Comparison of two protocols for induction of differentiation of human adipose derived stem cells into oligodendrocyte progenitor cells

Ghasemi N., PhD[1]
1.Assistant Professor, Department of Anatomical Science and Molecular Biology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran (Corresponding Author), Tel:+98-311-7929156, n_ghasemi@med.mui.ac.ir

ABSTRACT

Background and Aim: Multiple sclerosis (MS) is an autoimmune demyelinating disease which affects central nervous system (CNS). The aim of this study was to provide a simple, short term and efficient method for differentiation of human adipose tissue-derived stem cells (hADSCs) into oligodendrocyte precursor cells in order to provide a homogeneous population of these cells.

Materials and Methods: After stem cell isolation, cell differentiation was performed by two methods using embryoid body and ectodermal-like cells. The cell viability was evaluated by MTT assay and the mean percentage of differentiated cells expressing Olig2 and A2B5 markers was determined by using immunocytochemistry techniques. Data were analyzed by independent- samples t- Test.

Results: The results showed that a high percentage of stem cells expressed CD90 and CD105 markers and a low percentage of them expressed CD14 and CD45 markers (hematopoietic cell markers). In addition, the mean percentages of the cells which expressed oligodendrocyte progenitor cells markers (Olig2 and A2B5) were different in the two groups (P=0.031). Moreover, comparison of cell viability showed significant light absorbance by the cells differentiated from embryoid body compared to the other groups (p = 0.044).

Conclusion: The differentiation of human adipose derived stem cells into oligodendrocyte progenitor cells using embryoid body is a rapid and efficient method in order to provide a homogeneous population of these cells.

Key words: Multiple sclerosis, Adult stem cells, Oligodendroglia.

Received: Feb 22, 2017 **Accepted:** May 31, 2017

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-18]

[DOI: 10.22102/22.5.93]

مقایسه دو پروتکل القایی برای تمایز سلول های بنیادی مشتق از بافت چربی انسان به سلول های پیش ساز الیگودندروسیت

ناظم قاسمی[۱]

۱.استادیار، گروه آناتومی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران (مولف مسوول)، تلفن ثابت:۳۷۹۲۹۱۵۶-۰۳۱،
n_ghasemi@med.mui.ac.ir

چکیده

زمینه و هدف: مولتیپل اسکلروزیس(MS) یک بیماری اتوایمن تخریب کننده میلین است که سیستم عصبی مرکزی را تحت تاثیر قرار می دهد. این مطالعه با هدف ارائه یک روش ساده، کارامد و کوتاه مدت در تمایز سلول های بنیادی مشتق از بافت چربی انسان به سلول های پیش ساز الیگودندروسیتی به منظور دستیابی به یک جمعیت همگنی از این سلول ها انجام شد.

روش بررسی: بعد از جداسازی سلول های بنیادی، تمایز سلولی به دو روش و با استفاده از اجسام شبه جنینی و سلول های شبه اکتودرمی انجام شد. قابلیت زیست پذیری سلولها با استفاده از روش MTT و درصد سلول های بیان کننده مارکر های Olig2 و A2B5با کمک ایمونوسیتوشیمی مشخص گردید. همه ی داده ها با استفاده از نرم افزار SPSS و با آزمون آماری Independent- Samples T Test آنالیز شدند.

یافته ها: نتایج نشان داد که درصد بالایی از سلول های بنیادی، مارکرهای CD90 و CD105 و درصد پایینی از آنها مارکرهای CD45 و CD14 (مارکرهای سلول های خونساز) را بیان کردند. بعلاوه میانگین درصد سلول های بیان کننده مارکرهای الیگودندروسیتی پیش ساز (Olig2 و A2B5) در دو گروه متفاوت بود (P=۰/۰۳۱). علاوه بر این، مقایسه قابلیت زیست پذیری سلولها نشان داد که میانگین جذب نوری در سلول های تمایز یافته با منشاء اجسام شبه جنینی نسبت به سایر گروها افزایش یافته است (P=۰/۰۴۴).

نتیجه گیری: تمایز سلول های hADSCs به سلول های الیگودندروسیتی پیش ساز با استفاده از اجسام شبه جنینی روشی سریع، کارامد و مقرون به صرفه برای دستیابی به یک جمعیت همگنی از این سلول ها می باشد.

کلمات کلیدی: مولتیپل اسکلروزیس، سلول های بنیادی بالغین، الیگودندروگلیا

وصول مقاله:۹۵/۱۲/۴ اصلاحیه نهایی:۹۶/۱/۱۶ پذیرش:۹۶/۳/۱۰

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-18]

[DOI: 10.22102/22.5.93]

مقدمه

بیماری اسکلروز متعدد [Multiple Sclerosis (MS)] شایعترین علت نورولوژیکی ناتوانی در بالغین جوان است که در زنان بیشتر از مردان بروز می کند (۱). اختلال در عملکرد سیستم عصبی مرکزی که به دنبال ابتلا به این بیماری ایجاد می شود می تواند به دلیل از بین رفتن تدریجی و پیشرونده غلاف میلین رشته های عصبی باشد. اگرچه علت اصلی بیماری MS شناخته شده نیست اما عوامل ژنتیکی و محیطی (عفونت های میکروبی و ویروسی) نقش عمده ای در پیدایش این بیماری دارند (۳ و۲). مصرف داروهای مهار کننده ایمنی و کورتیکواستروئیدها قادر به توقف فرآیند تخریب نورونی نمی باشند (۴) لذا پیشرفت هایی در زمینه درمان MS با استفاده از پیوند سلول های بنیادی و با هدف جایگزین کردن سلولهای از بین رفته و ترشح فاکتور های رشد انجام گرفته است (۵). سلولهای بنیادی مشتق از بافت چربی (Adipose Derived Stem Cell: ADSC) یک جمعیت مشخص از سلولهای بنیادی بالغین می باشند که توانایی تمایز به انواع سلول ها، بویژه سلول های عصبی را دارند (۶). از انجایی که دستیابی به بافت چربی نسبت به سایر بافت ها (مثل مغز قرمز استخوان) غیر تهاجمی تر است و با توجه به محتوای بالای سلول های بنیادی موجود در آن (۷)، بافت چربی به عنوان یک منبع سلولی ایده ال مورد توجه خاص قرار گرفته است. سلول های ADSC توانایی ترشح فاکتورهای رشد عصبی و عوامل ضد التهابی را دارند و پیوند این سلولها پیشرفت هایی را در زمینه درمان MS فراهم کرده است (۶) اما عوارض احتمالی مثل تومورزایی که به دنبال تکثیر پیشرونده این سلول ها در بافت ها رخ می دهد را نمی توان نادیده گرفت (۸). از آنجایی که سلول های تمایز یافته مشابه سلول های بنیادی قدرت تکثیر بالا ندارند بنابراین پیوند سلول های تمایز یافته بجای سلول های بنیادی به منظور کاهش عوارض احتمالی نظیر تومورزایی یک ضرورت است.

تاکنون مطالعات زیادی در زمینه تمایز سلول های بنیادی به سلول های الیگودندروسیتی انجام شده است. کریستانیا و همکاران (۹) سلول های بنیادی مشتق از ماتریکس طناب نافی انسان را با استفاده از یک روش چند مرحله ای به سلول های شبه الیگودندروسیتی تمایز دادند . علاوه بر این، در پژوهشی دیگر سلول های بنیادی مشتق از مغز استخوان در حضور فاکتورهای نوروتروفیک متعددی به سلول های الیگودندروسیتی تمایز داده شدند (۱۰). در اکثر این مطالعات دوره زمانی صرف شده جهت تمایز سلول های بنیادی به سلول های شبه الیگودندروسیتی طولانی مدت بوده و نتایج بدست امده هم در حد مورد قبول نبوده است. لذا با توجه به سهولت دستیابی به سلول های hADSC و پتانسیل بالای این سلول ها در تمایز به انواع سلول های دیگر و با تکیه بر توانایی این سلول ها در ترشح فاکتورهای نوروتروفیک ، این مطالعه برای اولین بار و با هدف ارائه یک روش ساده، کارامد و کوتاه مدت در تمایز سلول های بنیادی مشتق از بافت چربی انسان به سلول های پیش ساز الیگودندروسیتی به منظور دستیابی به یک جمعیت همگن از سلول های الیگودندروسیتی انجام شده است.

روش بررسی

جدا سازی و کشت سلولهای بنیادی مشتق از بافت چربی انسان

در این پژوهش، بعد از دریافت رضایت نامه از افراد کاندید عمل لیپوساکشن با میانگین سنی ۳۵-۲۵ سال، بافت چربی از ناحیه زیر جلدی برداشته شد و پس از شستشو با PBS، تجزیه مکانیکی و انزیمی با استفاده از تیغ جراحی و آنزیم کلاژناز I با غلظت 0.075 درصد انجام شد. در ادامه با انجام سانتریفوژ و تخلیه محیط رویی، رسوب سلولی حاصله با استفاده از محیط کشت DMEM /F12 حل شد و سوسپانسیون سلولی در فلاسک های T25 و در شرایط استاندارد (5 % Co2, 37 oC) تا پاساژ پنجم کشت داده شد.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-18]

[DOI: 10.22102/22.5.93]

تکنیک ایمونوسیتوشیمی و بررسی مارکرهای سطحی سلولهای بنیادی مشتق از بافت چربی

بدین منظور از تعداد ۱×۱۰^{۵} سلول hADSC کشت داده شده در پلیت های ۱۲ چاهکی برای بررسی CD مارکرها استفاده شد. بعد از شستشو با محلول BSA/PBS، این سلول ها به مدت ۳۰ دقیقه در مجاورت آنتی بادی های Anti- CD90, CD105, CD14, and CD45 متصل به رنگ فلورسنت قرار داده شدند. بعد از شستشو به منظور رنگ آمیزی هسته، رنگ DAPI به مدت دو دقیقه استفاده شد. نهایتا لامل ها با چسب انتلان بر روی لام ها فیکس شدند و با میکروسکوپ فلورسنس (مدل BX51،ژاپن) مورد بررسی قرار گرفتند. تعداد ۲۰۰ سلول در چند فیلد شمارش و میانگین درصد سلول های بیان کننده هر مارکر گزارش شد. لازم به ذکر است که این تکنیک سه بار تکرار شد و نتایج حاصله به شکل میانگین گزارش گردید.

روش اول در تمایز سلولهای بنیادی مشتق از بافت چربی به سلولهای الیگودندروسیتی پیش ساز

ابتدا از سلول های hADSCs و به روش قطره آویزان (Hanging drop) اجسام شبه جنینی تهیه شد. به منظور تشکیل اجسام شبه جنینی قطرات ۲۰ میکرولیتری محیط کشت DMEM/F12 حاوی 2% B27، 20 ng/ml Human epidermal growth factor(H-EGF) 20ng/ml Human basic fibroblast growth factor (hbFGF), که محتوی ۵۰۰ تا ۷۰۰ سلول hADSCs بود در سطح درونی درب دیش های مخصوص کشت سلول قرار داده شد و سپس درب ها به شکل وارانه بر روی دیش های محتوی PBS قرار داده شد به شکلی که لبه ی درب ها با PBS در تماس باشند و از تبخیر قطرات آویزان جلوگیری شود. دیش ها به مدت ۴۸ ساعت در شرایط استاندارد قرار داده شدند. بعد از گذشت ۴۸ ساعت، اجسام شبه جنینی تشکیل شده در قطرات آویزان جمع آوری شد و در محیط کشت قبلی و در فلاسک های T25 و در شرایط استاندارد به مدت ۴ روز کشت داده شد. بعد از تریپسینه کردن اجسام شبه جنینی، تعداد ۲×۱۰^{۴} سلول (به ازای هر سانتیمتر مربع) بر روی لامل های پوشش داده شده با پلی – ال – لایزین قرار داده شد و به مدت ۱۰ روز در محیط DMEM/F12 محتوی Streptomycin(100mg/ml), Penicillin (100u/ml), L-glutamine(2mM), 1X B27, 1X N2, SHH (200n/ml), Retinoic acid (2µM), 1x NEAA (Non essential Amino Acid) کشت داده شد. در ادامه محیط کشت قبلی با محیط DMEM/F12 جدید محتوی Streptomycin(100mg/ml), Penicillin (100u/ml), L-glutamine (2mM), 1X B27, 1X N2, Platelet- derived growth factor-AA (PDGαF) (10ng/ml), NT3 (30ng/ml) جایگزین شد و سلول ها به مدت دو هفته در این محیط کشت داده شدند. لازم به ذکر است که در طول دوره تمایز سلولی محیط کشت هر ۴-۳ روز یکبار با محیط جدید جایگزین می شد. بعلاوه تعداد ۲×۱۰^{۴} سلول تحت عنوان گروه کنترل، در محیط DMEM/F12 بدون حضور فاکتورهای تمایز، کشت داده شدند.

روش دوم در تمایز سلولهای بنیادی مشتق از بافت چربی به سلولهای الیگودندروسیتی پیش ساز

در این روش ابتدا سلول های hADSCs به سلول های نورواکتودرمی تمایز داده شدند. به منظور القائ تمایز ، تعداد ۱×۱۰^{۴} سلول به ازای هر سانتیمتر مربع در پلیت های ۱۲ چاهکی محتوی محیط کشت عصبی کامل شده با 10 ng/ml Human epidermal growth factor(H-EGF), 1X N2, Streptomycin(100mg/ml), Penicillin, (100u/ml) در شرایط استاندارد به مدت ۳ روز کشت داده شد. سلول های کشت داده شده ی مرحله قبل با استفاده از آنزیم تریپسین جدا شدند و در پلیت های ۲۴ چاهکی فاقد پوشش به مدت ۱۸ روز و در حضور محیط کشت عصبی با مکمل 2% B27 20 ng/ml Human epidermal growth factor(H-EGF) 20ng/ml

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-18]

[DOI: 10.22102/22.5.93]

Human basic, fibroblast growth factor (hbFGF), کشت داده شدند. بعد از گذشت ۱۸ روز، سلول های بنیادی مرحله قبل با عمل پیپتینگ به صورت تک تک در آمده و به تعداد ۲×۱۰^{۴} (سلول به ازای هر سانتیمتر مربع) بر روی لامل های پوشش داده شده با پلی – ال – لایزین قرار داده شد و به مدت ۱۰ روز در محیط DMEM/F12 محتوی Penicillin (100u/ml), Streptomycin(100mg/ml), L-glutamine(2mM), 1X B27, 1X N2, SHH (200n/ml), Retinoic acid (2µM), 1x NEAA (Non essential Amino Acid) و به مدت دو هفته در حضور محیط قبلی محتوی NT3 (30ng/ml) و Platelet-derived growth factor alpha (PDGFα) (10ng/ml) و بدون حضور SHH و RA کشت داده شدند.

بررسی میزان زنده مانی سلول های تمایز یافته با تکنیک MTT

به منظور بررسی زیست پذیری سلولی، بعد از تخلیه ی محیط کشت سلولهای گروه کنترل و سلول های تمایز یافته به دو روش مختلف، محیط کشت به همراه محلول MTT (5mg/ml)(به نسبت یک به ده) به چاهک ها اضافه گردید و به مدت ۴ ساعت در انکوباتور و در شرایط استاندارد نگهداری شد. بعد از این دوره زمانی، محیط کشت تخلیه و ۴۰۰ میکرولیتر (Dimethyl Sulphoxide) DMSO اضافه شد و عمل پیپت کردن انجام شد. در انتها این محلول به پلیت ۹۶ چاهکی منتقل گردید و توسط دستگاه الایزا جذب نوری آنها مشخص شد.

تکنیک ایمونوسیتوشیمی و بررسی مارکرهای سطحی ویژه سلول های الیگودندروست پیش ساز

در ابتدا سلول های تمایز یافته در هر دو روش با محلول پارافرمالدئید ۴ درصد به مدت ۲۰ دقیقه فیکس شدند. بعد از شستشو با محلول PBS، سلول ها در محلول 0.1 % Triton X100 به مدت یک ساعت نفوذپذیر شدند و در ادامه به مدت ۳۰ دقیقه در محلول بلاکینگ (BSA 1%/PBS.) قرار داده شدند. در ادامه مرحله اینکوبه کردن با آنتی بادی های اولیه شامل Anti-A2B5, Anti-Olig2 به مدت یک شبانه روز در دمای ۳۷ درجه انجام شد. بعد از شستشوی نمونه ها با حلال آنتی بادی اولیه، اینکوبه کردن با آنتی بادی ثانویه متصل به FITC به مدت یک ساعت انجام شد. بعد از شستشوی سلول ها با استفاده از PBS، نهایتا اینکوبه کردن با DAPI به مدت ۲ دقیقه در دمای اتاق انجام شد و بعد از شستشوی نمونه ها با استفاده PBS و مونت کردن، تعداد ۲۰۰ سلول در زیر میکروسکوپ فلورسنت و در چند فیلد مختلف شمارش شد و درصد سلول های بیان کننده مارکرهای A2B5 و Olig2گزارش گردید. لازم به ذکر است که کلیه ی مراحل ایمونوسیتوشیمی سه بار تکرار و میانگین نتایج گزارش شد.

آتالیز آماری داده ها

آتالیز آماری داده ها با استفاده از نرم افزار SPSS و با کمک آزمون Independent- Samples T Test انجام شد و نتایج به صورت Mean± SE گزارش شد و P-Value کمتر از ۰/۰۵ معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته ها

مورفولوژی سلول های بنیادی، اجسام شبه جنینی و سلول های شبه نورواکتودرمی

تصاویر میکروسکوپ فازکنتراست نشان داد که سلول های بنیادی جدا شده از بافت چربی انسانی حدود ۸-۶ ساعت بعد از پاساژ دوم به ته فلاسک اتصال پیدا کردند. این سلول ها در ابتدا ظاهری گرد داشتند اما بعد از گذشت ۴۸ ساعت، این سلول ها ظاهری دوکی شکل شبیه سلول های فیبروبلاست پیدا کردند (شکل ۱- الف). بعد از گذشت ۴۸ ساعت از انجام Hanging drop، سلول های بنیادی تجمع پیدا کرده و توده های سلولی متعددی بنام اجسام شبه جنینی را پدید آوردند (شکل ۱- ب). سلول های بنیادی القائ شده به سلول های شبه نورواکتودرمی در ابتدا دوکی شکل بودند

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-18]

[DOI: 10.22102/22.5.93]

و بلافاصله قبل از تمایز به سلول های الیگودندروسیتی موفولوژی سلول های شبه اپیتلیالی را پیدا کردند (شکل ۱- ج).

مورفولوژی سلول های تمایز یافته

با شروع تمایز سلولی در هر دو روش، در بخش های مختلف جسم سلولی استطاله های سلولی باریک و بلندی پدیدار شد (شکل ۲- الف) و با پایان دوره تمایز سلولی، شبکه ای از سلول ها با استطاله های قطور تر در زیر میکروسکوپ مشاهده گردید. لازم به ذکر است که شبکه های سلولی حاصل از تمایز اجسام شبه جنینی تراکم بیشتری نسبت به گروه دیگر داشت (شکل ۲- ب وج).

تکنیک ایمونوسیتوشیمی و بررسی مارکرهای سطحی سلول

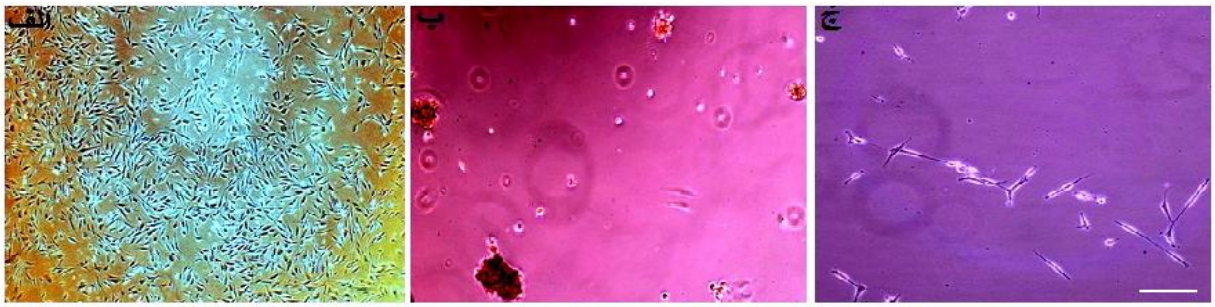
نتایج اینکوباسیون با آنتی بادی های متصل به رنگ فلوئورسنس و مقایسه نتایج نشان داد که حدود ۹۳/۵ درصد از سلول های hADSCs مارکر CD90 و حدود ۹۰ درصد از آنها مارکر CD105 را بیان کردند که در مقایسه با میانگین درصد سلول های بیان کننده مارکرهای CD14 (۳,۵ درصد) و CD45 (۱,۵ درصد) به صورت معنی داری بالاتر بود (P=۰/۰۴۵). (شکل ۳).

مقایسه نتایج قابلیت زیست پذیری سلول های بنیادی و سلول های تمایز یافته

مقایسه میانگین نتایج قابلیت زیست پذیری سلولها نشان داد که میانگین درصد زیست پذیری سلول های تمایز یافته در گروه القائ تمایز اجسام شبه جنینی (۳/۴ ± ۱۴۱) و در گروه القائ تمایز سلول های شبه نورواکتودرمی (۲/۳ ± ۱۲۲/۵) بود که به صورت معنی داری بیشتر از گروه کنترل (۱/۹ ± ۹۹/۵) می باشد (P=۰/۰۴۴) (نمودار ۱).

مقایسه نتایج ایمونوسیتوشیمی و بررسی مارکرهای سطحی سلول های الیگودندروسیت

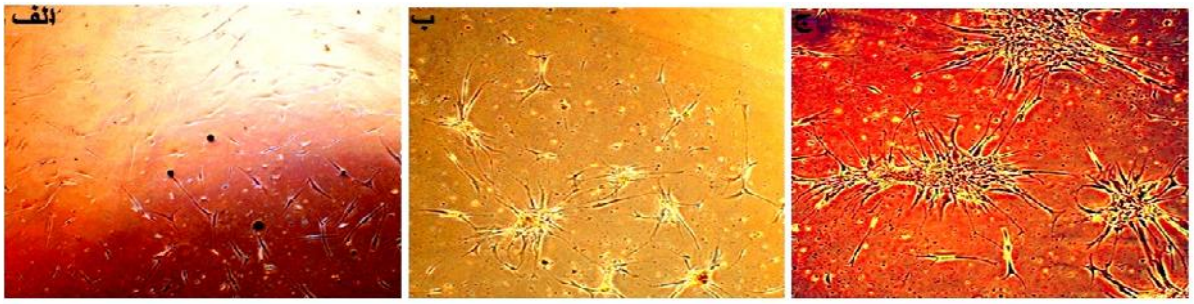
بعد از پایان تمایز سلولی، به منظور بررسی میانگین درصد سلولهای الیگوندروسیت پیش ساز، مارکر های A2B5 و Olig2(شکل ۴ و ۵) با استفاده از روش ایمونوسیتوشیمی مورد بررسی قرار گرفت. مقایسه نتایج نشان داد که میانگین درصد سلول های های A2B5 و Olig2 مثبت تمایز یافته از اجسام شبه جنینی به ترتیب ۱/۹۷ ± ۸۸ و ۱/۹۷۸ ± ۸۳، و در سلول های تمایز یافته از سلول های شبه نورواکتودرمی به ترتیب ۲/۲۳ ± ۶۸ و ۱/۸۸ ± ۶۲ بود که در مقایسه با گروه قبل کاهش معنی داری داشته است (P=۰/۰۳۱)(نمودار ۲).



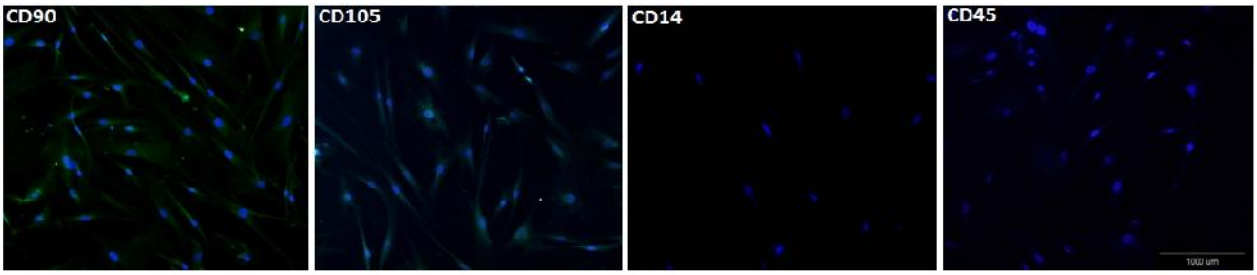
شکل ۱: تصاویر میکروسکوپ فازکنتراست از مورفولوژی سلولی قبل از القائ تمایز الیگودندروسیتی. (الف) سلول های بنیادی بعد از کشت اولیه ظاهری گرد داشتند که با گذشت زمان مورفولوژی سلول های فیبروبلاست را پیدا کردند، (ب) اجسام شبه جنینی بعد از گذشت ۴۸ ساعت از انجام Hanging drop، (ج) سلول های شبه نورواکتودرمی با موفولوژی سلول های شبه اپیتلیالی (Scale bar = 200 µm).

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-18]

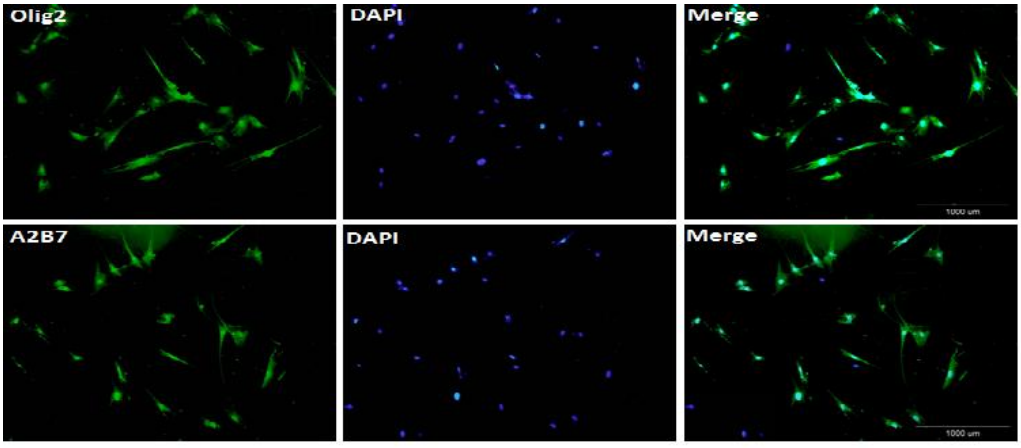
[DOI: 10.22102/22.5.93]



شکل ۲: تصاویر میکروسکوپ فازکنتراست از مورفولوژی سلولی بعد از القائ تمایز. (الف) شروع تمایز سلولی و پدیدار شدن استطاله های سلولی باریک و بلند در بخش های مختلف جسم سلولی، (ب) مورفولوژی سلول های تمایز یافته در ابتدای دوره تمایز سلولی (بزرگنمایی × ۴۰)، (ج) مورفولوژی سلول های تمایز یافته در پایان دوره تمایز سلولی (بزرگنمایی × ۱۰۰).



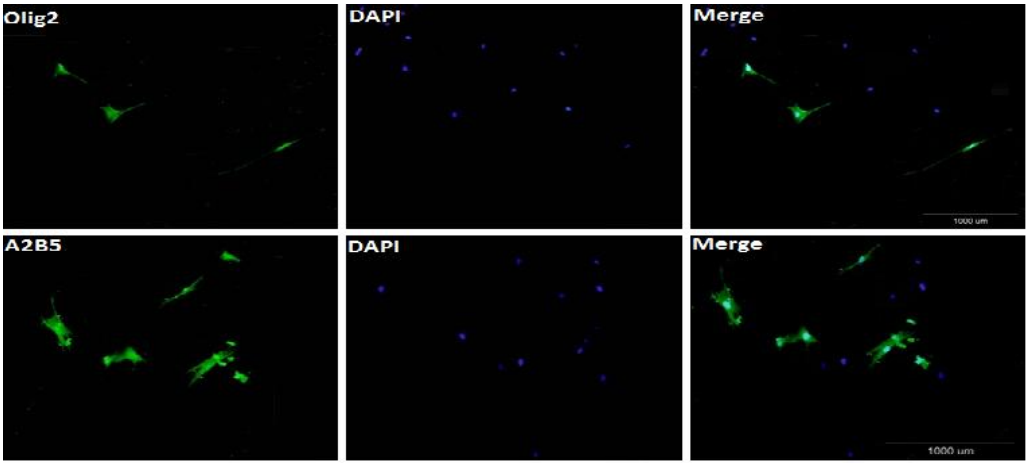
شکل ۳: تصاویر میکروسکوپ فلوئورسنس از سلول های بنیادی. بیان مارکرهای CD90 و CD105 و عدم بیان مارکرهای CD14 و CD45 بعد از پاساژ ۳ (مقیاس ۱۰۰۰میکرومتر).



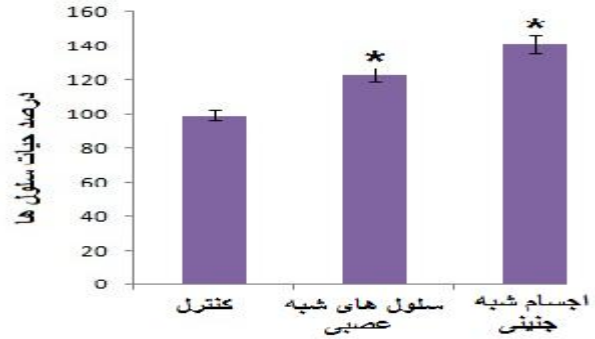
شکل ۴: ایمونوسیتوشیمی سلول های الیگودندروسیتی پیش ساز تمایز یافته از اجسام شبه جنینی. بیان نشانگرهای Olig2 و A2B5 در پایان تمایز (مقیاس ۱۰۰۰میکرومتر).

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-18]

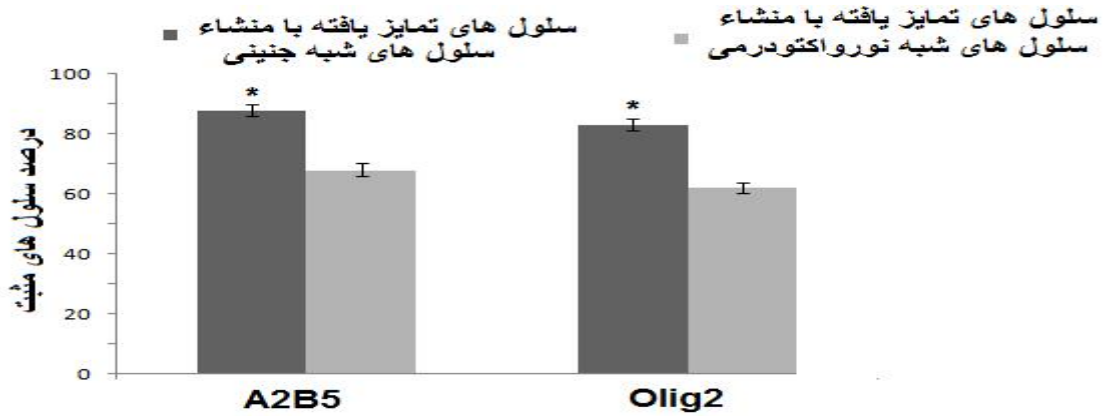
[DOI: 10.22102/22.5.93]



شکل ۵: ایمونوسیتوشیمی سلول های الیگودندروسیتی پیش ساز تمایز یافته از سلول های بنیادی شبه نورواکتودرمی. بیان نشانگرهای Olig2 و A2B5 در پایان تمایز (مقیاس ۱۰۰۰میکرومتر).



نمودار ۱: مقایسه ی میانگین درصد قابلیت زیست پذیری سلولها در گروه کنترل (سلول های بنیادی)، گروه تمایز یافته با اجسام شبه جنینی و گروه تمایز یافته با سلول های شبه نورواکتودرمی. میانگین درصد قابلیت زیست پذیری در گروه های تمایز یافته نسبت به گروه کنترل به شکل معنی داری بالاتر بود (*P= ۰,۰۴۴).



نمودار ۲: مقایسه ی میانگین درصد سلول های بیان کننده مارکرهای الیگودندروسیتی تمایز یافته از اجسام شبه جنینی و سلول های شبه نورواکتودرمی.
میانگین درصد سلول های مارکرهای مثبت در گروه سلولهای تمایز یافته از اجسام شبه جنینی نسبت به گروه دیگر به شکل معنی داری بالاتر بود (P=۰,۰۳۱ *).

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-18]

[DOI: 10.22102/22.5.93]

بحث

در ایـن مطالعـه، بـا اسـتفاده از روش ایمونوسیتوشـیمی و بـا کمک میکروسـکوپ اینـورت، بنیـادی بـودن سـلول هـای جداسازی شده از بافت چربی اثبات شد. نتایج حاصله نشـان داد کـه درصـد بـالایی از سـلول هـای جداسـازی شـده، مارکرهای ویژه سـلول هـای بنیـادی بافـت چربـی و درصـد پایینی از آنها مارکرهای سلول های بنیـادی خونسـاز را بیـان کردند. بعلاوه با انجام کشـت سـلولی تغییـرات مورفولـوژی قابل توجهی در این سلول هـا مشـاهده گردیـد. سـلول هـای جداسازی شده ابتدا ظاهری گرد داشتند اما با گذشت زمان مورفولوژی آنها تغییر کرد و ظاهری دوکـی شـکل، شـبیه سلول های فیبروبلاست پیدا کردند که خود می تواند موید بنیادی بودن این سلول هـا باشـد. در ایـن مطالعـه یافتـه هـای بدست آمـده از بررسـی مارکرهـای سـطحی و مورفولـوژی سلولی با نتایج قاسمی (۳) و رضـوی (۱۱) مطابقـت دارد. بـا اضافه کـردن فـاکتور هـای رشـد جهـت تمـایز سـلول هـای بنیادی، تغییرات مورفولوژی قابل توجهی مشاهده گردید. در هر دو روش تمایز سلولی و در مرحلـه نخسـت تمـایز، ابتـدا استطاله های سلولی باریک و بلندی در بخش هـای مختلـف جسم سلولی پدیدار شد. در ادامه، این استطاله هـا قطـور تـر شده و در پایان دوره تمایز، شبکه ای از سـلول هـای تمـایز یافته با استطاله های در هم پیچیده مشاهده گردید.

مقایسه نتایج زیست پذیری سلولها قبل و بعد از تمایز سلولی نشان داد که میزان زنده مانی سلول های تمایز یافته نسبت بـه سلول هـای hADSCs بیشـتر مـی باشـد. در توجیـه ایـن تفاوت می توان گفت که حضور بعضی از فاکتورهای رشـد موجود در محیط تمایزی سلول ها (مثل فـاکتور FGF) مـی تواند منجر به افزایش بقای سلول ها شود. لازم به ذکر اسـت کـه در مطالعـات رضـوی و همکـاران توانـایی سـلول هـای hADSCs در سـنتز فاکتورهـای نوروتروفیـک بـه اثبـات رسیده است (۱۲ و ۱۱). در نتیجه اضـافه کـردن فاکتورهـای رشد تمایزی به همراه سایر عوامل سنتز شـده از سـلول هـای hADSCs، می توانـد دلیلـی بـر افـزایش بقـای سـلولی در دوره تمایز باشد.

اخیرا پتانسیل تمایزی بالای سلول های hADSCs به سلول های شـبه عصـبی توسـط اسـفندیاری و همکـاران بـه اثبـات رسیده است(۱۳). بعلاوه در مطالعات قبلی پیونـد موفقیـت آمیز سلول های hADSCs جهت بهبود ویژگـی هـای فـرا ساختار میلین در مدل حیـوانی MS بـه انجـام رسـیده اسـت (۳و ۲). نتایج حاصله از این مطالعـات نشـان داد کـه درصـد سلول های الیگودندروسـیت تمـایز یافتـه از hADSCs در محیط درونی بـدن پـایین مـی باشـد. بعـلاوه عوارضـی مثـل تومورزایی که به دنبال تکثیر پیشرونده سلول های بنیادی رخ می دهد را نمـی تـوان نادیـده گرفـت (۱۴). لـذا بـه منظـور کاهش تومورزایی و افـزایش سـلول هـای میلـین سـاز بـالغ، پیوند سلول های پیش ساز بجـای سـلول هـای بنیـادی یـک ضرورت است. به منظور بهبود نتایج پیوند سلولی، شناسـایی و اثبات سلول های پیش ساز الیگودندروسیتی بـا اسـتفاده از مارکرهای ویژه سطحی قبل از پیوند سلولی ضروری است.از جمله آنتی ژن هـای سـطحی مـورد اسـتفاده بـرای شناسـایی سلول های پیش ساز الیگودندروسیتی می توان بـه Olig2 و A2B5 اشاره کرد. Olig2 نوعی فاکتور رونویسـی اسـت که منحصرا در CNS و توسـط ژن Olig2 کـد مـی شـود. این فاکتور معمـولا بـرای شناسـایی نـورون هـای حرکتـی و سلول های الیگودندروسیتی پیش ساز مورد استفاده قرار مـی گیرد (۱۵). A2B5 نوعی گانگلیوزید بیان شـده در سـطح سلول می باشد که توسط سلول های اپیتلیال تیموس، سـلول های الیگودندروسیتی پیش ساز بیان می شود (۱۶).

همانطوری که در تصاویر ایمونوسیتوشیمی (تصـاویر ۴ و ۵) دیده می شود، در پایان تمایز سلولی تعداد سـلول هـای بیـان کننـده فاکتورهـای الیگودندروسـیتی پـیش سـاز (Olig2 و A2B5) در گروهی که از سـلول هـای اجسـام شـبه جنینـی استفاده شده بود نسبت به گروه دیگـر بـالاتر مـی باشـد. در توجیه این مسئله می توان گفت که احتمالا با شـروع تمـایز، سلول های hADSC موجود در اجسام شـبه جنینـی طیـف

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-18]

[DOI: 10.22102/22.5.93]

وسیعی از فاکتور نوروتروفیکی را سنتز کرده اند و از آنجایی که کل دوره تمایز سلولی در این روش کوتاهتر از روش دیگر است، این فاکتورها فرصت کافی برای اثر بر مکانیسم های درون و برون سلولی درگیر در بیان ژن های مسئول در تمایز سلولی را داشته اند. بعلاوه با توجه به نیمه عمر کوتاه فاکتورهای نوروتروفیکی (۱۸و۱۷)، انتظار می رود که هر چه دوره ی تمایز سلولی کوتاهتر باشد نتایج تمایز سلولی به دلیل کفایت عمل فاکتورهای نوروتروفیکی بهتر باشد. تصاویر میکروسکوپ فاز کنتراست هم در تایید این نتایج نشان داد که سلول های تمایز یافته با منشاء اجسام شبه جنینی، شبکه های سلولی گسترده ای را پدید آورده اند. این شبکه های سلولی در گروه تمایز یافته از سلول های شبه نورواکتودرمی از گستردگی کمتری برخوردار می باشد. در توجیه آن می توان گفت که احتمالا تشکیل و گسترش این شبکه های سلولی هم مشروط بر حضور فاکتورهای نوروتروفیکی موجود در محیط اطراف سلول ها می باشد. این عوامل با افزایش بقاء سلولی زمینه لازم برای تکثیر و تمایز بهتر سلولی را فراهم می کنند.

در مجموع می توان گفت که به دلیل توانایی بالای سلول های hADSC در سنتز فاکتورهای نوروتروفیکی، این سلول ها می توانند منبع بسیار مناسبی برای تمایز به سلول های پیش ساز الیگودندروسیتی باشند. بعلاوه با توجه به نیمه عمر پایین فاکتورهای نوروتروفیکی و به منظور افزایش کارایی این عوامل بر تمایز سلولی و دستیابی به مجموعه ای همگن از سلول های پیش ساز الیگودندروسیتی، پیشنهاد می شود که قبل از شروع تمایز سلولی، اجسام شبه جنینی مشتق از hADSC تهیه شود و سلول های حاصله در یک دوره زمانی محدود در محیط تمایزی ویژه الیگودندروسیتی کشت داده شوند.

نتیجه گیری

با توجه به کوتاه بودن مدت تمایز سلولی در روش Hanging droop و دستیابی به جمعیت بالایی از سلول های الیگودندروسیت پیش ساز، استفاده از اجسام شبه جنینی می تواند روشی سریع، کارامد و مقرون به صرفه در تمایز hADSC به سلول های الیگودندروسیتی پیش ساز باشد.

تشکر و قدردانی

مقاله حاضر، حاصل طرح پژوهشی شماره ۱۹۴۲۶۷ مصوب معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی اصفهان و با کد اخلاق IR.MUI.REC.1394.1.267 می باشد که نویسنده بدینوسیله از مسئولین محترم تشکر می نماید.

References

1.Khan F, Turner-Stokes L, Ng L, Kilpatrick T. Multidisciplinary rehabilitation for adults with multiple sclerosis. Cochrane Database Syst Rev 2007; 18;CD006036.
2.Ghasemi N, Razavi S, Nikzad E. Multiple Sclerosis: Pathogenesis, Symptoms, Diagnoses and Cell-Based Therapy. Cell J 2017; 19: 1-10.
3.Ghasemi N, Razavi S, Salehi H. Improvement of myelin ultra structure after transplantation of human adipose tissue-derived stem cell in rat model of MS. Journal of Isfahan Medical School 2016; 33: 366. [In Persian]
4.Rizvi SA, Agius M.A. Current approved options for treating patients with multiple sclerosis. Neurology 2004; 63: 8-14.
5.Ben-HurT, Goldman SA. Prospects of cell therapy for disorders of myelin. Ann N Y Acad Sci 2008; 1142:218-49.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-18]

[DOI: 10.22102/22.5.93]

6.Ghasemi N, Razavi S, Mardani M, Esfandiari E, Salehi H, Esfahani SH. Transplantation of human adipose-derived stem cells enhances remyelination in lysolecithin-induced focal demyelination of rat spinal cord. Mol Biotech 2014; 56: 470-8.
7.Fraser JK, Wulur I, Alfonso Z, Hedrick MH. Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. Trends Biotech 2006; 24: 150-4.
8.Erdö F, Bührle C, Blunk J, et al. Host-dependent tumorigenesis of embryonic stem cell transplantation in experimental stroke. J Cereb Blood Flow Metab 2003; 23: 780-5.
9.Leite C, Silva NT, Mendes S, Ribeiro A, de Faria JP, Lourenço T, et al. Differentiation of human umbilical cord matrix mesenchymal stem cells into neural-like progenitor cells and maturation into an oligodendroglial-like lineage. PloS one 2014;9: e111059.
10.Xu YT, Li F, Liu T, You HB, Fang Z. Directional differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into oligodendrocytes induced by the combination of various neurotrophic factors. Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research 2009;13: 2793-6.
11.Razavi S, Razavi MR, ZarkeshEsfahani H, Kazemi M, Mostafavi FS. Comparing brain-derived neurotrophic factor and ciliaryneurotrophic factor secretion of induced neurotrophic factor secreting cells from human adipose and bone marrow-derived stem cells. Dev Growth Differ 2013; 55: 648-55.
12.Razavi S, Razavi MR, Kheirollahi-Kouhestani M, Mardani M, Mostafavi FS. Co-culture with neurotrophic factor secreting cells induced from adipose-derived stem cells: Promotes neurogenic differentiation. Biochem Biophys Res Commun 2013; 440: 381-7.
13.Esfandiari B, Soliemani M, Kaviani S, Parivar K. Differentiation of Adipose Derived Stem Cells to Neuron Like Cells on Aligned Nanofibrous Scaffold. ZUMS J 2017; 25: 81-95.
14.Amariglio N, Hirshberg A, Scheithauer BW, et al. Donor-derived brain tumor following neural stem cell transplantation in an ataxia telangiectasia patient. PLoS Med 2009; 6: e1000029.
15.Chen LP, Li ZF, Ping M, et al. Regulation of Olig2 during astroglial differentiation in the subventricular zone of a cuprizone-induced demyelination mouse model. Neuroscience 2012; 221: 96-107.
16.Baracskay KL, Kidd GJ, Miller RH, Trapp BD. NG2-positive cells generate A2B5-positive oligodendrocyte precursor cells. Glia 2007; 55: 1001-10.
17.Razavi S, Nazem G, Mardani M, Esfandiari E, Salehi H, Esfahani SH. Neurotrophic factors and their effects in the treatment of multiple sclerosis. Advanc Biomed Res 2015 17;4:53.
18.Thorne RG, Frey II WH. Delivery of neurotrophic factors to the central nervous system. Clin Pharmacokinet 2001; 40: 907-46.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-18]

[DOI: 10.22102/22.5.93]