

Transdifferentiation of Adipose Derived Stem Cells into Neural Stem/Progenitor Cells by Neurosphere Cultivation Assay

Elahe Barfi¹, Taghi Tirrahi^{2*}, Shahram Darabi³

¹ Department of Anatomical Sciences, School of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

² Shefa Neuroscience Research Center, Khatam-al-Anbia Hospital, Tehran, Iran.

³ Qazvin University of Medical Science, School of Medicine, Qazvin, Iran.

Article Info:

Received: 18 Jan, 2014

Accepted: 6 Feb, 2014

ABSTRACT

Introduction: Adipose derived stem cells (ADSCs) have the potency to differentiate into the neuron and glial cells. One of the ways to make a large number of neural stem/progenitor cells (NS/PCs) from ADSCs is the usage of neurosphere cultivation. In this procedure, ADSCs proliferate under certain conditions continuously and make multipotent undifferentiated colonies named neurosphere that can differentiate to NS/PCs. **Materials and Methods:** In the current study, adipose stem cells isolated from rat inguinal and pararenal regions. Then these cells differentiated to the NS/PCs using indirect differentiation method (neurosphere culture). Adipose derived stem cells, neurosphere and NS/PCs were evaluated using immunocytochemistry and RT-PCR techniques. **Results:** The results indicated ADSCs were immunoreactive to CD90, CD29, CD49d, CD44, CD105 and CD99 without any immunoreactivity for CD106 and CD31. In addition, these cells expressed the genes of Nanog, Oct4 and Sox2. Both of Neurosphere and NS/PCs were immunoreactive to Nestin, NF-68 and NF-200 and also were able to express Nanog, Sox2, NeuroD1, Oct4, Musashi1 and Nestin genes. However, these cells were unable to express MBP gene. **Conclusion:** It seems that indirect differentiation is effective for differentiate ADSCs into NS/PCs.

Key words:

1. Adipose Tissue
2. Neurons
3. Neural Stem Cells
4. Neuroglia

* **Corresponding Author:** Taghi Tirrahi

E-mail: takialtr@modares.ac.ir

تمایز سلول های بنیادی مشتق از بافت چربی به سلول های بنیادی /پیش ساز عصبی با استفاده از روش کشت نوروسفر

الهه برفی^۱، تقی طریحی^{۲*}، شهرام دارابی^۳

^۱ گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

^۲ مرکز تحقیقات علوم اعصاب شفا، بیمارستان خاتم الانبیا، تهران، ایران.

^۳ دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران.

اطلاعات مقاله:

تاریخ پذیرش: ۱۷ بهمن ۱۳۹۲

تاریخ دریافت: ۲۸ دی ۱۳۹۲

چکیده

مقدمه: سلول های بنیادی مشتق از بافت چربی قادرند به سلول های عصبی و گلیالی تمایز یابند. یکی از روش هایی که به واسطه آن می توان تعداد قابل توجهی سلول بنیادی/پیش ساز عصبی از تمایز سلول های بنیادی مشتق از بافت چربی به دست آورد روش کشت نوروسفر می باشد. در این فرایند سلول های بنیادی مشتق از بافت چربی تحت شرایط مناسب تکثیر یافته و تجمعات سلولی تمایز نیافته چند توانی به نام نوروسفر را ایجاد می کنند که قادرند به سلول های بنیادی/پیش ساز عصبی تبدیل شوند. **مواد و روش ها:** در این تحقیق سلول های بنیادی از بافت چربی ناحیه ی کشاله ران و پشت کلیه ی موش صحرایی جدا و پس از کشت با استفاده از روش تمایزی غیر مستقیم (کشت نوروسفر) به سلول های بنیادی/پیش ساز عصبی تمایز داده شدند. سلول های بنیادی مشتق از بافت چربی، نوروسفر و سلول های بنیادی/پیش ساز عصبی با روش ایمونوسیتوشیمی و RT-PCR ارزیابی شدند. **یافته ها:** سلول های بنیادی مشتق از بافت چربی نشان گرهای CD90، CD29، CD44، CD105 و CD99 را بیان کردند اما قادر به بیان نشان گرهای CD106 و CD31 نبودند. به علاوه ژن های Nanog، Sox2 و Oct4 در این سلول ها بیان شد. نوروسفر و سلول های بنیادی/پیش ساز عصبی نشان گرهای Nestin و Musashi1، Oct4، NeuroD1، Sox2، Nanog و NF-200 و NF-68، Nestin کردند. ژن MBP در این سلول ها بیان نشد. **نتیجه گیری:** به نظر می رسد روش تمایز غیر مستقیم جهت تمایز سلول های بنیادی مشتق از بافت چربی به سلول های بنیادی/پیش ساز عصبی مؤثر باشد.

کلید واژه ها:

۱. بافت چربی
۲. نورون
۳. سلول های بنیادی عصبی
۴. نوروگلیا

* نویسنده مسئول: تقی طریحی

آدرس الکترونیکی: takialtr@modares.ac.ir

مقدمه

سلول های بنیادی قادر به خود تکثیری (Self-renewal) بوده و در شرایط مناسب می توانند به انواع سلول های بالغ تمایز یابند (۳-۱). بر اساس منشأ و ظرفیت تمایزی، دو نوع سلول بنیادی رویانی (Embryonic) و بالغ (Somatic) تشخیص داده شده است (۴). سلول های بنیادی مشتق از بافت چربی سلول های بنیادی بالغ هستند که از بافت چربی منشأ گرفته و قادرند به رده های مزانشیمی و غیرمزانشیمی تمایز یابند (۷-۵، ۱). دستیابی به منبع بافت چربی نسبت به مغز استخوان راحت تر و از خطر کمتری برخوردار است (۱۰-۸). سلول های بنیادی مشتق از بافت چربی و سلول های استرومایی مغز استخوان از نظر بیان ژن و قدرت تمایز شبیه به هم عمل می کنند اما سلول های بنیادی مشتق از بافت چربی از توانایی خودتکثیری بالاتری برخوردار است (۱۱). مطالعات انجام شده نشان می دهد که سلول های بنیادی جدا شده از بافت چربی حفره ی شکم موش صحرایی فرآیند تمایز سلول های بنیادی مشتق از بافت چربی انسان را تقلید می کنند و قادرند ویژگی های ظاهری سلول چربی، غضروفی، استخوانی و عصبی را نشان دهند (۱۲، ۱۱). یکی از نکات مهم در زمینه ی تمایز سلول های بنیادی مشتق از بافت چربی به سلول های بنیادی/پیش ساز عصبی استفاده از روش کشت مناسب است که می توان به روش کشت نوروسفر اشاره کرد.

روش ایجاد نوروسفر نخستین بار در سال ۱۹۹۲ توسط رینولدز و همکارانش به منظور جداسازی نوروسفرها از جسم مخطط^۱ مغز موش بالغ استفاده شد و از آنجایی که با استفاده از این روش می توان خاصیت نوسازی، تکثیر و قابلیت تمایز چند توانی موجود در سلول های بنیادی/پیش ساز عصبی را نشان داد، لذا این روش معمولاً به عنوان روشی استاندارد و معروف برای تشخیص و جداسازی این سلول ها مورد استفاده قرار می گیرد. در این روش شرایطی فراهم می شود که سلول های بنیادی/پیش ساز عصبی به طور مداوم تقسیم شده و توده های چند توانی تمایز نیافته به نام نوروسفر را ایجاد کنند. قطر این توده ها با گذشت زمان و در محیط القایی مناسب افزایش می یابد، چرا که سلول ها تقسیم می شوند و این توده های سلولی به هم می پیوندند (۱۳). کشت نوروسفر به عنوان یک روش استاندارد و گسترده جهت تولید سلول های بنیادی/پیش ساز عصبی با قدرت خود سازی در بسیاری از تحقیقات مورد مطالعه و بررسی قرار گرفته است (۱۵، ۱۴).

در سال ۲۰۰۱ Kawaguchi و همکارانش طی انجام مطالعاتی گزارش کردند که توده های اولیه ی نوروسفر از تجمع سلول های بنیادی/پیش ساز تشکیل می شود و نوروسفرهای بعدی می توانند از تقسیم یک سلول ایجاد شوند، این در حالی بود که سلول های بنیادی/پیش ساز عصبی از نوع سلول های چند توان هستند که توانایی ساخت سلول های شبیه به خود را دارند (۱۶). Chung و همکارانش در سال ۲۰۱۳ با تمایز سلول های بنیادی مشتق از بافت چربی و سلول های بنیادی مغز استخوان به نوروسفر و مقایسه نوروسفرهای دو گروه اعلام کردند که نوروسفرهای تولید شده از بافت چربی دارای قطر بزرگ تر و سرعت رشد بیشتر

هستند (۱۷). دارایی و همکارانش در سال ۲۰۱۳ سلول های بنیادی مغز استخوان را به نوروسفر تمایز دادند. نوروسفرهای تولید شده قادر به بیان ژن های NeuroD1، Nestin، Nanog، Oct4، Sox2 و Musashi1 بودند (۱۸). در این تحقیق تلاش شده تا سلول های بنیادی مشتق از بافت چربی با استفاده از روش کشت نوروسفر به سلول های بنیادی/پیش ساز عصبی تمایز داده شوند.

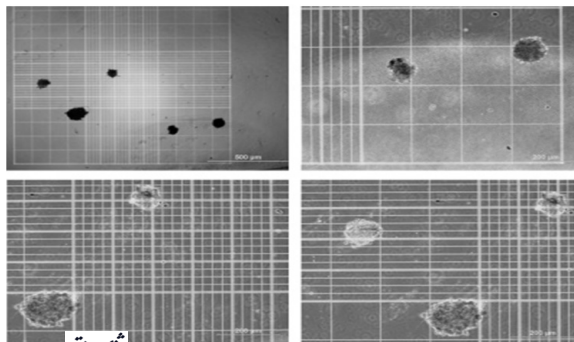
مواد و روش ها

جداسازی و کشت سلول های بنیادی مشتق از بافت چربی

در این مطالعه با رعایت اصول و مقررات کار با حیوانات (مورد تأیید دانشگاه تربیت مدرس) برای تهیه ی سلول های بنیادی مشتق از بافت چربی از موش های صحرایی نر بالغ از نژاد Sprague-Dawley با میانگین سنی شش الی هشت هفته وزن حدود ۲۰۰ الی ۳۰۰ گرم استفاده شد. ابتدا موش های صحرایی به صورت تصادفی انتخاب و به وسیله ی کلروفرم قربانی شدند. سپس ناحیه ی شکم حیوان و کشاله ران با محلول الکلی ۷۰٪ و بتادین ضد عفونی گردید. سپس در شرایط کاملاً استریل بافت چربی از نواحی زیر جلدی پایین شکم و اطراف کلیه ها و ناحیه ی کشاله ی ران جدا شد. به منظور حذف سلول های خونی، نمونه های بافت چربی جدا شده و در داخل فالتکون ۵۰ سی سی استریل منتقل شد و چندین بار توسط بافر فسفات سالین شستشو داده شد و در مرحله ی بعد تا حد امکان به قطعات کوچکتری برش داده شدند. در مرحله ی بعد ۳ برابر حجم نمونه ی بافت چربی آنزیم Collagenase Type I با غلظت ۰/۰۷۵ درصد که در محیط کشت DMEM حل شده و به مدت نیم ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه قرار داده شده اضافه کرده و به مدت نیم ساعت در انکوباتور دارای shaker (دمای ۳۷ درجه ی سانتی گراد، ۵۰۰ rpm) قرار داده شد و سپس آنزیم کلاژناز توسط سرم آلبومین گاوی خنثی شد. در مرحله ی بعد محلول شیری رنگ به دست آمده از فیلتر نایلونی ۱۰۰ میکرومتری گذرانده و به فالتکون ۱۵ منتقل کرده و به مدت هشت دقیقه با سرعت ۲۸۰۰ rpm سانتریفیوژ شد. رسوب سلولی به دست آمده توسط ۱ سی سی محیط DMEM حاوی ۱۰ درصد سرم آلبومین گاوی پیتاژ شد و سوسپانسیون تهیه شده به درون دو فلاسک ۲۵ سانتی متری تخلیه و با محیط کشت DMEM حاوی ۱۰ درصد سرم آلبومین گاوی در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه ی سانتی گراد و میزان CO₂ ۵٪ و شرایط رطوبت ۹۸٪ برای مدت ۲۴ ساعت نگهداری شد و پس از یک روز این محیط تعویض شد. به هنگام تعویض محیط، سلول ها توسط فسفات بافر سالین استریل شسته شدند. سلول هایی که به کف ظرف پلاستیکی نچسبیده بودند با تعویض محیط از ظرف خارج شدند. تعویض محیط هر دو روز یکبار و تا تخلیه ی کامل سلول های خونی و دبریدمان ها و پر شدن بیش از ۹۰٪ کف فلاسک ادامه یافت. سلول ها از ابتدا روزانه از نظر شکل ظاهری و شرایط عمومی توسط میکروسکوپ اینورت بررسی شدند. بعد از چهار الی

^۱ Substantia Nigra

استفاده از تیغ جراحی استریل بریده و در ۵ فیلد مختلف از هر چاهک، نوروسفرها را برداشته و مانند شمارش سلولی با ۱۰ میلی لیتر تریپان بلو ترکیب و ۱۰ میلی لیتر از محصول حاصله را برداشته و در زیر لامل که روی لام نئوبار گذاشته شده ریخته و با توجه به اندازه ی اضلاع مربع ها قطر نوروسفرها اندازه گیری و محاسبه شد. این کار در ۶ خانه ی پلیت نچسب در ۵ فیلد مختلف ۵ بار تکرار شد (تصویر ۱).



تصویر ۱- لام نئوبار همراه با تجمعات سلولی نوروسفر.

تبدیل نوروسفر به سلول های بنیادی /پیش ساز عصبی

پس از هفت روز نوروسفرهای شناور به همراه محیط کشت توسط سمپلر به درون فالکون ۱۵ سی سی تخلیه شد و پس از سانتریفیوژ، محلول رویی دور ریخته شد و مجدداً به پلاک سلولی، محیط کشت DMEM/F12 حاوی ۵ درصد سرم جنین گاوی و فاکتورهای B27، bFGF و EGF افزوده شد. سپس سلول ها پیپتاژ گردید تا سوسپانسیون سلولی یکنواختی به دست آید. پس از آن سوسپانسیون سلولی در دو فلاسک کوچک آغشته به پلی - ال - اورتین ریخته شد و به هر فلاسک حدوداً ۵ سی سی محیط کشتی که به آن اشاره شد، اضافه گردید. برای ارزیابی سلول های بنیادی /پیش ساز عصبی تولید شده از بررسی نشان گرهای عصبی NF-68، NF-200 و Nestin و همچنین بیان ژن های Sox2، Oct4، Nanog، Musashi، NeuroD1 و MBP استفاده شد.

RT-PCR

سلول های بنیادی مشتق از بافت چربی، نوروسفر و سلول های بنیادی /پیش ساز عصبی به صورت جداگانه از کف ظرف کشت با محلول تریپسین و EDTA جدا شده و پس از سانتریفیوژ، مایع رویی خارج و توده ی سلولی به دست آمده برای استخراج RNA آماده شد. پس از لیز نمودن سلول ها به کمک محلول RNA Plus (CinaGen Inc., Tehran, Iran) استخراج RNA انجام و DNA ژنومیک با کمک آنزیم DNaseI (Fermentase kit) حذف شد. سپس واکنش رونویسی معکوس با استفاده از cDNA Synthesis Kit (Fermentas) انجام شد. پس از پایان ساخت cDNA مرحله PCR برای ژن های جدول ۱ در حجم ۲۵ میکرولیتر با استفاده از دستورالعمل کیت سیناژن اجرا شد. واکنش در دستگاه Thermal cycler (Mastercycler Gradient) صورت گرفت. لازم به توضیح است که در هر مرحله از انجام PCR به جای

شش روز سلول ها پاساژ داده شد. بدین منظور محیط کشت سلول ها تخلیه شد و سلول ها توسط فسفات بافر سالین استریل سه مرتبه شسته شدند، سپس با استفاده از محلول تریپسین ۰/۰۴ درصد و EDTA ۰/۲۵ درصد، سلول ها از کف فلاسک جدا شدند. سلول های کنده شده از کف ظرف کشت توسط پیپت شیشه ای استریل پیپتاژ شدند و سلول ها از همدیگر جدا شدند و سوسپانسیون سلولی یکنواخت بدست آمد. سپس نیم سی سی سرم آلبومین گاوی به این سوسپانسیون افزوده شد تا اثر تریپسین خنثی گردد. بعد از این مرحله سوسپانسیون حاوی سلول به لوله فالکون ۱۵ سی سی منتقل شد و با دور rpm ۱۵۰۰، به مدت پنج دقیقه سانتریفیوژ گردید. پس از دور ریختن محلول رویی مجدداً به پلاک سلولی، محیط کشت حاوی ۱۰٪ سرم آلبومین گاوی افزوده شد و سپس پیپتاژ گردید تا سوسپانسیون سلولی یکنواختی به دست آید. پس از آن سوسپانسیون سلولی در دو فلاسک کوچک ریخته شد و به هر فلاسک حدوداً ۵ سی سی محیط کشت حاوی ۱۰٪ سرم آلبومین گاوی اضافه شد و فلاسک ها به انکوباتور منتقل شد. سلول ها بعد از پاساژ سوم به جمعیت یک دست رسیدند و برای ادامه ی تحقیقات استفاده شدند. برای بررسی خلوص سلول ها و همچنین مزانشیمی بودن آن ها از آنتی بادی های CD99، CD29، CD44، CD105، CD90، CD49d، CD106 و CD45 و همچنین بیان ژن های Sox2، Nanog و Oct4 استفاده شد.

تمایز سلول های بنیادی مشتق از بافت چربی به نوروسفر

سلول های بنیادی مشتق از بافت چربی بعد از پاساژ سوم توسط تریپسین ۰/۰۴ درصد و EDTA ۰/۲۵ درصد از کف ظرف جدا و سانتریفیوژ شد. سپس سلول ها شمارش شده و با غلظت ۱۰۰۰۰ سلول در هر سانتی متر مربع در محیط DMEM/F12 غنی شده با bFGF^۲ (۲۰ ng/ml)، B27 (۲٪) و EGF^۳ (۲۰ ng/ml) کشت داده شدند. برای ارزیابی نوروسفرهای تولید شده از شمارش تعداد نوروسفر، اندازه گیری قطر نوروسفر و بررسی نوروسفرها از نظر بیان نشان گرهای عصبی NF-68، NF-200 و Nestin و همچنین بیان ژن های Sox2، Oct4، Nanog، Musashi، NeuroD1 و MBP استفاده شد.

شمارش تعداد نوروسفرها

در روزهای سوم، ششم و دهم تعداد نوروسفرها در ۵ ناحیه در ۶ خانه از پلیت توسط میکروسکوپ اینورت و با بزرگنمایی ۲۰× بررسی و یادداشت شد. این کار ۵ بار تکرار شد.

اندازه گیری قطر نوروسفرها با استفاده از لام نئوبار

اندازه گیری قطر سلول های نوروسفر در روزهای سوم، ششم و دهم بعد از کشت نوروسفر با استفاده از لام نئوبار در زیر میکروسکوپ اینورت انجام شد. لام نئوبار دارای ۹ خانه است (۴ خانه ی بزرگ در حاشیه ها + ۵ خانه ی کوچک در مرکز). هر ضلع از اضلاع مربع های بزرگ ۱ میلی متر می باشد و هر مربع از ۴ مربع کوچک تشکیل شده که طول اضلاع آن ها ۲۵۰ میکرومتر می باشد. در این روش ابتدا نوک سرسمپلر آبی را با

² basic Fibroblast growth factor

³ Epidermal growth factor

جدول ۱- اطلاعات مربوط به پرایمرهای Forward (Sense) و Reverse (Antisense) ژن‌های استفاده شده در مرحله ی القاء به همراه برخی از ویژگی‌های آن‌ها.

Musashi1	NM-148890	CACTGCTTATGGTCCGATGG	GGTGAAGGCTGTCGCAATC	274
NeuroD1	NM-019218	CTACTTGTTACCTTTCCCATGC	GCTAAGGCAACGCAATAAC	216
MBP	NM-001025294	TTCCAAAGAGACCCACACTG	AAGGTCGGTCGTTTCAGTCAC	247
Nestin	NM-012987	AAGGCTCAGGAGTTCCAGG	TACGGCTTTATTCAGGGAG	244
Sox2	NM-001109181	CCGTTACAGACAAGGAAGG	CAACGATATCAACCTGCATG	194
Nanog	NM-001100781	TTCAAGACCAGCCTGTACT	GCACTGGTTTATCATGGTAC	219
Oct4	NM-001009178	GGCTGTGTCCTTTCCTCT	TCTCTTTGTCTACCTCCCTTC	218
GAPDH	NM-017008.4	GGAGTAAGAAACCCTGGACCAC	GAGGGTGCAGCGAACTTTATTG	205

مشقی

یافته ها

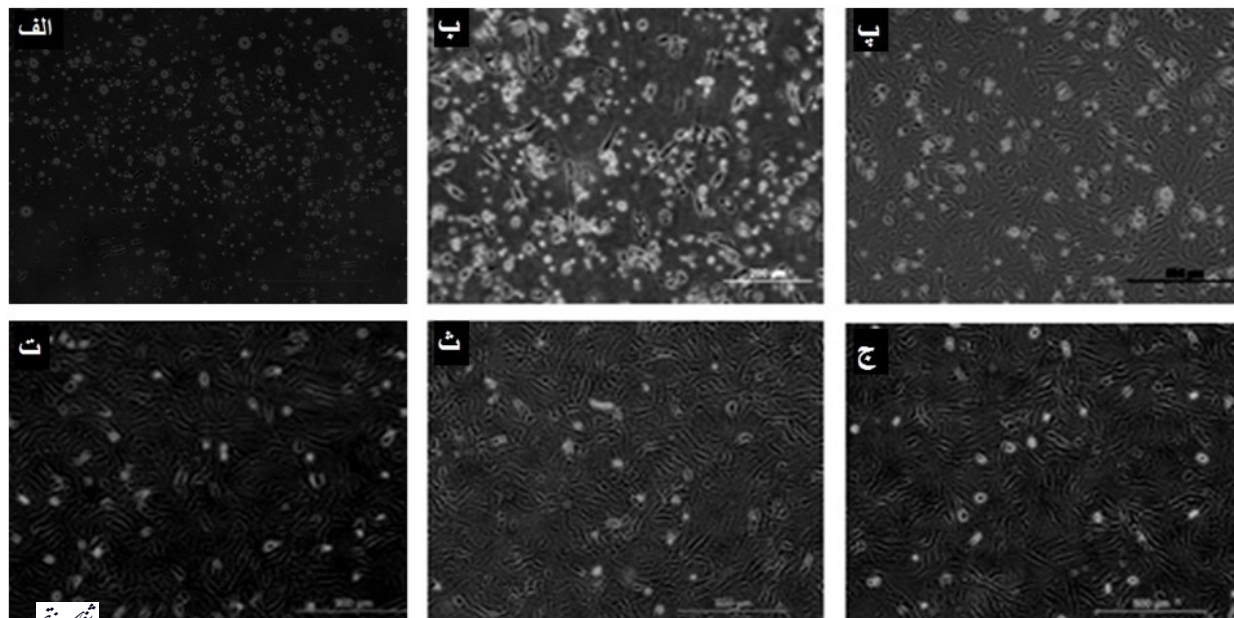
جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی

این سلول‌ها ۱۲ ساعت بعد از کشت اولیه به کف فلاسک چسبیدند. طی ۶ ساعت اول کشت، سلول‌ها گرد بوده و هسته ی نامشخص داشتند. با گذشت ۲۴ ساعت سلول‌ها دوکی شکل شده و از نظر مورفولوژی شبیه سلول‌های فیبروبلاست شدند. اولین پاساژ سلول‌ها بعد از حدود پنج الی هفت روز که سلول‌ها بیش از ۹۰ درصد کف ظرف کشت را پر کرده بودند، انجام شد. سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی با سرعت زیاد تقسیم می‌شوند به طوری که بعد از اولین پاساژ سلولی زمان دو برابر شدن سلول‌ها تقریباً دو روز است. این سلول‌ها پس از پاساژ سوم (ده روز بعد از شروع کشت اولیه) ظاهری نسبتاً یکدست و یکنواخت به دست آوردند و برای مراحل بعدی مطالعه مورد استفاده قرار گرفتند (تصویر ۲).

cDNA یک کنترل منفی نیز به کار گرفته شد. میکروتیوپ کنترل منفی حاوی ۵ میکرولیتر آب دیونیزه استریل و پرایمرهای GAPDH بود. محصول واکنش PCR روی ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز شد و مابقی محصول PCR در دمای ۲۰- درجه ی سانتی گراد نگهداری شد.

تجزیه و تحلیل آماری

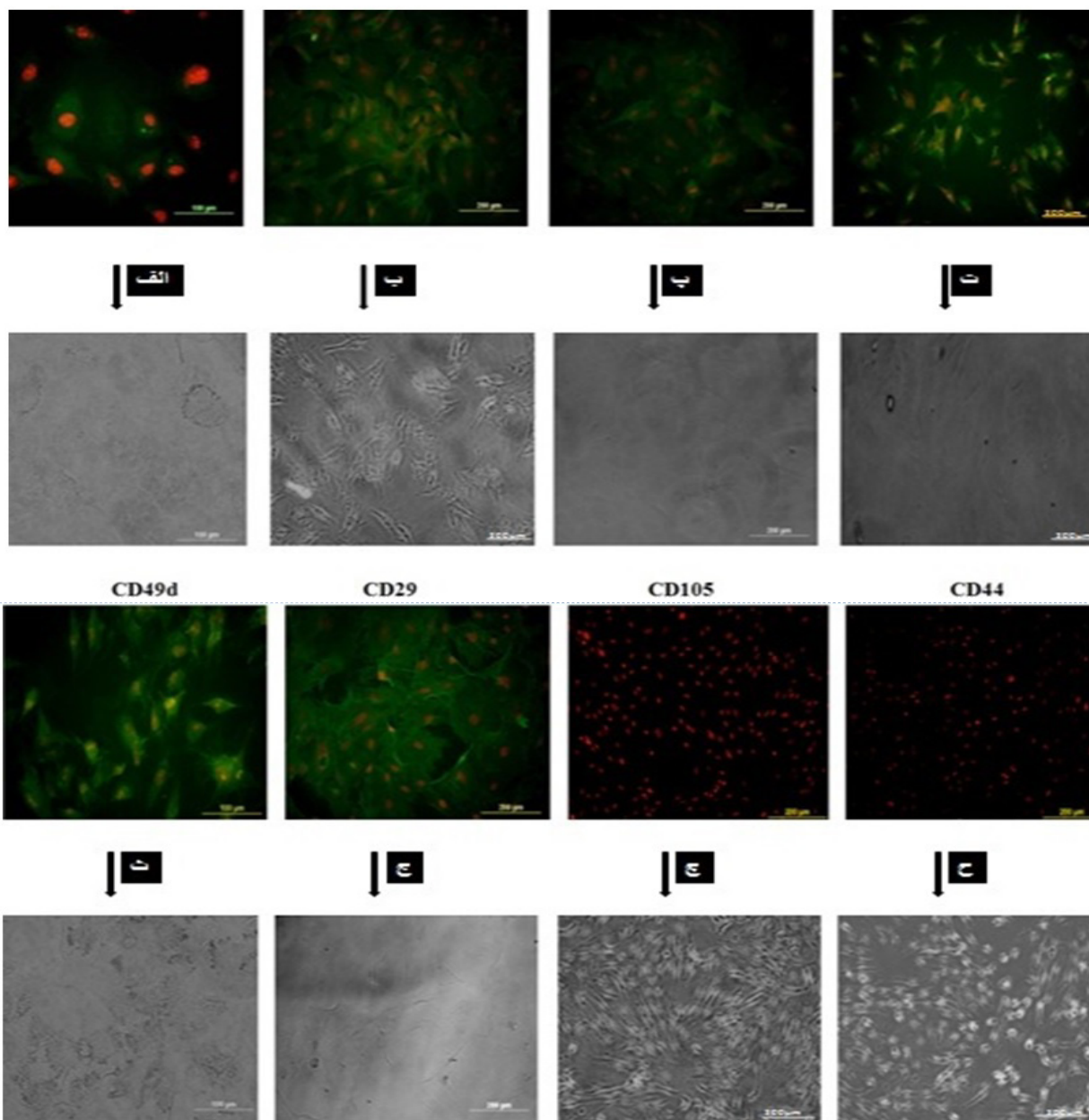
اطلاعات به دست آمده شامل درصد بیان مارکرهای سطحی در سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی و درصد بیان مارکرهای عصبی در سلول‌های عصبی و درصد تعداد و قطر نوروسفر، توسط آزمون آماری آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) و آزمون TUKEY و به وسیله نرم افزار SPSS version 16 انجام گرفت. سطح معنی‌داری $P < 0.05$ در نظر گرفته شد.



تصویر ۲- سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی. الف) سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی شش ساعت بعد از شروع کشت (اتصال سلول‌ها به کف ظرف کشت مشاهده می‌شود) ب) سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی ۲۴ ساعت بعد از شروع کشت (حضور گرانول‌های چربی در سیتوپلاسم سلول‌ها و دوکی شدن سلول‌های چسبیده به کف ظرف مشاهده می‌شود) پ) سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی سه روزه با ظاهری دوکی شکل، همچنان گرانول‌های چربی در سیتوپلاسم سلول‌ها دیده می‌شود. ت) سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی بعد از پاساژ اول (هفت روز بعد از کشت اولیه) ث) سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی بعد از پاساژ دوم (ده روز بعد از کشت اولیه)، سلول‌ها به صورت یکدست کف فلاسک را پر کرده اند. ج) سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی بعد از پاساژ سوم (۱۲ روز بعد از شروع کشت). تمام تصاویر با بزرگنمایی $\times 20$ گرفته شده است.

برای اثبات استرومایی بودن سلول ها و تعیین خلوصشان نشانگر های سطحی CD99، CD29، CD44، CD105، CD90، CD49d، CD106 و CD31 استفاده شد. تصویر ۳ مربوط به این نشانگرها است که غشا سلول ها سبز رنگ شده و برای تعیین درصد سلول های مثبت، هسته ی سلول ها توسط

Propidium Iodide قرمز رنگ شده است که ۹۰ درصد سلول ها به CD99، CD29، CD44، CD105، CD90، CD49d، CD106 و CD31 واکنش دادند اما آنتی بادی های CD106 (نشانگر اختصاصی سلول های استرومایی مغز استخوان) و CD31 (نشانگر اختصاصی سلول های اندوتلیالی) بیان نشدند.



CD90 شفاخته

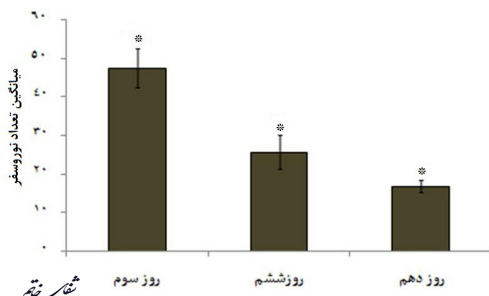
CD99

CD31

CD106

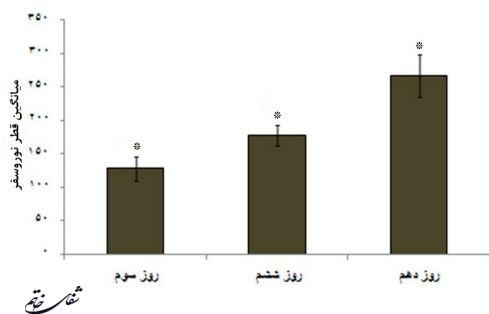
تصویر ۳- تأیید هویت سلول های بنیادی مشتق از بافت چربی با روش ایمونوسیتوشیمی: بیان نشانگرهای سطح سلولی در سلول های بنیادی مشتق از بافت چربی (پاساژ چهارم) (الف) نشانگر اختصاصی سلول های بنیادی مشتق از بافت چربی (CD49d) (ب) نشانگر اختصاصی سلول های مزانشیمی (CD29) (پ) نشانگر اختصاصی سلول های مزانشیمی (CD105) (ت) نشانگر اختصاصی سلول های مزانشیمی (CD44) (ث) نشانگر اختصاصی سلول های مزانشیمی (CD90) (ج) نشانگر اختصاصی سلول های مزانشیمی (CD99) (چ) نشانگر اختصاصی سلول های اندوتلیالی (CD31) (ح) نشانگر اختصاصی سلول های استرومایی مغز استخوان (CD106). رنگ قرمز نشان دهنده ی هسته ی سلول های رنگ شده با Propidium Iodide می باشد. بزرگنمایی تصویر الف ۱۰۰ و دیگر تصاویر ۲۰۰ میکرومتر.

نمودار ۱ مقایسه ی تعداد نوروسفرها را نشان می دهد. تعداد نوروسفرها با گذشت زمان به طور معنی داری ($P < 0.05$) کاهش یافت. به طوری که در روز دهم کمترین تعداد و روز سوم بیشترین تعداد نوروسفر مشاهده شد.



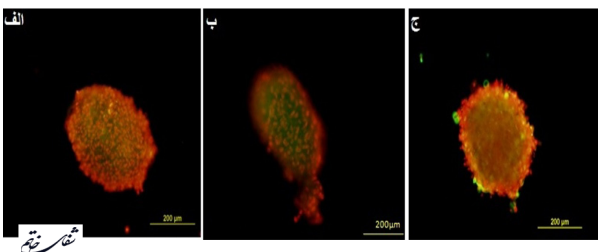
نمودار ۱- مقایسه تعداد نوروسفرها در روزهای سوم، ششم و دهم. مطالعات آماری در مورد میانگین تعداد نوروسفرها نشان داد با گذشت زمان تعداد نوروسفرها کاهش می یابد به طوری که در هر گروه نسبت به دیگر گروهها تفاوت چشم گیری مشاهده شد. در روز دهم کمترین تعداد و روز سوم بیشترین تعداد را داشتند. *: اختلاف معنی دار با سایر روزها ($P < 0.05$).

نمودار ۲ مقایسه ی قطر نوروسفرها را نشان می دهد قطر نوروسفرها با گذشت زمان به طور معنی داری ($P < 0.05$) افزایش یافت.



نمودار ۲- مقایسه قطر نوروسفرها در روزهای سوم، ششم و دهم. بررسی آماری میانگین قطر نوروسفرها در روزهای سوم، ششم و دهم نشان داد با گذشت زمان قطر نوروسفرها افزایش می یابد. در هر گروه نسبت به دیگر گروهها تفاوت چشم گیری مشاهده شد در روز دهم بیشترین قطر و روز سوم کمترین قطر را نشان داد. *: اختلاف معنی دار با سایر روزها ($P < 0.05$).

بررسی ایمونوسیتوشیمی نوروسفرها در روز هفتم نشان داد این توده های سلولی نشانگرهای NF-68، NF-200 و Nestin را بیان کردند. هسته ی سلولها به وسیله Propidium Iodide رنگ آمیزی شد (تصویر ۶).



تصویر ۶- ایمونوسیتوشیمی نوروسفر. (الف) بیان NF-68 در سلولهای نوروسفر (ب) بیان NF200 در سلولهای نوروسفر (ج) بیان Nestin در سلولهای نوروسفر. هسته ها با رنگ آمیزی Propidium Iodide نارنجی دیده می شوند و رنگ سبز در تصاویر به دلیل استفاده از آنتی بادی ثانویه کوئوگه به FITC می باشد. تمامی این تصاویر با بزرگنمایی $\times 20$ گرفته شده است.

در بررسی RT-PCR تجمعات نوروسفر، mRNA ژن های Sox2، Nanog، Oct4، NeuroD1، Musashi1 و Nestin و ژن

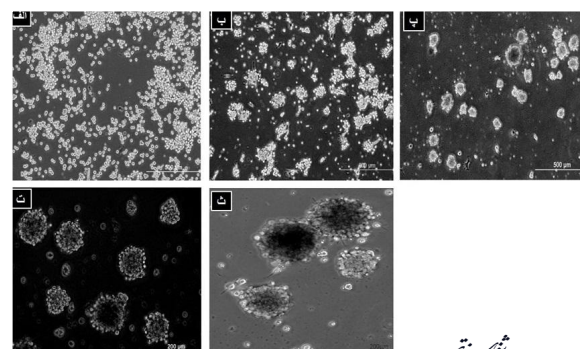
همچنین در بررسی RT-PCR این سلول ها، mRNA ژن های Sox2، Nanog و Oct4 به خوبی بیان شدند که در این بررسی ژن GAPDH به عنوان کنترل داخلی استفاده گردید (تصویر ۴).



تصویر ۴- ژل الکتروفورز نمونه ی سلولهای بنیادی مشتق از بافت چربی. ژن های Sox2، Oct4، Nanog و ژن GAPDH به عنوان کنترل داخلی در این سلولها بیان شدند. NTC کنترل منفی واکنش می باشد.

تولید نوروسفر

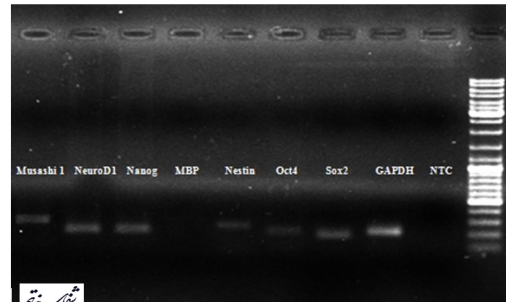
سلولهای بنیادی مشتق از بافت چربی، یک ساعت بعد از قرار گرفتن در محیط کشت القائی عصبی ساختارهای شناور و کروی شکل با سلولهای گرد و هسته ی نامشخص تشکیل دادند (تصویر ۵-الف). در ۲۴ ساعت بعد سلول های شناور به هم نزدیک شده و تجمعات شناور سلولی را ایجاد می کنند (تصویر ۵-ب). بررسی قطر و تعداد نوروسفرها حاکی از این بود که میانگین قطر این نوروسفرها پس از سه روز $127/85 \pm 17/57$ میکرومتر و میانگین تعداد نوروسفرها $47/37 \pm 5/06$ بود (تصویر ۵-پ). بعد از شش روز میانگین قطر نوروسفرها $177/14 \pm 15/27$ میکرومتر و میانگین تعداد نوروسفرها $25/62 \pm 4/47$ بود (تصویر ۵-ت). بعد از ۱۰ روز میانگین قطر نوروسفرها $267/14 \pm 32/13$ میکرومتر و میانگین تعداد نوروسفرها $16/75 \pm 1/47$ بود (تصویر ۵-ث).



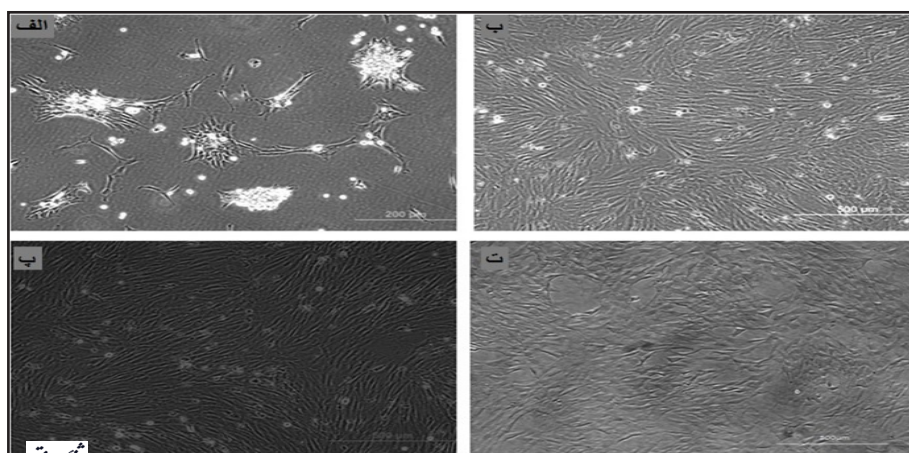
تصویر ۵- روند تشکیل نوروسفر. (الف) سلولهای بنیادی مشتق از بافت چربی را یک ساعت پس از قرار گیری در محیط القائی نوروسفر نشان می دهد، بسیاری از سلولها هنوز به صورت تک تک قرار گرفته اند ولی تعدادی از سلولها در حال به هم پیوستن هستند (بزرگنمایی تصویر $\times 10$). (ب) نشان دهنده تشکیل تجمعات سلولی پس از ۲۴ ساعت می باشد. هنوز تعداد زیادی از سلولها به صورت تک تک قرار گرفته اند و تا حدودی نیز به کف پلیت چسبیده اند (بزرگنمایی تصویر $\times 10$). (پ) توده های نوروسفر پس از سه روز، همانطور که در تصویر قابل مشاهده است توده های سلولی کوچک در حال به هم پیوستن می باشند (بزرگنمایی تصویر $\times 10$). (ت) نشان دهنده نوروسفرها در روز ششم است. تعداد سلولهای تک تک و چسبیده به کف پلیت خیلی کم شده و توده های کروی شکل واضح با حاشیه کاملاً منظم تشکیل داده اند و به صورت معلق در محیط قرار گرفته اند (بزرگنمایی تصویر $\times 20$). (ث) نشان دهنده ی نوروسفرها در روز دهم می باشد (بزرگنمایی تصویر $\times 20$).

بودند و به کف ظرف کشت اتصال داشتند (تصویر ۸-الف). در روز دوم و سوم به مرور از حجم توده‌ها کاسته شد و سلول‌ها کم کم پخش شدند در حالی که این سلول‌ها هم چنان قدرت تقسیم داشتند. سلول‌های بنیادی/پیش ساز عصبی بعد از گذشت چهار روز به اولین پاساژ رسیدند (تصویر ۸-ب). سپس هر سه روز یک بار پاساژ سلولی انجام می‌گرفت. این سلول‌ها تا پاساژ سوم برده شدند. برای تعیین سرنوشت سلول‌ها، نشانگرهای NF-200، NF-68 و Nestin استفاده شد. تصویر ۹ مربوط به این نشانگرها است که سیتوپلاسم سلول‌ها سبز رنگ شده و برای تعیین درصد سلول‌های مثبت، هسته سلول‌ها توسط Propidium Iodide به رنگ قرمز رنگ شد که ۹۷ درصد سلول‌ها

GAPDH به عنوان کنترل داخلی به خوبی بیان شد درحالی که باند مشخصی در بیان mRNA ژن MBP در ژل الکتروفورز مشاهده نشد (تصویر ۷).



تصویر ۷- ژل الکتروفورز نمونه‌ی سلول‌های نوروسفر. ژن‌های Musashi1، NeuroD1، Nanog، Nestin، Oct4، Sox2 و ژن GAPDH به عنوان کنترل داخلی در این سلول‌ها بیان شدند. در این سلول‌ها ژن MBP بیان نشد. NTC کنترل منفی واکنش می‌باشد.

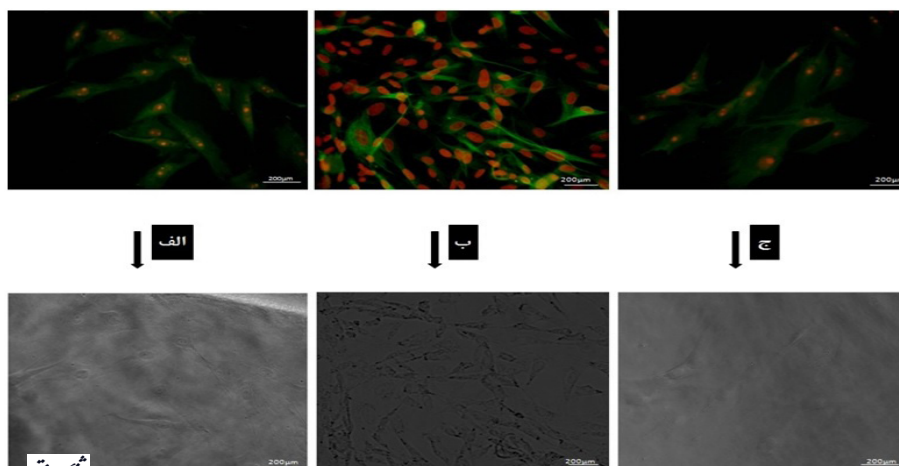


تصویر ۸- سلول‌های بنیادی عصبی. (الف) سلول‌های بنیادی عصبی را پس از یک روز نشان می‌دهد که به صورت توده‌های چسبیده به کف پلیت دیده می‌شوند. (ب) سلول‌های بنیادی عصبی پس از پاساژ یک، در این تصاویر توده‌های سلولی دیده نمی‌شود و سلول‌ها دوکی شکل هستند. (پ) سلول‌های بنیادی عصبی پس از پاساژ دوم، این سلول‌ها کاملاً کف ظرف کشت را پر کرده و حالت کشیده و دوکی شکل دارند. (ت) سلول‌های بنیادی عصبی یک روز پس از پاساژ سه می‌باشند (بزرگنمایی $\times 20$).

با نشانگر Nestin، ۹۵/۳ درصد سلول‌ها با نشانگر NF-68 و حدود ۹۳ درصد سلول‌ها با نشانگر NF-200 واکنش دادند. mRNA ژن‌های Musashi1، NeuroD1، Oct4، Nanog، Sox2 و Nestin و ژن GAPDH به عنوان کنترل داخلی به خوبی بیان شد در حالی که باند مشخصی در بیان mRNA ژن MBP در ژل الکتروفورز مشاهده نشد (تصویر ۱۰).

تولید سلول‌های بنیادی/پیش ساز عصبی

نوروسفرهای تشکیل شده در مرحله‌ی قبلی آزمایش در محیط مناسب جهت تبدیل به سلول‌های بنیادی/پیش ساز عصبی قرار گرفتند. زوائد و استتاله‌هایی در سلول‌ها ایجاد گردید. سلول‌ها دوکی شکل شدند و مرز بین سلول‌ها منظم‌تر و مشخص‌تر بود. در روز اول ابتدا این سلول‌ها به صورت توده



تصویر ۹- ایمونوسیتوشیمی سلول‌های بنیادی عصبی. (الف) بیان نشانگر NF-68 در سلول‌های بنیادی عصبی (ب) بیان نشانگر Nestin در سلول‌های بنیادی عصبی (ج) بیان نشانگر NF200 در سلول‌های بنیادی عصبی. هسته‌ها با رنگ آمیزی Propidium Iodide تارنجی دیده می‌شوند و رنگ سبز در تصاویر به دلیل استفاده از آنتی بادی ثانویه کونژوگه به FITC می‌باشد. تمامی این تصاویر با بزرگنمایی $\times 20$ گرفته شده است.

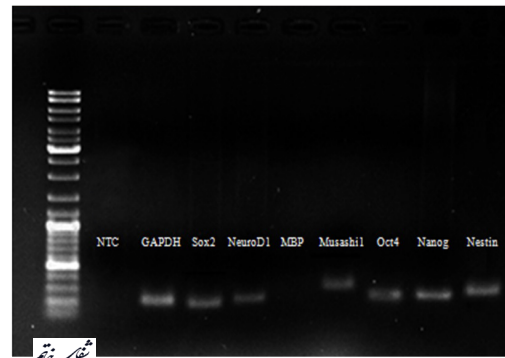
سلول‌های بنیادی مزانشیمی بافت چربی به ظرف کشت در کمتر از ۱۲ ساعت انجام می‌گیرد (۲۷).

ما نیز در این مطالعه به این نتیجه رسیدیم که سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی ۱۲ ساعت بعد از کشت اولیه به سطح ظرف کشت اتصال یافتند. این یافته با یافته‌های سایر محققین مطابقت دارد (۲۶، ۲۷). در این تحقیق با استفاده از روش ایمونوسیتوشیمی و RT-PCR هویت سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی مورد ارزیابی قرار گرفت. سلول‌ها با استفاده از آنتی بادی‌های CD49d (به عنوان نشان‌گر سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی)، CD90 (به عنوان نشان‌گر سلول‌های بنیادی مزانشیمی)، CD31 (به عنوان نشان‌گر سلول‌های اندوتلیالی)، CD106 (به عنوان نشان‌گر سلول‌های استرومای مغز استخوان)، CD44 (به عنوان نشان‌گر سلول‌های بنیادی مزانشیمی)، CD105 (به عنوان نشان‌گر سلول‌های بنیادی مزانشیمی)، CD29 (به عنوان نشان‌گر سلول‌های بنیادی مزانشیمی) و CD99 (به عنوان نشان‌گر سلول‌های بنیادی مزانشیمی) تأیید شدند. نتایج نشان داد که بیان آنتی بادی‌های CD90، CD49d، CD29، CD105، CD44، CD99 بنیادی مشتق از بافت چربی مثبت بودند ولی این سلول‌ها نسبت به آنتی بادی CD106 و CD31 بیانی نشان ندادند. نتایج بدست آمده در این مرحله با نتایج سایر محققین مطابقت داشت (۳۲-۲۸، ۲۴، ۱۱، ۱۰، ۳). بر اساس گزارشات محققین سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی قادر به بیان ژن‌های Nanog، Oct4، Sox2 می‌باشند. در مطالعه ی حاضر با استفاده از روش RT-PCR بیان ژن‌های نام برده بررسی شد و نتایج نشان داد که این سلول‌ها قادر به بیان این ژن‌ها هستند. بنابراین نتایج بدست آمده در این مرحله از تحقیق توسط نتایج دیگر پژوهشگران تأیید می‌گردد (۳۳، ۳۰، ۱۷).

روش ایجاد نوروسفر روشی ارزشمند و مهم برای ایجاد منبع دائمی و تجدید پذیر از سلول‌های پیش‌ساز و تمایز نیافته عصبی به منظور استفاده ی این سلول‌ها در مطالعات علمی و درمانی می‌باشد (۱۳). در مطالعه ای پژوهشگران با استفاده از محیط کشت تمایزی، سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی موش صحرایی را به نوروسفر تبدیل کردند. نتایج تحقیقاتشان حاکی از این بود که تعدادی از نوروسفرها در محیط کشت به کف پلیت چسبیدند و در مراحل بعد با اضافه کردن سرم جنین گاوی به محیط کشت نوروسفر، سلول‌های بنیادی/پیش ساز عصبی از اسفرهای موجود شکل گرفتند (۳۱).

در مطالعه ای دیگر محققان سلول‌های پیش‌ساز عصبی جدا شده از مغز جنین موش صحرایی را در محیط کشت DMEMF-12 و حاوی EGF، B27 و bFGF به نوروسفر تمایز دادند و سپس با افزودن سرم جنین گاوی به محیط کشت، اسفرها به سلول بنیادی/پیش ساز عصبی تبدیل شدند. با گذشت زمان شکل ظاهری یک دستی در سلول‌های بنیادی/پیش ساز عصبی ایجاد شد (۳۴).

Chung و همکارانش در سال ۲۰۱۳ سلول‌های استرومای مغز استخوان و سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی سگ



تصویر ۱- ژل الکتروفورز نمونه سلول‌های بنیادی عصبی. ژن‌های Sox2، NeuroD1، Musashi1، Nestin، Nanog، Oct4 و GAPDH به عنوان کنترل داخلی در سلول‌های بنیادی عصبی بیان شدند. این سلول‌ها ژن MBP را بیان نکردند. NTC کنترل منفی واکنش می‌باشد.

بحث و نتیجه گیری

استراتژی سلول درمانی در بیماری‌های مخرب سیستم عصبی از سال ۱۹۷۰ توسط لیندوال و همکارانش مطرح شد (۱۹). امروزه سلول‌های بنیادی به عنوان منبع مناسب سلول درمانی محسوب می‌شود. این سلول‌ها در اکثر بافت‌های تمایز یافته حضور دارند (۲۰). سلول‌های بنیادی بالغ با داشتن خاصیت خود تجدیدی قادرند برای مدت زمان طولانی قدرت تقسیم خود را حفظ کنند و به سایر رده‌های سلولی تمایز یابند (۲۱). سلول‌های بنیادی مزانشیمی موجود در مغز استخوان و سایر بافت‌ها در شرایط خارج از بدن (In vitro) به راحتی کشت داده می‌شوند و به رده‌های عصبی و گلیالی تمایز می‌یابند (۲۲).

در این مطالعه از سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی استفاده شده است. گرچه نمونه ی مغز استخوان منبع خوبی از سلول‌های بنیادی می‌باشد ولی به چند دلیل استفاده از سلول‌های مشتق از بافت چربی بهتر است: ۱- تهیه ی نمونه ی مغز استخوان روش تهاجمی و دردناک است و این در حالی است که با یک برش ساده پوستی و در طی عمل لیپوساکشن به عنوان یک عمل جراحی رایج و نسبتاً بی خطر می‌توان مقدار زیادی بافت چربی تهیه کرد (۲۳). ۲- میزان بقا، قدرت تمایز و تعداد سلول‌های بنیادی موجود در مغز استخوان با افزایش سن بیمار کاهش می‌یابد ولی این محدودیت سنی برای بافت چربی وجود ندارد (۲۴). ۳- سلول‌های بنیادی مغز استخوان در پاساژهای ۵ الی ۶ به بعد دستخوش تمایز خودبخودی می‌شوند و این در حالی است که تمایز خودبخودی در سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی به ندرت دیده می‌شود (۲۴).

Fraser و همکارانش در سال ۲۰۰۶ طی تحقیقاتی نشان دادند که تعداد سلول‌های بنیادی موجود در بافت چربی ۵۰۰ برابر بیشتر از نمونه ی مغز استخوان (در یک حجم برابر از نمونه ی بافت چربی و مغز استخوان) است (۲۵). Yongchao و همکارانش در سال ۲۰۰۵ با انجام مطالعاتی گزارش کردند که سلول‌های بنیادی مغز استخوان با گذشت ۱۲ الی ۲۴ ساعت از شروع کشت اولیه به کف ظرف می‌چسبند (۲۶). این در حالی است که Lai و همکارانش در سال ۲۰۱۱ اعلام کردند اتصال

سلول‌های بنیادی/پیش ساز عصبی از نظر بیان آنتی بادی‌های Nestin (به عنوان نشان‌گر سلول‌های پیش‌ساز عصبی)، NF-68 (به عنوان نشان‌گر سلول‌های بنیادی عصبی) و NF-200 (به عنوان نشان‌گر سلول‌های عصبی) تأیید شدند (۱۷، ۱۸، ۳۱، ۳۴، ۳۵). نتایج نشان داد که بیان آنتی بادی‌های Nestin، NF-68 و NF-200 در نوروسفرها و سلول‌های بنیادی/پیش ساز عصبی مثبت بود. نتایج به دست آمده در این مرحله با نتایج مطالعات سایر محققین مطابقت داشت. بررسی بیان ژن‌های Sox2، Nestin، Nanog، MBP، Oct4، NeuroD1، Musashi1 و Sox2 با روش RT-PCR نشان داد که در تجمعات نوروسفر و سلول‌های بنیادی/پیش ساز عصبی ژن‌های Sox2، Nestin، Nanog، Oct4، NeuroD1، Musashi1 و Sox2 بیان شدند در حالی که بیان ژن MBP در این سلول‌ها مشاهده نشد. نتایج بدست آمده در این مرحله با نتایج دیگر مطالعاتی که در این زمینه صورت گرفته است همخوانی دارد و تأیید کننده ی مطلب فوق است (۱۷، ۱۸، ۳۶).

نتایج به دست آمده در این تحقیق گویای این است که با استفاده از سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی به عنوان منبع سلولی مناسب و با به کارگیری روش کشت نوروسفر تعداد زیادی سلول بنیادی/پیش ساز عصبی حاصل می شود که می توان از آن ها برای تحقیقات آتی استفاده کرد.

تقدیر و تشکر

از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس و مرکز تحقیقات علوم اعصاب شفاء بیمارستان خاتم الانبیا تهران که امکان انجام این پژوهش را فراهم نمودند، تقدیر و تشکر می شود.

را در محیط کشت تمایزی به نوروسفر تمایز دادند. اسفرهای تولید شده از سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی بزرگتر و سلول‌های عصبی حاصل از آن ها بیشتر بود (۱۷).

Darabi و همکارانش در سال ۲۰۱۳ طی تحقیقاتی مشاهده کردند که بعد از تیمار سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی با محیط کشت حاوی DMEMF-12 همراه با B27، bFGF و EGF این سلول‌ها به شکل منفرد، گرد و شناور ظاهر شدند و پس از گذشت یک ساعت سلول‌ها شروع به نزدیک شدن به هم کردند. بعد از ۲۴ ساعت تجمعات شناور سلولی کامل تر و بزرگتری در محیط کشت شکل گرفتند و با گذشت زمان تجمعات سلولی با همدیگر ترکیب شدند و توده‌های بزرگتری را تشکیل دادند به طوری که با گذشت زمان قطر تجمعات سلولی افزایش و تعداد آن ها کاهش یافت (۱۸).

نتایج حاصل از مطالعه ی ما در این مرحله، تأییدی بر نتایج تحقیقات دیگر محققین بود به طوری که در محیط کشت تمایز، حاوی DMEMF-12 همراه با B27، bFGF و EGF سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی به نوروسفر تبدیل شدند. تعدادی از نوروسفرها در محیط کشت به کف ظرف چسبیدند و با گذشت زمان تعداد توده‌های نوروسفر کاهش و قطر آن ها افزایش پیدا کرد. نوروسفرها هفت روز بعد از کشت به ظرف بچسب منتقل شدند و سرم جنین گاوی به محیط کشت آن ها اضافه شد. نوروسفرها شروع به چسبیدن به کف ظرف کردند و با گذشت ۳ الی ۴ پاساژ سلول‌های بنیادی/پیش ساز عصبی با شکل ظاهری دوکی و یک دست ایجاد شدند. در این تحقیق با استفاده از روش ایمونوسیتوشیمی و RT-PCR هویت نوروسفرها و سلول‌های بنیادی/پیش ساز عصبی مورد ارزیابی قرار گرفت. در روش ایمونوسیتوشیمی نوروسفرها و

منابع

- Aschettino J, Dalton-Petille S, Keaffer L, zerszunowic J, Adams D. Stem Cells and Society. B.S.c.thesis. Worcester Polytechnic Institute. 2012.
- McGraw J, Hiebert G, Steeves J. Modulating astrogliosis after neurotrauma. J Neurosci Res. 2001; 63(2): 109-15.
- Tapp H, Hanley EN, Patt JC, Gruber HE. Adipose-derived stem cells: characterization and current application in orthopaedic tissue repair. Exp Bio Med. 2009; 234(1): 1-9.
- Zhao LR, Duan WM, Reyes M, Keene CD, Verfaillie CM, Low WC. Human bone marrow stem cells exhibit neural phenotypes and ameliorate neurological deficits after grafting into the ischemic brain of rats. Exp Neurol. 2002; 174(1): 11-20.
- Hsieh J, Nakashima K, Kuwabara T, Mejia E, Gage FH. Histone deacetylase inhibition-mediated neuronal differentiation of multipotent adult neural progenitor cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004; 101(47): 16659-64.
- Huang T, He D, Kleiner G, Kuluz J. Neuron-like differentiation of adipose-derived stem cells from infant piglets in vitro. J Spinal Cord Med. 2007; 30: 35-40.
- Lotfi AS, Khoshdel A, Soleimani M, Daliri M, Razban V, Adibi B. High yield generation of hepatocyte like cells from adipose derived stem cells. SRE. 2012; 7(10): 1141-7.
- Golipoor Z, Kashani-Ragerdi I, Mohammad A, Hassanzadeh GH, Malek F, Mahmoudi R. Differentiation of adipose-derived

stem cells into schwann cell phenotype in comparison with bone marrow stem cells. *Iran J Basic Med Sci.* 2010; 13 (3): 76-84.

9. Herzog EL, Chai L, Krause DS. Plasticity of marrow-derived stem cells. *Blood.* 2003; 102(10): 3483-93.

10. Jang S, Cho HH, Cho YB, Park JS, Jeong HS. Functional neural differentiation of human adipose tissue-derived stem cells using bFGF and forskolin. *BMC Cell Biol.* 2010; 11(1): 25.

11. Kingham PJ, Kalbermatten DF, Mahay D, Armstrong SJ, Wiberg M, Terenghi G. Adipose-derived stem cells differentiate into a Schwann cell phenotype and promote neurite outgrowth in vitro. *Exp Neurol.* 2007; 207(2): 267-74.

12. Wu YP, Chen WS, Teng C, Zhang N. Stem cells for the treatment of neurodegenerative diseases. *Molecules.* 2010; 15(10): 6743-58.

13. Yang Q, Mu J, Li Q, Li A, Zeng Z, Yang J, et al. A simple and efficient method for deriving neurospheres from bone marrow stromal cells. *Biochem Bioph Res Commun.* 2008; 372(4): 520-4.

14. Engstrom CM, Demers D, Dooner M, McAuliffe C, Benoit BO, Stencel K, et al. A method for clonal analysis of epidermal growth factor-responsive neural progenitors. *J Neurosci Methods.* 2002; 117(2): 111-21.

15. Nakamura Y, Sakakibara S-i, Miyata T, Ogawa M, Shimazaki T, Weiss S, et al. The bHLH gene *hes1* as a repressor of the neuronal commitment of CNS stem cells. *The J Neurosci.* 2000; 20(1): 283-93.

16. Kawaguchi A, Miyata T, Sawamoto K, Takashita N, Murayama A, Akamatsu W, et al. Nestin-EGFP transgenic mice: visualization of the self-renewal and multipotency of CNS stem cells. *Mol Cell Neurosci.* 2001; 17(2): 259-73.

17. Chung C, Fujita N, Kawahara N, Yui S, Nam E, Nishimura R. A Comparison of Neurosphere Differentiation Potential of Canine Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells and Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells. *J Vet Med Sci.* 2013; 75(7): 879-86.

18. Darabi S, Tiraihi T, Ruintan A, Abbaszadeh HA, Delshad A, Taheri T. Polarized neural stem cells derived from adult bone marrow stromal cells develop a rosette-like structure. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2013; 49(8): 638-52.

19. Lindvall O, Björklund A. Cell replacement therapy: helping the brain to repair itself. *NeuroRx.* 2004; 1(4): 379-81.

20. Dazzi F, Ramasamy R, Glennie S, Jones SP, Roberts I. The role of mesenchymal stem cells in haemopoiesis. *Blood Rev.* 2006; 20(3): 161-71.

21. Sylvester KG, Longaker MT. Stem cells: review and update. *Arch Surg.* 2004; 139(1): 93-9.

22. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature.* 2002; 418(6893): 41-9.

23. Cheng KH, Kuo TL, Kuo KK, Hsiao CC. Human adipose-derived stem cells: Isolation, characterization and current application in regeneration medicine. *GMBHS.* 2011; 3(2): 53-62.

24. Wang CY, Yang F, He XP, Je HS, Zhou JZ, Eckermann K, et al. Regulation of neuromuscular synapse development by glial cell line-derived neurotrophic factor and neurturin. *J Biol Chem.* 2002; 277(12): 10614-25.

25. Fraser JK, Wulur I, Alfonso Z, Hedrick MH. Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. *Trends Biotechnol.* 2006; 24(4): 150-4.

26. Yongchao W, Qixin Z, Xiaodong G, Zhongping X, Yuntao W, Jie H. Differentiation of bone marrow mesenchymal cells to neural cells. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci.* 2005; 25(5): 488-90.

27. Lai K, Zeng K, Zeng F, Wei J, Tan G. Allogeneic adipose-derived stem cells suppress Th17 lymphocytes in patients with active lupus in vitro. *Acta Biochim Biophys Sin.* 2011; 43(10): 805-12.

28. Izadpanah R, Joswig T, Tsien F, Dufour J, Kirijan JC, Bunnell BA. Characterization of multipotent mesenchymal stem cells from the bone marrow of rhesus macaques. *Stem Cells Dev.* 2005; 14(4): 440-51.

29. Xiao Y, Mareddy SR, Crawford RW. Clonal characterization of bone marrow derived stem cells and their application for bone regeneration. *Int J Oral Sci.* 2010; 2(3): 127-35.

30. Park E, Patel AN. Changes in the expression pattern of

mesenchymal and pluripotent markers in human adipose-derived stem cells. *Cell Biol Int*. 2010; 34(10): 979-84.

31. Xu Y, Liu Z, Liu L, Zhao C, Xiong F, Zhou C, et al. Neurospheres from rat adipose-derived stem cells could be induced into functional Schwann cell-like cells in vitro. *BMC Neurosci*. 2008; 9(1): 21.

32. Gaiba S, França LPd, França JPd, Ferreira LM. Characterization of human adipose-derived stem cells. *Acta Cir Bras*. 2012; 27(7): 471-6.

33. Baer PC, Geiger H. Adipose-derived mesenchymal stromal/stem cells: tissue localization, characterization, and heterogeneity. *Stem cells Int*. 2012; 2012: 812693.

34. Go HS, Seo JE, Kim KC, Han SM, Kim P, Kang YS, et al. Valproic acid inhibits neural progenitor cell death by activation of NF-B signaling pathway and up-regulation of Bcl-XL. *J Biomed Sci*. 2011; 18(1): 48.

35. Yang J, Yan Y, Ciric B, Yu S, Guan Y, Xu H, et al. Evaluation of bone marrow-and brain-derived neural stem cells in therapy of central nervous system autoimmunity. *Am J Pathol*. 2010; 177(4): 1989-2001.

36. Lee SH, Jeyapalan JN, Appleby V, Noor M, Azri D, Sottile V, et al. Dynamic methylation and expression of Oct4 in early neural stem cells. *J Anat*. 2010; 217(3): 203-13.