

بررسی بیان ژن های نوروتروفینی در سلول های بنیادی چربی استخراج شده از خانم های سزارینی

بیمارستان ولایت دامغان

آرزو امیری^۱، دکتر مریم حاجی قاسم کاشانی^{۲*}

۱- کارشناس ارشد بافت شناسی و جنین شناسی، دانشکده زیست شناسی، دانشگاه دامغان. ۲- استادیار گروه سلولی و مولکولی، دانشکده زیست شناسی، دانشگاه دامغان.

نشانی: دامغان، دانشگاه دامغان، دانشکده زیست شناسی.

* نویسنده مسئول: دکتر مریم حاجی قاسم کاشانی، پست الکترونیکی

نوروتروفین ها در سلول های بنیادی چربی

Arezoo Amiri¹, Dr Maryam Haji Ghasem Kashani²

¹MSc in Histology & Embryology, School of Biology, Damghan University, Damghan, Iran. ² Assistant Professor Department of Cellular and Molecular Biology, School of Biology, Damghan University, Damghan, Iran

بیان ژن های نوروتروفینی در سلول های بنیادی چربی استخراج شده از خانم های سزارینی بیمارستان ولایت دامغان

خلاصه:

سابقه و هدف: سلول های بنیادی مشتق شده از چربی انسانی (hASCs) منبع مناسبی برای درمان بیماری های عصبی هستند. هدف از این مطالعه بررسی بیان ژن های نوروتروفینی در hASCs است.

مواد و روش ها: در این پژوهش، از چربی زیرجلدی شکم خانم های سزارینی بیمارستان ولایت دامغان استفاده شد. پس از هضم مکانیکی و آنزیمی بافت چربی، سلول های استخراج شده در محیط کشت α -MEM حاوی ۱۰٪ سرم جنین گاوی کشت داده شدند. در پاساژ چهارم، بنیادی بودن سلولها با روش فلوسایتومتری و قابلیت تمایزشان به سلول های چربی و استخوان تأیید شد. تکثیر و بقاء سلولی، به ترتیب با روش های هموسایتومتری و MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium bromide] انجام شد. میزان بیان ژن های فاکتورهای نوروتروفیک در hASCs با روش RT-PCR مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج: hASCs به نشانگرهای CD44، CD73، CD90، CD105 پاسخ مثبت و به نشانگرهای CD34 و CD45 پاسخ منفی دادند و توانایی تمایز به سلول های چربی و استخوان را داشتند. نتایج شمارش سلولی و MTT نشان داد بقاء و تکثیر سلولی hASCs کشت شده در محیط سرم دار به مدت ۴۸ ساعت نسبت به سلول هایی که در محیط بدون سرم کشت داده شدند، به طور معنی داری افزایش یافته است. علاوه بر آن، سرم باعث شده بود که میزان بیان ژن های BDNF و NT-3 نسبت به سلول هایی که در محیط بدون سرم کشت داده شده بودند افزایش معنی داری را نشان دهد.

نتیجه گیری: محیط کشت سرم دار موجب افزایش بقاء و تکثیر سلولی و افزایش بیان ژن های BDNF و NT-3 در hASCs استخراج شده از چربی زیر جلدی ناحیه شکم خانم های سزارینی شد.

واژگان کلیدی: سلول های بنیادی چربی انسان، نوروتروفین ها، تکثیر، بقاء

Expression of neurotrophin genes in human adipose stem cells extracted from women during cesarean section at Velayat hospital in Damghan

Background: Stem cells derived from human adipose (hASCs) are a good source for treating neurological diseases. The aim of this study was to evaluate the expression of neurotrophin genes of hASCs.

Materials and Methods: In this study, the abdominal subcutaneous fat of cesarean women in Velayat hospital of Damghan were used. After mechanical and enzymatic digestion of fat tissue, extracted cells were seeded in a α -MEM containing 10% of fetal bovine serum. At fourth passage, the stemness related properties of cells were determined by flow cytometry and their differentiation into adipocyte and osteocyte. Cell proliferation and survival were done by using hemocytometry and MTT [3- (4,5-Dimethylthiazol-2-yl) -2,5-Diphenyltetrazolium bromide] methods respectively. The expression of neurotrophic factor genes of hASCs were examined by RT-PCR.

Results: hASCs had a positive response to CD44, CD73, CD90, CD105 markers and negative response to CD34 and CD45 markers and had the ability to differentiate into adipocyte and osteocyte. Results of cell count and MTT showed that survival and proliferation of hASCs cultured in serum-based medium for 48 hours were significantly increased compared to cultured cells in serum free medium. In addition, serum-based culture caused a significant increase of BDNF and NT-3 expression as compared to cultured cells in serum-free medium.

Conclusion: serum-based culture increased survival and cell proliferation and the expression of BDNF and NT-3 genes in hASCs extracted from subcutaneous abdominal fat of cesarean women.

Keywords: human adipose stem cells, neurotrophins, proliferation, survival.

بافت چربی از لایه مزودرم جنینی مشتق شده و در هر دو دوره پیش و پس از تولد تکوین می‌یابد [۱]. بافت چربی ارگانی پیچیده است که یک سوم آن ادیپوسایت‌های بالغ و دو سوم دیگر، ترکیبی از انواع سلول‌ها است. تکامل در پستانداران دو نوع بافت چربی با کیفیت‌های مختلف بافت‌شناسی را حفظ کرده است. بافت چربی سفید و بافت چربی قهوه‌ای که توسط انواع مختلف ادیپوسایت‌های بالغ ترکیب شده‌اند و هرکدام نقش‌های متفاوتی در متابولیسم انرژی دارند. عملکرد اولیه ادیپوسایت‌های سفید، ذخیره انرژی اضافه به صورت چربی و تجهیز آن در پاسخ به نیازهای متابولیکی است. ادیپوسایت‌های قهوه‌ای از چربی‌های انباشته شده به عنوان انرژی آزاد شده در فرم گرما استفاده می‌کنند. چربی قهوه‌ای در انسان، در طول رشد، دچار تغییرات مورفولوژیک شده و در نهایت هیچ مجموعه‌ای از آن را نمی‌توان در انسان بالغ یافت. چربی سفید را می‌توان در چندین مجموعه جداگانه و متمایز آناتومیکی یافت که دو زیرمجموعه عمده آن بافت چربی احشایی^۱ یا شکمی^۲ و بافت چربی زیرجلدی^۳ است [۲]. سلول‌های بنیادی چربی را می‌توان در هر نوع بافت چربی سفید از جمله چربی زیرجلدی و چربی امتنوم^۴ یافت [۳]. با توجه به مزایای فراوان ASCs، مطالعات و بررسی‌های اخیر، این سلول‌ها را برای اهداف خود مناسب دیده‌اند. این جمعیت سلولی که قابلیت تمایز به چندین رده سلولی^۵ را دارند از استرومای چربی به دست می‌آید و برای اولین بار توسط زوک^۶ و همکارانش در سال ۲۰۰۱ شرح داده شد. او از اصطلاح سلول‌های جدا شده از اسپیراسیون چربی استفاده کرد. از آنجاکه بافت چربی حاوی چندین نوع سلول است، لیپوآسپیره حاصل از آن را می‌توان با سانتریفیوژ پردازش و سلول‌های بنیادی آن را به طور مرتب جدا کرد. پس از سانتریفیوژ ممکن است بخش زیادی از سلول‌های چربی در طول پردازش از هم پاشیده شده و بمیرند. بخش دیگر سانتریفیوژ که بخش عروقی - استرومایی (SVF)^۷ نامیده می‌شود، 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 اندوتلیال و همچنین پری‌ادیپوسایت‌ها یا پیش‌سازهای ادیپوسایت است. گام نهایی، جدا کردن پری‌ادیپوسایت‌های چسبیده به ظروف کشت از دیگر سلول‌های SVF است. ASCs پس از چند پاساژ پی در پی در کشت و ویژگی چسبندگی، مولکول‌های گیرنده، آنزیم‌های سطحی، پروتئین‌های سیتواسکلتون و ماتریکس خارج سلولی و پروتئین‌های همراه با فنوتیپ سلول استرومایی را بیان می‌کنند [۵]. hASCs منبع خوبی از سلول‌های بنیادی بالغ برای سلول درمانی هستند. ویژگی‌های مشابه سلول‌های بنیادی مزانشیمی را نشان می‌دهند و دارای ظرفیت تمایز به استئوبلاست، کندروسیت، ادیپوزیتیک، میوزنیک و دودمان‌های عصبی هستند [۶]. جمع آوری بافت چربی بالغ، از لحاظ فنی آسان و ایمن است. علاوه بر این برداشتن ASCs از لحاظ اخلاقی مشکلی ندارد و تنها مقدار یک گرم از چربی می‌تواند در کشت مؤثر باشد. به این ترتیب در مقایسه با سلول‌های بنیادی دیگر، ASCs برای کاربردهای بالینی مناسب تر هستند [۷].

ASCs در مقایسه با BMSCs راحت‌تر کشت شده و سرعت تکثیر بالایی دارند [۸]. همچنین به مدت طولانی‌تری کشت داده می‌شوند، پیش از آن که پیر شوند [۹]. مطالعات نشان می‌دهند که hASCs، فاکتورهای نوروتروفیک بیان می‌کنند از جمله: فاکتور رشد عصبی (NGF)^۸، فاکتور نوروتروفیک مشتق شده از گلیال (GDNF)^۹، فاکتور نوروتروفیک مشتق شده از گلیال (BDNF)^۹، همچنین ممکن است این سلول‌ها مولکول‌های سطحی را برای تنظیم و تمایز عصبی بیان کنند که نشان‌دهنده توانایی hASCs در تمایز نورونیک است. بنابراین، به نظر می‌رسد hASCs در بحث سلول درمانی برای بیماری‌های عصبی و آسیب‌های مغزی مؤثر است [۱۱].

مواد و روش‌ها

جداسازی و کشت سلولی

¹ Visceral adipose tissue

² Abdominal adipose tissue

³ Subcutaneous adipose tissue

⁴ Omental fat

⁵ Multilineage

⁶ Zuk

⁷ Stromal-vascular fraction

⁸ Nerve growth factor

⁹ Brain derived neurotrophic factor

¹⁰ Glial-derived neurotrophic factor

در این تحقیق، سلول‌های بنیادی چربی از بافت چربی زیر جلدی شکم زنان باردار تحت جراحی سزارین در بیمارستان ولایت شهرستان دامغان (با کسب رضایت از بیماران) تهیه شد. بلافاصله پس از جراحی، بافت چربی به آزمایشگاه منتقل شد. قطعات بافت چربی تحت شرایط استریل، پس از هضم مکانیکی با استفاده از تیغ اسکالپل، به قطعات کوچک‌تری تبدیل شده و هضم آنزیمی توسط کلاژناز (۲/۰ درصد) انجام شد. کلاژناز با حجمی برابر از محیط α -MEM غنی شده با ۱۰ درصد سرم جنین گاو (FBS) غیرفعال شده و پس از سانتریفیوژ (دور ۱۲۰۰rpm، ۵min، دمای 37°C) سلول‌ها داخل فلاسک 25cm^2 در معرض محیط α -MEM غنی شده با ۱۰ درصد و پنی‌سیلین-استرپتومایسین ۱ درصد و در انکوباتور (دمای 37°C درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۹۵ درصد و CO_2 پنج درصد) قرار داده شدند. پس از گذشت ۷۲ ساعت محیط رویی تعویض شد. سلول‌های استرومایی به کف فلاسک چسبیده، باقی مانده و سلول‌های خونی با تعویض محیط حذف شدند. پس از رسیدن سلول‌ها به تراکم $80-70$ درصد با کمک محلول تریپسین/EDTA سلول‌ها از کف فلاسک جدا و به نسبت ۲:۱ پاساژ داده شدند. در این مطالعه از سلول‌های پاساژ چهارم استفاده شد.

گروه‌های مورد مطالعه:

الف) سلول‌های کشت داده شده در محیط کشت حاوی سرم ۱۰ درصد (Medium+fbs) سلول‌هایی که در محیط فاقد سرم کشت داده شدند (Medium)

تأیید هویت سلول‌ها با روش فلوسایتومتری

برای تأیید هویت مزانشیمی، بیان نشانگرهای سطحی CD90, CD73, CD105, CD44, CD34, CD45 با روش فلوسایتومتری در تعداد 10^6 سلول بررسی شد.

تمایز hADSCs به سلول‌های استخوانی

پس از کشت سلول‌های پاساژ چهارم در پلیت ۱۲ خانه و رسیدن به تراکم $90-80$ درصد، محیط کشت اختصاصی استخوان-ساز (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 رنگ‌آمیزی آلزارین رد (Sigma A5533) بررسی شد. ابتدا سلول‌ها با PBS شسته و مدت ۱ ساعت در دمای 4°C درجه سانتی‌گراد در معرض محلول فیکساتیو فرمالدئید ۴ درصد قرار داده شدند. سپس سلول‌ها به مدت ۲ دقیقه در معرض محلول رنگی آلزارین 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 $90-80$ درصد، محیط کشت اختصاصی چربی-ساز (Adipogenesis Differentiation Medium, Life technology) اضافه شد. هر ۳ روز یکبار تعویض محیط انجام شد و پس از گذشت ۲۱ روز تمایز سلول‌ها با روش رنگ‌آمیزی اوایل رد (Sigma O0625) بررسی شد. ابتدا سلول‌ها با PBS شسته و مدت ۱ ساعت در دمای 4°C درجه سانتی‌گراد در معرض محلول فیکساتیو فرمالدئید ۴ درصد قرار داده شدند. سپس سلول‌ها را با الکل ۷۰ درصد شسته و به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه در معرض محلول رنگی اوایل رد قرار داده شدند. در مرحله‌ی بعد محلول رنگی را خارج کرده و سلول‌ها را ۳ بار با الکل ۷۰ درصد شستشو داده با میکروسکوپ مشاهده و عکس‌برداری گردید.

ارزیابی تکثیر سلولی به وسیله لام نئوبار و تریپان بلو

ارزیابی میزان حیات و تکثیر سلولی توسط لام نئوبار و رنگ تریپان بلو انجام شد. سلول‌ها با تریپسین از فلاسک کشت جدا شده و سانتریفیوژ شدند. با رسوب بدست آمده سوسپانسیون سلولی تهیه و به نسبت مساوی تریپان بلو اضافه شد (ده میکرولیتر سوسپانسیون سلولی و ده میکرولیتر

تریان بلو). شمارش سلولی توسط میکرو سکوپ نوری انجام شد. تریان بلو با تخریب غشاء در سلول‌های مرده نفوذ می‌کند. به همین دلیل سلول‌های مرده به رنگ آبی و سلول‌های زنده بی‌رنگ دیده می‌شوند. تکثیر سلولی در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت بررسی شد.

ارزیابی حیات و تکثیر سلولی به روش [MTT[3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium bromide]

ارزیابی حیات و سرعت تکثیر hASCs به روش MTT انجام شد. سلول‌های پاساژ چهارم با تراکم 2×10^4 سلول در هر خانه پلیت ۹۶ خانه با ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت α -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) ۵mg/ml افزوده و به مدت ۴ ساعت در شرایط ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس ۸۵ میکرولیتر از محیط رویی برداشته و ۵۰ میکرولیتر دی متیل سولفوکساید (DMSO) اضافه گردید و به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه شده و در نهایت میزان جذب، در طول موج ۵۴۰nm با دستگاه ELIZA reader (BioTek) اندازه‌گیری شد.

بررسی مولکولی بیان ژنهای اعضای خانواده نوروتروفین

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

استخراج RNA

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

سنتز DNA مکمل (cDNA)

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

واکنش PCR

واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام شد. برای اطمینان از توزیع یکسان مواد، ابتدا مخلوط مستر همه‌ی 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، دمای ۹۴ و ۵۸-۵۷ درجه هر کدام ۳۰ ثانیه. پس از اتمام ۳۰ سیکل، ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه قرار گرفت.

دمای Annealing بر اساس Tm پرایمرها تعیین می‌شود. Tm پرایمر ژن‌های NTF4، BDNF، NGF، NTF3 و ۵۷ °C، Tm پرایمر ژن‌های GDNF و GAPDH، ۵۵ °C تعیین شد. از ژن GAPDH به عنوان ژن کنترل داخلی استفاده شد. برای مشخص شدن

¹ Neurotrophin-3

² Neurotrophin-4

تکثیر قطعه مورد نظر و بیان ژن، محصول PCR به روش الکتروفورز با ژل آگارز ۱/۵ درصد بررسی شد. تمامی ژل‌های آگارز تهیه شده با استفاده از دستگاه نمایشگر ژل بررسی شدند. عکس ژل محصولات PCR با نرم افزار ImageJ بررسی شد. توالی پرایمرها به شرح زیر است: (HF:Human Forward ; HR:Human Reverse) [۱۲، ۱۳]

HF-NGF: 5'- ATACAGGCGGAACCACACTCAG-3'
HR-NGF: 5'- GTCC ACAGTAATGTTGCGGGTC-3'
HF-BDNF: 5'- AGAGGCTTGACATCATTGGCTG-3'
HR-BDNF: 5'- CAAAGGCACTTGACTACTGAGCATC-3'
HF- NTF3: 5'- GGGAGATCAAAACGGGCAAC-3'
HR- NTF3: 5'- ACAAGGCACACACACAGGAC-3'
HF- NTF4: 5'- CTGTGTGCGATGCAGTCAGT-3'
HR- NTF4: 5'- TGCAGCGGGTTTCAAAGAAGT-3'
HF-GDNF: 5'-CACCAGATAAACAATGGCAGTGC-3'
HR-GDNF: 5'-CGACAGGTCATCATCAAAGGCG-3'

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 و به سلول‌های استرومایی افزوده شده است (شکل ۱).

تأیید هویت سلول‌های بنیادی چربی با روش فلوسایتومتری

hASCs با آنتی بادی علیه آنتی ژن نشان‌دار و با فلوسایتومتری مورد بررسی قرار گرفت. سلول‌ها به نشانگرهای CD44، CD73، CD90، CD105 پاسخ مثبت و به نشانگرهای CD34 و CD45 پاسخ منفی دادند (شکل ۲).

قابلیت تمایز چند توانی سلول‌های بنیادی چربی انسانی به چربی و استخوان

در این مطالعه، برای نشان دادن قابلیت چند ظرفیتی hASCs، تمایز آن‌ها به سلول چربی و استخوانی نشان داده شده است. پس از اینکه سلول‌ها در معرض محیط تمایز ادیپوژنیک و استئوژنیک قرار گرفتند، به تدریج مورفولوژی شبیه ادیپوسایت و استئوبلاست ظاهر شده و پس از سه هفته رنگ‌آمیزی اختصاصی انجام شد. تمایز ادیپوژنیک با تجمع قطرات لیپیدی در طول هفته اول آغاز شد که پس از ۲۱ روز با Oil Red O رنگ‌آمیزی و مشاهده شد (شکل ۳، E و D). همچنین تمایز استئوژنیک با تولید فسفات کلسیم و ماتریکس خارج سلولی معدنی، پس از ۲۱ روز با رنگ‌آمیزی Alyzarin Red مشاهده شد (شکل ۳، C و B).

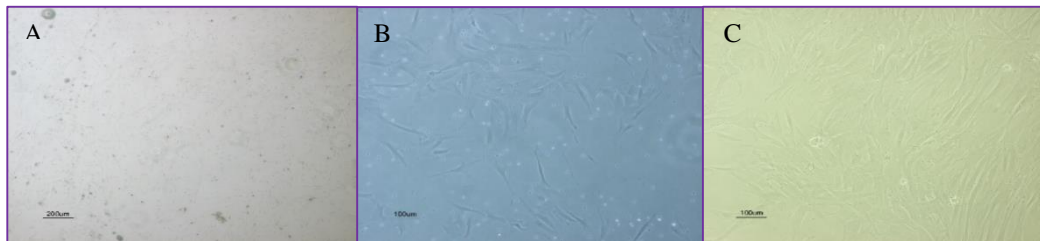
نتایج شمارش سلولی به روش هموسایتومتری

در این پژوهش تأثیر محیط کشت بر بقای hASCs مورد بررسی قرار گرفت. شمارش سلول‌ها در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت با روش هموسایتومتری انجام شد. شمارش سلول و بررسی‌های آماری نشان داد که سرعت تکثیر سلول‌هایی که در محیط حاوی سرم ۱۰٪ و به مدت ۴۸ ساعت کشت داده شده بودند، افزایش معنی داری را در مقایسه با سلول‌هایی که در محیط فاقد سرم بودند نشان داد. همچنین سلول‌های بنیادی چربی که مدت ۲۴ ساعت کشت داده شده بودند کاهش معنی داری در سرعت تکثیر نسبت به گروه‌های مشابه در ۴۸ ساعت را نشان دادند (شکل ۴).

نتایج ارزیابی حیات و تکثیر سلولی به روش MTT

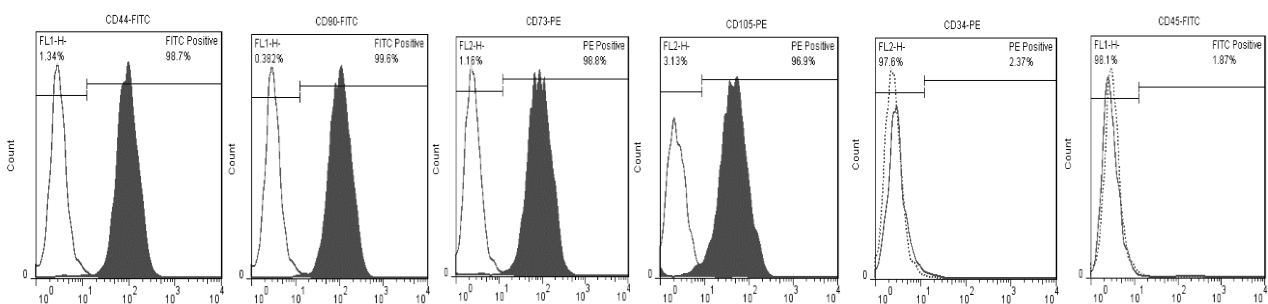
سرعت تکثیر سلول‌ها در ۲۴ و ۴۸ ساعت با روش MTT بررسی شد. سرعت تکثیر در سلول‌هایی که به مدت ۲۴ ساعت و همچنین ۴۸ ساعت در محیط و سرم کشت داده شده بودند در مقایسه با گروه‌های مشابه خودشان در محیط بدون سرم افزایش معنی‌داری را نشان داد. از طرفی نیز سلول‌هایی که ۴۸ ساعت در محیط سرم دار بودند، نسبت به سلول‌هایی که به مدت ۲۴ ساعت در همین شرایط کشت داده شده بودند مشاهده نشد (شکل ۵).

در مطالعه حاضر، میزان بیان فاکتورهای نوروتروفیک در hASCs بررسی شده است. محیط کشت سرم‌دار بیان ژن‌های BDNF و NT-3 را در این سلول‌ها به طور معنی‌داری افزایش داد، اما در میزان بیان ژن‌های NT-4، GDNF و NGF تأثیری چشمگیری نداشت (شکل ۶).



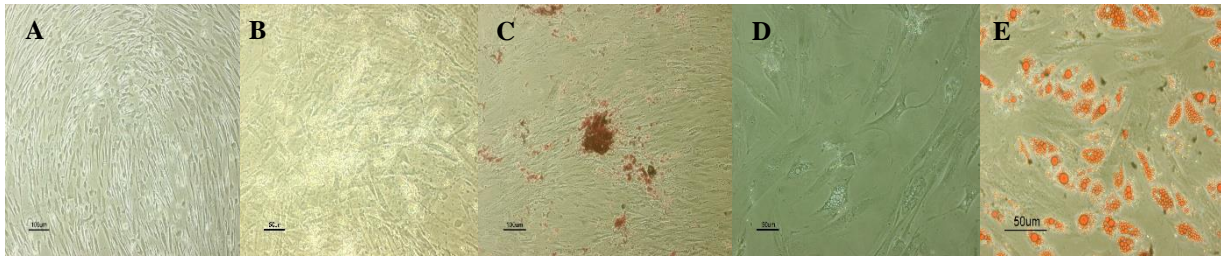
شکل ۱: بررسی مورفولوژیکی سلول‌های بنیادی چربی انسان.

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



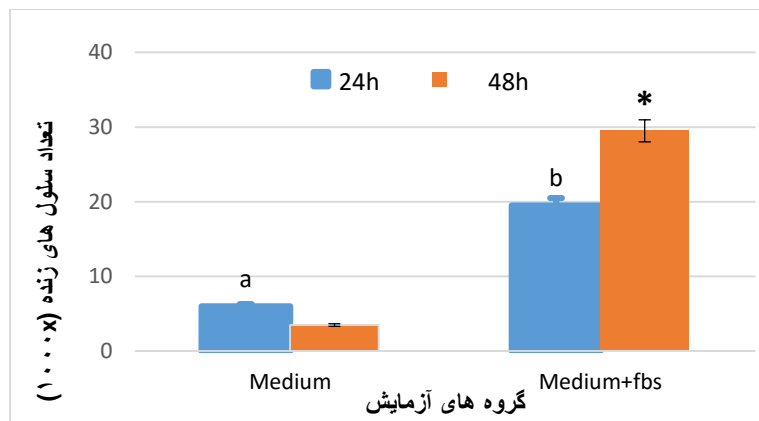
شکل ۲: نشانگرهای سطحی hASCs

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



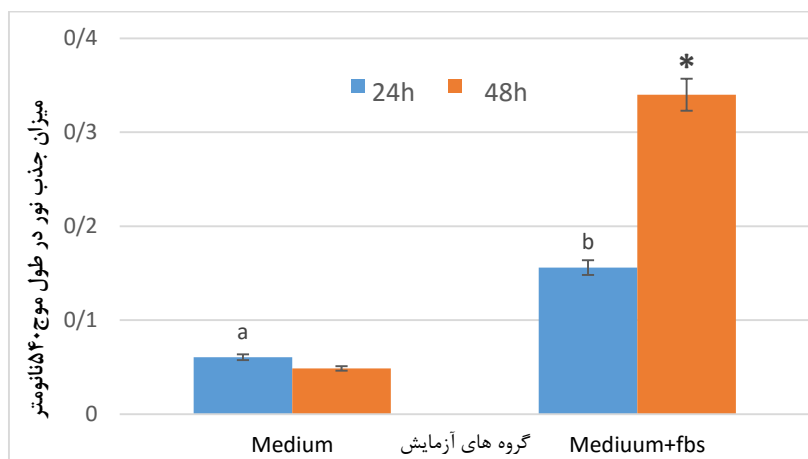
شکل ۳: سلول های بنیادی چربی انسان تمایز یافته به استخوان و چربی در محیط کشت خاص:

A. کنترل: سلول های تمایز نیافته ای که در محیط کشت القایی قرار نگرفته اند. B. سلول های تمایز یافته به استخوان. C. سلول های تمایز یافته به استخوان پس از رنگ آمیزی با Alizarin Red، رسوب تیغه های استخوانی در فضاهای بین سلولی مشاهده می گردند، بزرگنمایی $\times 10$. D. سلول های تمایز یافته به چربی قبل از رنگ آمیزی که گرانول های چربی در سیتوپلاسم قابل مشاهده هستند. E. سلول های تمایز یافته به چربی پس از رنگ آمیزی با Oil Red-O که گرانول های چربی رنگ شده اند.



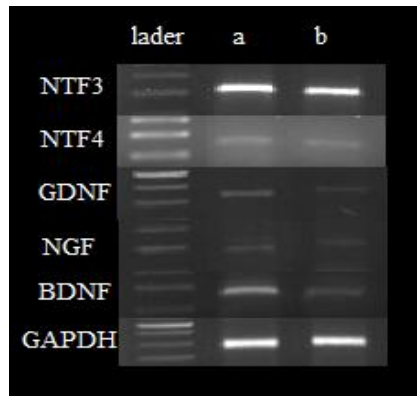
شکل ۴: بررسی در صد سلول های زنده با روش هموسایتومتری در hASCs در مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت.

گروه ها: Medium: محیط کشت بدون سرم، Medium+fbs: محیط کشت + سرم. *معنی دار بودن با گروه ۲۴ ساعت



شکل ۵: بررسی سرعت تکثیر hASCs با روش MTT به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت.

گروه ها: Medium: محیط کشت بدون سرم، Medium+fbs: محیط کشت + سرم. *معنی دار بودن با گروه ۲۴ ساعت



شکل ۶: آنالیز واکنش زنجیره پلیمرز با رونویسی معکوس برای بیان ژن‌های نوروتروفین در hASCs

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

ژن GAPDH (Glyceraldehyde3-phosphate dehydrogenase) به عنوان رفرنس داخلی جهت نرمالایز کردن به کار رفت.

(نمودار مربوط به بررسی بیان ژن را نگذاشته اید)

بحث

مطالعه بر روی سلول‌های بنیادی پرتوان، احتمالات جدیدی برای سلول‌درمانی به وجود می‌آورد. از آنجا که کاربرد سلول‌های بنیادی جنینی انسان از نظر اخلاقی بحث برانگیز است، بنابراین سلول‌های بنیادی بالغ مزانشیمی به خصوص BMSCs بیشتر مورد توجه قرار گرفته است. با این حال، تکثیر و پتانسیل تمایز استوژنیک BMSCs با پیری همراه است و استفاده از آن‌ها در درمان سلولی اتولوگ در بیماران مسن نامناسب است. hASCs با چندین مزیت از جمله استخراج آسان، فراوانی نسبی، قدرت تکثیر بالا در شرایط کشت آزمایشگاهی و قابلیت نگهداری به صورت منجمد، به عنوان یک منبع جایگزین ایده‌آل شناسایی شده‌اند [۱۴]. ASCs سلول‌های چندتوان هستند که برای مدت طولانی نگهداری می‌شوند و در آزمایشگاه به تمام دودمان‌های مزانشیمی تمایز می‌یابند. این سلول‌ها برای پیوند اتولوگ مناسب هستند و با قرار گرفتن در محیط کشت‌های خاص، توانایی تمایز به سلول‌های عصبی، شوان، سلول‌های بتا و هیپاتوسیت‌ها را دارند. جداسازی این سلول‌های بنیادی، تأثیری چشمگیر در طب ترمیمی و سلول‌درمانی دارد [۱۵]. با توجه به پتانسیل درمانی قابل توجه MSCs در شاخه‌های مختلف پزشکی، معیارهایی برای تعریف این سلول‌ها پیشنهاد شده است: ۱- MSCs در شرایط کشت استاندارد باید خاصیت چسبندگی داشته باشند ۲- باید نشانگرهای CD73, CD105, CD90, را بیان کنند و فاقد نشانگرهای CD45, CD34, CD14, CD79a و یا مولکول‌های سطحی HLA-DR باشند ۳- باید در شرایط آزمایشگاه به استئوبلاست، ادیپوسایت و کندروبللاست تمایز یابند [۱۶, ۴]. بنابراین منطقی است که برای اثبات MSCs بودن سلول‌ها، معیارهای ذکر شده بررسی شود.

سلول‌های بنیادی چربی زیرجلدی، ویژگی چسبندگی به فلاسک‌های کشت را دارند و در آغاز با مورفولوژی دوکی شکل یا ستاره‌ای ظاهر می‌شوند. سپس از پاساژ دوم یا سوم به بعد، مورفولوژی فیروبللاستی پهن و کشیده از خود به نمایش می‌گذارند [۶, ۱۷, ۱۸]. Zhu و همکارانش، hASCs را تا بیش از ۲۵ پاساژ کشت دادند و کیتیک رشد و قدرت تمایزی آنها را بررسی کردند [۱۹]. در تحقیق حاضر، در طی هفته‌ی اول، hASCs به دلیل چسبیدن به کف فلاسک کشت از سلول‌های خونی شناور جدا شدند. مورفولوژی فیروبللاستی و دوکی شکل سلول‌ها مشاهده و به تدریج با افزایش پاساژ از سرعت تکثیر کاسته شد. به منظور تأیید هویت بنیادی سلول‌های مزانشیمی، ماهیت نشانگرهای سطحی آنها با روش فلوسایتمتری بررسی شد. محققان زیادی ایمونوفنوتیپ‌های سطحی ASCs جدا شده از چربی انسان و گونه‌های دیگر را بررسی کرده‌اند. با وجود روش‌های یکسان جداسازی و کشت، ایمونوفنوتیپ‌های به دست آمده در آزمایشگاه‌های مختلف، نسبتاً مشابه هستند. در واقع ایمونوفنوتیپ‌های سطحی ASCs همانند BMSCs و MSCs است. ایمونوفنوتیپ‌های سطحی ASCs و MSCs در مقایسه با هم، ۹۰٪ یکسان هستند [۸]. در مطالعات متعدد گزارش شده است که hASCs، نشانگرهایی از جمله CD106 [۱۶, ۲۰], CD29, CD73, CD105, CD90 را بیان

می‌کنند. درحالی‌که نشانگرهای سطحی سلول خونساز مثل CD45 و CD34 را بیان نمی‌کنند [۱۶، ۲۱]. در مطالعه حاضر، حدود ۱۰٪ سلول حاصل از پاساژ چهارم یا پنجم برای برخی از نشانگرهای ذکر شده بررسی شد. نتایج به دست آمده با گزارش‌های قبل مطابقت دارد. بیش از ۹۶٪ از سلول‌ها برای نشانگرهای CD90, CD44, CD105, CD73 مثبت بودند. این میزان در مورد CD90 به میزان ۹۹/۶٪ رسید. همچنین بیش از ۹۷٪ از سلول‌ها به نشانگرهای CD34 و CD45 پاسخ منفی دادند. در ادامه‌ی بررسی ماهیت بنیادی مزانشیمی hASCs قابلیت تمایز آنها به سلول چربی و استخوان مورد آزمایش قرار گرفت. معمولاً تمایز ادیپوژنیک و استئوژنیک به ترتیب این‌گونه تعریف می‌شود: سلول‌های حاوی قطرات چربی درون سلولی که با رنگ‌آمیزی اویل‌رد مشخص می‌شوند و سلول‌هایی با افزایش بیان آلکالین فسفاتاز و مینرالیزه شده که با رنگ‌آمیزی آلیزارین‌رد می‌توان معدنی شدن آنها را مشخص کرد [۱۶]. در بیشتر مطالعاتی که بر روی hASCs انجام می‌شود، پتانسیل تمایز سلول‌ها نیز بررسی می‌شود. به طوری‌که در همه‌ی آنها قابلیت تمایز hASCs به ادیپوسایت و استئوبلاست نشان داده شده است [۱۶، ۲۲-۲۴]. در این مطالعه، پس از اینکه سلول‌ها در معرض محیط تمایز ادیپوژنیک و استئوژنیک قرار گرفتند، به تدریج مورفولوژی شبیه ادیپوسایت و استئوبلاست ظاهر شده و پس از سه هفته رنگ‌آمیزی اختصاصی انجام شد. تمایز ادیپوژنیک با تجمع قطرات لیپیدی در طول هفته اول آغاز شد که پس از ۲۱ روز با Oil Red-O رنگ‌آمیزی و مشاهده شد. همچنین تمایز استئوژنیک با تولید فسفات کلسیم و ماتریکس خارج سلولی معدنی، پس از ۲۱ روز با رنگ‌آمیزی Alyzarin Red مشاهده شد. در این پژوهش بقاء و سرعت تکثیر hASCs مورد بررسی قرار گرفت. نتایج شمارش سلولی و MTT نشان داد بقاء و تکثیر سلولی hASCs کشت شده با محیط سرم‌دار در زمان ۴۸ ساعت نسبت به سلول‌هایی که در محیط فاقد سرم کشت داده شده بودند، به طور معنی‌داری افزایش یافته است.

فاکتورهای نوروتروفیک در بقاء، رشد، تمایز و مهاجرت سلول‌های سیستم عصبی نقش مهمی ایفا می‌کنند. علاوه بر این، برخی از آنها برای تنظیم شکل‌پذیری^۱ سیناپس در مغز پس از تولد مورد نیاز هستند [۲۵]. BDNF و NGF برای شکل‌پذیری هیپوکمپ لازم هستند و کاهش آنها با تخریب نورون‌های کولینرژیک و اختلالات شناختی در آلزایمر مرتبط است [۲۶]. گزارش شده است که GDNF در نورون‌های باقی‌مانده جسم سیاه در مغز بیماران پارکینسونی کاهش می‌یابد [۲۷]. نوروتروفین‌ها به عنوان گزینه‌های درمانی نوروپروتکتیو در بیماری‌های پارکینسون، آلزایمر، هانتینگتون، آمیوتروفیک لترال اسکلروزیس و نوروپاتی محیطی محسوب می‌شوند. شواهد قابل توجهی در جوندگان و پستانداران نشان داده است که تأثیر نوروتروفین‌هایی مانند NGF و BDNF موجب جلوگیری از مرگ نورون‌ها، بهبود سیگنالینگ سلولی، بازگرداندن حافظه و یادگیری و جلوگیری از زوال شناختی وابسته به سن می‌شود [۲۸]. در بررسی‌های مغز افراد پارکینسونی پس از مرگشان مشخص شده است که سطح پروتئین BDNF در مناطقی همچون جسم سیاه، هسته دمی و پوتامن کاهش یافته است [۲۹]. براساس یافته‌های کشت سلول و مدل‌های حیوانی، فاکتورهای نوروتروفیک به عنوان عوامل درمانی بالقوه در اختلالات عصبی محسوب می‌شوند. فاکتورهای نوروتروفیک نیمه عمر کوتاهی دارند که کاربرد مستقیم آنها را محدود می‌کند. از طرفی، وزن مولکولی نسبتاً زیاد این مولکول‌ها نیز مانع عبور آنها از سد خونی مغزی می‌شود [۳۰]. بنابراین در کنار تزریق داخل مغزی پروتئین‌های نوروتروفیک، روش‌های دیگری برای هدف قرار دادن مکانیسم عمل این فاکتورها در مغز وجود دارد: مانند فعال کردن گیرنده آنها با کمک مولکول‌های کوچک آگونیست [۳۱]. استفاده از روش دارودرمانی که ترشح اندوژن فاکتورهای نوروتروفیک را تحریک می‌کند [۳۲] و پیوند سلول‌های ترشح‌کننده فاکتورهای نوروتروفیک [۳۳]. تحقیقات نشان داده است که ASCs قادر به ترشح انواع فاکتورهای رشد هستند و به طور مؤثری از روند تمایز عصبی پشتیبانی می‌کنند. سلول‌های ترشح‌کننده فاکتورهای نوروتروفیک حاصل از ASCs قادر به ترشح بیشتر این فاکتورها هستند. بنابراین می‌توان از این سلول‌ها برای پیوند استفاده کرد [۱۱]. پیوند سلول‌های ترشح‌کننده نوروتروفین موجب بهبود در علائم برخی از بیماری‌های نورودژنراتیو می‌شود [۳۴]. در مطالعات *in vivo* و *in vitro* نشان داده شده است که hASCs موجب افزایش بیان ژن‌های BDNF، GDNF، NGF و افزایش سطح پروتئین آن‌ها می‌شوند [۳۵، ۳۶]. ترشح BDNF توسط hASCs باعث تحریک رشد آکسون و بازسازی عصب در مدل حیوانی آسیب مغزی می‌شود [۳۵]. گزارش شده است که میزان بیان BDNF در سلول‌های بنیادی مزانشیمی مختلف انسانی از جمله hADSCs به شرایط کشت و حضور فاکتورهای مناسب بستگی دارد و hASCs توانایی افزایش ترشح این فاکتور نوروتروفیک را دارد [۳۷]. فعالیت پروتئین GDNF تولید شده از hASCs در آزمایشگاه موجب تحریک و القاء رگ‌زایی می‌شود [۳۸]. محیط کاندیشنال به دست آمده از hASCs حاوی فاکتورهای نوروتروفیک و نوروپروتکتیو مختلف از جمله

¹ Plasticity

BDNF، فاکتور رشد اندوتلیالی عروق (VEGF)^۱، فاکتور رشد کبدی (HGF)^۲، NGF و فاکتور رشد شبه انسولینی (IGF-1)^۳ است و در مدل‌های کشت سلولی و حیوانی ضایعه عصبی باعث محافظت نورونی می‌شود [۳۹]. NGF موجود در محیط کاندیشنال به دست آمده از hASCs نقش مهمی در حفاظت از نورون‌ها در موش مدل جهش یافته سوپراکسیددسموتاز نشان می‌دهد [۴۰]. در این پژوهش بیان ژن‌های BDNF، NT-3، NT-4، GDNF و NGF در hASCs کشت شده با محیط سرم‌دار و محیط بدون سرم بررسی و مشخص شد که میزان بیان ژن‌های BDNF و NT-3 در hASCs کشت شده در محیط سرم‌دار افزایش معنی‌داری نسبت به محیط بدون سرم می‌شود. در مورد ژن‌های دیگر اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد.

نتیجه گیری

محیط کشت سرم‌دار می‌تواند موجب افزایش بقا و تکثیر سلولی و همچنین افزایش بیان ژن‌های BDNF و NT-3 در hASCs استخراج شده از چربی زیر جلدی ناحیه شکمی شود.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل بخشی از پایان نامه خانم آرزو امیری برای اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته بافت‌شناسی و جنین‌شناسی در دانشگاه دامغان بود. بدین وسیله از دانشکده زیست‌شناسی دانشگاه دامغان به خاطر پرداخت هزینه مواد، وسایل و در اختیار قرار دادن امکانات آزمایشگاهی تشکر و قدردانی می‌گردد.

References:

1. Martin RJ, Hausman GJ, Hausman DB: **Regulation of adipose cell development in utero.** *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine Society for Experimental Biology and Medicine (New York, NY)* 1998, **219**(3):200-210.
2. Vindigni V, Giatsidis G, Reho F, Dalla Venezia E, Mammanna M, Franco B: **Adipose derived stem cells: current state of the art and prospective role in regenerative medicine and tissue engineering.** *Regenerative medicine and tissue engineering, ISBN* 2013:953-978.
3. Kitada M, Dezawa M: **Parkinson's disease and mesenchymal stem cells: potential for cell-based therapy.** *Parkinson's disease* 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 journal of stem cells* 2011, **3**(4):25-33.
5. Gimble JM, Katz AJ, Bunnell BA: **Adipose-derived stem cells for regenerative medicine.** *Circulation research* 2007, **100**(9):1249-1260.
6. Guo X, Li S, Ji Q, Lian R, Chen J: **Enhanced viability and neural differentiation potential in post-thaw hADSCs by agarose multi-well dishes and spheroid culture.** *Human cell* 2015, **28**(4):175-189.
7. Egashira Y, Sugitani S, Suzuki Y, Mishiro K, Tsuruma K, Shimazawa M, Yoshimura S, Iwama T, Hara H: **The conditioned medium of murine and human adipose-derived stem cells exerts neuroprotective effects against experimental stroke model.** *Brain research* 2012, **1461**:87-95.
8. Mitchell JB, McIntosh K, Zvonick S, Garrett S, Floyd ZE, Kloster A, Di Halvorsen Y, Storms RW, Goh B, Kilroy G *et al*: **Immunophenotype of human adipose-derived cells: temporal changes in stromal-associated and stem cell-associated markers.** *Stem cells (Dayton, Ohio)* 2006, **24**(2):376-385.
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 (Dayton, Ohio)* 2006, **24**(5):1294-1301.
10. Wang X, Zhao Z, Gong J, Zhou S, Peng H, Shatara A, Zhu TZ, Meltzer R, Du Y, Gu H: **Adipose stem cells-conditioned medium blocks 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity via the IGF-1/PI3K/AKT pathway.** *Neuroscience letters* 2014, **581**:98-102.

¹ Vascular endothelial growth factor

² Hepatocyte growth factor

³ Insulin-like growth factor-1

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.** *Development, growth & differentiation* 2013, **55**(6):648-655.
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 and development* 2013, **23**(7):741-754.
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 and development* 2012, **21**(15):2817-2826.
14. Chen HT, Lee MJ, Chen CH, Chuang SC, Chang LF, Ho ML, Hung SH, Fu YC, Wang YH, Wang HI *et al*: **Proliferation and differentiation potential of human adipose-derived mesenchymal stem cells isolated from elderly patients with osteoporotic fractures.** *Journal of cellular and molecular medicine* 2012, **16**(3):582-593.
15. Ogura F, Wakao S, Kuroda Y, Tsuchiyama K, Bagheri M, Heneidi S, Chazenbalk G, Aiba S, Dezawa M: **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):717-728.
16. Oliva-Olivera W, Coin-Araguez L, Salas J, Lhamyani S, Gentile AM, Sarria Garcia E, Hmadcha A, Zayed H, Vega-Rioja A, Tinahones FJ *et al*: **Myocardial Ischemic Subject's Thymus Fat: A Novel Source of Multipotent Stromal Cells.** *PloS one* 2015, **10**(12):e014440.
17. Witkowska-Zimny M, Walenko K: **Stem cells from adipose tissue.** *Cellular & molecular biology letters* 2011, **16**(2):236-257.
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.** *International journal of clinical and experimental pathology* 2014, **7**(1):174-183.
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 and function* 2008, **26**(6):664-675.
20. Izadpanah R, Trygg C, Patel B, Kriedt C, Dufour J, Gimble JM, Bunnell BA: **Biologic properties of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue.** *Journal of cellular biochemistry* 2006, **99**(5):1285-1297.
21. Ribeiro TB, Duarte AS, Longhini AL, Pradella F, Farias AS, Luzo AC, Oliveira AL, Olalla Saad ST: **Neuroprotection and immunomodulation by xenografted human mesenchymal stem cells following spinal cord ventral root avulsion.** *Scientific reports* 2015, **5**:16167.
22. 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 research & therapy* 2016, **7**(1):84.
23. 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 international* 2016, **2016**:2152435.
24. Huang S, Wang S, Bian C, Yang Z, Zhou H, Zeng Y, Li H, Han Q, Zhao RC: **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):2531-2540.
25. Airaksinen MS, Saarma M: **The GDNF family: signalling, biological functions and therapeutic value.** *Nature reviews Neuroscience* 2002, **3**(5):383-394.
26. Conner JM, Franks KM, Titterness AK, Russell K, Merrill DA, Christie BR, Sejnowski TJ, Tuszynski MH: **NGF is essential for hippocampal plasticity and learning.** *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2009, **29**(35):10883-10889.
27. Chauhan NB, Siegel GJ, Lee JM: **Depletion of glial cell line-derived neurotrophic factor in substantia nigra neurons of Parkinson's disease brain.** *Journal of chemical neuroanatomy* 2001, **21**(4):277-288.
28. Deinhardt K, Chao MV: **Trk receptors.** *Handbook of experimental pharmacology* 2014, **220**:103-119.
29. Mogi M, Togari A, Kondo T, Mizuno Y, Komure O, Kuno S, Ichinose H, Nagatsu T: **Brain-derived growth factor and nerve growth factor concentrations are decreased in the substantia nigra in Parkinson's disease.** *Neuroscience letters* 1999, **270**(1):45-48.
30. Moller JC, Sautter J, Kupsch A: **Potential of neurotrophic factors in therapy of Parkinson's disease.** *Journal of neural transmission Supplementum* 1996, **48**:103-112.
31. Tokugawa K, Yamamoto K, Nishiguchi M, Sekine T, Sakai M, Ueki T, Chaki S, Okuyama S: **XIB4035, a novel nonpeptidyl small molecule agonist for GFRalpha-1.** *Neurochemistry international* 2003, **42**(1):81-86.

32. Visanji NP, Orsi A, Johnston TH, Howson PA, Dixon K, Callizot N, Brotchie JM, Rees DD: **PYM50028, a novel, orally active, nonpeptide neurotrophic factor inducer, prevents and reverses neuronal damage induced by MPP+ in mesencephalic neurons and by MPTP in a mouse model of Parkinson's disease.** *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2008, **22**(7):2488-2497.
33. 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):1162-1166.
34. Sadan O, Melamed E, Offen D: **Intrastratial transplantation of neurotrophic factor-secreting human mesenchymal stem cells improves motor function and extends survival in R6/2 transgenic mouse model for Huntington's disease.** *PLOS Currents Huntington Disease* 2012.
35. Lopatina T, Kalinina N, Karagyaur M, Stambolsky D, Rubina K, Revischin A, Pavlova G, Parfyonova Y, Tkachuk V: **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.
36. 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 and development* 2014, **23**(7):741-754.
37. Zemel'ko VI, Kozhukharova IB, Alekseenko LL, Domnina AP, Reshetnikova GF, Puzanov MV, Dmitrieva RI, Grinchuk TM, Nikol'skii NN, Anisimov SV: **[Neurogenic potential of human mesenchymal stem cells isolated from bone marrow, adipose tissue and endometrium: a comparative study].** *Tsitologiya* 2013, **55**(2):101-110.
38. Zhong Z, Gu H, Peng J, Wang W, Johnstone BH, March KL, Farlow MR, Du Y: **GDNF secreted from adipose-derived stem cells stimulates VEGF-independent angiogenesis.** *Oncotarget* 2016, **7**(24):36829-36841.
39. Kim IG, Piao S, Lee JY, Hong SH, Hwang T-K, Kim SW, Kim CS, Ra JC, Noh I, Lee JY: **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 Engineering Part A* 2012, **19**(1-2):14-23.
40. Fontanilla CV, Gu H, Liu Q, Zhu TZ, Zhou C, Johnstone BH, March KL, Pascuzzi RM, Farlow MR, Du Y: **Corrigendum: Adipose-derived Stem Cell Conditioned Media Extends Survival time of a mouse model of Amyotrophic Lateral Sclerosis.** *Scientific reports* 2016, **6**:20747.