت تمایزشان به سلول های چربی و استخوان تأیید شد. تکثیر و بقاء سلولی، به ترتیب با روش های هموسایتو متری و MTT بررسی شد. همچنین، میزان ژن های نوروتروفیک با روش RT-PCR ارزیابی گردید.

نتایج: سلول ها به نشان گر های CD105, CD90, CD44, CD34 و CD45 پاسخ منفی دادند و توائی ای تمایز به سلول های چربی و استخوان را داشتند. بقاء و تکثیر سلول های کشت شده در محیط سرم دار به مدت ۴۸ ساعت نسبت به محیط بدون سرم، به طور معنی داری افزایش معنی داری در میزان بیان ژن های BDNF و NT-3 نسبت به سلول هایی که در محیط بدون سرم کشت داده 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، بقاء، سرم

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

چربی قهقهه ای در طول رشد انسان دچار تغییرات مورفو لوژیک شده و درنهایت هیچ مجموعه ای از آن را نمی توان در انسان بالغ یافت. چربی سفید را می توان در چندین در چندین مجموعه جداگانه و متایمیز آناتومیکی یافت که دو زیرمجموعه عمدۀ 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 امتنوم یافت [۳] با توجه 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 در سال ۲۰۰۱ شرح داده شد. آنها از اصطلاح سلول های جدنشده از آسپیراسیون چربی استفاده کردند. از آنجا که بافت چربی حاوی چندین نوع سلول است، لیپو آسپیره حاصل از آن را می توان با سانتریفیوژ پردازش نموده و سلول های بنیادی آن را به طور مرتب جدا کرد. پس از سانتریفیوژ ممکن است بخش زیادی از سلول های چربی در طول پردازش از هم پاشیده شده و بمیرند. بخش دیگر سانتریفیوژ که بخش عروقی استرومای (Stromal-vascular fraction; SVF) نامیده می-

## مقدمه

بافت چربی از لایه مژو درم جنبینی 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 دو سوم 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 قهقهه 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 نیاز های متابولیکی است. آدیپوسایت های قهقهه ای از چربی های انباسته 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

\* نشان نویسنده مسئول:

دامغان، دانشگاه دامغان، دانشکده زیست شناسی  
تلفن: ۰۹۳۷۴۵۴۹۸۰۳، دورنوبس: ۰۲۳۳۵۲۲۰۱۲۰

پست الکترونیک: Kashani@du.ac.ir

تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۶/۳/۱۲، 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 تعزیزه بافت آنژیم کلاژنаз ۰/۲ درصد بهمیزان ۱/۵ میلی‌لیتر به ازای هر گرم بافت چربی در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۶۰ دقیقه به کار گرفته شد. کلاژنаз با حجمی برابر از محیط α-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 فلاکس ۲۵cm<sup>۲</sup> در مععرض محیط α-MEM غنی شده با ۱۰ FBS درصد و پنی‌سیلین-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 فلاکس چسبیده، باقی‌مانده و سلول‌های خونی با تعویض محیط حذف شدند. پس از رسیدن EDTA سلول‌ها به تراکم ۷۰-۸۰ درصد با کمک محلول تریپسین/EDTA سلول‌ها از کف فلاکس جدا و به نسبت ۱:۲ پاساز داده شدند. در این مطالعه از سلول‌های پاساز 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).

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

**تمایز hASCs به سلول‌های استخوانی**  
پس از کشت سلول‌های پاساز چهارم در پلیت ۱۲ اخانه و رسیدن به تراکم ۸۰-۹۰ درصد، محیط کشت اختصاصی (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 آلیزارین رد (Sigma, A5533) بررسی شد. ابتدا سلول‌ها با PBS شسته شده و مدت ۱ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در مععرض محلول فیکساتیو پارافرمالدئید ۴ درصد قرار داده شدند. سپس، سلول‌ها به مدت ۲ دقیقه در مععرض محلول رنگی آلیزارین

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، فیبروبلاست‌ها، پری‌سایت‌ها، سلول‌های اندوتیال و همچنین پره‌آدیپوسایت‌ها است. گام نهایی، جدا کردن پره‌آدیپوسایت‌های چسبیده به ظروف کشت از دیگر سلول‌های ASCs است. پس از چند پاساز پی دربی در کشت ویژگی چسبندگی، مولکول‌های گیرنده، آنژیم‌های 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 سلول درمانی هستند. hASCs ویژگی‌های مشابه سلول‌های بنیادی مزانشیمی را نشان می‌دهند و دارای ظرفیت تمایز به استوپلاست، کندروسیت، آدیپوژنیک، میوزنیک و دودمان‌های عصبی هستند [۶]. جمع‌آوری بافت چربی بالغ از لحاظ فنی آسان و ایمن است. علاوه‌بر 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، برای کاربردهای بالینی مناسب‌تر هستند [۷]. در مقایسه با سلول‌های بنیادی مغز ASCs استخوان (BMSCs) راحت‌تر کشت شده و سرعت تکثیر بالایی دارند [۸]؛ همچنین، پیش از آنکه پیر شوند، به مدت طولانی تری کشت داده می‌شوند [۹]. نشان داده شده است که 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 توائیابی آنها در تمایز نوروزنیک است. بنابراین به نظر می‌رسد hASCs در بحث سلول درمانی برای بیماری‌های عصبی و آسیب‌های مغزی مؤثر است [۱۱-۱۳]. در این تحقیق پس از بررسی ماهیت بنیادی سلول‌ها، سرعت تکثیر و میزان زنده‌ماندن سلول‌ها نیز ارزیابی شد. از آنجاکه سرم گاوی در انسان ایمونولوژیک بوده و به هنگام 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 حتی الامکان با حذف سرم بهینه‌سازی شرایط کشت صورت گرفته و سلول‌های مناسب‌تری برای پیوند و سلول درمانی 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، ۱۶].

بررسی مولکولی بیان ژن‌های اعضای خانواده نوروتروفین NGF، BDNF، GDNF، به منظور بررسی بیان ژن‌های hASCs نوروتروفین-۳ (NT-3) و نوروتروفین-۴ (NT-4) در hASCs استفاده شد. از تکنیک RT-PCR از ۲۴ ساعت در معرض محیط کشت به همراه سرم و محیط فاقد سرم قرار گرفتند. سپس، mRNA از سلول‌ها استخراج شده و با آنزیم کپی برداری 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 بدست آمد. استخراج RNA به وسیله کیت RNX Plus صورت گرفت. غلظت RNA بدست آمده با استفاده از جذب نوری در طول موج ۲۶۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفوتومتر اندازه‌گیری شد. همچنین، کیفیت RNA نیز با الکتروفورز ژل آگارز بررسی شد.

#### ستز DNA مکمل (cDNA)

این مرحله با توجه به دستورالعمل کیت ساخت cDNA RNA (Fermentas-K1622) انجام شد. ابتدا یک میکروگرم (معادل ۱۰ میکرولیتر) به همراه یک میکرولیتر الیگوپرایمر در میکروتیوب ریخته شده و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی گراد قرار داده شد. سپس، با افزودن بافر واکنش dNTP و مهارکننده ریبونوکلئاز به محلول فوق به مدت ۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفت. با اضافه کردن آنزیم سانتی گراد Reverse transcriptase در دمای ۴۲ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی گراد 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 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  $8 \times 10^4$  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 PBS (Sigma, O0625) بررسی شد. ابتدا سلول‌ها با اویل رد (Sigma, O0625) شسته شده و مدت ۱ ساعت در دمای ۴ درصد قرار داده شدند. معرض محلول فیکساتیو پارافرمالدئید ۴ درصد قرار داده شدند. سپس، سلول‌ها با الکل ۷۰ درصد شسته شده و به مدت ۱۰-۱۵ دقیقه در معرض محلول رنگی اویل 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 به وسیله لام ثوبار و تریپان بلو ارزیابی میزان حیات و تکثیر سلولی توسط لام ثوبار و رنگ تریپان بلو انجام شد. سلول‌ها با تریپسین از فلاسک کشت جدا شده و سانتریفیوژ شدند. با رسوب به دست 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 به همین دلیل سلول‌های مرده به رنگ آبی و سلول‌های زنده به رنگ 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 به مدت ۴ ساعت در شرایط ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه گردید. سپس، ۸۵ میکرولیتر از محیط رویی برداشته شده و ۵۰ میکرولیتر دی‌متیل سولفوكساید (DMSO) اضافه گردید و به مدت 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 [۱۲، ۱۳].

پرایمر ژن‌های NTF3 و BDNF، NTF4 و GAPDH و GDNF و GAPDH به عنوان 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' ۵'→۳'              | اندازه ژن (جفت باز) |
|----------|---------------------------|---------------------|
| F-NGF    | ATACAGGGGAAACACACTCAG     | ۱۷۴                 |
| R-NGF    | GTCC ACAGTAATGTTGGGGTC    |                     |
| F-BDNF   | AGAGGCTTGACATCATTGGCTG    | ۱۶۷                 |
| R-BDNF   | CAAAGGCACCTTGACTTGAGCATC  |                     |
| F- NTF3  | GGGAGATCAAACGGGCAAC       | ۲۲۲                 |
| R- NTF3  | ACAAGGCACACACACAGGAC      |                     |
| F- NTF4  | CTGTGTGCGATGCAGTCAGT      | ۱۴۱                 |
| R- NTF4  | TGCAGCGGGTTCAAAGAAGT      |                     |
| F-GDNF   | CACCAAGATAAACAAATGGCAGTGC | ۳۳۵                 |
| R-GDNF   | CGACAGGTATCATCAAAGGCG     |                     |
| F- GAPDH | GCTGGGGCTCATTGAGG         | 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 آمیپوسایت 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). همچنین، تمایز استئوژنیک با تولید فسفات کلسیم و ماتریکس خارج سلولی معدنی پس از ۲۱ روز با رنگ‌آمیزی آلیزانین رد مشاهده شد (شکل شماره ۲، B و C).

نتایج شمارش سلولی به روش هموسایوتومتری در این پژوهش تأثیر محیط کشت بر بقاء hASCs مورد بررسی قرار گرفت. شمارش سلول‌ها در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت با روش هموسایوتومتری 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 معنی داری 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 کلوموگروف، با کمک آزمون t مستقل اختلاف معنی دار بین گروه‌ها بررسی گردید. سطح معنی داری  $P \leq 0.05$  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 دوکی شکل 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 فلوسایوتومتری hASCs با آنتی‌بادی علیه آنتی‌ژن نشان‌دار و با فلوسایتو-متری مورد بررسی قرار گرفت. سلول‌ها به نشان‌گرهای CD44، CD90، CD73، CD105، CD34 و به نشان‌گرهای CD45 پاسخ مثبت و به نشان‌گرهای CD45 پاسخ منفی دادند (شکل شماره ۲).

همین شرایط کشت داده شده بودند اختلاف معنی‌داری را نشان دادند، درحالی که هیچ اختلاف معنی‌داری 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 سرمدار بیان ژن‌های BDNF و NTF-3 را در سلول‌های کشت داده شده، به طور معنی‌داری افزایش داد، درحالی که در میزان بیان ژن‌های NTF-4 و NGF و GDNF تأثیری نداشت (نمودار شماره ۳).

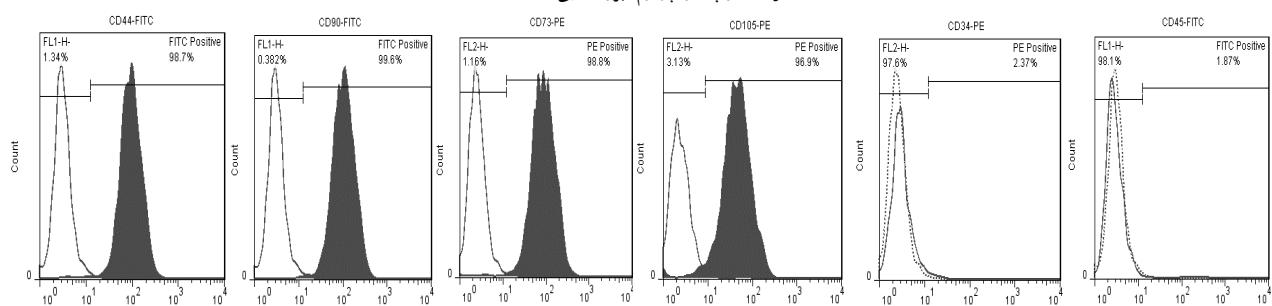
معنی‌داری نسبت به گروه مشابه در ۴۸ ساعت را نشان داد (نمودار شماره ۱).

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 معنی‌داری را نشان داد. از طرف دیگر نیز سلول‌هایی که ۴۸ ساعت در محیط سرمدار بودند، نسبت به سلول‌هایی که به مدت ۲۴ ساعت در



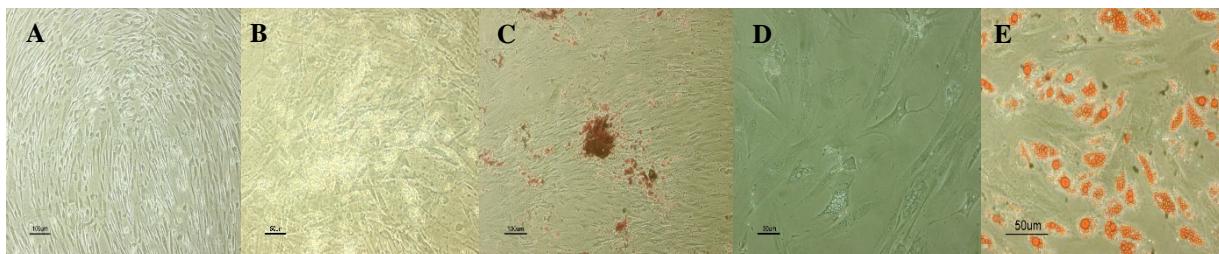
شکل شماره ۱- بررسی مورفولوژیکی سلول‌های بنیادی چربی انسان

A: سلول‌های بنیادی چربی به شکل دوکی و کشیده، ۹۶ ساعت پس از کشت که در آن سلول‌های خونی نیز شناور می‌باشند. بزرگنمایی  $\times 10$ . B: همان سلول‌ها با بزرگنمایی  $\times 40$  در پاساژ چهارم. بزرگنمایی  $\times 10$



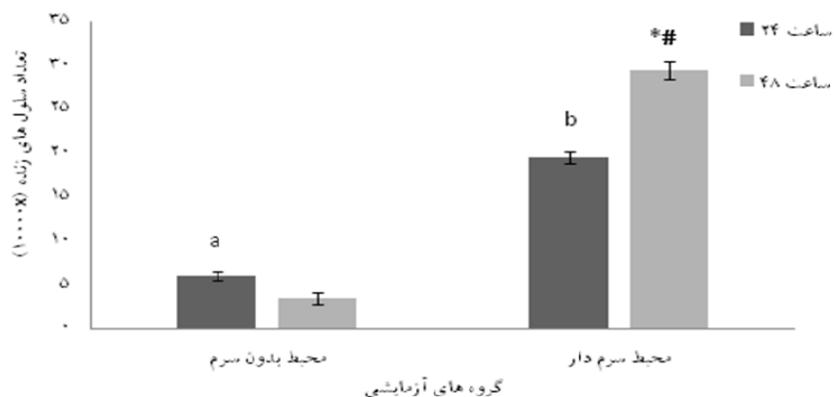
شکل شماره ۲- نشانگرهای سطحی hASCs

hASCs با آنتی‌بادی علیه آنتی ژن نشاندار شده و با فلوزایوتومتری مورد بررسی قرار گرفت. سلول‌ها به نشانگرهای CD44، CD90، CD73، CD105، CD34 و CD45 پاسخ مثبت و به نشانگرهای CD45 پاسخ منفی دادند.



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

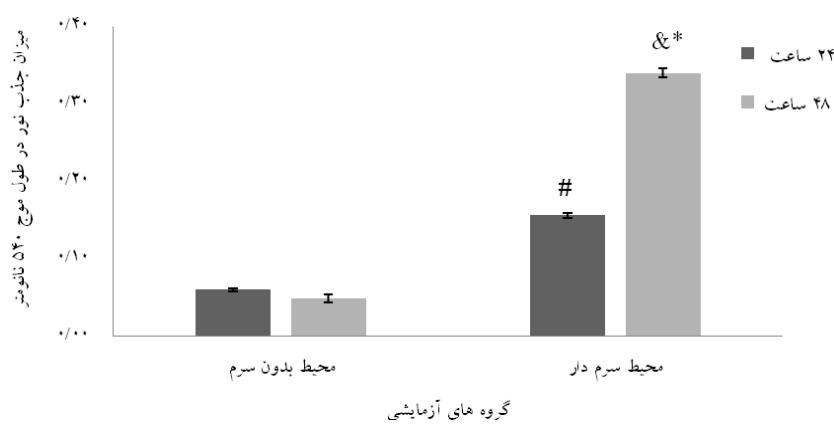
A: سلول‌های تمایز یافته ای که در محیط کشت القایی قرار نگرفته‌اند، بزرگنمایی  $\times 10$ . B: سلول‌های تمایز یافته به استخوان، بزرگنمایی  $\times 10$ . C: سلول‌های تمایز یافته به استخوان، بزرگنمایی  $\times 20$ . D: سلول‌های تمایز یافته به چربی قبل از رنگ‌آمیزی که گرانول‌های چربی در سیتوپلاسم قابل مشاهده هستند، بزرگنمایی  $\times 10$ . E: سلول‌های تمایز یافته به چربی پس از رنگ‌آمیزی با اویل رد که گرانول‌های چربی رنگ شده‌اند، بزرگنمایی  $\times 20$ .



نمودار شماره ۱- بررسی درصد سلول‌های زنده با روش هموسایتو متري 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

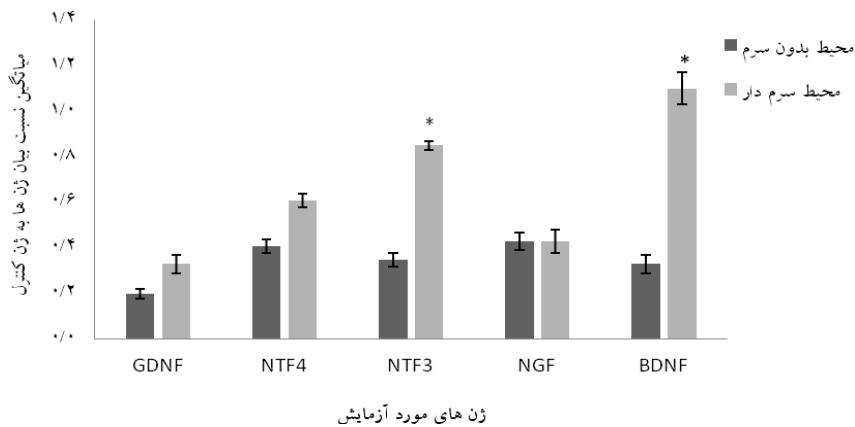


نمودار شماره ۲- بررسی سرعت تکثیر hASCs با روش MTT به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت

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

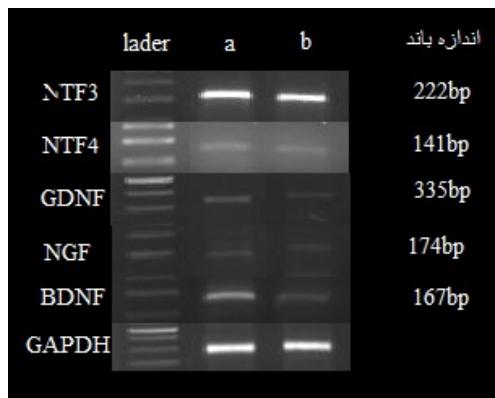
& معنی‌داری نسبت به سلول‌های کشته داده شده در محیط بدون سرم ۴۸ ساعت

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



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

\* معنی‌داری در مقایسه با گروه بدون سرم مربوطه



شکل شماره ۴- آنالیز واکنش زنجیره پلیمراز با رونویسی معکوس برای بیان ژن‌های نوروتروفین در hASCs  
a: محیط کشت بدون سرم b: محیط کشت + سرم

CD73 مثبت بودند. این میزان در مورد CD90 بهمیزان ۹۹/۶ درصد رسید. همچنین، بیش از ۹۷ 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. عموماً تمایز آدیپوژنیک و استئوژنیک به ترتیب این گونه تعریف می‌شود: سلول‌های حاوی قطرات چربی درونسلولی که با رنگ آمیزی اویل رد مشخص می‌شوند و سلول‌هایی با افزایش بیان آلکالین فسفاتاز و میترالیزه شده که با رنگ آمیزی آلیزارین 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 [۲۸-۳۰]. در این مطالعه پس از اینکه سلول‌ها در معرض محیط تمایز آدیپوژنیک و استئوژنیک قرار گرفتند، به تدریج مورفوژوئی شبیه آدیپوست و استئوبلاست ظاهر شده و پس از ۳ هفته رنگ آمیزی اختصاصی انجام شد. تمایز آدیپوژنیک با تجمع قطرات لیپیدی در طول هفته اول آغاز شده و پس از ۲۱ روز با اویل رد رنگ آمیزی و مشاهده شد. همچنین، تمایز استئوژنیک با تولید فسفات کلسیم و ماتریکس خارج سلولی معدنی پس از ۲۱ روز با رنگ آمیزی آلیزالین 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 نوروتروفینیک در بقاء، رشد، تمایز و مهاجرت سلول‌های سیستم عصبی نقش مهمی ایفا می‌کنند. علاوه بر این، برخی از آن‌ها برای تنظیم شکل‌بندی سیناتیسی در مغز پس از تولد مورد نیاز

## بحث

سلول‌های بنیادی چربی زیرجلدی ویژگی چسبندگی به فلاسک‌های کشت را دارند و در آغاز با مورفوژوئی دوکی شکل یا ستاره‌ای ظاهر می‌شوند. سپس، از پاساژ دوم یا سوم به بعد، مورفوژوئی فیبروبلاستی پهن و کشیده از خود به نمایش می-گذارند [۱۷، ۱۶]. Zhu و همکاران [۱۷، ۱۶] hASCs را تا بیش از ۲۵ پاساژ کشت دادند و کیتیک رشد و قدرت تمایزی آنها را بررسی کردند [۱۸، ۱۹]. در تحقیق حاضر در طی هفته اول hASCs بهدلیل چسبیدن به کف فلاسک کشت از سلول‌های خونی شناور جدا شدند. مورفوژوئی فیبروبلاستی و دوکی شکل سلول‌ها مشاهده شده و به تدریج با افزایش پاساژ از سرعت تکثیر کاسته شد. بهمنظور تأیید هویت بنیادی سلول‌های مزانشیمی ماهیت نشانگرهای سطحی آن‌ها با روش فلوسایتومتری بررسی شد. محققان زیادی ایمونوفوتیپ‌های سطحی ASCs جداسهده از چربی انسان و گونه-های دیگر را بررسی کرده‌اند [۲۰-۲۲]. با وجود روش‌های یکسان جداسازی و کشت، ایمونوفوتیپ‌های به دست آمده در آزمایشگاه-های مختلف نسبتاً مشابه هستند [۲۴، ۲۳] در واقع ایمونوفوتیپ‌های سطحی ASCs همانند BMSCs و MSCs است [۲۵]. ایمونوفوتیپ‌های سطحی ASCs و MSCs در مقایسه باهم ۹۰ درصد یکسان هستند [۸]. در مطالعات متعدد گزارش شده است که hASCs نشانگرهایی از جمله CD90، CD106، CD29، CD101، CD73 و CD105 را بیان می‌کنند، در حالی‌که نشانگرهای سطحی سلول خونساز مثل CD45 و CD34 را بیان نمی‌کنند [۲۶، ۱۶]. در مطالعه حاضر برای اولین‌بار، 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 CD44، CD105، CD44، CD90 و CD105، CD44، CD90 و CD105 می‌باشد.

دارد [۴۵]. فعالیت پروتئین GDNF تولید شده از hASCs آزمایشگاه موجب تحريك و القاء رگزایی می‌شود [۴۶]. محیط به دست آمده از hASCs حاوی فاکتورهای نوروتروفیک و نوروپروتکتو مختلف از جمله BDNF، فاکتور رشد اندولیالی عروق (VEGF)، فاکتور رشد کبدی (HGF)، NGF و فاکتور رشد شبکه انسولینی ۱ (IGF-1) است و در مدل‌های کشت سلولی و NGF حیوانی ضایعه عصبی باعث محافظت نورومنی می‌شود [۴۷]. موجود در محیط به دست آمده از hASCs نقش مهمی در حفاظت از نوروون‌ها 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 آنتی‌بیوتیک در چنین محیطی افزایش یافته، به طوری که پس از تزریق به موش‌های مدل ایسکمی باعث بهبودی آنها شده است [۴۹، ۵۰]. در این پژوهش میزان بیان ژن‌های BDNF، NTF-3، NTF-4 و NGF در hASCs کشت داده شده در دو محیط سرمه‌دار و بدون سرم بررسی و با یکدیگر مقایسه شد. میزان بیان ژن‌های NTF-3 و BDNF در hASCs کشت شده در محیط سرمه‌دار افزایش معنی‌داری نسبت به محیط بدون سرم نشان داد، ولی در مورد ژن‌های دیگر اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. بنابراین، با توجه به اینکه سرم گاوی هزینه‌بر است و همچنین در پیوند با آلوگیک 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 گستردۀ‌تری 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 چنین‌شناسی در دانشگاه دامغان است. بدمین‌وسیله، 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 نوروون‌های کولینرژیک و اختلالات شناختی در آلزایمر مرتبط است [۳۲]. گزارش شده است که GDNF در نوروون‌های باقی‌مانده جسم سیاه در مغز بیماران پارکینسونی کاهش می‌یابد [۳۳]. نوروتروفین‌ها به عنوان گزینه‌های درمانی نوروپروتکتو 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 نوروون‌ها، 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 به عنوان 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 فعل کردن گیرنده آنها با کمک مولکول‌های کوچک آگونیست [۳۹]. استفاده از روش دارودرمانی که ترشح آندوزن فاکتورهای نوروتروفیک را تحریک می‌کند [۴۰] و پیوند سلول‌های ترشح کننده فاکتورهای نوروتروفیک [۴۱] وجود دارد. نشان داده شده است که ASCs قادر به ترشح انواع فاکتورهای رشد هستند و به طور مؤثری از روند تمايز عصبی پشتیبانی می‌کنند [۴۲]. سلول‌های ترشح کننده فاکتورهای نوروتروفیک حاصل از ASCs قادر به ترشح بیشتر این فاکتورها هستند، بنابراین می‌توان از این سلول‌ها برای پیوند استفاده کرد [۱۱]. پیوند سلول‌های ترشح کننده نوروتروفین موجب بهبود علائم برخی از بیماری‌های نورووزنراتیو hASCs می‌شود [۴۳]. مطالعات درون و برونتی نشان داده‌اند که موج افزایش بیان ژن‌های BDNF، NGF و GDNF از 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 بینادی مژاشیمی مختلف انسانی از جمله 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 differential 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, Shatara 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<sup>+</sup> 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. Intrastratal 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. *Tsitolgiia* 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, Lakshmipathy 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.