

## بررسی میزان بقا، آپتوزیس و بیان ژن P75NTR در سلول های بنیادی مشتق از بافت چربی به هنگام تمایز عصبی در بی وزنی شبیه سازی شده

وجیهه زرین پور <sup>۱</sup>Ph.D. Student، زهرا حاج ابراهیمی <sup>۲</sup>Ph.D.\*، مجتبی جعفری نیا <sup>۱،۲</sup>Ph.D.

۱- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات فارس، گروه زیست شناسی، مرودشت، ایران

۲- دانشگاه آزاد اسلامی مرودشت، گروه زیست شناسی، واحد مرودشت، مرودشت، ایران

۳- پژوهشگاه هوافضا، وزارت علوم، تحقیقات و فناوری، تهران، ایران

\* پست الکترونیک نویسنده مسئول: [hajebrahimi@ari.ac.ir](mailto:hajebrahimi@ari.ac.ir)

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۶/۱۴

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۴/۱۱

### چکیده

**هدف:** در مطالعه حاضر اثر بی وزنی بر میزان مرگ و میر سلولی و بیان ژن p75NTR قبل و بعد از تمایز عصبی سلول های مزانشیمی مشتق از بافت چربی بررسی شد.

**مواد و روشها:** در این مطالعه ابتدا سلول های بنیادی مزانشیمی از بافت چربی جدا و کشت و تمایز داده شد. دستگاه کلینواست تک محوره برای شبیه سازی بی وزنی به مدت ۶، ۲۴ و ۷۲ ساعت استفاده شد. از سلول ها استخراج RNA صورت گرفت و تغییرات بیان ژن با تکنیک Real-time PCR بررسی شد. میزان زنده بودن سلول ها با روش MTT و میزان آپتوزیس با تست انکسین اندازه گیری شد.

**نتایج:** نتایج ما نشان داد که بی وزنی به طور قابل توجهی منجر به کاهش میزان بیان p75NTR در سلول های مزانشیمی شد. بی وزنی تاثیر معنی داری بر میزان زنده بودن سلول ها قبل و بعد از القای تمایز به سلول های شبه عصبی نداشت؛ اما میزان آپتوزیس را در سلول های تمایز نیافته در مقایسه با نمونه های کنترل کاهش داد.

**نتیجه گیری:** با توجه به کاهش میزان مرگ و میر و افزایش پتانسیل تمایزی سلول ها، بی وزنی می تواند به عنوان ابزاری قدرتمند و محیط جدیدی برای کشت و تمایز سلول های عصبی و دستیابی به درمان های پیوند موفق تر معرفی شود.

**واژگان کلیدی:** سلول های بنیادی مشتق از بافت چربی، بی وزنی، نوروتروفین، P75NTR، آپتوزیس

## مقدمه

توانایی سیستم عصبی پستانداران بالغ برای جایگزین کردن نورون‌های آسیب‌دیده و ترمیم ضایعات عصبی بسیار محدود می‌باشد. علی‌رغم وجود سلول‌های بنیادی عصبی در مناطق محدودی از سیستم عصبی مرکزی در افراد بالغ، توانایی این سلول‌ها برای ترمیم بافت‌های آسیب‌دیده ناچیز می‌باشد (۱). در چند دهه اخیر، پیوند سلول‌های شبه عصبی حاصل از تمایز سلول‌های بنیادی جنینی یا بالغ به‌عنوان ابزار قدرتمندی جهت درمان ضایعات سیستم عصبی مورد توجه بوده است (۲-۴). پیوند موفقیت‌آمیز این سلول‌ها در محل ضایعه بستگی به زنده ماندن طولانی مدت این سلول‌ها و فعالیت صحیح آن‌ها در محل جدید دارد. این واقعیت که اغلب این سلول‌های شبه عصبی قبل یا بعد از پیوند دچار مرگ می‌شوند. استفاده‌ی بالینی آن‌ها را با مشکل مواجه ساخته است (۵). بنابراین یکی از چالش‌های مهم بالینی، جلوگیری از مرگ نورون‌ها یا سلول‌های گلیالی حاصل از تمایز نورونی سلول‌های بنیادی می‌باشد.

در سال‌های اخیر، سلول‌های بنیادی مزانشیمی به‌صورت گسترده‌ای جهت جایگزینی سلول‌های عصبی و ترمیم ضایعات عصبی هم باهدف پیوند برای فرد دهنده (پیوند اتولوگ) و هم با هدف پیوند در بیماران دیگر استفاده شده است (۶ و ۷). فعالیت سلول‌های پیوند شده در محل ضایعه عصبی، بستگی به زنده ماندن طولانی مدت این سلول‌ها دارد. یکی از مشکلاتی که در استفاده از سلول‌های شبه عصبی حاصل از تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی برای ترمیم ضایعات سیستم عصبی مرکزی وجود دارد. مرگ اکثر این سلول‌ها به دنبال تمایز نورونی آنها می‌باشد (۵).

نوروتروفین‌ها از مهمترین فاکتورهای رشد در سیستم عصبی می‌باشند که نقش کلیدی در بقا و مرگ سلول‌های عصبی دارند. این پروتئین‌ها نقش خود را از طریق دو نوع گیرنده، گیرنده اختصاصی  $Trk(TrkA, TrkB, TrkC)$  و گیرنده عمومی (p75NTR) اعمال می‌نمایند (۸). اتصال اعضای خانواده نوروتروفین‌ها به گیرنده اختصاصی خود،

موجب بقای سلول‌های عصبی هدف می‌شوند. این در حالی است که در سلول‌های فاقد گیرنده  $Trk$ ، اتصال نوروتروفین‌ها به گیرنده عمومی p75NTR بیشتر از آنکه از مرگ نورون‌ها جلوگیری کند، آنرا تشدید می‌کند. گیرنده p75NTR مسیرهای متعددی از جمله NF $\kappa$ B و کیناز JUN را فعال می‌کند. فعال شدن مسیر NF $\kappa$ B موجب زنده ماندن نورون‌های حسی و سمپاتیک جنینی می‌شوند، اما فعال شدن مسیر کیناز Jun می‌تواند با به‌کارگیری پروتئین P53 و افزایش بیان لیگاند Fas، موجب بروز آپوپتوزیس در سلول شود (۹). نکته جالب توجه این است که مشخص شده است که بیان ژن p75NTR در سلول‌های شبه عصبی حاصل از تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی هم‌زمان با رخداد مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده (آپوپتوزیس) در سلول‌های کشت داده شده می‌باشد (۱۰) به‌گونه‌ای که مهار بیان این ژن، موجب کاهش آپوپتوزیس در این سلول‌ها می‌شود (۱۱).

در سال‌های اخیر، نیروهای بیوفیزیکی مانند جریان، تنش برشی و جاذبه به‌طور فزاینده‌ای به‌عنوان یک روش کشت و دست‌کاری سلول‌ها به‌تنهایی و یا همراه با تکنیک‌های بیوشیمیایی مورد توجه قرار گرفته است. جاذبه، یکی از مهم‌ترین نیروهای محیطی است که در طول حیات در تکامل موجودات زنده موثر بوده است. حذف این نیرو و مطالعه سلول‌ها در شرایط بی‌وزنی می‌تواند منجر به روشن شدن بسیاری از سوالات علم زیست‌شناسی و حتی بهبود کیفیت زندگی بشر بر روی زمین شود (۱۲). مطالعات نشان داده است که بی‌وزنی می‌تواند تمایز، تکثیر سلولی و رشد سلول را تحریک کرده و منجر به رشد سه بعدی سلول، بدون نیاز به داربست شود که این امر در مهندسی بافت و ارگان بسیار حائز اهمیت می‌باشد (۱۳-۱۵). علاوه بر این مشخص شده است که بی‌وزنی می‌تواند تمایز سلول‌های بنیادی را تسریع نماید (۱۶). مطالعات قبلی نشان داده است که بی‌وزنی تاثیر مثبت بر تمایز نورونی سلول‌های بنیادی مزانشیمی دارد به‌گونه‌ای که بی‌وزنی منجر به افزایش تمایز سلول‌های

زاک و همکاران (۱۹) انجام شد. ابتدا به منظور هضم بافت چربی، هم حجم بافت چربی آنزیم کلاژناز نوع 1A (Sigma, USA) اضافه شد و مخلوط به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. برای خنثی کردن آنزیم، هم حجم مخلوط، محیط کشت DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium; Biowest, France) به همراه ۱۰ درصد سرم گاوی (FBS; Biowest, France) اضافه شد و سپس با دور ۴۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. رسوب سلولی به دست آمده در محیط کشت DMEM حاوی ۱۰ درصد سرم و ۱ درصد آنتی بیوتیک‌های پنی سیلین/استرپتومایسین یک درصد و ۲۵ نانوگرم بر میلی‌لیتر آمفوتریسین بی (amphotericin B) (Biowest, France) حل شد و در فلاسک T25 (TPP, Switzerland) در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد با ۵ درصد گاز دی اکسید کربن کشت داده شد. روز بعد محیط کشت تعویض شد. به هنگام تعویض محیط، سلول‌ها توسط فسفات بافر سالین استریل شسته شدند. سلول‌هایی که به کف ظرف پلاستیکی نچسبیده بودند با تعویض محیط از ظرف خارج شدند. تعویض محیط هر دو روز یک بار و تا تخلیه‌ی کامل سلول‌های خونی و بقایای سلولی انجام شد پس از پرشدن بیش از ۸۰ درصد کف فلاسک، پاساژ دهی با آنزیم تریپسین-EDTA ۰/۰۵ درصد (Biowest, France) انجام شد و شمارش سلولی توسط لام هماتوسایتومتر انجام شد. بعد از سه تا چهار پاساژ، سلول‌ها برای آنالیزهای بعدی مورد استفاده قرار گرفتند. همچنین سلول‌ها از ابتدا، روزانه از نظر شکل ظاهری و شرایط عمومی توسط میکروسکوپ بررسی شدند. جهت اثبات مزانشیمی بودن سلول‌های استخراج شده، روش فلوسایتومتری و تمایز به دو رده استخوان و چربی انجام شد (۱۸). در روش فلوسایتومتری آنتی ژن‌های سطحی CD90، CD105 و CD73 به عنوان مارکرهای مثبت و CD34 و CD45 به عنوان مارکرهای

مزانشیمی به سلول‌های شبه عصبی و افزایش بیان نوروتروفین‌ها در این سلول‌ها می‌شود (۱۷ و ۱۸). شرایط بی‌وزنی را می‌توان با پروازهای فضایی یا سقوط آزاد ایجاد کرد. به دلیل محدودیت در سفرهای فضایی و کوتاه بودن طول مدت بی‌وزنی در سقوط آزاد، روش‌هایی برای شبیه‌سازی شرایط بی‌وزنی بر روی زمین توسعه یافته است که از بین آن‌ها دستگاه کلینواست تک محوره، وسیله مفیدی برای شبیه‌سازی بی‌وزنی برای سلول‌ها است (۱۲). با توجه به مطالب گفته شده، هدف از مطالعه حاضر بررسی اثر بی‌وزنی بر میزان مرگ و میر سلولی و بیان ژن p7NTR5 قبل و بعد از تمایز عصبی سلول‌های مزانشیمی مشتق از بافت چربی (Adipose derived stem cells=ADSC) می‌باشد.

#### مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر از نوع مداخله‌ای آینده‌نگر بوده و در آزمایشگاه زیست‌شناسی، پژوهشگاه هوافضا از تاریخ ۱۳۹۳ تا ۱۳۹۵ به انجام رسیده است. بافت چربی از ۲ زن سالم (۳۴ و ۴۸ سال) مراجعه کننده به مرکز پزشکی لیزر دانشگاه تهران (ACECR) و با رضایت افراد اهدا کننده طی عمل لیپوساکشن به دست آمد. بافت چربی به دست آمده تحت شرایط کاملا استریل به آزمایشگاه تحقیقاتی پژوهشگاه هوافضا منتقل شد. کد اخلاق IR.ACECR.ROYAN.REC.1395.54 بود.

#### استخراج سلول‌های بنیادی مشتق از چربی و اثبات

مزانشیمی بودن آن‌ها: به منظور حذف سلول‌های خونی، نمونه‌های بافت چربی جدا شده و در داخل فالكون ۵۰ میلی‌لیتر استریل منتقل شد و چندین بار توسط بافر فسفات سالین شستشو داده شد. سپس نمونه‌ها با محلول HBSS (Hank's Balanced Salt Solution; Biowest, France) شسته شد و برای جداسازی سلول‌های بنیادی مورد استفاده قرار گرفتند. جداسازی سلول‌های بنیادی در آزمایشگاه مطابق روش

منفی بررسی شدند و نمونه‌ها با استفاده از دستگاه فلوسایتومتری (Cyflow Space, Partec, Germany) و نرم افزار FloMax (version 2.70) آنالیز شدند (۲۰). برای بررسی پتانسیل تمایزی سلول‌ها، از کیت تمایزی Human Mesenchymal Stem Cell Functional Identification (R&D systems, USA) و مطابق دستورالعمل کیت استفاده شد. به‌طور خلاصه پس از کشت سلول‌ها در پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای، محیط تمایز به چربی ( $\alpha$ -MEM، ۱۰ درصد سرم، ۰/۵ میکرومول ایزوبوتیل متیل زانتین، ۱ میکرومول دگزامتازون و ۶۰ میکرومول ایندومتاسین) و یا محیط تمایز به استخوان ( $\alpha$ -MEM، ۱۰ درصد سرم، ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر اسکوربیک فسفات و ۱۰ میکرومول  $\beta$ گلیسرول فسفات) به ترتیب برای تمایز به چربی و استخوان به سلول‌ها اضافه شد. پس از ۷ الی ۱۴ روز، آدیپوسیت‌ها تثبیت شده و با رنگ Oil-Red O برای تایید تمایز آدیپوژنیک رنگ آمیزی شدند. نواحی که به سلول‌های چربی تمایز پیدا کرده بودند به علت واکنش تری‌گلیسیریدهای موجود در سلول‌های تمایز یافته با رنگ Oil Red به رنگ قرمز درآمدند و با میکروسکوپ نوری مشاهده شدند. برای بررسی تمایز به سلول‌های استخوانی، پس از ۲۱ روز سلول‌ها با Alizarin Red S رنگ آمیزی شدند. سلول‌های تمایز یافته به استخوان به علت وجود رسوبات کلسیمی در حضور این رنگ به رنگ قرمز درآمدند (۲۰).

مکانیسم‌های القا خارج شده و محیط القایی (NIM) Neural Induction Medium اضافه شد. سلول‌ها در زمان‌های مختلف زیر میکروسکوپ بررسی شده و در ساعات ۶، ۲۴ و ۷۲ ساعت پس از القا، سلول‌ها جهت استخراج RNA لیز و یا این که جهت مطالعات دیگر استفاده شد. به‌جز تعویض محیط کشت معمولی هیچ تغییر دیگری روی نمونه‌های کنترل اعمال نشد. محیط القاکننده عصبی شامل مواد زیر بود: محیط کشت  $\alpha$ -MEM، bFGF (۱۰ ng/ml)، butylatedhydroxyanisole، Forskolin (۱۰  $\mu$ M) (Sigma)، KCl (۲۵ mM)، valporic acid (۲ mM) (شرکت داروسازی رازک، تهران) و انسولین انسانی regular (۵  $\mu$ g/ml) (داروسازی لرستان، ایران).

**تیمار بی‌وزنی:** تمامی نمونه‌های مورد مطالعه (تمایز نیافته و تمایز یافته) شامل دو گروه بودند: سلول‌های کنترل (۱G یا بدون بی‌وزنی) و نمونه‌های بی‌وزنی (۶ ساعت، ۲۴ ساعت و ۷۲ ساعت). میزان بی‌وزنی ۱G/۰/۰۰ بود. برای ایجاد بی‌وزنی از دستگاه کلینواست تک محوره در پژوهشگاه هوافضا که از سازمان ملل گرفته شده بود، استفاده شد. چرخش دستگاه به صورتی است که جاذبه برای سلول‌ها قابل تشخیص نیست.

مراحل ایجاد بی‌وزنی به شرح زیر بود: دستگاه کلینواست پس از استریل کردن توسط نور ماورای بنفش و الکل ۷۰ درصد، در داخل انکوباتور کشت سلولی قرار داده شد. دور دستگاه کلینواست بر روی ۱۰ rpm تنظیم شد و سپس پلیت بر روی صفحه کلینواست توسط چسب دوطرفه چسبانده شد (پلیت باید به نحوی بر روی صفحه کلینواست قرار گیرد که خانه‌های حاوی سلول در مرکز صفحه قرار گیرد تا میزان جی وارده بر سلول‌ها ۰/۰۰۱ باشد). دستگاه را روشن کرده و در زمان‌های ۶، ۲۴ و ۷۲ ساعت دستگاه را قطع کرده و نمونه‌ها جهت استخراج RNA خارج شدند. لازم به ذکر است نمونه‌های کنترل همزمان در داخل انکوباتور و خارج از کلینواست قرار

**تمایز سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی به سلول‌های شبه عصبی:** تمایز عصبی بر اساس پروتکل قبلی ما انجام شد (۲۰). به‌طور خلاصه، ابتدا سلول‌های بنیادی مشتق از چربی در فلاسک  $25\text{ cm}^2$  کشت داده شدند. زمانی که رشد سلول‌ها به حدود ۷۰ تا ۸۰ درصد رسید، سلول‌ها به پلیت‌های ۹۶ خانه منتقل شد. پس از چسبیدن سلول‌ها به کف ظرف، محیط کشت عوض شد و به همه آن‌ها ۲۵۰ میکرولیتر محیط پیش القا (محیط کشت کامل تازه دارای ۱۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر بتا

استفاده از ۲ میکرولیتر از محصول cDNA، پرایمرهای مخصوص هر ژن (جدول ۱)، کیت SYBR Green (Takara, Japan) Real Time Master Mix و دستگاه StepOnePlus Real-Time PCR (Applied Biosystems, USA) انجام شد. شرایط دمایی مورد استفاده شامل یک مرحله فعال سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه و در ادامه ۴۰ سیکل به صورت ۵ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای دناتوراسیون و ۳۰ ثانیه در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد برای گسترش هم‌زمان بود. برای اطمینان از اختصاصی بودن محصولات، منحنی ذوب برای ژن‌ها بعد از انجام واکنش Real time PCR رسم شد. میزان بیان ژن با روش کمی نسبی و تعیین  $\Delta\Delta CT$  و استفاده از فرمول  $2^{-\Delta\Delta CT}$  محاسبه گردید. از GAPDH به عنوان ژن رفرانس استفاده شد. بیان نسبی با استفاده از نرم افزار REST 2009 (Version 2.0.13) اندازه‌گیری شد. پرایمرهای اختصاصی با نرم افزار OLIGO7 طراحی شد و توسط شرکت MacroGen (South Korea) سفارش داده شد. توالی پرایمرها در جدول ۱ آورده شده است.

گرفتند. همچنین از آنجا که خانه‌ها پر از محیط کشت شده و درب آن محکم بر روی پلیت قرار می‌گرفت، امکان تبادل گاز دی‌اکسیدکربن وجود نداشت. برای حل این مشکل از HEPES ۱۵ میلی‌مولار استفاده شد که به محیط کشت اضافه شد. کلیه آزمایشات ۳ بار تکرار شد.

**آنالیز بیان ژن به روش Real-time PCR** میزان بیان گیرنده p75NTR قبل و بعد از القا تمایز عصبی و نیز قبل و بعد از تیمار بی‌وزنی توسط Real-time quantitative PCR بررسی شد. RNA تام سلولی از سلول‌های تمایز داده شده و تمایز داده نشده با استفاده از کیت استخراج RNA (Cell Amp™ Direct RNA Prep Kit for RT-PCR; Takara, Japan) استخراج شد و بلافاصله در نیتروژن مایع فریز شد و در دمای -۷۵ درجه سانتی‌گراد تا زمان استفاده نگه‌داری شد. یک میکروگرم از RNA تام برای سنتز cDNA و با استفاده از کیت Prime Script™ RT reagent (Takara, Japan) در حجم واکنش ۲۰ میکرولیتر و مطابق پروتکل شرکت سازنده استفاده شد. جهت تکثیر ژن‌های P75NTR و رفرانس، واکنش Real time PCR با

جدول ۱: ترادف و مشخصات پرایمرهای به کار گرفته شده در این مطالعه

نام ژن	RefSeq شماره	توالی پرایمر (ه به ۳)	طول محصول PCR (bp)
GAPDH	NG_007073.2	Forward: GGAAGGTGAAGGTCGGAGTCA Reverse: TCATTGATGGCAACAATATCCACT	101
P75NTR	NM_002507.3	Forward : ACCACCGACAACCTCATCC Reverse : TGTTGGCTCCTTGCTTGTCT	121

میلی‌لیتر) اضافه شد. سپس نمونه‌ها برای مدت ۳ تا ۴ ساعت در انکوباتور قرار داده شد تا رسوب بنفش ظاهر شود. بعد از آن محیط به آرامی خارج شد و ۲۰۰ میکرو لیتر دی‌متیل سولفوکساید (DMSO) به هر چاهک اضافه و پیتاژ انجام شد. در نهایت جذب نوری در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه ایزا ریدر خوانده شد. سپس میزان زنده بودن سلول‌ها با کمک منحنی استاندارد به درصد محاسبه شد.

**تست MTT** برای بررسی میزان زنده بودن سلول‌ها و یا بررسی فعالیت متابولیسمی سلول‌ها از کیت MTT شرکت ATOCEL به شماره ABM21-P1 استفاده شد. برای این منظور ابتدا سلول‌ها به تعداد ۵۰ هزار در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه کشت داده شدند. سلول‌ها به مدت ۳ روز در شرایط بی‌وزنی کشت شدند. پس از آن به هر چاهک، ۲۰ میکرو لیتر محلول MTT (۱۰ میلی‌گرم بر

Whitney به وسیله نرم افزار SPSS version 15 انجام شد. سطح معنی دار  $p < 0.05$  در نظر گرفته شد.

### نتایج

#### مشخصات فنوتیپی ADSC و تغییرات مورفولوژیکی در طی القای عصبی

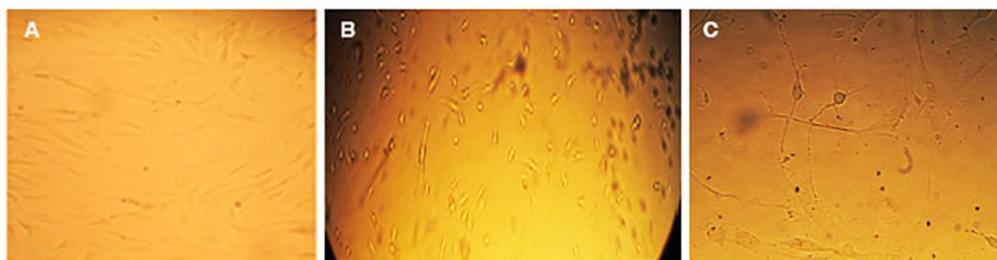
پس از استخراج و کشت ADSCها، آنها به کف پلاستیکی فلاسکهای کشت چسبیدند و جمعیتی از سلولهای هتروژن با مورفولوژی سلولهای دوکی شکل را نشان دادند که در بین آنها تعداد کمی قطرات چربی هم دیده می‌شد. ADSCها به سرعت در انکوباتور تکثیر می‌شدند و تقریباً پس از گذشت دو پاساژ از کشت اولیه، آنها شامل جمعیتی هموژن با مورفولوژی فیروبلاست مانند شدند (شکل ۱A). آنالیز فلوسایتومتری در پاساژ ۲ نشان داد که بیش از ۹۵ درصد سلولها ماهیت مزانشیمی داشتند. و برای مارکرهای CD90، CD73 و CD105 مثبت بودند در حالی که برای مارکرهای هماتوپویتیک CD34 و CD45 منفی گزارش شدند (۲۰). همچنین استفاده از محیط القایی تمایز به چربی و استخوان و رنگ آمیزی با رنگ‌های Oil Red O و Alizarin Red S اثبات کرد که سلولهای استخراج شده بنیادی بوده و پتانسیل تمایز به رده‌های مختلف سلولی را دارا هستند (۲۰).

پروتکل اجرا شده برای القای تمایز شامل دو مرحله پیش‌تمایزی و تمایز بود. پس از قرار دادن ADSCها در معرض محیط پیش-القایی، مورفولوژی سلولهای ADSC تغییر پیدا نکرد. اما به فاصله دو تا سه ساعت پس از قرار گرفتن در محیط تمایزی NIM سلولها شروع به تغییر شکل به سمت سلولهای شبه عصبی نمودند. به این ترتیب که ابتدا سیتوپلاسم و جسم سلولی پهن و گسترده و چند وجهی شد و سپس زوائد سلولی شبیه دندریت و اکسون ظاهر شدند (شکل ۱B و C). این تغییرات مورفولوژیکی مطرح کننده تمایز عصبی در مدت زمان کوتاهی پس از القاء بود که همچنان نیز ادامه داشت به طوری که ۱۲ ساعت پس از القاء تقریباً ۹۰ درصد سلولها مورفولوژی شبه نورونی داشتند.

**تست انکسین:** برای تشخیص سلولهای در حال آپوپتوزیس در یک جمعیت سلولی (و نه در بافت) از کیت Annexin-V-FluOS Staining kit استفاده شد. این کیت امکان تشخیص و تمیز دادن سلولهای در حال آپوپتوزیس را از سلولهای نکروزیس میسر می‌سازد. بدین منظور محیط کشت سلولها در یک ظرف تمیز تخلیه و نگهداری شد و سطح سلولها دو مرتبه با PBS شستشو داده شد. سپس سلولها تریپسینه شدند تا به طور کامل از کف فلاسک جدا شوند. محیط روئی به سوسپانسیون سلولی اضافه شد. سوسپانسیون سلولی در دور ۲۰۰g به مدت ۶ دقیقه در دمای محیط سانتریفیوژ شد. محلول روئی تخلیه شد و رسوب در ۰/۵ میلی لیتر PBS حل شد. سپس ۴/۵ میلی لیتر اتانول ۷۰ درصد سرد به نمونهها افزوده شد و به شدت پیچانده شد. سلولهای تثبیت شده در دور ۲۰۰g به مدت ۶ دقیقه در دمای محیط سانتریفیوژ شدند. محلول روئی تخلیه شد و رسوب در ۵ میلی لیتر بافر PBS حل شد. مجدداً سلولها در دور ۲۰۰g به مدت ۶ دقیقه در دمای محیط سانتریفیوژ شدند. محلول روئی تخلیه شد. در نهایت ۲۰ میکرولیتر ماده Annexin-V-Fluos در ۱ میلی لیتر بافر انکوباسیون حل شد و به آن ۲۰ میکرولیتر محلول پروپیدیم آیویداید (PI) اضافه شد. ۱۰۰ میکرولیتر از محلول حاصل به سلولهای آماده شده افزوده شد. سلولها برای مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۵ تا ۲۵ درجه سانتی گراد انکوبه شدند و جهت آنالیز وارد دستگاه فلوسایتومتری شدند.

#### آنالیز آماری

آنالیز آماری اطلاعات به دست آمده شامل درصد بیان مارکرهای سطحی در سلولهای بنیادی مشتق از بافت چربی و درصد بیان مارکرها در سلولهای عصبی و درصد مرگ و میر سلولی و نیز میزان زنده مانده سلولها، توسط آزمون آماری آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) و آزمون Tukey و همچنین آزمون غیر پارامتریک Mann-

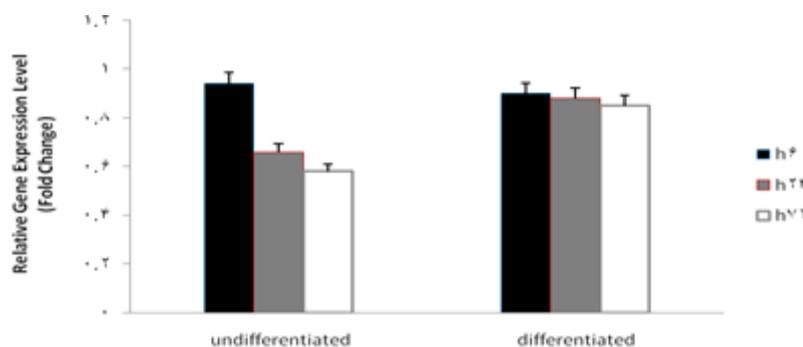


شکل ۱: استخراج و تمایز عصبی سلول‌های ADSC. فنوتیپ سلول‌ها پس از اضافه کردن محیط کشت القایی شروع به تغییر می‌کند. (A) سلول‌های تمایز نیافته (۱۰۰×) (B) سلول‌های شبه عصبی ۶ ساعت پس از القاء تمایز (۱۰۰×) (C): سلول‌های شبه عصبی ۲۴ ساعت پس از القاء تمایز (۱۰۰×). جسم سلولی مدور بزرگ و زوائد دندروتیک مانند ظاهر شده است.

### آنالیز بیان ژن

برای بررسی اثر بی‌وزنی بر بیان ژن P75NTR، ADSCها پس از ۶، ۲۴ و ۷۲ ساعت تیمار بی‌وزنی توسط کلینواستت جمع‌آوری شدند. سلول‌های شبه عصبی نیز بعد از ۶، ۲۴ و ۷۲ ساعت تیمار بی‌وزنی توسط کلینواستت جمع‌آوری شدند. برای اندازه‌گیری تغییرات میزان بیان از واکنش Real time PCR استفاده شد. نتایج نشان داد که ژن P75NTR هم قبل از تمایز و

هم بعد از آن در سلول‌های استخراج شده بیان می‌شود. به دنبال تیمار بی‌وزنی کاهش تدریجی و مشخصی در بیان ژن P75NTR دیده شد. به طوری که بی‌وزنی منجر به کاهش بیان ژن P75NTR (در حدود ۴۰ درصد) در مقایسه با نمونه کنترل پس از ۷۲ ساعت در سلول‌های تمایز نیافته شد. پس از القای تمایز، بیان ژن P75NTR در نمونه‌های بی‌وزنی در مقایسه با نمونه کنترل (IG) اختلاف معنی‌داری را نشان نداد ( $p > 0.05$ ) (شکل ۲).

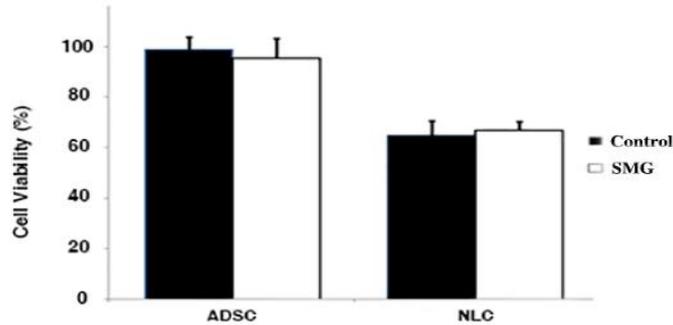


شکل ۲: بیان ژن P75NTR در ۶ ساعت و ۲۴ ساعت و ۷۲ ساعت بعد از تیمار بی‌وزنی در گروه بی‌وزنی در مقایسه با گروه نرمال زمینی. بیان ژن‌ها با ژن رفرانس GAPDH نرمالیز شده است. بی‌وزنی منجر به کاهش معنی‌دار بیان ژن P75NTR در مقایسه با نمونه کنترل در سلول‌های تمایز نیافته شد. بیان ژن P75NTR در نمونه‌های بی‌وزنی در مقایسه با نمونه کنترل (IG) پس از القای تمایز، اختلاف معنی‌داری را نشان نداد.  $p < 0.05$  به عنوان سطح معنی‌دار در نظر گرفته شده است.

### تست MTT

ارزیابی توانایی زنده ماندن سلول‌ها پس از گذشت ۷۲ ساعت از کشت سلول‌ها در شرایط بی‌وزنی و نرمال زمینی قبل و بعد از القای تمایز عصبی با استفاده از تست MTT انجام شد. همان‌طور که در شکل ۳ نشان داده شده است،

بی‌وزنی تاثیر معنی‌داری بر میزان زنده بودن سلول‌ها قبل و بعد از القای تمایز به سلول‌های شبه عصبی نداشته است ( $p > 0.05$ ). اگرچه بعد از تمایز میزان زنده بودن سلول‌ها در هر دو گروه کاهش یافت (۳/۳۸ درصد).

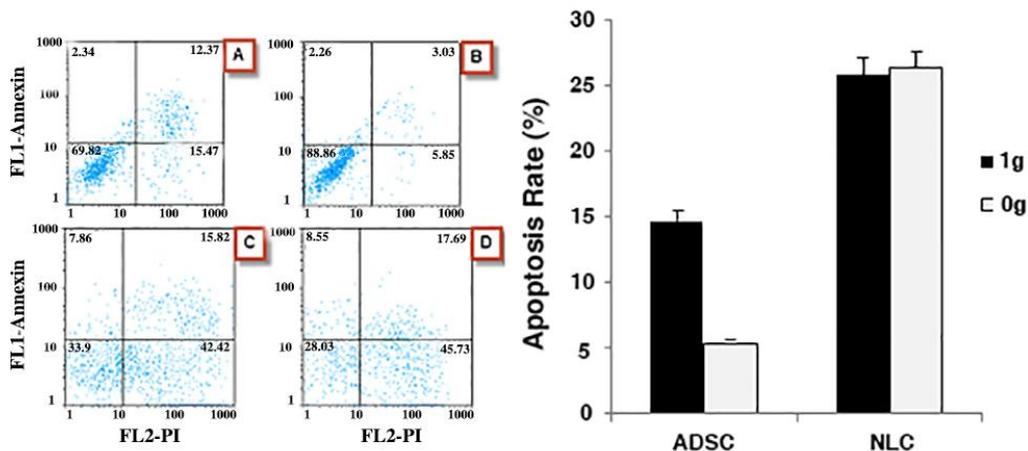


شکل ۳: میزان زنده بودن ADSC های کشت داده شده در شبیه سازی بی وزنی (SMG)، قبل و بعد از القای تمایز عصبی با استفاده از سنجش MTT. همانطور که مشخص است شبیه سازی بی وزنی اثری بر میزان زنده بودن سلول های تمایز داده شده و تمایز داده نشده نداشته است. NLC: سلول های شبه عصبی پس از ۲۴ ساعت تمایز

### تست انکسین

برای بررسی میزان مرگ برنامه ریزی شده سلولی (آپوپتوزیس) قبل و بعد از تمایز در دو شرایط نرمال زمینی و بی وزنی از تست انکسین استفاده شد. شکل ۴ نتایج تست انکسین را نشان می دهد. در این شکل مشاهده می شود که در سلول های تمایز نیافته ای که در شرایط نرمال زمینی قرار گرفته بودند، میزان نکروزه شدن سلول ها ۱۵/۴۷ درصد، میزان آپوپتوزیس اولیه ۲/۳۴ درصد و میزان آپوپتوزیس دیر هنگام ۱۲/۳۷ درصد بود. بنابراین به طور کلی ۱۴/۷۱ درصد سلول ها پس از گذشت ۲۴ ساعت دچار آپوپتوزیس شدند. اما در سلول های تمایز نیافته ای که در شرایط بی وزنی قرار گرفته بودند، میزان نکروزه شدن سلول ها ۵/۸۵ درصد، میزان آپوپتوزیس اولیه ۲/۲۶ درصد و میزان آپوپتوزیس دیر هنگام ۳/۰۳ درصد بود و در نهایت ۵/۲۹ درصد سلول ها پس از گذشت ۲۴

ساعت دچار آپوپتوزیس شدند. بنابراین بی وزنی به طور معنی داری میزان آپوپتوزیس را در سلول های تمایز نیافته در مقایسه با نمونه های کنترل کاهش داد. در سلول های تمایز یافته ای که در شرایط نرمال زمینی قرار گرفته بودند، میزان نکروزه شدن سلول ها ۴۲/۴۲ درصد، میزان آپوپتوزیس اولیه ۷/۸۶ درصد و میزان آپوپتوزیس دیر هنگام ۱۵/۸۲ درصد بود و در کل میزان آپوپتوزیس شدند. در سلول های تمایز نیافته ای که در شرایط تیمار بی وزنی قرار گرفته بودند، میزان نکروزه شدن سلول ها ۴۵/۷۳ درصد، میزان آپوپتوزیس اولیه ۸/۵۵ درصد و میزان آپوپتوزیس دیر هنگام ۱۷/۶۹ درصد بود. بنابراین به طور کلی ۲۶/۲۴ درصد سلول ها پس از گذشت ۲۴ ساعت دچار آپوپتوزیس شدند که اختلاف معنی داری با نمونه های کنترل تمایز یافته نداشت.



شکل ۴: اندازه گیری میزان آپوپتوزیس با استفاده از تست انکسین (A، B) در شرایط زمینی، (C) سلول های تمایز یافته بعد از ۲۴ ساعت تیمار در شرایط زمینی، (D) سلول های تمایز یافته بعد از ۲۴ ساعت تیمار در بی وزنی. بی وزنی میزان آپوپتوزیس در سلول های تمایز نیافته را به طور معنی داری در مقایسه با نمونه های کنترل کاهش داد. میزان آپوپتوزیس در نمونه های تمایز یافته اختلاف معنی داری با کنترل نداشت.

## بحث

جاذبه یکی از مهم‌ترین نیروهای فیزیکی است که در طول حیات در تکامل موجودات زنده موثر بوده است. حذف این نیرو و مطالعه سلول‌ها در شرایط بی‌وزنی می‌تواند منجر به روشن شدن بسیاری از سوالات علم زیست‌شناسی و حتی بهبود کیفیت زندگی بشر بر روی زمین شود (۱۲). مطالعات نشان داده است که بی‌وزنی می‌تواند تمایز، تکثیر سلولی و رشد سلول را تحریک کرده و منجر به رشد سه بعدی سلول‌ها بدون نیاز به داربست شود که این امر در مهندسی بافت و ارگان بسیار حائز اهمیت می‌باشد (۱۳-۱۵). تاثیر بی‌وزنی بر روی رفتار سلول‌ها، مسیرهای پیام‌رسانی، تکثیر سلولی و بیان ژن‌ها در مقالات مختلفی بررسی شده است (۲۱-۲۴). در این مطالعه ما به بررسی اثر بی‌وزنی بر میزان مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی (آپوپتوزیس) وابسته به گیرنده p75NTR در سلول‌های بنیادی مشتق از چربی و نیز در سلول‌های شبه عصبی حاصل از تمایز آنها پرداختیم. گیرنده نوروتروفینی p75NTR از اعضای گیرنده‌های مرگ می‌باشد ولی برخلاف نامش هم در مرگ و هم در بقای سلول‌های مختلف عصبی ایفای نقش می‌کند. عملکرد غیرمعمول، نقش دوگانه و پیچیدگی تعاملات و مسیرهای سیگنالی وابسته به این گیرنده، آنرا کاندید مطالعات بیانی هم در سطح ژن و هم در سطح پروتئین در بسیاری از بیماری‌های عصبی نموده است. باوجود مطالعات زیادی که بر روی نقش p75NTR در شرایط مختلف انجام شده است، هنوز مکانیسم‌های اساسی فعال‌سازی این گیرنده و مولکول‌ها و مسیرهای سیگنالی وابسته به آن به خوبی شناخته نشده‌اند. باوجود ابهاماتی که در مورد چگونگی عملکرد و اثرات p75NTR در بیماری‌های مختلف عصبی مشاهده می‌شود، این امکان وجود دارد که بتوان با ایجاد یک تعادل مناسب بین p75NTR و گیرنده‌های نوروتروفینی تیروزین کینازی به‌ویژه TrkA، درمان احتمالی برای بسیاری از بیماری‌های عصبی از جمله آلزایمر، پارکینسون و ضایعات نخاعی معرفی کرد. نوروتروفین‌ها به‌وسیله اتصال به گیرنده‌های Trk از خانواده تیروزین کینازها و گیرنده p75NTR اثر خودشان را اعمال می‌کنند (۲۱). گیرنده p75NTR نقش‌های متفاوتی در سلول‌های متفاوت دارد. برای مثال، بقای

بعضی از نوروتروفین‌ها را در پاسخ به فاکتور رشد عصبی (NGF) بالا می‌برد (۳) اما در بعضی دیگر از انواع سلول‌ها و نورون‌ها پاسخ سایتوکایینی را به NGF واسطه‌گری می‌کند (۵، ۶، ۸-۱۰).

زمان بیان گیرنده‌ها و نوع فاکتورهایی که به‌عنوان لیگاند گیرنده نقش بازی می‌کنند، کلید اصلی فعالیت گیرنده‌های سطح سلولی است. بنابراین میزان، نوع و زمان حضور نوروتروفین‌ها سبب فعالیت‌های مختلف و بعضاً متضاد گیرنده‌ها می‌شود (۲۵). گیرنده p75NTR در طی تکوین مغز بسیار بیشتر از زمان بلوغ بیان می‌شود (۲۶ و ۲۷). همچنین مطالعات نشان داده است که پس از آسیب سیستم عصبی بیان این گیرنده در جمعیت‌های نورونی به‌ویژه نورون‌هایی که دچار آپوپتوزیس شده‌اند، افزایش می‌یابد. بنابراین می‌توان نتیجه‌گیری کرد که در این شرایط نوروتروفین‌ها موجب القای مرگ سلولی از طریق مکانسیم وابسته به p75NTR می‌شوند (۲۸ و ۲۹).

به‌طور کلی فعال شدن گیرنده p75NTR در غیاب مسیرهای سیگنالی Trk منجر به مرگ نورون‌ها می‌شود (۳۰-۳۳). همچنین تمایل نوروتروفین‌های غیر فعال برای اتصال به گیرنده p75NTR بیش از گیرنده‌های Trk می‌باشد. درحالی‌که اتصال نوروتروفین‌های فعال به گیرنده‌های Trk منجر به تنظیم عملکردهای مختلف نورون‌ها مانند بقای، تمایز و اثر سیناپتیک می‌شود، اتصال نوروتروفین‌های غیر فعال به گیرنده p75NTR منجر به فعال شدن مسیرهای آپوپتوزیس و در نهایت مرگ نورون‌ها می‌شود (۳۴ و ۳۵). در سال‌های اخیر، سلول‌های بنیادی مزانشیمی به‌صورت گسترده‌ای جهت جایگزینی سلول‌های عصبی و ترمیم ضایعات عصبی استفاده شده است (۶). فعالیت سلول‌های پیوند شده در محل ضایعه عصبی، بستگی به زنده ماندن طولانی مدت این سلول‌ها دارد. یکی از مشکلاتی که در استفاده از سلول‌های شبه عصبی حاصل از تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی برای ترمیم ضایعات سیستم عصبی مرکزی وجود دارد. مرگ اکثر این سلول‌ها به‌دنبال تمایز نورونی آن‌ها می‌باشد (۵). در مطالعه‌ای که قبلاً توسط یعقوبی و همکاران (۱۰) انجام شد، نشان داده شد که بیان گیرنده p75NTR در حدود ۶ ساعت پس از شروع تمایز سلول‌های بنیادی مغز استخوان موش

سلولی (و نه در بافت) می‌باشد. کیت Annexin-V-Fluorescence Staining هم دارای ماده Annexin V و هم دارای رنگ PI می‌باشد که امکان تشخیص و تمیز دادن سلول‌های در حال آپوپتوزیس را از سلول‌های نکروز میسر می‌سازد (۳۹). آنالیز انکسین نشان داد که بی‌وزنی همچنین منجر به کاهش میزان آپوپتوزیس در سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی قبل از تمایز به سلول‌های شبه عصبی می‌شود. این نتایج هم راستا با داده‌های بیان گیرنده p75NTR می‌باشد و نتایج به‌دست آمده توسط عدالت و همکاران (۱۱) را تایید می‌کند. همچنین این نتایج مجدداً تأکیدی بر این موضوع می‌باشد که گیرنده p75NTR می‌تواند موجب القای آپوپتوزیس در سلول‌های نوروئروفین‌ها در شرایط بی‌وزنی نشان داد که تیمار بی‌وزنی در سلول‌های بنیادی مشتق از چربی قبل از القای تمایز عصبی منجر به افزایش بیان نوروئروفین‌ها می‌شود (۲۰). بنابراین می‌توان این‌گونه نتیجه گرفت که بی‌وزنی با افزایش نوروئروفین‌ها و کاهش p75NTR مانع از اثر آپوپتوزی این گیرنده می‌گردد. از طرف دیگر نتایج تست MTT نشان داد که بی‌وزنی تأثیر معنی‌داری بر میزان زنده بودن سلول‌ها قبل از القای تمایز به سلول‌های شبه عصبی ندارد. علت اختلاف مشاهده شده در نتایج تست انکسین با تست MTT می‌تواند ناشی از این باشد که در تست MTT قراورده‌های متابولیکی سلول سنجیده می‌شود در حالی که در تست انکسین میزان آپوپتوز سلولی با آنتی‌بادی‌های سطح سلولی اندازه‌گیری می‌شود. از آنجا که ژن‌های درگیر در این دو مسیر با یکدیگر متفاوت است نتایج این دو تست ممکن است با یکدیگر اختلاف داشته باشند. به‌طور مثال سلول‌هایی ممکن است برای انکسین مثبت باشند در حالی که در تست MTT مشخص نگردند و این امر موجب شود تا تفاوت در تست MTT مشاهده نشود. از طرف دیگر تست MTT معمولاً اثرات محافظتی تیمارهای مختلف بر روی سلول‌های عصبی (neuroprotective effects) را به‌خوبی اندازه‌گیری نمی‌کند. این امر ناشی از این می‌باشد که نقطه اثر تیمارهای مختلف در مسیرهای مرگ سلولی با یکدیگر متفاوت می‌باشد. بنابراین تست MTT از ارزش محدودی در ارزیابی اثرات محافظتی مواد مختلف بر روی سلول‌های عصبی برخوردار است ولی با این وجود می‌تواند اطلاعاتی

صحرائی به سلول‌های شبه عصبی شروع شده و تا ۱۲ ساعت ادامه می‌یابد. نکته جالب توجه این است که بیشترین مرگ نورون‌ها (آپوپتوزیس) نیز در همین زمان اتفاق می‌افتاد. بنابراین تداخل در بیان گیرنده p75NTR می‌تواند منجر به افزایش بقای سلول‌های شبه عصبی پیوند شده در محل آسیب شود. مطالعه عدالت و همکاران (۱۱) تأکیدی بر این مسئله بود.

در مطالعه حاضر، به بررسی اثر بی‌وزنی بر بیان ژن p75NTR و میزان مرگ و میر سلولی در سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی قبل و بعد از تمایز به سلول‌های شبه عصبی پرداخته شد. نتایج نشان داد که بی‌وزنی منجر به کاهش بیان ژن p75NTR در سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی قبل از تمایز به سلول‌های شبه عصبی می‌شود به طوری که پس از ۷۲ ساعت اعمال بی‌وزنی، بیان این ژن در حدود ۴۰ درصد کاهش می‌یابد. القای مرگ سلولی توسط گیرنده p75NTR قبلاً در برخی مطالعات گزارش شده است (۳۶-۳۸). به‌منظور ارزیابی تأثیر کاهش بیان p75NTR بر میزان آپوپتوز در سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی کشت شده در شرایط بی‌وزنی، میزان آپوپتوزیس در این سلول‌ها با استفاده از کیت انکسین اندازه‌گیری شد. آپوپتوزیس یک فرآیند فیزیولوژیکی طبیعی است که در طول تکوین جنینی و همچنین برای حفظ هومئوستازی بافت‌ها صورت می‌گیرد. در مراحل اولیه آپوپتوزیس، یک سری تغییرات در سطح سلول و در غشای پلاسمایی آن اتفاق می‌افتد. یکی از تغییرات غشای پلاسمایی سلول، جابه‌جایی فسفاتیدیل سرین (PS) از سطح داخلی و سیتوپلاسمی غشاء و قرار گرفتن آن در سطح خارجی غشا می‌باشد. مطالعات نشان داده‌اند که ماکروفاژها به‌طور اختصاصی این مولکول‌های PS را که در سطح خارجی غشای لنفوسیت‌ها قرار گرفته‌اند، در طول فرایند آپوپتوزیس می‌شناسند. با توجه به مطالب فوق، یکی از روش‌های موجود برای بررسی آپوپتوزیس، آنالیز و مطالعه مولکول‌های PS موجود در سطح خارجی غشا به‌هنگام فرایند آپوپتوزیس می‌باشد. مولکول Annexin V یک پروتئین متصل شونده به فسفولیپیدها در حضور یون کلسیم می‌باشد. این ماده دارای تمایل بالایی برای مولکول PS می‌باشد. بنابراین این ماده بسیار مناسب برای تشخیص سلول‌های در حال آپوپتوزیس در یک جمعیت

پیوند موفق تر معرفی شود.

### تشکر و قدردانی

این مقاله بر اساس نتایج حاصل از پایان نامه دانشجوی دکتری با کد ۱۹۸۳۰۵۵۳۹۳۱۰۰۲ که در سال ۱۳۹۳-۱۳۹۵ در آزمایشگاه زیست فضایی پژوهشگاه هوافضا انجام شده است، نگارش شد. نویسندگان مقاله مراتب تشکر و قدردانی خود را از مسئولین محترم پژوهشی آن مرکز ابراز می‌دارند.

### منابع

1. Lindvall O, Kokaia Z. Stem cells for the treatment of neurological disorders. *Nature*. 2006; 441: 1094–1096.
2. Cuevas P, Carceller F, Dujovny M, Garcia-Gómez I, et al. Peripheral nerve regeneration by bone marrow stromal cells. *Neurol Res*. 2002; 24(7): 634–638.
3. Hofstetter C, Schwartz E, Hess D, Widenfalk J, et al. Marrow stromal cells form guiding strands in the injured spinal cord and promote recovery. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002; 99(4): 2199–2204.
4. Azizi F, Jalil HR, Moshtaghian SJ, Doostmohammadi A, et al. Neuronal differentiation of embryonal carcinoma stem cells in threedimensional culture system. *Journal of Cell and Tissue (JCT)*. 2017; 7(3): 301-311.
5. Rismanchi N, Floyd C, Berman R, Lyeth B. Cell death and long-term maintenance of neuron-like state after differentiation of rat bone marrow stromal cells: a comparison of protocols. *Brain Res*. 2003; 991: 46–55.
6. Sanchez-Ramos J, Song S, Cardozo-Pelaez F, Hazzi C, et al. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. *Exp Neurol*. 2000; 164(2): 247–256.
7. Jahantigh F, Nanakar H, Ghorashi SMB. Fabrication and characterization of graphene foams and using it for electrical stimulation of human neural stem cells. *Journal of Cell and Tissue (JCT)*. 2017; 7(3): 259-273.

دراختیار ما قرار دهد مبنی بر اینکه تیمارهای ضد آپوپتوزیس در کدام بخش مسیرهای میتوکندریایی (بالادست و یا پایین دست) منجر به آپوپتوزیس می‌شود (۴۰).

نتایج به دست آمده بعد از تمایز سلول‌های فوق به سلول‌های شبه عصبی متفاوت بود. نتایج ما نشان داد که بی‌وزنی تأثیری بر بیان گیرنده p75NTR در سلول‌های شبه عصبی حاصل از تمایز سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی ندارد. نتایج کیت انکسین نیز این مسئله را تایید نمود به طوری که میزان آپوپتوزیس در سلول‌های شبه عصبی کشت داده شده در شرایط بی‌وزنی اختلاف معنی‌داری را با سلول‌های کشت شده در شرایط نرمال اجی نشان نداد. به نظر می‌رسد با شروع تمایز مسیرهایی در سلول فعال می‌شود که مانع از تأثیر بی‌وزنی بر میزان مرگ سلولی از طریق گیرنده p75NTR می‌شود و تأثیر بی‌وزنی بر سلول‌ها قبل از تمایز بیش از تأثیر آن بعد از تمایز می‌باشد. به نظر می‌رسد بی‌وزنی روشی مفید برای تسهیل فرآیند تمایز سلولی و افزایش پتانسیل تمایز سلول‌های بنیادی می‌باشد و منجر به افزایش ماهیت بنیادی بودن سلول‌ها می‌گردد؛ ولی با شروع فرآیند تمایز دیگر تأثیر چشم‌گیری بر فرایند تمایز ندارد. بنابراین پیشنهاد می‌شود که پیش-تیمار سلول‌های بنیادی با بی‌وزنی، می‌تواند تأثیری مثبت بر فرایند تمایز بگذارد. مطالعات چن و همکاران (۴۱) نیز موید این مطلب است. آن‌ها نشان دادند که تیمار سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان با بی‌وزنی، پتانسیل تمایز و توان ترمیم آن‌ها را پس از پیوند در محل ضایعه عصبی افزایش می‌دهد.

### نتیجه‌گیری

به طور کلی امروزه از سلول‌های بنیادی به عنوان یک درمان بالقوه برای بسیاری از بیماری‌های عصبی استفاده می‌شود. موفقیت چنین روش‌هایی به واسطه مرگ سلول‌های پیوندشده، امیدوارکننده نبوده و کاربرد بالینی این روش‌ها را محدود می‌سازد. با توجه به کاهش میزان مرگ و میر و افزایش پتانسیل تمایز سلول‌ها، بی‌وزنی می‌تواند به عنوان ابزاری قدرتمند و محیط جدیدی برای کشت و تمایز سلول‌های عصبی و دستیابی به درمان‌های

- survival. *Neuron*. 1989; 2(6): 525–1534.
9. Huang EJ, Reichardt LF. Neurotrophins: Roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci*. 2001; 24: 677–736.
  10. Yaghoobi MM, Mowla SJ. Differential gene expression pattern of neurotrophins and their receptors during neuronal differentiation of rat bone marrow stromal cells. *Neurosci Lett*. 2006; 397(1-2):149-54.
  11. Edalat H, Hajebrahimi Z, Movahedin M, Tavallaei M, et al. P75NTR suppression in rat bone marrow stromal stem cells significantly reduced their rate of apoptosis during neural differentiation. *Neurosci Lett*. 2011; 498(1):15-9.
  12. Rea G, Cristofaro F, Pani G, Pascucci B, et al. Microgravity-driven remodeling of the proteome reveals insights into molecular mechanisms and signal networks involved in response to the space flight environment. *J Proteomics*. 2016; 137: 3-18.
  13. Grimm D, Bauer J, Kossmehl P, Shakibaei M, et al. Simulated microgravity alters differentiation and increases apoptosis in human follicular thyroid carcinoma cells. *Faseb J*. 2002; 16:604-614.
  14. Claassen DE, Spooner BS. Impact of altered gravity on aspects of cell biology. *Int Rev Cyt*. 1994; 156: 301– 373.
  15. Hammond TG, Lewis FC, Goodwin TJ, et al. Gene expression in space. *Nat Med*. 1999; 70(5): 359.
  16. Unsworth BR, Lelkes PI. Growing tissues in microgravity. *Nat Med*. 1998; 4(8):901-907.
  17. Chen J, Liu R, Yang Y, Li J, et al. The simulated microgravity enhances the differentiation of mesenchymal stem cells into neurons. *Neurosci Lett*. 2011; 505(2):171-5.
  18. Yuge L, Sasaki A, Kawahara Y, Wu SL, et al. Simulated microgravity maintains the undifferentiated state and enhances the neural repair potential of bone marrow stromal cells. *Stem Cells Dev*. 2010; 20(5): 893–900.
  19. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH, 2002, Human
  8. Barde YA. Trophic factors and neuronal adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell*. 13(12):4279–4295
  20. Zarrinpour V, Hajebrahimi Z, Jafarinia M. Expression pattern of neurotrophins and their receptors during neuronal differentiation of adipose-derived stem cells in simulated microgravity condition. *Iran J Basic Med Sci*. 2017; 20:178-186.
  21. Hughes-Fulford M, Lewis ML. Effects of microgravity on osteoblast growth activation. *Exp Cell Res*. 1996; 224(1): 103– 109.
  22. Moos- PJ, Fattaey HK, Johnson TC. Cell proliferation inhibition in reduced gravity. *Exp Cell Res*. 1994; 213: 458– 462.
  23. Boonstra J. Growth factor-induced signal transduction in adherent mammalian cells is sensitive to gravity. *Faseb J*. 1999; 13: S35– S42.
  24. Carmeliet G, Bouillon R. The effect of microgravity on morphology and gene expression of osteoblasts in vitro. *Faseb J*. 1999; 13: S129– S134.
  25. Ibanez C, Fand Simi A. neurotrophin receptor signaling in nervous system injury and degeneration: paradox and opportunity. *Trends Neurosci*. 2012; 35(7): 431-440
  26. Yan Q, Johnson EM Jr. An immunohistochemical study of the nerve growth factor receptor in developing rats. *J Neurosci*. 1988; 8(9):3481–3498.
  27. Friedman WJ, Olson L, Persson H. Temporal and spatial expression of NGF receptor mRNA during postnatal rat brain development analyzed by in situ hybridization. *Dev Brain Res*. 1991; 63:43-51.
  28. Ernfors P, Henschen A, Olson L, Persson H. Expression of nerve growth factor receptor mRNA is developmentally regulated and increased after axotomy in rat spinal cord motoneurons. *Neuron*. 1989; 2(6): 1605– 1613
  29. Koliatsos VE, Crawford TO, Price DL. Axotomy induces nerve growth factor receptor immunoreactivity in spinal. *Brain Res*. 1991; 549(2): 297-304.

30. Domeniconi M, Zampieri N, Spencer T, et al. MAG induces regulated intramembrane proteolysis of the P75 neurotrophin receptor to inhibit neurite outgrowth. *Neuron* 2005; 46(6): 849-855.
31. Ahmed Z, Mazibrada G, Seabright RJ, et al. TACE-induced cleavage of NgR and P75NTR in dorsal root ganglion cultures disinhibits outgrowth and promotes branching of neurites in the presence of inhibitory CNS myelin. *FASEB J* 2006; 20(11): 1939-1941.
32. Cosgaya JM, Chan JR, Shooter EM. The neurotrophin receptor P75NTR as a positive modulator of myelination. *Science* 2002; 298(5596): 1245-1248.
33. Chan JR, Jolicoeur C, Yamauchi J, et al. The polarity protein Par-3 directly interacts with P75NTR to regulate myelination. *Science* 2006; 314(5800): 832-836.
34. Kaplan D. R, Stephens R. M. Neurotrophin signal transduction by the Trk receptor. *J Neurobiol.* 1994; 25(11):1404-1417.
35. Barbacid M. The Trk family of neurotrophin receptors. *J Neurobiol.* 1994; 25(11):1386-1403.
36. Hasegawa Y, Yamagishi S, Fujitani M, Yamashita T. P75 neurotrophin receptor signaling in the nervous system. *Biotechnol Annu Rev.* 2004; 10: 123-149.
37. Lee R, Kermani P, Teng KK, Hempstead BL. Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science.* 2001; 294: 1945-1948.
38. Teng HK, Teng KK, Lee R, Wright S, et al. ProBDNF induces neuronal apoptosis via activation of a receptor complex of p75NTR and sortilin. *J Neurosci.* 2005; 25(22): 5455-5463.
39. Penaloza C, Orlanski S, Ye Y, Entezari-Zaher T, et al. Cell death in mammalian development. *Curr Pharm.* 2008; 4: 184-196.
40. Lobner D. Comparison of the LDH and MTT assays for quantifying cell death: validity for neuronal apoptosis?. *J Neurosci Methods.* 2000; 96(2): 147-152.
41. Chena J, Liub R, Yang Y. Zhang X, et al. The simulated microgravity enhances the differentiation of mesenchymal stem cells into neurons. *Neurosci Lett.* 2011; 505(2): 171-175.

## The viability, apoptosis rate and p75NTR gene expression in neural differentiation of adiposae derived stem cells in simulated microgravity

Zarrinpour, V, Ph.D Student<sup>1, 2</sup>, Hajebrahimi Z, Ph.D<sup>3\*</sup>, Jaafarinia M, Ph.D<sup>1</sup>

1. Department of Biology, Fars Science and Research Branch, Islamic Azad University, Marvdasht, Iran

2. Department of Biology, Marvdasht Branch, Islamic Azad University, Marvdasht, Iran

3. Aerospace Research Institute, Ministry of Science Research and Technology, Tehran, Iran,

\* Email corresponding author: hajebrahimi@ari.ac.ir

Received: 2 Jul. 2017

Accepted: 5 Sep. 2017

---

### Abstract

**Aim:** In this study, the effects of simulated microgravity on the apoptosis and expression of p75NTR gene were investigated in the adipose derived stem cells before and after the neural differentiation.

**Material and Methods:** Human adipose derived stem cells were isolated, cultured and differentiated. A single-axis clinostat apparatus was used to simulate microgravity for 6, 24 and 72 hours. Real time PCR technique was used for gene expression analysis after extraction of RNA of samples. Cell viability was assessed by MTT assay and apoptosis rate was calculated by Annexin V staining.

**Results:** Our results showed that microgravity led to a significant decrease in p75NTR gene expression in adipose derived stem cells. However, microgravity had no significant effect on viability of cells before and after differentiation, but apoptosis in undifferentiated cells was decreased in contrast to controls.

**Conclusion:** Due to reduction of apoptosis and increment of differentiation potential of cells, microgravity can be introduced as a powerful tool and also new condition for cell culture and neural differentiation for achievement to effective cell therapy.

**Keywords:** Adipose derived stem cells, Microgravity, Neurotrophins, p75NTR, Apoptosis.