

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

Ghasemi N., PhD<sup>1</sup>

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

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

ناظم قاسمی<sup>۱</sup>

۱. استادیار، گروه آناتومی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران (مؤلف مسؤل)، 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، کارآمد 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 مارکرهای Olig2 و A2B5 با 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 ( $P=0/031$ ). 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 گروهها افزایش یافته است ( $P=0/044$ ).

**نتیجه گیری:** تمایز سلول های hADSCs به سلول های الیگودندروسیتی پیش ساز با استفاده از اجسام شبه جنینی روشی سریع، کارآمد 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

## مقدمه

بیماری اسکروز 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 و ۲). مصرف داروهای مهارکننده 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 فاکتورهای 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 آنجایی 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 آل 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. کریستالیا 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 آمده 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، کارآمد 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 (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>) تا پاساژ پنجم کشت داده شد.

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  $2 \times 10^4$  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 (PDG F) (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 ۳-۴ روز یکبار با محیط جدید جایگزین می شد. بعلاوه تعداد  $2 \times 10^4$  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 نوروکتودرمی تمایز داده شدند. به منظور القای تمایز، تعداد  $1 \times 10^4$  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 20 ng/ml Human 2% B27 epidermal growth factor(H-EGF) 20ng/ml

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

بدین منظور از تعداد  $1 \times 10^5$  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

(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، نهایتاً اینکوبه کردن با DAPI به مدت ۲ دقیقه در دمای اتاق انجام شد و بعد از شستشوی نمونه ها با استفاده از 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 Olig2 گزارش گردید. لازم به ذکر است که کلیه 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  $\text{Mean} \pm \text{SE}$  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 فاز کنتراست 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 فیروبلست 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 القای شده به سلول های شبه نورواکتودرمی در ابتدا دوکی شکل بودند

Human basic, fibroblast growth factor (hbFGF)، بعد از گذشت ۱۸ روز، سلول های بنیادی مرحله قبل با عمل پیپتینگ به صورت تک تک در آمده و به تعداد  $2 \times 10^4$  (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 (2 $\mu$ M), 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 RA (10ng/ml) (PDGF) و بدون حضور SHH 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 الیزا 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

مقایسه میانگین نتایج قابلیت زیست پذیری سلولها نشان داد که میانگین درصد زیست پذیری سلول های تمایز یافته در گروه القای تمایز اجسام شبه جنینی ( $141 \pm 3/4$ ) و در گروه القای تمایز سلول های شبه نورواکتودرمی ( $2/3 \pm 122/5$ ) بود که به صورت معنی داری بیشتر از گروه کنترل ( $1/9 \pm 99/5$ ) می باشد ( $P=0/044$ ) (نمودار ۱).

مقایسه نتایج ایمونوسیتوشیمی و بررسی مارکرهای سطحی سلول های الیگودندروسیت

بعد از پایان تمایز سلولی، به منظور بررسی میانگین درصد سلولهای الیگودندروسیت پیش ساز، مارکرهای 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  $88 \pm 1/97$  و  $83 \pm 1/97$  و در سلول های تمایز یافته از سلول های شبه نورواکتودرمی به ترتیب  $68 \pm 2/23$  و  $62 \pm 1/88$  بود که در مقایسه با گروه قبل کاهش معنی داری داشته است ( $P=0/031$ ) (نمودار ۲).

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

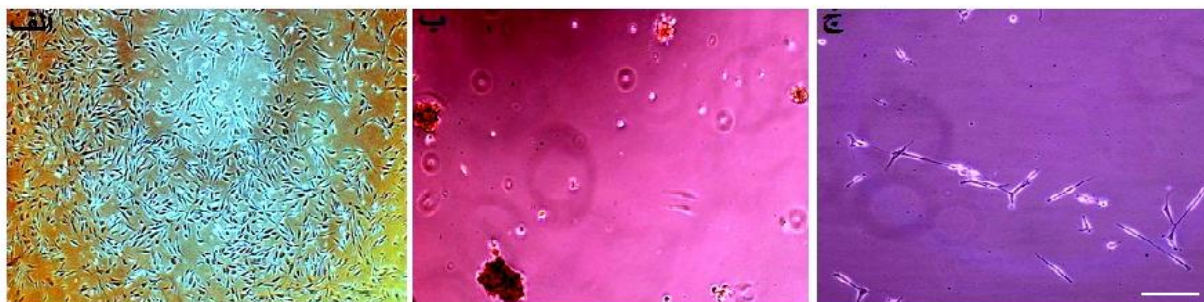
مورفولوژی سلول های تمایز یافته

با شروع تمایز سلولی در هر دو روش، در بخش های مختلف جسم سلولی استتاله های سلولی باریک و بلندی پدیدار شد (شکل ۲-الف) و با پایان دوره تمایز سلولی، شبکه ای از سلول ها با استتاله 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 و ج).

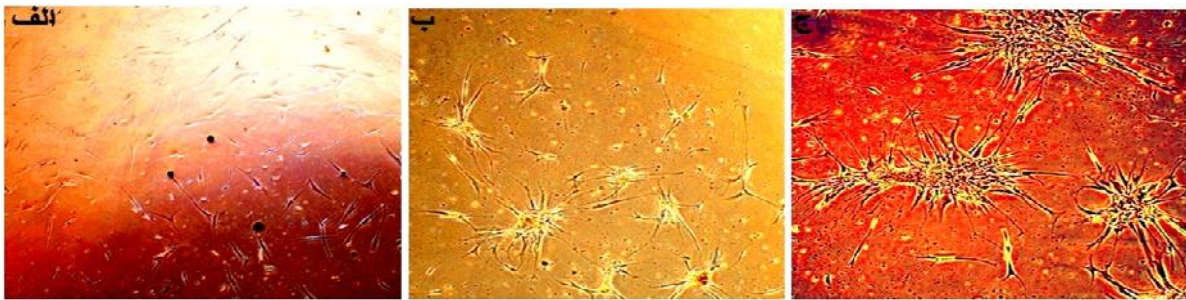
تکنیک ایمونوسیتوشیمی و بررسی مارکرهای سطحی سلول

نتایج اینکوباسیون با آنتی بادی های متصل به رنگ فلئورسنتس و مقایسه نتایج نشان داد که حدود  $93/5$  درصد از سلول های hADSCs مارکر CD90 و حدود  $90$  درصد از آنها مارکر CD105 را بیان کردند که در مقایسه با میانگین درصد سلول های بیان کننده مارکرهای CD14 ( $3,5$  درصد) و CD45 ( $1,5$  درصد) به صورت معنی داری بالاتر بود ( $P=0/045$ ). (شکل ۳).

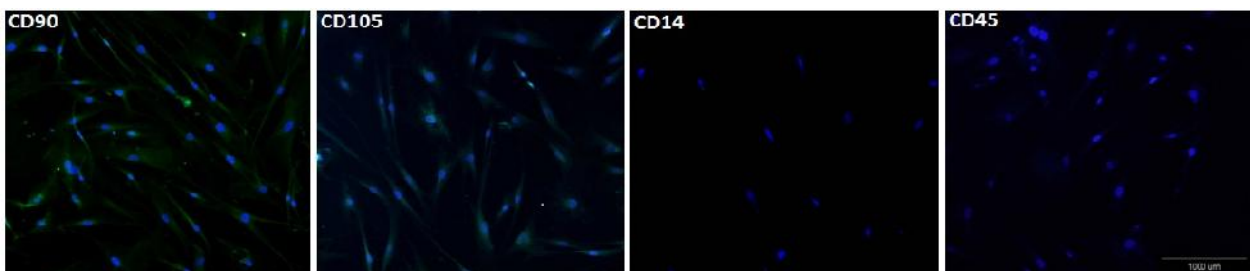
مقایسه نتایج قابلیت زیست پذیری سلول های بنیادی و سلول های تمایز یافته



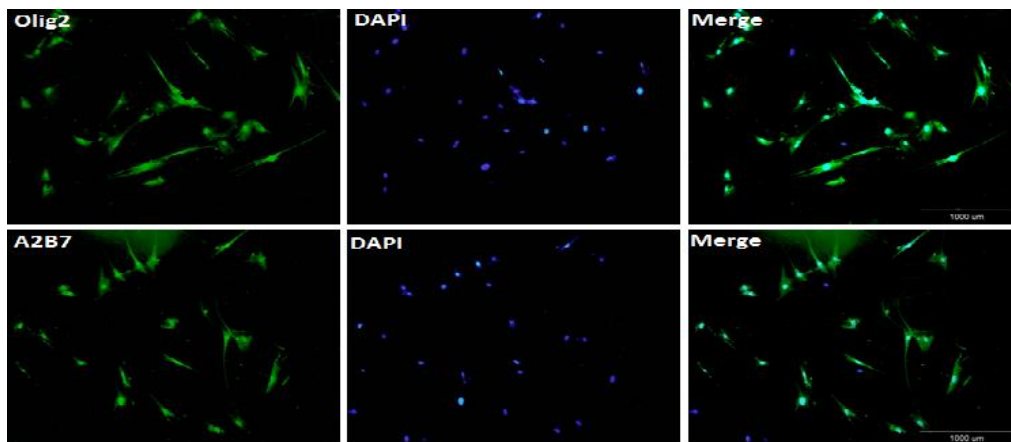
شکل ۱: تصاویر میکروسکوپ فاز کتراست از مورفولوژی سلولی قبل از القای تمایز الیگودندروسیتی. (الف) سلول های بنیادی بعد از کشت اولیه ظاهری گرد داشتند که با گذشت زمان مورفولوژی سلول های فیروبلاست را پیدا کردند، (ب) اجسام شبه جنینی بعد از گذشت ۴۸ ساعت از انجام Hanging drop، (ج) سلول های شبه نورواکتودرمی با مورفولوژی سلول های شبه اپیتلیالی (Scale bar = 200  $\mu$ m).



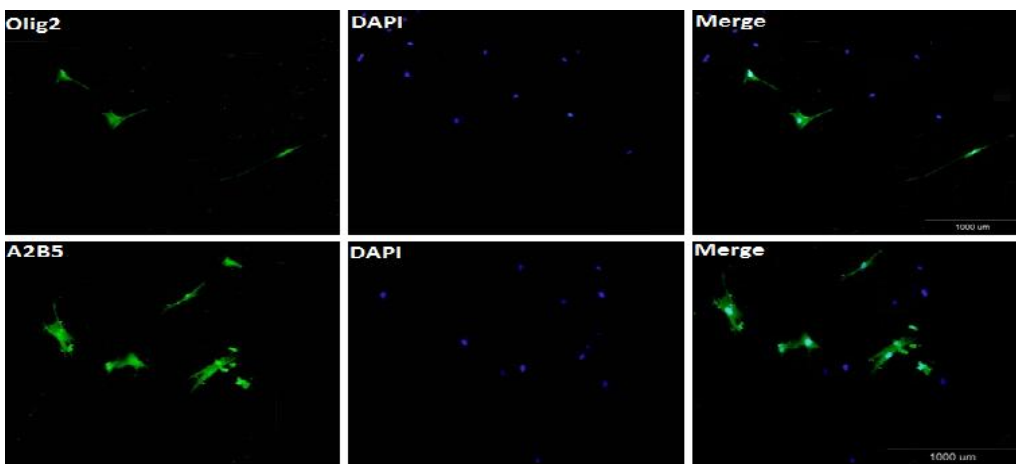
شکل ۲: تصاویر میکروسکوپ فاز کنتراست از مورفولوژی سلولی بعد از القای تمایز. (الف) شروع تمایز سلولی و پدیدار شدن استپاله های سلولی باریک و بلند در بخش های مختلف جسم سلولی، (ب) مورفولوژی سلول های تمایز یافته در ابتدای دوره تمایز سلولی (بزرگنمایی  $\times 40$ )، (ج) مورفولوژی سلول های تمایز یافته در پایان دوره تمایز سلولی (بزرگنمایی  $\times 100$ ).



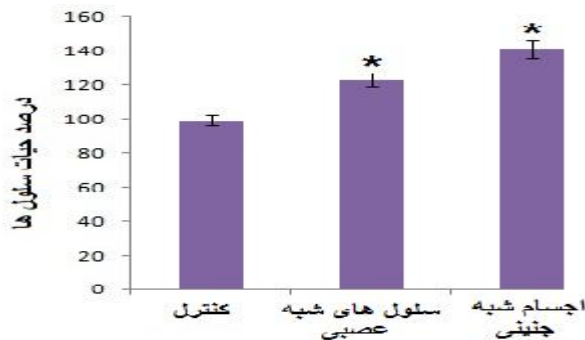
شکل ۳: تصاویر میکروسکوپ فلورسینس از سلول های بنیادی. بیان مارکرهای CD90 و CD105 و عدم بیان مارکرهای CD14 و CD45 بعد از پاساژ ۳ (مقیاس  $1000$  میکرومتر).



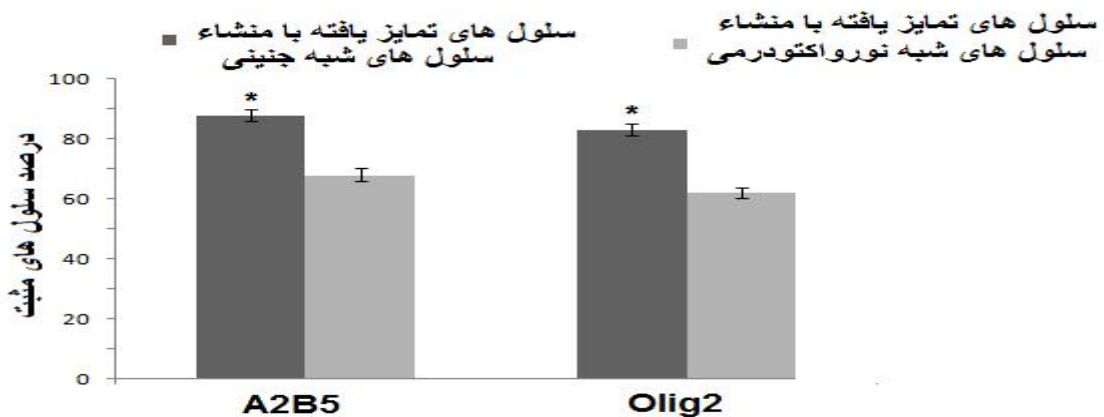
شکل ۴: ایمونوسیتوشیمی سلول های الیگودندروسیتی پیش ساز تمایز یافته از اجسام شبه جنینی. بیان نشانگرهای Olig2 و A2B7 در پایان تمایز (مقیاس  $1000$  میکرومتر).



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



نمودار ۱: مقایسه‌ی میانگین درصد قابلیت زیست‌پذیری سلول‌ها در گروه کنترل (سلول‌های بنیادی)، گروه تمایز یافته با اجسام شبه جنینی و گروه تمایز یافته با سلول‌های شبه نورواکتودرمی. میانگین درصد قابلیت زیست‌پذیری در گروه‌های تمایز یافته نسبت به گروه کنترل به شکل معنی‌داری بالاتر بود ( $P=0.044$ ).



نمودار ۲: مقایسه‌ی میانگین درصد سلول‌های بیان‌کننده مارکرهای الیگودندروسیتی تمایز یافته از اجسام شبه جنینی و سلول‌های شبه نورواکتودرمی. میانگین درصد سلول‌های مارکرهای مثبت در گروه سلول‌های تمایز یافته از اجسام شبه جنینی نسبت به گروه دیگر به شکل معنی‌داری بالاتر بود ( $P=0.031$ ).

## بحث

در این مطالعه، با استفاده از روش ایمونوسیتوشیمی و با کمک میکروسکوپ اینورت، بنیادی بودن سلول های جداسازی شده از بافت چربی اثبات شد. نتایج حاصله نشان داد که درصد بالایی از سلول های جداسازی شده، مارکرهای ویژه سلول های بنیادی بافت چربی و درصد پایینی از آنها مارکرهای سلول های بنیادی خونساز را بیان کردند. بعلاوه با انجام کشت سلولی تغییرات مورفولوژی قابل توجهی در این سلول ها مشاهده گردید. سلول های جداسازی شده ابتدا ظاهری گرد داشتند اما با گذشت زمان مورفولوژی آنها تغییر کرد و ظاهری دوکی شکل، شبیه سلول های فیروبلست پیدا کردند که خود می تواند موید بنیادی بودن این سلول ها باشد. در این مطالعه یافته های بدست آمده از بررسی مارکرهای سطحی و مورفولوژی سلولی با نتایج قاسمی (۳) و رضوی (۱۱) مطابقت دارد. با اضافه کردن فاکتور های رشد جهت تمایز سلول های بنیادی، تغییرات مورفولوژی قابل توجهی مشاهده گردید. در هر دو روش تمایز سلولی و در مرحله نخست تمایز، ابتدا استتاله های سلولی باریک و بلندی در بخش های مختلف جسم سلولی پدیدار شد. در ادامه، این استتاله ها قطور تر شده و در پایان دوره تمایز، شبکه ای از سلول های تمایز یافته با استتاله های در هم پیچیده مشاهده گردید.

مقایسه نتایج زیست پذیری سلولها قبل و بعد از تمایز سلولی نشان داد که میزان زنده ماندن سلول های تمایز یافته نسبت به سلول های hADSCs بیشتر می باشد. در توجیه این تفاوت می توان گفت که حضور بعضی از فاکتورهای رشد موجود در محیط تمایزی سلول ها (مثل فاکتور FGF) می تواند منجر به افزایش بقای سلول ها شود. لازم به ذکر است که در مطالعات رضوی و همکاران توانایی سلول های hADSCs در سنتز فاکتورهای نوروتروفیک به اثبات رسیده است (۱۲ و ۱۱). در نتیجه اضافه کردن فاکتورهای رشد تمایزی به همراه سایر عوامل سنتز شده از سلول های

hADSCs، می تواند دلیلی بر افزایش بقای سلولی در دوره تمایز باشد.

اخیرا پتانسیل تمایزی بالای سلول های hADSCs به سلول های شبه عصبی توسط اسفندیاری و همکاران به اثبات رسیده است (۱۳). بعلاوه در مطالعات قبلی پیوند موفقیت آمیز سلول های hADSCs جهت بهبود ویژگی های فرا ساختار میلین در مدل حیوانی MS به انجام رسیده است (۳ و ۲). نتایج حاصله از این مطالعات نشان داد که درصد سلول های الیگودندروسیت تمایز یافته از hADSCs در محیط درونی بدن پایین می باشد. بعلاوه عوارضی مثل تومورزایی که به دنبال تکثیر پیشرونده سلول های بنیادی رخ می دهد را نمی توان نادیده گرفت (۱۴). لذا به منظور کاهش تومورزایی و افزایش سلول های میلین ساز بالغ، پیوند سلول های پیش ساز بجای سلول های بنیادی یک ضرورت است. به منظور بهبود نتایج پیوند سلولی، شناسایی و اثبات سلول های پیش ساز الیگودندروسیتی با استفاده از مارکرهای ویژه سطحی قبل از پیوند سلولی ضروری است. از جمله آنتی ژن های سطحی مورد استفاده برای شناسایی سلول های پیش ساز الیگودندروسیتی می توان به Olig2 و A2B5 اشاره کرد. Olig2 نوعی فاکتور رونویسی است که منحصرا در CNS و توسط ژن Olig2 کد می شود. این فاکتور معمولا برای شناسایی نورون های حرکتی و سلول های الیگودندروسیتی پیش ساز مورد استفاده قرار می گیرد (۱۵). A2B5 نوعی گانگلیوزید بیان شده در سطح سلول می باشد که توسط سلول های اپیتلیال تیموس، سلول های الیگودندروسیتی پیش ساز بیان می شود (۱۶).

همانطوری که در تصاویر ایمونوسیتوشیمی (تصاویر ۴ و ۵) دیده می شود، در پایان تمایز سلولی تعداد سلول های بیان کننده فاکتورهای الیگودندروسیتی پیش ساز (Olig2 و A2B5) در گروهی که از سلول های اجسام شبه جنینی استفاده شده بود نسبت به گروه دیگر بالاتر می باشد. در توجیه این مسئله می توان گفت که احتمالا با شروع تمایز، سلول های hADSC موجود در اجسام شبه جنینی طیف

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، کارآمد 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.

وسیعیی 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 در گیر در بیان ژن های مسئول در تمایز سلولی را داشته اند. بعلاوه با توجه به نیمه عمر کوتاه فاکتورهای نوروتروفیکی (۱۷ و ۱۸)، 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 احتمالاً 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

### 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.

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 ciliary neurotrophic 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.