پژوهنده (مجله پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی)
سال هجدهم، شماره ۵، پی در پی ۹۵، صفحات ۲۵۴ تا ۲۶۶
آذر و دی ۱۳۹۲

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۲/۶/۲۷
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۲/۱۰/۲۳

بررسی عملکرد سلول‌های شبه عصبی حرکتی مشتق از بافت چربی موش صحرایی با استفاده از رنگ‌آمیزی کلسیم داخل سلولی و ارزیابی ترشح وزیکول‌های سیناپسی

*مرضیه درویشی[۱]، دکتر تقی طریحی[*۲]، دکتر علیرضا دلشاد[۳]، دکتر علیرضا مصباح نمین[۴]، دکتر طاهر طاهری[۵]*

۱. گروه علوم تشریح، ساختمان علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران
۲. مرکز تحقیقات علوم و اعصاب شفا، بیمارستان خاتم الانبیا، تهران
۳. گروه علوم تشریح، دانشگاه شاهد، تهران
۴. گروه بیوشیمی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران
۵. مرکز تحقیقات علوم و اعصاب شفا، بیمارستان خاتم الانبیا، تهران

چکیده

سابقه و هدف: با وجود پیشرفت‌های گسترده در زمینه‌ی کشت سلول‌های بنیادی، هنوز انتخاب بهترین منبع سلولی کارآمد جهت تزریق، قابل تأمل است. علاوه بر این، تا کنون از نشانگر کلسیمی برای بررسی سلول‌های عصبی حرکتی استفاده نشده است. روش‌هایی که تا کنون برای بررسی عملکرد سلولی مورد استفاده قرار گرفته همچون روش‌های الکتروفیزیولوژی (patch-clamp)، علاوه بر سخت بودن و وقت‌گیر بودن، در هر بررسی فقط یک سلول را مورد بررسی قرار می‌دهد. در این تحقیق، نشانگر کلسیمی و ترشح وزیکول‌های سیناپسی در سلول‌های عصبی- حرکتی مشتق از بافت چربی، با استفاده از رنگ‌آمیزی FM1-43 و نشانگر کلسیمی FLUO-2 مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها: از موش صحرایی نر بالغ، نژاد wistar با وزن ۲۵۰-۲۰۰ گرم استفاده شد. بافت چربی استخراج و سلول‌های بنیادی آن جداگردید. سپس، سلول‌های به دست آمده از لحاظ مارکرهای سلول‌های بنیادی مزانشیمی و مولتی‌پوتنسی، مورد بررسی قرار گرفتند. سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی تحت تأثیر القا کننده‌های رتینوئیک اسید و SHH، به سلول‌های شبه عصبی حرکتی تمایز یافتند. بعد از تمایز، سلول‌های تولید شده با استفاده از تکنیک‌های ایمنوسیتوشیمی و RT-PCR مورد تأیید قرار گرفتند. در مرحله‌ی نهایی، فانکشنال بودن سلول‌ها با توانایی برقراری ارتباط عصبی-عضلانی، ترشح وزیکول‌های سیناپسی و تبادلات کلسیمی، مورد ارزیابی قرار گرفت که برای این کار از روش‌های هم‌کشتی، رنگ آمیزی FM1-43 و نشانگر کلسیمی FLUO-2 استفاده گردید.

یافته‌ها: سلول‌های عصبی- حرکتی مشتق از بافت چربی، تمام مارکرهای مزانشیمی و اختصاصی چربی را بیان می‌کنند و توانایی تمایز به سایر رده‌های سلول‌های مزانشیمی شامل سلول استخوانی، غضروفی و چربی را دارند. این سلول‌ها، بعد از تمایز به سلول عصبی- حرکتی، مارکرهای islet-1، oligo-2 و HB9 را بیان می‌کنند. همچنین، دارای توانایی برقراری ارتباط عصبی- عضلانی، ترشح وزیکول‌های سیناپسی و تبادلات کلسیمی می‌باشند.

نتیجه‌گیری: نتایج بدست آمده نشان می‌دهد که سلول‌های عصبی- حرکتی مشتق از بافت چربی، توانایی برقراری ارتباط عصبی- عضلانی، ترشح وزیکول‌های سیناپسی و تبادلات کلسیمی را داشته و یک سلول فانکشنال می‌باشند.

واژگان کلیدی: سلول بنیادی مشتق از بافت چربی، سلول عصبی- حرکتی، رنگ آمیزی FM1-43، نشانگر کلسیمی

لطفاً به این مقاله به صورت زیر استناد نمایید:

Darvishi M, Tarihi T, Delshad AR, Mesbah Namin AR, Taheri T. Evaluating the function of motoneuron-like cells differentiated from rat adipose derived stem cells through calcium ion imaging and investigating the synaptic vesicle recycling. Pejouhandeh 2013;18(5):254-266.

مقدمه

بیماری‌های تخریب نورونی از جمله اختلالات ناتوان‌کننده‌ای هستند که در سال‌های اخیر مورد توجه محققین قرار گرفته است (۱). این اختلالات به دلیل عدم توانایی سیستم عصبی مرکزی در ترمیم و بازسازی با وجود پیشرفت‌های متعدد در زمینه‌ی دارویی وجراحی، هنوز به عنوان یک مسأله‌ی پیچیده در علوم پزشکی مطرح می‌باشند (۲). بیماری‌های سلول عصبی- حرکتی (MND: motoneuron diseases) همچون ALS (Amyotrophic lateral sclerosis) با از دست دادن

*نویسنده مسؤول مکاتبات: دکتر تقی طریحی؛ مرکز تحقیقات علوم اعصاب شفا، بیمارستان خاتم الانبیا، تهران. نمابر: ۸۸۰۱۶۵۴۴ (۰۲۱)؛ پست الکترونیک: takialtr@modares.ac.ir

[Downloaded from pajoohande.sbmu.ac.ir on 2026-11-14]

سلول‌های عصبی- حرکتی فوقانی و تحتانی ایجاد می‌شود (۳). جایگزین کردن سلول‌های عصبی- حرکتی تخریب شده، با سلول‌های القا شده، یکی از روش‌های مناسب جهت بهبود حرکتی در این بیماران می‌باشد (۴ و ۵). مطالعات اخیر نشان داده‌اند که سلول‌های عصبی- حرکتی از منابع مختلف سلولی همچون سلول‌های بنیادی جنینی، سلول‌های بنیادی عصبی، سلول بنیادی بالغ و سلول‌های برنامه‌ریزی شده مجدد، ایجاد می‌شوند (۹-۶). سلول بنیادی بالغ به علت در دسترس بودن، عدم محدودیت اخلاقی، عدم رد پیوند و تومورزایی به عنوان مناسب‌ترین منبع سلولی جهت درمان مطرح است (۱۰). سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی با توانایی تمایز به سمت سلول‌های عصبی، نمونه‌ای از سلول‌های بنیادی بالغ می‌باشند (۱۱ و ۱۲). این گروه سلولی، دارای توانایی تمایز به تمام رده‌های سلول مزانشیمی هستند (۱۳). همچنین، نسبت به سایر رده‌های سلول مزانشیمی، قدرت تکثیر بالاتری داشته و تا ۱۵ پاساژ پیش می‌روند (۱۴). این سلول‌ها، تحت تأثیر القا با دپرنیل، به سمت سلول‌های عصبی-حرکتی تمایز می‌یابند (۱۵).

مکانیسم تمایز سلول‌های عصبی- حرکتی، با استفاده از روش‌های ایمنوسیتوشیمی و واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز و همچنین از طریق بررسی شکل سلول، قابل شناسایی هستند (۱۵). اما یکی از مواردی که در سلول درمانی اهمیت دارد، تولید سلول دارای عملکرد فیزیولوژیک است. روش‌های فوق‌الذکر، قادر به بیان میزان عملکرد سلول‌های تولید شده نمی‌باشند و از این رو، ارائه‌ی راه‌کارهای جدید به منظور بررسی دینامیک بودن و به دنبال آن عملکرد فیزیولوژیک سلول، بسیار حایز اهمیت است (۱۶). بررسی تبادلات وزیکول‌های ترشحی و تغییرات سطح کلسیم در سلول‌های تمایز یافته، یکی از روش‌های ارزیابی میزان فعالیت سلول است که با استفاده از رنگ آمیزی FM1-43 و نشانگر کلسیم فلوئوروکروم Fluo-2 انجام می‌گیرد (۱۷ و ۱۸) . همچنین، مطالعات گذشته نشان داده است که سلول‌های عصبی حرکتی تولید شده از سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی، دارای قدرت تبادل وزیکول‌های ترشحی می‌باشند. این یافته‌ها، با روش‌های الکتروفیزیولوژی نظیر patch-clamp تأیید گردیده است، اما این روش فقط یک سلول را در هر بررسی نشان می‌دهد (۱۹ و ۲۰). علاوه بر این، از روش رنگ آمیزی با FM1-43 و روش‌های الکتروفیزیولوژی جهت بررسی بلوغ، تمایز و میزان فعالیت سلول‌های عصبی- حرکتی تمایز یافته از سلول‌های بنیادی جنینی، استفاده شده است (۲۱). در چندین مطالعه، برای بررسی اگزوسیتوز و اندوسیتوز درپایانه‌های عصبی سلول‌های حرکتی، از رنگ فلورسنت FM1-43 استفاده شده است (۲۲). درنمونه‌هایی از موش و قورباغه، پایانه‌های سلول‌های عصبی- حرکتی، با FM1-43 رنگ‌آمیزی شد و مشخص گردید که این وزیکول‌ها به صورت لکه‌های فلورسنت با فاصله و طول یکسان قرار گرفته‌اند (۲۳). همچنین، بررسی‌های اخیر نشان داده که می توان از نشانگرهای کلسیم، جهت بررسی عملکرد سلول استفاده کرد، به دلیل اینکه در روند تبادلات سلولی و مهار وزیکول‌های ترشحی، کلسیم یکی از عناصر مؤثر می‌باشد. به همین جهت، ثبت تغییرات آن می‌تواند تصویر کلی از فعالیت سلول در اختیار قرار دهد (۲۴). در بررسی انجام شده در سال ۲۰۱۰ نشان داده شد که جهت تعیین پتانسیل حرکتی سلول‌های عصبی مشتق از سلول‌های بنیادی جنینی، از نشانگر کلسیمی فلوئوروکروم Fluo-4 استفاده شده است. علاوه بر آن، این روش با استفاده از روش‌های الکتروفیزیولوژی (patch-clamp) مورد تأیید قرار گرفت (۲۵). بر خلاف روش patch-clamp که در یک سلول استفاده می‌شود و روشی با تکنیک پیچیده و زمان‌بر می‌باشد، استفاده از نشانگرهای فلورسنت و کلسیمی بسیار ساده و سریع بوده و در عین حال، تراکم بالایی از سلول را در برمی‌گیرد (۲۶). همچنین این مطالعات، با بررسی عملکرد سلول‌های عصبی- حرکتی انسانی با استفاده از Fluo-4 تأیید شد (۲۷). با اینکه در مطالعات گذشته، از سلول‌های بنیادی جهت تولید سلول‌های شبه عصبی- حرکتی استفاده شده است، ولی منبع مناسب سلولی برای تولید این سلول، بیان نشده است. از آنجا که سلول‌های مشتق از بافت چربی به راحتی در دسترس بوده و در هر برداشت تعداد زیادی سلول در اختیار قرار می‌دهد، منبع مناسبی جهت سلول درمانی محسوب می‌شوند. اگر چه در مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۱ از این سلول برای تولید سلول‌های شبه عصبی- حرکتی استفاده شد، ولی به علت به کار بردن دپرنیل به عنوان القاکننده، میزان تولید سلول پایین بوده و علاوه بر آن دینامیک بودن سلول نیز مورد بررسی قرار نگرفته بود. از آنجا که در روند سلول درمانی، اهمیت کار در تولید سلول‌های فانکشنال و قابل دسترس است، احتیاج به بررسی تکنیک‌هایی است که بتوان از آنها برای تأیید مطالعات استفاده نمود. هدف از انجام این مطالعه تولید سلول‌های فانکشنال عصبی- حرکتی از سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی بود. در این مطالعه، جهت بررسی میزان عملکرد سلول‌های تمایز یافته، از چندین تکنیک استفاده شده است. ابتدا به منظور بررسی توانایی

[Downloaded from pajoohande.sbmu.ac.ir on 2026-11-14]

سلول‌های تولید شده برای برقراری رابطه‌ی عصبی با سلول عضلانی، سلول‌های عصبی- حرکتی تمایز یافته از بافت چربی، با سلول‌های میوسیت رده‌ی C2C12 هم‌کشتی داده شدند. سپس، جهت بررسی شکل‌گیری وزیکول‌های سیناپسی و سرعت ترشح وزیکول‌های سیناپسی برای تعیین بلوغ و فعالیت سلول، از رنگ‌آمیزی FM1-43 و Fluo-2 استفاده گردید. تاکنون، مطالعه‌ای در زمینه‌ی بررسی عملکردی سلول‌های شبه عصبی- حرکتی با استفاده از Fluo-2 انجام نشده است.

مواد و روش‌ها

برای جداسازی، کشت و تأیید سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی، از نمونه‌های بالغ موش صحرایی نر با نژاد wistar و وزن ۲۰۰-۲۵۰ گرم استفاده شد. موش‌های صحرایی با تزریق داخل صفاقی دوز بالای کتامین و زایلزین بیهوش شدند و پس از باز نمودن پوست و کنار زدن عضلات، چربی ناحیه‌ی اینگوئینال و اطراف کلیه، جدا گردید. در مرحله‌ی جداسازی بافت چربی، باید در نظر داشته باشیم که عروق خونی ناحیه دچار پارگی نشود. سپس نمونه‌های جدا شده در پلیت حاوی ترکیبات PBS، استرپتومایسین U/ml ۱۰۰ و پنی‌سیلین ۱ U/ml ۱۰۰، قرار داده شد.

پس از شستشوی بافت چربی، به فالکون ۵۰ منتقل و به مدت ۳۰ دقیقه در معرض ۰/۱٪ کلاژناز نوع ۴ به همراه PBS و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شد. مخلوط حاصل، از فیلتر مش با قطر ۱۰۰ میکرومتر، عبور داده و به مدت ۱۰ دقیقه، با دور موتور ۱۲۰۰، سانتریفیوژ شد. سپس مایع رویی خارج و پلیت سلولی در ته لوله‌ی فالکون با محیط کشت DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) پیپتاژ شد و مجدداً با دور موتور ۱۲۰۰، سانتریفوژ گردید. سانتریفیوژ، به منظور جداسازی سلول‌های خونی و چربی شناور در محیط انجام گرفت. پلیت نهایی سلول، به فلاسک ۲۵ سانتی‌متر مربع حاوی محیط DMEM و سرم منتقل و سپس در ۵ درصد CO_2 و دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه گردید. بعد از ۲۴ ساعت، به منظور جداسازی سلول‌های مرده، شستشو با PBS انجام گرفت و پس از ۵ تا ۷ روز، سلول‌ها به منظور ایجاد بافت یکنواخت با تریپسین ۵٪ ، از کف فلاسک جدا و سپس کشت داده شدند. این روند برای ۳ تا ۵ پاساژ تکرار شد.

به منظور تأیید سلول‌های کشت داده شده، یک میلیون سلول در پاساژ سوم، به پلیت ۶ خانه منتقل و مارکرهای لیست شده در جدول ۱ مورد بررسی قرار گرفتند.

مولتی‌پوتنسی آنها از طریق انکوبه کردن سلول‌ها در محیط کشت تمایزی استخوان، غضروف و چربی ارزیابی شد. مینرالیزاسیون ماتریکس خارج سلولی از طریق رنگ‌آمیزی Alizarin red و تمایز به سمت چربی و غضروف، به ترتیب با رنگ‌آمیزی Oil red و Safranin O انجام گرفت (۲۸).

برای تبدیل سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی به سلول‌هایی با مشخصات سلول‌های بنیادی عصبی، از روشی مشابه با Yongfeng و همکارانش با کمی تغییر استفاده شد (۲۹). سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی، با تریپسین ۵٪ جدا شده و به تعداد ۵۰۰/۰۰۰ سلول در پلیت ۶ خانه‌ی پوشش‌دار شده با پلی‌الایزین، به همراه ۲ میلی‌لیتر محیط DMEM/F12 (Dulbecco's modified Eagle's medium/Ham's F-12 medium) حاوی سرم ۵ درصد و ۲ درصد B27، ۲۰ نانوگرم در میلی‌لیتر از bFGF و ۲۰ ۲۰ نانوگرم در میلی‌لیتر از EGF کشت داده شدند. بعد از رسیدن سلول‌ها به ظرفیت ۸۰ درصد، با استفاده از پیپتاژ جدا شدند و این کار تا ۳ پاساژ انجام شد. سپس سلول‌ها با تکنیک ایمنوسیتوشیمی و RT-PCR بررسی شدند.

برای تبدیل سلول‌های بنیادی عصبی به سلول‌های شبه عصبی- حرکتی، سلول‌های بنیادی عصبی در پاساژ ۴-۳ انتخاب شدند و برای ۵ روز اول در معرض رتینوئیک اسید ۰/۱ مولار و SHH (sonichedgehog) به صورت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در محیط کشت DMEM/F12 حاوی ترکیبات bFGF، B27 و EGF قرار داده شدند. پس از ۵ روز، فاکتورهای رشد عصبی شامل Glial cell derived neurotrophic factor (GDNF) و Brain-derived neurotrophin factors (BDNF) به میزان ۱۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر و NT-3 (neurotrophin 3) به میزان ۵ نانوگرم بر میلی‌لیتر به محیط اضافه شد (۱۱).

سلول‌های کشت داده شده در پلیت ۶ خانه جهت انجام تکنیک ایمنوسیتوشیمی با PBS شستشو و در محلول ۴٪ پارافرمالدئید برای ۳۰ دقیقه قرار داده شدند. سپس به منظور نفوذپزیری غشا، سلول‌ها به مدت ۱۵ الی ۲۰ دقیقه، در محلول تریتون X-100 و ۵ درصد سرم، انکوبه شدند. سپس، آنتی‌بادی اولیه لیست شده در جدول ۱، به صورت رقیق شده در PBS ، به مدت ۱۲ ساعت و دمای ۴ درجه سانتیگراد انکوبه شد. در نهایت، سلول‌ها مجدداً با PBS شستشو داده شده و آنتی‌بادی ثانویه برای مدت ۲ ساعت در دمای اتاق در معرض سلول قرار گرفت. بعد از ۳ بار شستشو، هسته‌ی سلول‌ها با ترکیب پروپیدیم یداید، رنگ آمیزی و با میکروسکوپ فلورسنت و بزرگنمایی ۲۰۰ برابر، مشاهده شدند.

[Downloaded from pajoohande.sbmu.ac.ir on 2026-11-14]

کنترل منفی سلول‌ها به صورت استفاده از آنتی‌بادی ثانویه بدون حضور آنتی‌بادی اولیه انجام گرفت (۱۱).

جدول۱. لیست آنتی‌بادی‌های مورد استفاده جهت تعیین ایمنوسیتوشیمی.

Rabbit anti-CD49d monoclonal antibody	Millipore	۱:۳۰۰	Primary antibody
Mouse anti-CD106 monoclonal antibody	Millipore	۱:۳۰۰	Primary antibody
Mouse anti-CD31 monoclonal antibody	Millipore	۱:۲۰۰	Primary antibody
Mouse anti-CD90 monoclonal antibody	Millipore	۱:۳۰۰	Primary antibody
Mouse anti-NF-68 monoclonal antibody	Millipore	۱:۲۰۰	Primary antibody
Mouse anti Neu-N monoclonal antibody	Millipore	۱:۲۰۰	Primary antibody
Mouse anti-Neuro D monoclonal antibody	Millipore	۱:۲۰۰	Primary antibody
Anti-mouse FITC-conjugated	Millipore	۱:۱۰۰	Secondary antibody
Anti-rabbit FITC-conjugate	Millipore	۱:۱۰۰	Secondary antibody
Rabbit anti-oligo-2 monoclonal antibody	Abcam	۱:۳۰۰	Primary antibody
Rabbit anti-islet-1 monoclonal antibody	Abcam	۱:۳۰۰	Primary antibody
Rabbit anti-HB9 monoclonal antibody	Abcam	۱:۳۰۰	Primary antibody

به منظور بررسی بیان ژن‌های islet1، oligo-2 و HB9 در سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی، سلول‌های بنیادی عصبی و سلول‌های شبه عصبی حرکتی و نخاع نوزاد موش صحرایی به عنوان کنترل مثبت، از تکنیک RT-PCR استفاده شد. در این روش، RNA کل سلول‌های کنترل و تمایز یافته، به وسیله کیت Ambion استخراج گردید و بعد از DNA treatment به منظور جلوگیری از بروز نتایج کاذب، با DNase1 انجام گرفت و محصول به دست آمده با استفاده از پرایمر oligo-dt به cDNA تبدیل شد. سپس، پرایمر ژن‌های لیست شده در بالا، با استفاده از نرم افزار primer 3 طراحی و با Gene runner تأیید گردید. در این مطالعه، GAPDH به عنوان ژن داخل سلولی مورد بررسی قرار گرفت. سپس محصول PCR در دستگاه الکتروفورز و در ۱٪ آگارز و GEL RED قرار داده شد و باندهای DNA به وسیله دستگاه GELDOC مشاهده و تصاویر ثبت شدند. این کار برای ۳ بار تکرار شد (۳۰).

برای تعیین توانایی سلول‌های شبه عصبی حرکتی در ایجاد اتصالات عصبی- عضلانی، این سلول‌ها با سلول‌های میوبلاست رده‌ی C2C12 هم‌کشتی داده شدند. برای آماده‌سازی سلول‌های C2C12 به مدت ۴ روز در محیط کشت DMEM و سرم ۱۰٪ قرار داده شدند. پس از ۴ روز، به منظور تمایز سلول‌ها به میوتیوپ، از سرم اسب با غلظت ۲٪ به مدت ۵ روز استفاده شد. بعد از تأیید سلول‌های میوتیوب، سلول‌های شبه عصبی- حرکتی تولید شده، به مرکز کشت این سلول‌ها اضافه گردید و بعد از ۲ روز، با رنگ PKH رنگ‌آمیزی شد و به کمک میکروسکوپ فلورسنت، عکس برداری گردید.

به منظور بررسی حرکت و روند ترشحی وزیکول‌های سیناپسی و همچنین بررسی اگزوسیتوز و اندوسیتوز در سلول‌های شبه عصبی- حرکتی، از نشانگر فلورسنت FM1-43 استفاده شد. میزان رنگ‌آمیزی با FM1-43 به وسیله‌ی میکروسکوپ فلورسنت، مورد بررسی قرار گرفت. نمونه‌ها برای این منظور شسته شدند و برای ۱۰ دقیقه در محلول نمکی حاوی ۱۷۰ میلی‌مولار NaCl، ۵/۳ میلی‌مولار KCl، ۴/۰ میلی‌مولار KH_2PO_4، ۵ میلی‌مولار $NaHCO_3$، ۲/۱ میلی‌مولار Na_2SO_4، ۲/۱ میلی‌مولار MgCl2، ۳/۱ میلی‌مولار CaCl2، ۵ میلی‌مولار گلوکز و ۲۰ میلی‌مولار تریس بافر قرار داده شدند. سپس محلول فوق با محلول تحریکی ۱ که شامل ترکیب نمکی با ۱۰۰ میلی‌مولار KCl و ۱۰ میکرومولار FM 1-43 است، تعویض گردید. این ترکیب به مدت ۲ دقیقه در معرض محلول تحریکی قرار داده می‌شود. سپس این محلول با محلول تحریکی ۲ که شامل ۳/۵ میلی‌مولار KCl و ۱۰ میکرومولار FM 1-43 می‌باشد، تعویض شده و این محلول به مدت ۳ دقیقه در مجاورت سلول قرار می‌گیرد. برای بی رنگ کردن، از محلول ۱۰۰ میلی‌مولار KCl استفاده شد. عکس‌برداری با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت و به صورت یک عکس در هر دقیقه تا ۱۰ عکس گرفته شد (۲۳).

کلسیم داخل سلولی با استفاده از اندازه‌گیری شدت فلورسنت از سلول‌های رنگ شده با نشانگر کلسیم FLUO-2 در سلول‌های شبه عصبی- حرکتی کشت داده شده در پلیت ۲۴ خانه تعیین شد. برای این منظور سلول‌های بنیادی عصبی مشتق شده از نوروسفر با تعداد ۲۵۰۰۰ سلول، به پلیت ۲۴ خانه منتقل شد و سپس مراحل تمایز سلولی به سمت تولید سلول‌های شبه عصبی- حرکتی انجام گرفت. بعد از تمایز

[Downloaded from pajoohande.sbmu.ac.ir on 2026-11-14]

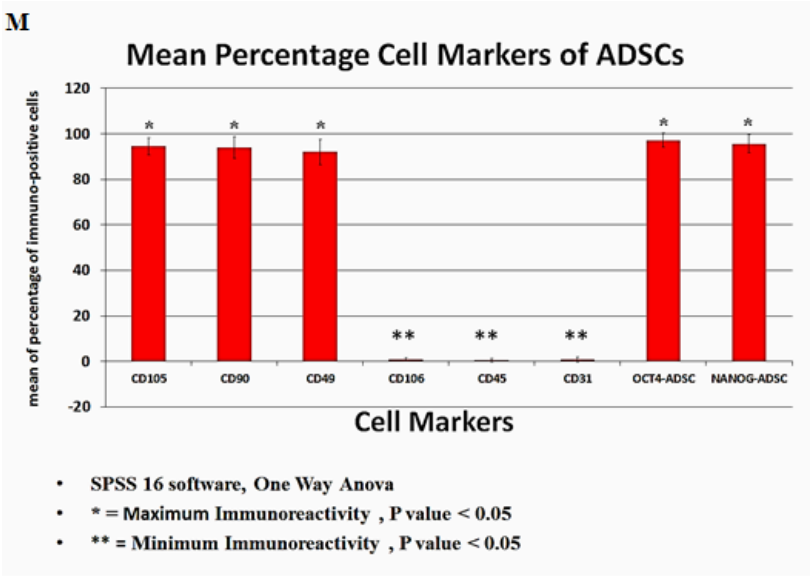
سلول‌ها، محیط سلول تخلیه و سلول‌ها ۳ بار با محلول PBS شستشو داده شد. جهت رنگ آمیزی، ۱۰۰ میکرومولار از محلول رنگ آمیزی FLUO-2 (۲/۵ میلی‌مولار) به هر پلیت اضافه گردید. پلیت‌ها ابتدا برای ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه و سپس برای ۳۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شدند. در انتها، سلول‌ها با میکروسکوپ فلورسنت در طول موج ۴۹۴ نانومتر مورد بررسی قرار گرفته و تصاویر ثبت شدند (۲۵).

جهت بررسی آماری، از نرم افزار SPSS (نسخه ۱۶) استفاده گردید و خطای معیار (SEM) و تست آماری One Way ANOVA (Tukey) با سطح معناداری P<۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی جدا شده از اطراف کلیه، ۲۴ ساعت بعد از کشت به صورت کروی دیده می‌شوند و بعد از ۴ روز به ظرفیت ۸۰ درصد می‌رسند. در این حالت، سلول‌ها شبیه سلول‌های فیبروبلاستی و به صورت دوکی شکل قابل مشاهده هستند. این سلول‌ها به صورت یک لایه‌ی پهن به کف فلاسک می‌چسبند.

سلول‌های بیان‌کننده‌ی مارکرهای سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی، به صورت نمودار هیستوگرام در شکل ۱ نشان داده شده است. درصد بیان مارکرهای CD90 (مارکر سلول‌های بنیادی مزانشیمی)، CD49 (مارکر اختصاصی سلول‌های چربی)، CD31 (مارکر سلول‌های اندوتلیالی)، CD106 (مارکر سلول‌های مزانشیمی مشتق از مغز استخوان) به ترتیب ۰/۹±۹۳/۹، ۱/۱±۹۳/۹، ۰/۱±۰/۷ و ۰/۱±۰/۴ است (نمودار ۱). همچنین توانایی سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی برای تمایز به سایر رده‌های سلول‌های مزودرمی (استخوان، غضروف و چربی) مورد بررسی قرار گرفت و مشخص گردید که این سلول‌ها قادرند به تمام رده‌های سلول‌های مزودرمی، تمایز یابند (شکل ۱).



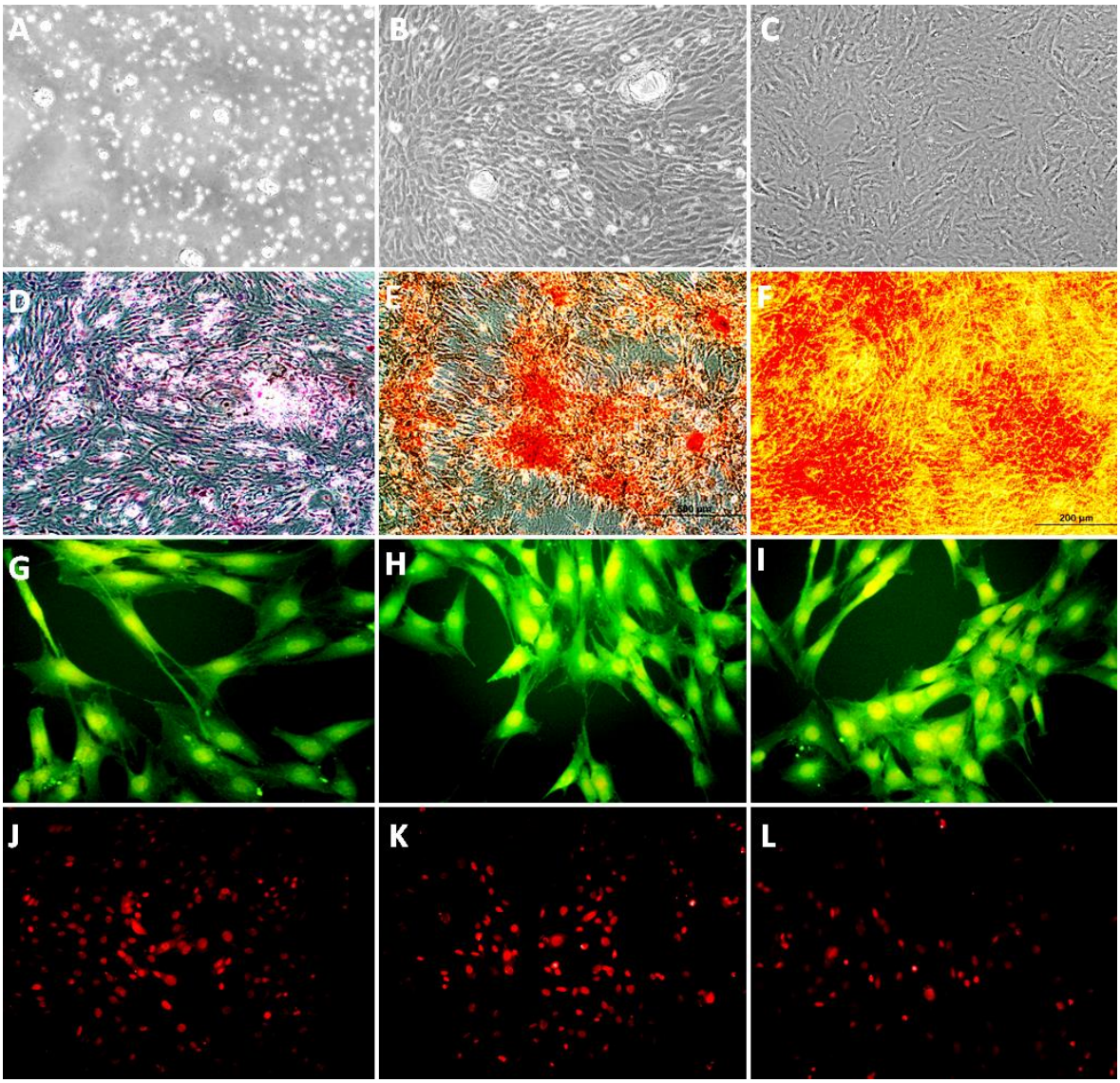
نمودار ۱. مقایسه‌ی درصد بیان نشانگرهای سطح سلولی در سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی بعد از پاساژ سلولی چهارم. بررسی درصد بیان نشانگرهای سطحی CD49d (مارکر اختصاصی چربی)، CD90 و CD105 (مارکرهای اختصاصی سلول‌های مزانشیمی)، OCT4 و NANOG (مارکرهای سلول‌های بنیادی) و CD45 (مارکرهای خونی) و CD106 (مارکر اختصاصی سلول‌های بنیادی مشتق از مغز استخوان) با روش ایمونوسیتوشیمی نشان می‌دهد که بیشترین بیان مربوط به نشانگر سطحی سلول‌های مزانشیمی و نشانگر پلوری‌پوتنسی می‌باشد. خطای معیار (SEM)، تست آماری One Way ANOVA (Tukey) و P<۰/۰۵.

محیط کشت عصبی باعث می‌شود که سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی به سلول‌هایی با مشخصات سلول عصبی تبدیل شوند. این سلول‌ها با انتقال به پلیت‌های پوشش‌دارشده با پلی الایزین به کف فلاسک چسبیده و حالت دوکی شکل دارند. همچنین نتایج حاصل از رنگ آمیزی ایمنوسیتوشیمی نشان داد که درصد بیان مارکرهای عصبی نستین و NeuroD به ترتیب ۵/۶±۹۷/۷ و ۲/۶±۹۷/۴ درصد بوده است (شکل‌های ۲ و ۳).

سلول‌های شبه عصبی حرکتی تولید شده از سلول‌های بنیادی عصبی بعد از گذشت ۱۲ روز القا توسط رتینوییک اسید و SHH و سپس فاکتورهای رشد عصبی، از نظر مورفولوژی مورد بررسی قرار گرفته و نتایج نشان داد که

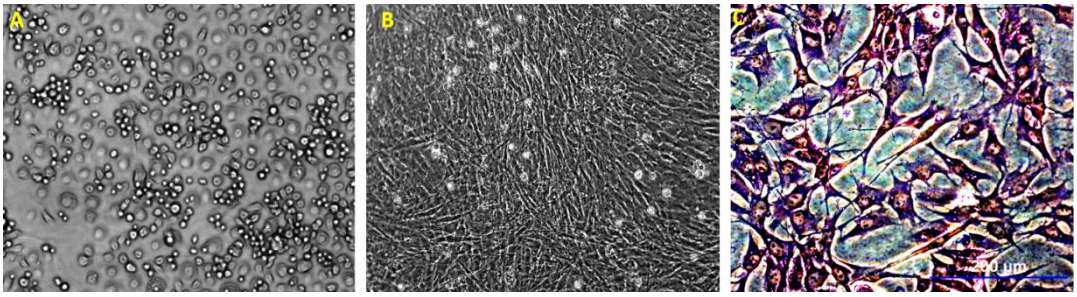
[Downloaded from pajoohande.sbmu.ac.ir on 2026-11-14]

این سلول‌ها قادر به اتصال به کف فلاسک هستند. این سلول‌ها، دارای زواید آکسونی مشخص و همچنین دندریت‌های متعدد بوده و مورفولوژی مشابه سلول‌های عصبی- حرکتی دارند. بعد از القا، سلول‌های شبه عصبی- حرکتی در روزهای اول، دوم و هفته دوم، از لحاظ مارکرهای مربوط به سلول‌های شبه عصبی- حرکتی، مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج ایمنوسیتوشیمی در روز اول بعد از القا با رتینوئیک اسید نشان داد که درصد بیان مارکرهای oligo-2 (مارکر پیش‌ساز سلول عصبی- حرکتی)، islet-1 (مارکر سلول عصبی- حرکتی نابالغ)، نستین (مارکر سلول عصبی)، HB9 (مارکر سلول عصبی- حرکتی بالغ) به ترتیب (۹۶/۳±۰/۶)، (۶۱/۶±۳/۳) و (۲۹,۷±۲,۴) بوده است. همچنین در صد بیان این مارکر ها در روز دوم به ترتیب ۹۳/۸±۱/۲، ۹۴/۸±۱/۲ و ۵۰/۱±۱/۷ و در هفته‌ی دوم ۷۴/۹±۲/۷، ۸۱/۴±۴/۱ و ۹۴/۳±۱/۳ بوده است. بیشترین درصد بیان مارکر oligo-2 در روز اول و علاوه بر آن بیشترین درصد بیان مارکر HB9 در هفته‌ی دوم بعد از القا، نشان داده شد (شکل‌های ۴ و ۵). برای مارکرهای استفاده شده در بالا، از مغز نوزاد موش صحرایی استفاده شد که نتایج آن در شکل ۶ آمده است.

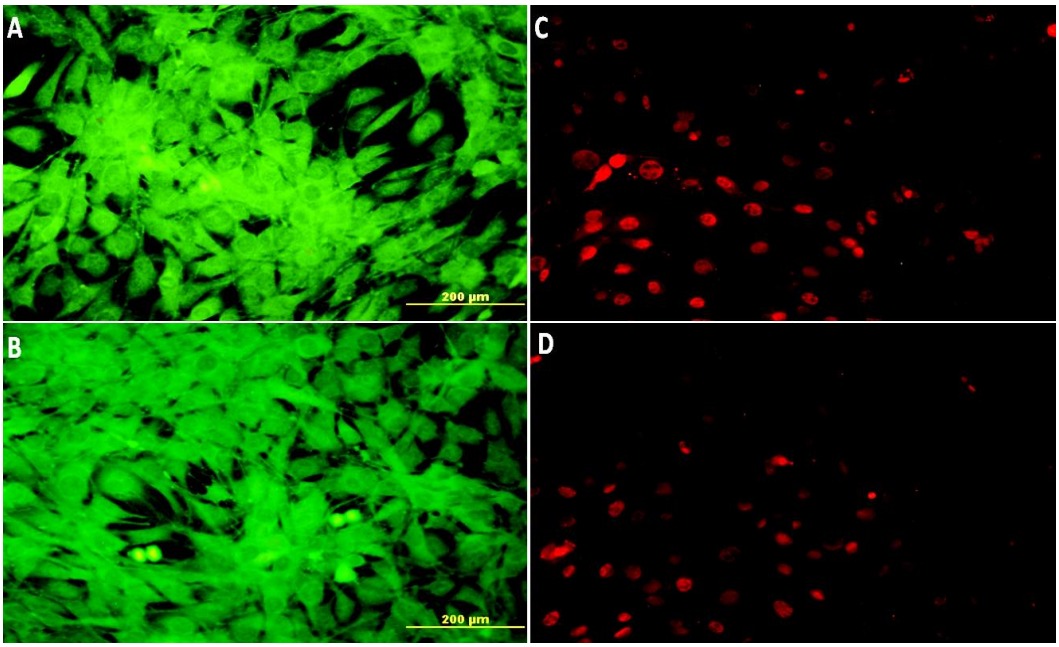


شکل ۱. سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی (کشت در ۲۴ ساعت بعد از جداسازی و در پاساژ ۳ (P3)، بررسی مولتی‌پوتنسی و مارکرهای ایمنوسیتوشیمی). سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی ۲۴ ساعت بعد ازجداسازی، سلول‌ها کروی شکل و به صورت هتروژن قابل مشاهده هستند (A). سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی در P3، سلول‌ها دوکی شکل و هموژن با اتصال به کف فلاسک دیده می‌شوند (B). مینرالیزاسیون ماتریکس خارج سلولی از طریق رنگ‌آمیزی Alizarin red (E) و تمایز به سمت چربی و غضروف به ترتیب با رنگ‌آمیزی Red oil (D) و Safranin O (F) انجام شد. تأیید مارکرهای CD90 (مارکر سلول‌های بنیادی مزانشیمی) (G)، CD49 (مارکر اختصاصی سلول‌های چربی) (H)، تأیید مارکرهای CD105 (مارکر سلول‌های بنیادی مزانشیمی) (I)، CD31 (مارکر سلول‌های اندوتلیالی) (J)، CD45 (مارکر سلول‌های خونی) (K)، CD106 (مارکر سلول‌های مزانشیمی مشتق از مغز استخوان) (L) با ایمنوسیتوشیمی نشان داده شده است.

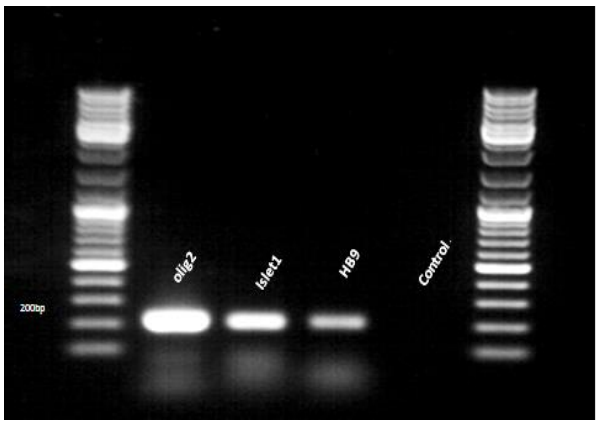
[Downloaded from pajoohande.sbmu.ac.ir on 2026-11-14]



شکل ۲. تحت تأثیر محیط کشت عصبی، سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی به سلول‌هایی با مشخصات سلول عصبی تبدیل می‌شوند. این ساختارها، بعد از یک روز (A) در محیط کشت قابل شناسایی هستند. بعد از پاساژ دوم، سلول‌ها رشد بیشتری یافته و کف ظرف را به سرعت پر می‌کنند (B). با رنگ‌آمیزی کرزیل ویوله، درصد سلول‌های بنیادی بافت چربی که به سلول عصبی تمایز می‌یابد تعیین می گردد (C).



شکل ۳. مارکرهای نستین (A) و NeuroD (B) در سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی مثبت ارزیابی شد. MAP2 و NeuroN (C و D) مارکر سلول‌های عصبی بالغ در این سلول‌ها، منفی است.



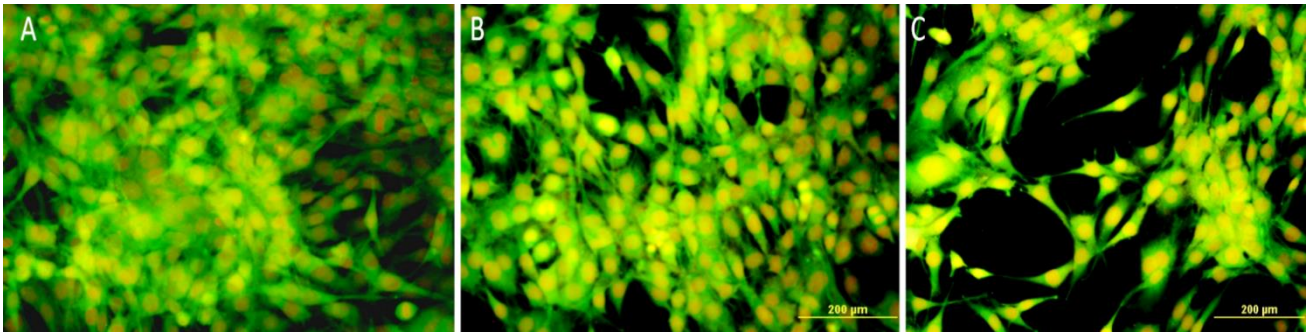
شکل ۴. به منظور بررسی بیان ژن‌های islet، oligo-2 و HB9 در سلول‌های شبه عصبی- حرکتی، از تکنیک RT-PCR استفاده شد.

[Downloaded from pajoohande.sbmu.ac.ir on 2026-11-14]

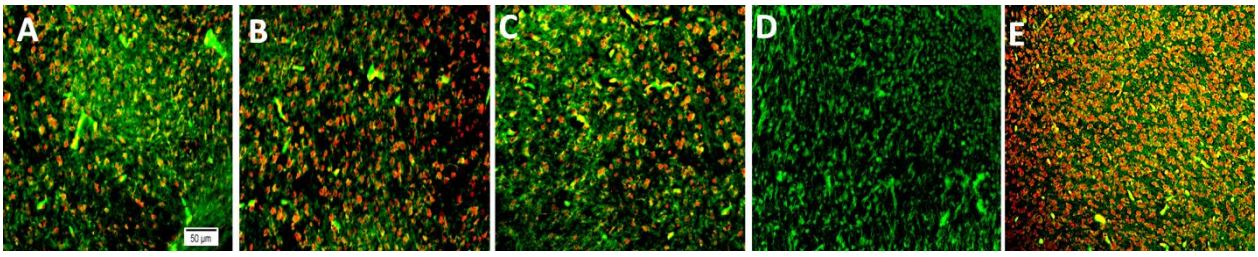
برای تأیید فعالیت‌های مربوط به سلول‌های شبه عصبی- حرکتی، این سلول‌ها با سلول‌های رده‌ی C2C12 هم‌کشتی داده شد. نتایج نشان داد که این سلول‌ها قادر به ایجاد ساختارهای شبه سیناپسی با میوتیوب‌ها و بیان مارکر ChAT در محل سیناپس می‌باشند (شکل ۶).

جهت بررسی عملکرد سلول‌های شبه عصبی- حرکتی، سرعت ترشح وزیکول‌های سیناپسی و همچنین تبادلات سلول به صورت اگزوسیتوز و اندوسیتوز، از رنگ آمیزی FM1-43 استفاده گردید. نتایج نشان داد که این سلول‌ها، تحت تأثیر تحریک، قادر به ترشح وزیکول‌های سیناپسی هستند. همچنین تجمع وزیکول‌های سیناپسی در پایانه‌های آکسونی این سلول‌ها دیده می‌شود. همچنین، این وزیکول‌های ترشحی، به صورت لکه‌های روشن در طول آکسون قابل مشاهده هستند (شکل ۸).

جهت بررسی سطح تغییرات کلسیم داخل سلولی، از نشانگر کلسیمی استفاده شد. در شکل ۹، افزایش پایداری در کلسیم داخل سلولی بعد از تحریک اعمال شده به سلول‌های شبه عصبی- حرکتی با محیط استاندارد، دیده می‌شود



شکل ۵. سلول‌های شبه عصبی- حرکتی رنگ‌آمیزی شده توسط oligo-2 (مارکر پیش‌ساز سلول عصبی- حرکتی) (A)، islet-1 (مارکر سلول عصبی- حرکتی نابالغ) (B) و HB9 (مارکر سلول عصبی- حرکتی بالغ) (C) که توسط میکروسکوپ فلورسنت مشاهده شدند. سلول‌های بنیادی بعد از القا توسط فاکتورهای سلول‌های رتینوئیک اسید و SHH و سپس فاکتورهای رشد عصبی از نظر مورفولوژی مورد بررسی قرار گرفته و نتایج نشان داد که این سلول‌ها قادر به اتصال به کف فلاسک هستند. این سلول‌ها دارای زواید آکسونی مشخص و همچنین دندریت‌های متعدد بوده و مورفولوژی مشابهی با سلول‌های عصبی- حرکتی دارند. بار عکس ۲۰۰×.

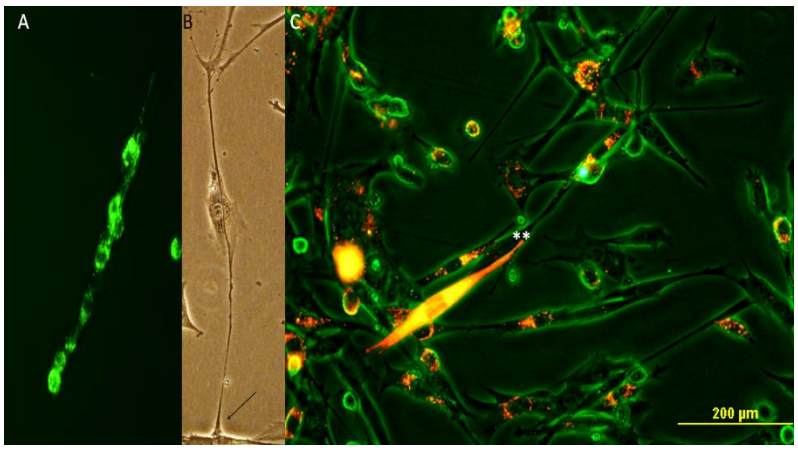


شکل ۶. رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی در برش‌های بافت مغز موش ناحیه کورتکس و هیپوکامپ (بررسی کنترل مثبت آنتی‌بادی‌ها). برش‌های بافت مغزی با آنتی‌بادی‌های اولیه علیه Nestin (A)، NF-68 (B)، oligo-2 (C)، HLX-9 (D) و Islet-1 (E)، رنگ آمیزی شده‌اند. در تصاویر تهیه شده، از آنتی‌بادی ثانویه‌ی کونژوگه به رنگ سبز FITC استفاده شده است و هسته‌ها با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شده‌اند. مقیاس ۲۰۰ میکرومتر.

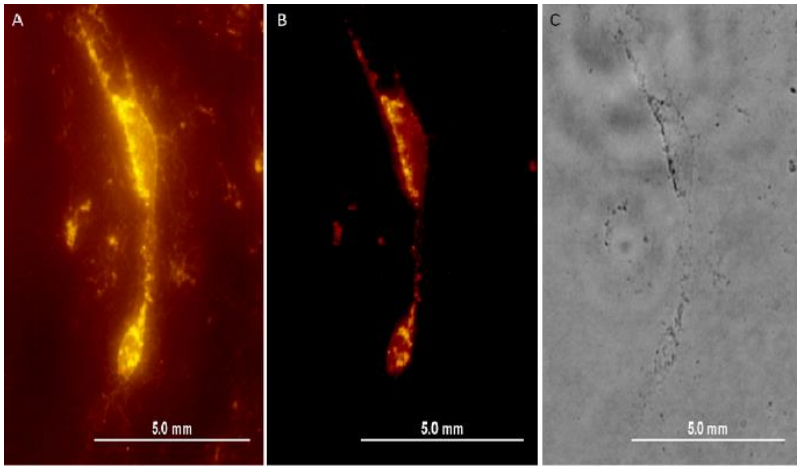
بحث

نتایج به دست آمده نشان می‌دهد که سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی، قادر به تمایز به سلول‌های شبه عصبی- حرکتی دارای عملکرد، می‌باشند. هدف اصلی از سلول درمانی در درمان بیماری‌های مخرب سلول عصبی- حرکتی، تولید سلول‌های فانکشنال عصبی است (۳۱). با توجه به مطالعات انجام شده در زمینه‌ی کاربردهای بالینی سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی به عنوان منبع جایگزین سلولی (۳۲)، ما توانایی این سلول‌ها را در تولید سلول های عصبی حرکتی فانکشنال مورد بررسی قرار دادیم. نتایج ما تأیید می‌کند که سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی، در کشت اولیه به صورت هتروژنوس بوده و شامل چندین گروه سلولی است که از آن جمله می‌توان سلول‌های خونی، اندوتلیالی و سلول‌های بالغ چربی را نام برد که فراوانی این سلول‌ها با افزایش تعداد پاساژهای سلولی، کاهش می‌یابد (۳۳). علاوه بر این، سلول‌های بنیادی بافت چربی، مارکرهای CD105، CD90 و CD49 را بیان می‌کنند، در صورتی که مارکرهای خونی و

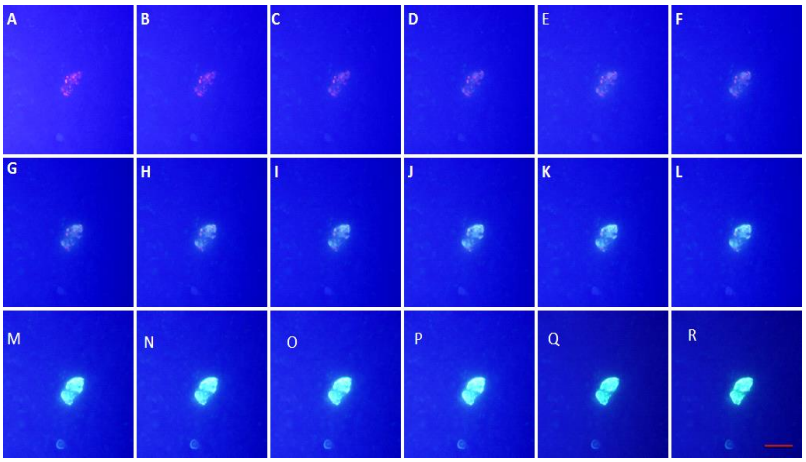
[Downloaded from pajoohande.sbmu.ac.ir on 2026-11-14]



شکل ۷. هم‌کشتی سلول‌های شبه عصبی حرکتی با سلول‌های C2C12. سلول‌های میوتیوب تمایز یافته از C2C12 با استفاده از رنگ فلوئوروکروم PKh 26 رنگ آمیزی شد. سلول‌های شبه عصبی- حرکتی بعد از تمایز، با رنگ فلورسنت PKh 67 رنگ آمیزی و سپس با سلول‌های میوتیوپ هم‌کشتی داده شدند. میوتیوب (A)، تصویر فاز کنتراست از هم‌کشتی سلول‌های شبه عصبی- حرکتی و میوتیوب؛ پیکان، محل اتصال را نشان می‌دهد (B). هم‌کشتی و رنگ آمیزی با رنگ PKh (C).



شکل ۸. بررسی عملکردی سلول‌های شبه عصبی- حرکتی با استفاده از ثبت ترشح وزیکول‌های سیناپسی. سلول‌های شبه عصبی- حرکتی با FM1-43 رنگ‌آمیزی شدند. برای بی‌رنگ کردن، از محلول ۱۰۰ میلی‌مولار KCl استفاده شد. عکس‌برداری با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت و به صورت یک عکس در هر دقیقه تا ۱۰ عکس، صورت گرفت. بعد از آنالیز عکس‌ها، عملکرد سلول‌ها از طریق ترشح وزیکولی، تأیید گردید.



شکل ۹. کلسیم داخل سلولی با استفاده از اندازه‌گیری شدت فلورسنت از سلول‌های رنگ شده با نشانگر کلسیم FLUO-2 در سلول‌های شبه عصبی- حرکتی کشت داده شده در پلیت ۲۴ خانه، تعیین گردید. بعد از تمایز سلول‌ها، محیط سلول تخلیه و سلول‌ها ۳ بار با محلول PBS شستشو داده شدند. جهت رنگ آمیزی، ۱۰۰ میکرومولار از محلول رنگ آمیزی FLUO-2 (۲/۵ میلی‌مولار) به هر پلیت اضافه شد. پلیت‌ها ابتدا برای ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه و سپس برای ۳۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شدند. در انتها، سلول‌ها با میکروسکوپ فلورسنت در طول موج ۴۹۴ نانومتر مورد بررسی قرار گرفتند.

[Downloaded from pajoohande.sbmu.ac.ir on 2026-11-14]

نتایج به دست آمده نشان می‌دهد که سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی، قادر به تمایز به سلول‌های شبه عصبی- حرکتی دارای عملکرد، می‌باشند.

هدف اصلی از سلول درمانی در درمان بیماری‌های مخرب سلول عصبی- حرکتی، تولید سلول‌های فانکشنال عصبی است (۳۱). با توجه به مطالعات انجام شده در زمینه‌ی کاربردهای بالینی سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی به عنوان منبع جایگزین سلولی (۳۲)، ما توانایی این سلول‌ها را در تولید سلول‌های عصبی حرکتی فانکشنال مورد بررسی قرار دادیم.

نتایج ما تأیید می‌کند که سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی، در کشت اولیه به صورت هتروژنوس بوده و شامل چندین گروه سلولی است که از آن جمله می‌توان سلول‌های خونی، اندوتلیالی و سلول‌های بالغ چربی را نام برد که فراوانی این سلول‌ها با افزایش تعداد پاساژهای سلولی، کاهش می‌یابد (۳۳). علاوه بر این، سلول‌های بنیادی بافت چربی، مارکرهای CD105، CD90 و CD49 را بیان می‌کنند، در صورتی که مارکرهای خونی و مزانشیمال مربوط به مغز استخوان را بیان نمی‌کنند (۳۴). این سلول‌ها توانایی تمایز به سایر رده‌های سلول‌های مزودرمی را دارند (۳۵). تمام یافته‌های مربوط به مورفولوژی و بیان مارکرهای سلولی به دست آمده در این مطالعه در تأیید سایر گزارشات انجام شده می‌باشد. همچنین در این مطالعه، سلول‌های مشتق از بافت چربی، به سلول‌های بنیادی عصبی تبدیل شد (۳۶). این سلول ها قدرت بیان مارکرهای عصبی را دارند و این نشان می‌دهد که سلول بنیادی مشتق از بافت چربی علاوه بر تمایز به رده‌های مزانشیمی، قدرت تمایز به رده‌های اکتودرمی را نیز دارند (۳۷). علاوه بر این، مطالعات ما نشان داد که سلول‌های بنیادی عصبی در محیط حاوی سرم و در پلیت پوشش‌دارشده با پلی‌الایزین، می‌توانند به کف فلاسک بچسبند. چسبیدن سلول‌ها یکی از مشخصه‌های سلول‌های بنیادی عصبی است. این سلول‌ها قدرت بیان مارکرهای عصبی همچون نستین و NeuroD و مارکرهای آستروسیتی را دارند که این تأییدی بر توانایی تبدیل سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی به سلول‌های عصبی می‌باشد (۲۹ و ۳۸). این مطالعات توسط سایر محققین تأیید شده است. در این مطالعه سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی در سه مرحله‌ی پیش القا (با استفاده از فاکتورهای bFGF، EGF و B27)، القا (رتینوئیک اسید و SHH) و در نهایت، مرحله‌ی تمایز (با استفاده از فاکتورهای رشد) به سلول‌های شبه عصبی- حرکتی تمایز یافت (۳۹ و ۴۰). ابتدا سلول‌ها به سلول بنیادی عصبی و در نهایت به سلول شبه عصبی- حرکتی تمایز پیدا کردند. سلول‌های بنیادی عصبی در حضور القاکننده‌هایی همچون رتینوئیک اسید و SHH، از سیکل سلولی خارج شده و به سمت تمایز پیش می‌روند (۴۱ و ۴۲). این سلول‌ها، ژن‌های سلول‌های عصبی- حرکتی شامل oligo-2، islet-1 و HB9 را بیان می‌کنند که این یافته، با مطالعات سایر محققین همسو می‌باشد (۴۳ و ۴۴). در مطالعه‌ی انجام شده در سال ۲۰۰۶ توسط Du نشان داده شد که سلول‌های بنیادی جنینی، تحت تأثیر رتینوئیک اسید، توانایی تمایز به سلول‌های شبه عصبی- حرکتی را دارا بوده و این سلول‌ها ژن‌های oligo-2، islet-1 و HB9 را بیان می‌کنند (۴۵). همچنین، در این مطالعه نشان داده شد که سلول‌های oligo-2 مثبت در روز اول، بیشترین درصد را دارند که این نتایج مشابه با نتایج عبدانی پور است. علاوه بر آن، میزان بیان ژن HB9 از روز اول تا هفته دوم افزایش می‌یابد و بیشترین درصد بیان این مارکر در روز ۱۴ دیده می‌شود که این یافته ها نیز در توافق با مطالعات گذشته می‌باشد (۱۵ و ۴۵).

مکانیسم‌های تمایز در سلول‌های شبه عصبی- حرکتی کشت داده شده، معمولاً از طریق مورفولوژی، ایمنوسیتوشیمی و RT-PCR مورد بررسی قرار می‌گیرد (۱۵). این روش‌ها به صورت قطع نمی‌توانند فانکشنال بودن سلول‌های عصبی- حرکتی را نشان دهند (۱۶). روش‌های ارزیابی عملکرد سلول‌های عصبی- حرکتی از طریق بررسی دینامیک سلولی و ارتباطات عصبی- عضلانی انجام می‌گیرد. فعال بودن سلول‌ها، از طریق تنظیم محتوی سلول به وسیله اندوسیتوز و اگزوسیتوز تأیید می‌گردد (۱۷). چندین بررسی در سال‌های اخیر نشان داده که کلسیم با درجات مختلف، نقش مهمی در تبادلات سلولی و فعالیت‌های غشایی ایفا می‌کند (۱۸). همچنین، کلسیم از طریق کنترل فنوتیپ نوروترانسمیترها، مورفولوژی دندرتیک و رشد آکسونی، در تنظیم تمایز سلول‌های عصبی، نقش دارد. بر طبق گزارشات به دست آمده از مطالعات اخیر، کلسیم باعث فعال‌سازی آنزیم‌هایی در روند تمایز سلول‌های عصبی می‌شود (۴۶ و ۴۷). از جمله، از طریق فعال‌سازی آنزیم‌های ترانس‌کریپشنال (باعث کنترل بیان نوروترانسمیترها می‌شود) یا تنظیم حرکات اسکلت سلولی (کنترل مورفولوژی دندریت و آکسون)، بر روند تمایز مؤثر می‌باشند. ترشح نوروترانسمیترها از طریق وزیکول‌های ترشحی با استفاده از ابزار و تکنیک‌های متفاوتی مشخص می‌شود. نشانگرهای فلورسنت برای بررسی عملکرد پایانه‌های عصبی در

[Downloaded from pajoohande.sbmu.ac.ir on 2026-11-14]

سلول‌های عصبی بنیادی و سلولهای عصبی- حرکتی، مورد استفاده قرار گرفته است (۴۸ و ۴۹). در این مطالعه، از FM1-43 جهت رنگ آمیزی پایانه‌های عصبی و از نشانگر کلسیمی FLUO-2 جهت ثبت تغییرات کلسیم داخل سلولی استفاده شد. مطالعات انجام شده نشان داد که سلول‌های عصبی- حرکتی تمایز یافته از سلول‌های بنیادی بافت چربی، قادر به ترشح وزیکول‌های سیناپسی می‌باشند. در مطالعه‌ای مشابه در سال ۲۰۰۶، Soundararajan نشان داد که سلول‌های عصبی- حرکتی مشتق از سلول‌های بنیادی جنینی، توانایی ترشح وزیکول‌های سیناپسی را دارند. این فرایند، با رنگ‌آمیزی وزیکول‌های سیناپسی با استفاده از FM1-43 و روش الکتروفیزیولوژی patch-clamp تأیید گردید (۴۰). همچنین، در مطالعه‌ی دیگری که توسط Betz و همکارانش انجام شد، وجود ارتباطات عصبی- عضلانی با استفاده از رنگ فلورسنت FM1-43 و نشانگر کلسیمی RH414 نشان داده شد (۵۰). در تحقیق انجام شده در سال ۲۰۱۲، عملکرد سلول‌های عصبی- حرکتی مشتق از بافت جنینی و IPSCs، با استفاده از نشانگر کلسیمی AMFura Red و FLUO-2 انجام گرفت (۵۱). Smetters و همکارانش تبادلات کلسیم را در برش‌های نئوکورتیکال مغز مورد بررسی قرار دادند و دریافتند که در سلول‌های عصبی، تغییراتی در غشا و کانال‌های کلسیمی در زمان ترشح سیناپسی، دیده می‌شود (۴۷). در مطالعه‌ی انجام شده از طریق بررسی طیف رنگ‌های ایجاد شده در هنگام آزادسازی کلسیم و همچنین فعالیت استرازی رنگ در حضور کلسیم تغییر رنگ از قرمز به آبی و سبز، فعالیت کانال‌های کلسیمی و در نهایت فعالیت سلولی را نشان می‌دهد. همچنین هم‌کشتی سلول‌های القا شده در این مطالعه با سلول‌های میوسیت مشتق از رده‌ی C2C12، ارتباط عصبی- عضلانی را بین سلول‌های شبه عصبی- حرکتی و سلول‌های میوسیت نشان می‌دهد. ایجاد زواید متعدد سلولی در تقابل با سلول‌های میوسیت، نشان‌دهنده‌ی برقراری سیناپس بین سلول‌های هم‌کشتی می‌باشد. این نتایج، با یافته‌های سایر محققین در یک راستا بوده است. به این ترتیب، با نتایج به دست آمده در مطالعه‌ی فوق، می‌توان این‌چنین ارزیابی کرد که سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی، بر خلاف سایر منابع سلولی، جهت تزریق سلولی، مناسب و قابل دسترس می‌باشند. همچنین این سلول‌ها، توانایی تمایز به رده‌های عصبی و به‌خصوص سلول‌های شبه عصبی- حرکتی را داشته و بر خلاف سایر مطالعات انجام شده، با استفاده از روش حاضر، درصد سلول تولید شده بیشتر بوده و علاوه بر آن، سلول توانایی ترشح وزیکول‌های سیناپسی را نیز دارد. با وجود تولید سلول‌های شبه عصبی- حرکتی در سالهای اخیر از سلول‌های بنیادی جنینی و یا سلول‌های ترانسفکت شده با ژن‌های عصبی- حرکتی همچون oligo-2، islet-1 و HB9 که درصد تولید سلول‌های شبه عصبی- حرکتی را نیز افزایش می‌دهند، نیاز به ایجاد روش‌هایی برای تولید سلول با تعداد بالا و دارای عملکرد، احساس می‌شود. در این مطالعه، تلاش شد تا سلول‌های شبه عصبی- حرکتی از منابع ایمن‌تر و قابل دسترس‌تر و به تعداد بالا تولید شوند تا کارایی این سلول‌ها را برای درمان سلولی در اختلالات نورودژنراتیو افزایش دهد.

REFERENCES

1. Williams TL. Motor neuron disease: diagnostic pitfalls. Clin Med 2013;13(1):97–100.

2. Verstraete E, Veldink JH, Huisman MH. Lithium lacks effect on survival in amyotrophic lateral sclerosis: a phase II brandomised sequential trial. J NeurolNeurosurg Psychiatry 2012;83:557–64.

3. Abdanipour A, Tiraihi T, Delshad A. Trans-differentiation of the adipose tissue-derived stem cells into neuron-like cells expressing neurotrophins by selegiline. Iran Biomed J 2011;15(4):113–121.

4. Abbaszadeh H, Tiraihi T, Delshad A. Bone marrow stromal cell transdifferentiation into oligodendrocyte-like cells using triiodothyronine as a inducer with expression of platelet-derived growth factor α as a maturity marker. Restor Neurol Neurosci 2013:17(2):62–70.

5. Abdanipour A, Tiraihi T, Taheri T, Kazemi A. Microglial activation in rat experimental spinal cord injury model. Iran Biomed J 2013;17(4):214–220.

6. Karami M, Bathaie SZ, Tiraihi T, Habibi M, Arabkheradmand J, Faghihihzadeh S. Crocin improved locomotor function and mechanical behavior in the rat model of contused spinal cord injury through decreasing calcitonin gene related peptide (CGRP). Phytomedicine 2013;21(1):62–7.

7. Darabi S, Tiraihi T, Ruintan A, Abbaszadeh HA, 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.

8. Gharibani P, Tiraihi T. Improvement of contusive spinal cord injury in rats by co-transplantation of gamma-aminobutyric acid-ergic cells and bone marrow stromal cells. Cytotherapy. 2013;15(9):1073–85.

[Downloaded from pajoohande.sbmu.ac.ir on 2026-11-14]

9. Gharibani P, Tiraihi T, Arabkheradmand J, Kazemi. Induction of bone marrow stromal cells into GABAergic neuronal phenotype using creatine as inducer. Restor Neurol Neurosci 2012;30(6):511–25.

10. Kaka GR, TiraihiT, Delshad A, Arabkheradmand J, Kazemi. In vitro differentiation of bone marrow stromal cells into oligodendrocyte-like cells using triiodothyronine as inducer. Int J Neurosci 2012;122(5):237–47.

11. Abdanipour A, Tiraihi T. Induction of adipose-derived stem cell into motoneuron-like cells using selegiline as preinducer. Brain Res 2012;1440:23–33.

12. Nie X, Chen H, Tang N, Bian K. Progress in co-culture and differentiation in adipose-derived stem cells: a review. Sheng Wu Gong Cheng XueBao 2011;27(8):1121–31.

13. Chen PP, Zhang LH, Dong WR, Zhang Y, Qiao WG, Chen YH, et al. A two-step protocol for induction of rat adipose tissue-derived stem cells into neuron-like cells. Nan Fang Yi Ke Da XueXueBao 2011;31(3):512–7.

14. Ahmadi N, Razavi S, Kazemi M, Oryan S. Stability of neural differentiation in human adipose derived stem cells by two induction protocols. Tissue Cell 2012;44(2):87–94.

16. Bustin SA: Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. J Mol Endocrinol 2002;29:23–39.

17. De-Miguel FF, Santamaría-Holek I, Noguez P, Bustos C, Hernández-Lemus E, Rubí JM. Biophysics of active vesicle transport, an intermediate step that couples excitation and exocytosis of serotonin in the neuronal soma.PLoS One 2012;7(10):e45454.

18. Michel K, Michaelis M, Mazzuoli G, Mueller K, VandenBerghe P, SchemannM. Fast calcium and voltage-sensitive dye imaging in enteric neurones reveal calcium peaks associated with single action potential discharge. J Physiol 2011; 589(Pt 24):5941–7.

19. Ma W, Fitzgerald W, Liu QY, O'Shaughnessy TJ, Maric D, Lin HJ, et al. CNS stem and progenitor cell differentiation into functional neuronal circuitsinthree-dimensional collagen gels. Exp Neurol 2004;190:276–88.

20. Küppers-Munther B, Letzkus JJ, Lüer K, Technau G, Schmidt H, Prokop A. A new culturing strategy optimizes Drosophila primary cell cultures for structural and functional analyses. Dev Biol 2004;269:459–78.

21. Miles GB, Yohn DC, Wichterle H, Jessell TM, Rafuse VF, Brownstone RM. Functional properties of motoneuronsderived from mouse embryonic stem cells. J Neurosci 2004;24:7848–58.

22. Trueta C, De-Miguel FF. Extrasynaptic exocytosis and its mechanisms: a source of molecules mediating volume transmission in the nervous system. Front Physiol 2012;3:175. doi: 10.3389/fphys.2012.00319.

23. Henkel AW, Lübke J, Betz WJ. FM1-43 dye ultrastructural localization in and release from frog motor nerve terminals. Proc Natl Acad Sci USA 1996;93:1918–23.

24. Huang L, Liu Y, Zhang P, Kang R, Liu Y, Li X, et al. In vitro dose-dependent inhibition of the intracellular spontaneous calcium oscillations in developing hippocampal neurons by ketamine. PLoS One 2013;8(3):e59804.

25. Leao RN, Reis A, Emirandetti A, Lewicka M, Hermanson O, et al. A voltage-sensitive dye-based assay for the identification of differentiated neurons derived from embryonic neural stem cell cultures. PLoS ONE 2010;5(11): e13833.

26. Honsek SD, Walz C, Kafitz KW, Rose CR. Astrocyte calcium signals at Schaffer collateral to CA1 pyramidal cell synapses correlate with the number of activated synapses but not with synaptic strength. Hippocampus 2012;22(1):29–42.

27. Karumbayaram S, Kelly TK, Paucar AA, Roe AJT, Umbach JA, Charles A, et al. Human embryonic stem cell-derived motor neurons expressing SOD1 mutants exhibit typical signs of motor neuron degeneration linked to ALS. Dis Model Mech 2009;2(3–4):189–95.

28. 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(Suppl 1):S35–S40.

29. 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;9:21. doi: 10.1186/1471-2202-9-21.

30. Naghdi M, Tiraihi T, Namin SA, Arabkheradmand J.Transdifferentiation of bone marrow stromal cells into cholinergic neuronal phenotype: a potential source for cell therapy in spinal cord injury. Cytotherapy 2009;11:137–52.

32. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, et al. Multilineage cells fromhuman adipose tissue: implications for cell-based therapies. Tissue Eng 2001;7:211–28.

33. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. Mol Biol Cell 2002; 13:4279–95.

34. Yoshimura K, Shigeura T, Matsumoto D, Sato T, Takaki Y, Aiba-Kojima E, et al. Characterization of freshly isolated and cultured cells derived from the fattyand fluid portions of liposuction aspirates. J Cell Physiol 2006;208:64–76.

[Downloaded from pajoohande.sbmu.ac.ir on 2026-11-14]

35. Matsumoto D, Sato K, Gonda K, Takaki Y, Shigeura T, Sato T, et al. Cell-assisted lipotransfer (CAL): supportive use of human adipose-derived cells for soft tissue augmentation with lipo injection. Tissue Eng 2006;12(12):3375–82.

36. Kokai LE, Rubin JP, Marra KG. The potential of adipose-derived adult stem cells as a source of neuronal progenitor cells. Plast Reconstr Surg 2005;116:1453–60.

37. Qian DX, Zhang HT, Ma X, Jiang XD, Xu RX. Comparison of the efficiencies of three neural induction protocols in human adipose stromal cells. Neurochem Res 2010;35(4):572–9.

38. Safford KM, Rice HE. Stem cell therapy for neurologic disorders: therapeutic potential of adipose-derived stem cells. Curr Drug Targets 2005;6(1):57–62.

39. López-González R, Velasco I. Therapeutic potential of motor neurons differentiated from embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells. Arch Med Res 2012;43(1):1–10.

40. Soundararajan P, Miles GB, Rubin LL, Brownstone RM, RafuseVF. Motoneurons derived from embryonic stem cells express transcription factors and develop phenotypes characteristic of medial motor column neurons. J Neurosci 2006;26(12):3256–68.

41. Mey J, McCaffery P. Retinoic acid signaling in the nervous system of adult vertebrates. Neuroscientist 2004;10(5): 409–21.

42. Mey JZ. Retinoic acid as a regulator of cytokine signaling after nerve injury. Z Naturforsch C 2001;56(3–4):163–76.

43. Afonso ND, Catala M. Sonic hedgehog and retinoic acidare not sufficient to induce motoneuron generation in theavian caudal neural tube. Dev Biol 2005;279:356–67.

44. Reilly JO, Karavanova ID, Williams KP, Mahanthappa NK, Allendoerfer KL. Cooperative effects of sonic hedgehogand NGF on basal forebrain cholinergic neurons. Mol Cell Neurosci 2002;19:88–96.

45. Du ZW, Li XJ, Nguyen GD, Zhang SC. Inducedexpression of Olig2 is sufficient for oligodendrocyte specification but not for motoneuron specification andastrocyte repression. Mol Cell Neurosci 2006;33:371–80.

46. MaoBQ, Hamzei-SichaniF, AronovD, FroemkeRC, Yuste R. Dynamics of spontaneous activity in neocortical slices. Neuron 2001;32:883–98.

47. Smetters DK, Majewska A, Yuste R. Detecting action potentials in neuronal populations with calcium imaging. Methods 1999;18:215–21.

48. Tanaka E, Uchikado H, Niiyama S, Uematsu K, Higashi H. Extrusion of intracellular calcium ion after in vitro ischemia in the rat hippocampal CA1 region. J Neurophysiol 2002;88:879–87.

49. Vogelstein JT, Packer A, Machado TM, Sippy T, Babadi B, Yuste R, Paninski L. Fast non-negative deconvolution for spike train inference from population calcium imaging. J Neurophysiol 2010;104:3691–704.

50. Betz WT, Mao GS. Activity-dependent fluorescent staining and destaining of living vertebrate motor nerve terminals. J Neurosci 1992;12(2):363–75.

51. Thompson K, Dockery P, Horobin RW. Predicting and avoiding subcellularompartmentalization artifacts arising from acetoxymethyl ester calcium imaging probes. The case of fluo-3 AM and a general account of the phenomenon including a problem avoidance chart. Biotech Histochem 2012;87(7):468–83.

[Downloaded from pajoohande.sbmu.ac.ir on 2026-11-14]