

## تأثیر رتینوئیک اسید در تمایز سلول‌های بینیادی مزانشیمال بافت چربی به سلول‌های زایا

مربیم حسین زاده شیرذیلی: کارشناس ارشد علوم تشریحی، گروه آناتومی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.  
m\_hoseinzadeh@razi.tums.ac.ir

دکتر پریچهر پاسبخش: دانشیار و متخصص علوم تشریحی، گروه آناتومی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.  
pasbakhsh@hotmail.com

دکتر فردین عمیدی: دانشیار و متخصص علوم تشریحی، گروه آناتومی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.  
amidifardin@yahoo.com

زهره افسر طلا: کارشناس ارشد بیولوژی، گروه بیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.  
zafartala@yahoo.com

\*دکتر علیقلی سیبحانی: استاد و متخصص علوم تشریحی، گروه آناتومی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران (\*نویسنده مسئول).

تاریخ پذیرش: ۹۲/۶/۸ تاریخ دریافت: ۹۲/۴/۷

### چکیده

**زمینه و هدف:** مطالعات انجام شده در سال‌های اخیر در زمینه تمایز سلول‌های بینیادی به سلول‌های زایا نگرش دانشمندان را به مبحث باروری و ناباروری تغییر داده است. تولید داخل آزمایشگاهی سلول‌های زایا گام مهمی در درک بهتر نحوه تکامل سلول‌های زایا می‌باشد. با توجه به اینکه که کاربرد بالینی سلول‌های بینیادی رویانی به دلیل توان تومورزائی بالا و مسائل اخلاقی بسیار محدود است و محققان را با مشکلات عدیدهای روپرتو می‌سازد، بنابراین یافتن سلول‌هایی با ویژگی‌های پرتوانی و به دست آمده از یک بافت یا اندام بالغ می‌تواند جایگزین مناسبی برای سلول‌های مذکور در تولید گامت‌های درون آزمایشگاهی باشد. در این تحقیق، جهت القای تمایز سلول‌های بینیادی به سلول‌های زایا از رتینوئیک اسید (Retinoic Acid-RA) استفاده شد. لذا در مطالعه حاضر سعی بر آن بود که با تمایز سلول‌های بینیادی مزانشیمال بافت‌چربی به سلول‌های زایا (Germ cell)، سلول بینیادی مناسبی را به عنوان جایگزین سلول‌های رویانی معرفی کرد تا شاید بتوان با ادامه تحقیقات به تولید داخل آزمایشگاهی سلول‌های زایی تکامل یافته‌تر دست یافت.

**روش کار:** پس از به دست آوردن جمعیت خالصی از سلول‌های بینیادی مزانشیمال برگرفته از بافت چربی (Adipose Tissue Derived Adipocyte Mesenchymal Stem Cells- ADMSC) چهت ارزیابی چند توان بودن این سلول‌ها با استفاده از محیط تمایزی به Osteoblast و Adipocyte تمایز داده و با رنگ آمیزی Oil red-O و Alizarin Red S تمایز آن‌ها بررسی شد. همچنین فلوسیوتومتری چهت بررسی مارکرهای سطحی سلول‌های بینیادی مزانشیمال حاصل از بافت‌چربی و مغز استخوان (بیان دو مارکر CD90 و CD44، عدم بیان مارکرهای CD45 و CD31) انجام شد. سپس این سلول‌ها در محیط‌های القای حاوی رتینوئیک اسید (به مدت ۷ روز) به سلول‌های زایا تمایز داده شدند. سپس آنالیز فلوسیوتومتری و رنگ آمیزی ایمونوفلوروسنس جهت بررسی بیان مارکرهای رده سلول‌های زایا (Mvh و DAZL) (DAZL) انجام شد.

**یافته‌ها:** در سلول‌های مذکور، مثبت بودن مارکرهای سطحی سلول‌های بینیادی CD90 و منفی بودن مارکر آندوتیلیال (CD31) و سلول‌های خونی (CD45) نشان داده شده است که گویای مزانشیمالی بودن این سلول‌ها بود. قابلیت تمایز به سلول‌های Osteoblast و Adipocyte با رنگ Oil red-O و Alizarin Red S نشان داده شد که بیان کننده چند توان بودن این سلول‌ها می‌باشد. پس از بررسی سلول‌ها با آنالیز فلوسیوتومتری و ایمونوفلوروسنس مشخص شد که سلول‌های تیمار شده با رتینوئیک اسید، مارکرهای سلول‌های زایا (Mvh & DAZL) را بیان داشته‌اند.

**نتیجه‌گیری:** در مطالعه حاضر نشان داده شد که مارکرهای سلول جنسی در سلول بینیادی مزانشیمال حاصل از بافت چربی پس از اضافه کردن فاکتور تمایزی رتینوئیک اسید به محیط کشت بیان شده است.

**کلیدواژه‌ها:** سلول‌های بینیادی مزانشیمالی، ناباروری، سلول‌های زایا، اسید رتینوئیک.

### مقدمه

درمانی بسیاری نظیر هورمون درمانی، لقاح آزمایشگاهی (IVF)، تزریق درون سیتوپلاسمی اسپرم (ICSI) و انجماد جنین و تخمک پیشنهاد شده است (۲).

روش‌های ذکر شده در برخی از زوج‌ها موثر نبوده. لذا در سال‌های اخیر، گروهی از محققان توانسته‌اند روش جدیدی جهت درمان ناباروری ارائه دهند. آن‌ها با تمایز سلول‌های بینیادی

ناباروری یکی از شایع‌ترین مشکلات بین زوجین می‌باشد که می‌تواند در اثر هر دو عامل زنانه و مردانه رخ دهد. ناباروری به عنوان ناتوانی در بارداری پس از یک سال مقاربت جنسی منظم بدون استفاده از روش‌های پیشگیری از بارداری تعریف شده است (۱ و ۲). برای درمان ناباروری تحقیقات گسترده‌ای صورت گرفته و روش‌های

بنیادی مزانشیمی برگرفته از بافت چربی (ADMSCs) را به دلایل تزايد سریع، نمونه گیری راحت‌تر و عدم وجود عوارض در فرد دهنده، به عنوان جایگزین مناسبی برای مغز استخوان پیشنهاد داده‌اند (۱۷ و ۱۸). سلول‌های بنیادی مزانشیمال استخراج شده از بافت چربی قابلیت تزايد زیادی داشته و به چندین رده سلولی مثل آدیپوسیت، استئوبلاست، میوبلاست، کنдрوبلاست، آندوتیال و کارديومیوست تمایز داده شده‌اند (۱۷). با ادامه تحقیقات Song و همکاران توانستند سلول‌های بنیادی بافت چربی را در محیط آزمایشگاه به سلول‌های شبه اوسيت تمایز دهنند (۱۹). برای به‌دست آوردن سلول‌های تمایز یافته از سلول‌های بنیادی، دستکاری ژنتیکی فاکتورهای رونویسی و یا سیگنانالینگ مولکول‌ها موثر شناخته شده‌اند (۲۰ و ۲۱) یکی از سیگنانالینگ مولکول‌ها رتینوئیک اسید می‌باشد (۲۲). رتینوئیک اسید فرم اکسیدان ویتامین A می‌باشد و با توجه به مطالعات انجام شده باعث تمایز سلول‌های بنیادی جنینی به سلول‌های پیش‌ساز جنسی و تکثیر سلول‌های پیش‌ساز جنسی می‌شود (۲۳). مطالعاتی هم که توسط Geijssen و همکاران در سال ۲۰۰۳ و ۲۰۰۶ Nayernia و همکاران در سال‌های ۲۰۰۴ و ۲۰۰۳ صورت گرفت، تأثیر مثبت اسید رتینوئیک در تمایز سلول‌های بنیادی به سلول‌های جنسی و تحریک تکثیر PGCs را نشان دادند (۵، ۷ و ۲۴).

توجه به محدودیت‌ها و عوارض استفاده از سلول‌های بنیادی رویانی و مزانشیمی حاصل از مغز استخوان در انسان، یافتن سلول‌هایی با ویژگی‌های پرتوانی و به دست آمده از یک بافت یا اندام بالغ می‌تواند جایگزین مناسبی برای سلول‌های بنیادی رویانی و مزانشیمی مغز استخوان در تولید گامت‌های درون آزمایشگاهی باشد.

لذا مطالعه حاضر به منظور بررسی قابلیت تمایز ADMSCs به سلول‌های زایا طراحی شده است. همچنین تأثیر RA به عنوان مکمل ضروری در محیط کشت در تمایز به سمت سلول زایا مورد بررسی قرار گرفت تا بتوان با ادامه تحقیقات به تولید داخل آزمایشگاهی سلول‌های جنسی تکامل

(Stem cells) به سلول‌های جنسی مذکور و مؤنث در محیط آزمایشگاه قدم‌های امیدوار کننده‌ای برای درمان ناباروری با استفاده از تکنولوژی سلول‌های بنیادی برداشته‌اند (۳-۷). سلول‌های زایا جمعیت سلولی بسیار تخصص یافته‌ای هستند که جهت حفظ و بقای گونه ضروری می‌باشد. این سلول‌ها طیف وسیع سلولی هستند که شامل سلول‌های زایای بدوى در طی دوران امبریوژن تا اووسیت و اسپرم کامل پس از دوران گامتوژن می‌باشند (۸).

در دهه‌های اخیر دانشمندان جهت به دست آوردن سلول‌های زایا در محیط آزمایشگاه از منابع گوناگون سلول‌های بنیادی از قبیل سلول‌های بنیادی پوست، سلول‌های بنیادی جنینی و سلول‌های بنیادی مغز استخوان استفاده کردند (۳، ۴ و ۹-۱۳). به خاطر مسائل اخلاقی ناشی از دست کاری جنین انسان و احتمال ایجاد انواع تومورهای سرطانی در استفاده از ESCs، کانون توجه دانشمندان به سمت سلول‌های بنیادی بزرگسالان معطوف شد (۱۴-۱۶) (۱۵-۱۷). یکی از منابع برای تهییه سلول‌های بنیادی بزرگسالان سلول‌های بنیادی مزانشیمال حاصل از مغز استخوان می‌باشد که توانایی تمایز به سلول‌های متفاوت از قبیل استخوان، غضروف، چربی، عضله و غیره را دارد.

با ادامه تحقیقات دانشمندان توانستند با استفاده از سلول‌های بنیادی مزانشیمال حاصل از مغز استخوان انسانی و موشی، سلول‌های جنسی مذکور تولید کنند (۳، ۹-۱۲ و ۲۴). و همکاران Nayernia در سال ۲۰۰۶ برای اولین بار موفق به تمایز سلول‌های مزانشیمال مغز استخوان موشی به گامت نر در حضور رتینوئیک اسید شدند (۱۰). همچنین در سال‌های بعد مطالعات مشابهی در این زمینه انجام شد و دانشمندان توانستند تمایز سلول‌های زایا را در مراحل مختلف از سلول‌های بنیادی بالغ گزارش دهند (۹، ۱۱ و ۱۲). به دلیل مشکلات ناشی از استخراج سلول‌های بنیادی مغز استخوان مطالعات بر روی منابع دیگر سلول‌های بنیادی نیز متتمرکز گردید.

بر همین اساس بسیاری از محققین سلول‌های

نشان دادن قطرات چربی به رنگ قرمز سلول‌ها به وسیله (SIGMA, USA) Oil red-O رنگ آمیزی شدند.

**آنالیز مارکرهای سطحی:** سلول‌های مزانشیمی به دست آمده از بافت چربی و به طور کلی سلول‌های بنیادی مزانشیمی دارای خاصیت چسبندگی به ظروف کشت پلاستیکی هستند و ظاهری شبیه به فیبروبلاست و دارای توانایی بالا در تمایز می‌باشند. با این حال سلول‌های گرفته شده از حیوان باید تعیین هویت شوند که آیا سلول‌های کشت شده از نوع بنیادی مزانشیمی هستند یا خیر؛ که به واسطه CD مارکرهای موجود در سطح سلولی بررسی می‌گردد. آنالیز فلوسایتومتری بر اساس پروتکول چمیکون (Chemicone) برای بررسی بیان دو مارکر سطحی ab25064, abcam, (CD90 (eBioscience UK) ab25064, abcam, (CD44 (USA) (ویژه سلول‌های بنیادی مزانشیمی) و عدم بیان دو مارکر ab95652, abcam, USA) (ab25670, abcam, USA) (ویژه سلول‌های بنیادی خون‌ساز و سلول‌های آندوتیال) انجام گشت.

**تمایز به سلول‌های زایا:** جهت تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمیال بافت چربی به سلول‌های زایا، تعداد ۱۰۶ سلول در فلاسک کشت ۲۵ سانتی‌متر مربع و در محیط تمایزی مناسب [DMEM حاوی Penicillin 100 IU/ml / Streptomycin FBS ۱۰<sup>-۴</sup> μMRA(Invitrogen, USA) و ۱۰۰μg/ml مدت ۷ روز در انکو باتور (دما ۳۷ درجه سانتی گراد با ۵٪ اکسید کربن و رطوبت ۹۵٪) کشت گردید. اولین تعویض محیط ۲۴ ساعت پس از به دست آوردن سلول‌ها انجام گردید تا سلول‌های غیر چسبنده جدا گردند. پس از این مرحله محیط‌ها هر ۴ روز یک بار تعویض گشتند. این مرحله تا افزایش تعداد سلول‌ها ادامه یافت و پس از رسیدن سلول‌ها به تراکم ۹۰ درصد تریپسینه (trypsin, Invitrogen, USA) گشتند.

یافته‌تر دست یافت.

### روش کار

برای به دست آوردن سلول‌های بنیادی مزانشیمیال حاصل از بافت چربی، بافت چربی اطراف اپیدیدیم موش ۶-۸ هفته‌ای نژاد NMRI تحت شرایط استریل خارج گردید و به تیکه‌های کوچک تقسیم شد و سپس به ظرف حاوی محلول کلازناز (Collagenase1, Sigma, USA) منتقل گشت. پس از یک ساعت و اطمینان از هضم بافت‌ها، جهت خنثی نمودن کلازناز به میزان حجم درون لوله، محیط کشت حاوی (Invitrogen, USA) اضافه گشت. سپس سلول‌های به دست آمده به فلاسک کشت حاوی محیط کشت (DMEM (Invitrogen, USA) [Penicillin 10 IU/ml and FBS ۱۰٪, Streptomycin 10 IU μg/ml (Invitrogen, USA) می‌باشد و به انکوباتور (دما ۳۷ درجه سانتی گراد و دی اکسید کربن ۵٪ و رطوبت ۹۵٪) منتقل گردید. اولین تعویض محیط ۲۴ ساعت پس از به دست آوردن سلول‌ها انجام گردید تا سلول‌های غیر چسبنده جدا گردند. پس از این مرحله محیط‌ها هر ۴ روز یک بار تعویض گشتند. این مرحله تا افزایش تعداد سلول‌ها به تراکم ۹۰ درصد از رسیدن سلول‌ها به تراکم ۹۰ درصد تریپسینه (trypsin, Invitrogen, USA) گشتند.

**تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمیال چربی به استئوبلاست و لیپوبلاست:** سلول‌های به دست آمده از بافت چربی پس از رسیدن به تراکم ۸۰ الی ۹۰ درصد (سومین پاساژ سلولی) در محیط کشت استئوژنیک و لیپوژنیک (Bonyakhte Company, Rasht, Iran) به مدت ۲۱ روز در دما ۳۷ درجه سانتی گراد، دی اکسید کربن ۵٪ و رطوبت ۹۵٪ انکوبه شدند. تعویض محیط هر ۳-۴ روز تکرار شد. پس از آن، جهت بررسی و اثبات تمایز به استئوبلاست و نشان دادن نقاط مینیرالیزه و کلسیفیه شده، سلول‌ها به وسیله Alizarin Red S (SIGMA, USA) رنگ‌آمیزی شدند. جهت بررسی و اثبات تمایز به لیپوبلاست و

**رنگ آمیزی ایمونوفلورسنس:** رنگ آمیزی با آنتی بادی سیتوپلاسمی علیه پروتئین Mvh و DAZL برای بررسی میزان تمایز به سلول‌های

سلول‌های بنیادی بافت چربی به سلول‌های زایا، پس از پشت سر گذاشتن مراحل القاسلوی فلوسایتومتری برای پروتئین Mvh و DAZL انجام شد.

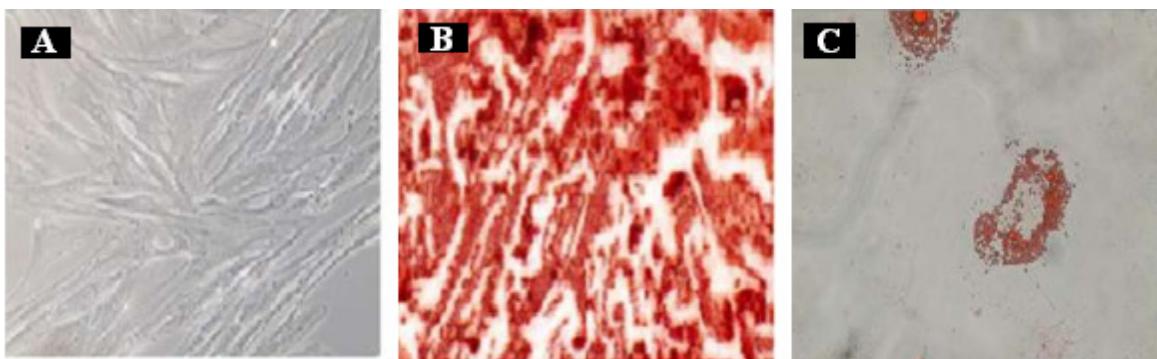
تعداد  $10^5-10^6$  سلول برداشته شد، سپس سلول‌ها توسط محلول پارافرمالدهید  $4\%$  فیکس شدند. برای دسترسی آنتی بادی‌ها به آنتی ژن‌های داخل از تریتون  $0.1\%$  استفاده شد. سپس آنتی بادی اولیه تهیه شده و کنترل ایزوتابیپ مربوطه با [Dazl (SANTA CRUZ 1:50) and Mvh (antibodies-online 1:50), Rabbit polyclonal IgG (ab27472, abcam, USA, 1:200), mouse IgG1 isotype control (11-4714, eBioscience, UK, 1:200)] به سوسپانسیون اضافه شد. سلول‌ها به مدت یک شب در محلول آنتی بادی اولیه انکوبه شدند و روز بعد پس از شستشو سلول‌ها با محلول PBS محلول آنتی بادی ثانویه تهیه شده با رقت مناسب [FITC diluted ideally: Rat anti-Rabbit IgG (antibodies-online 30087, 1:100) donkey anti-goat IgG (SANTA CRUZ, sc-2024, 30-45 ۱:100)] افزوده شده و سلول‌ها به مدت دقیقه در این محلول در دمای  $4^\circ\text{C}$  درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند (از این مرحله به بعد پروسه در محیطی که نور مستقیم وجود ندارد انجام گرفت). پس از گذشت زمان مورد نظر سلول‌ها با محلول PBS شستشو داده شده و در نهایت سلول‌ها تا زمان آنالیز توسط دستگاه فلوسایتومتر (Partec) در محلول پارافرمالدهید  $10\%$  قرار گرفته و کاملاً پخش شدند و سپس در دمای  $4^\circ\text{C}$  درجه سانتی‌گراد نگه داری شدند.

### یافته‌ها

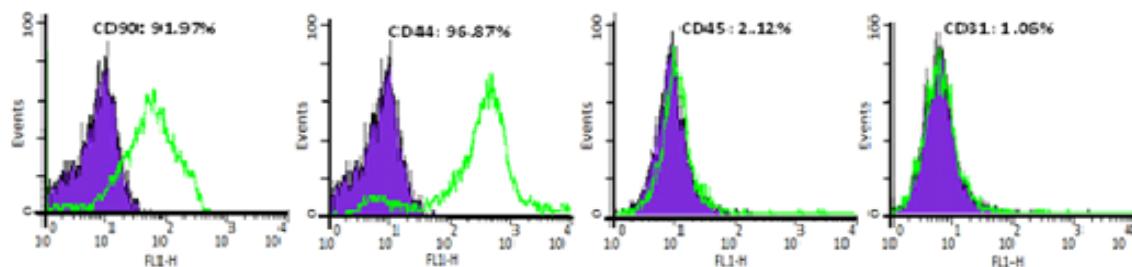
به طور طبیعی سلول‌های ADMSCs در طی  $5-4$  روز به  $90-80\%$  در صد تراکم رسیدند (شکل ۱A). جهت ارزیابی تمایز به استئوبلاست سلول‌های به دست آمده پس از ۳ هفته کشت در محیط استئوژنیک با رنگ آمیزی Alizarin Red S مورد ارزیابی قرار گرفتند (شکل ۱B) و جهت بررسی تمایز به لیپوبلاست پس از ۳ هفته کشت در

زایا، پس از پشت سر گذاشتن مراحل القاسلوی و همچنین به منظور بررسی عدم بیان مارکرهای سلول‌های زایا در سلول‌های فاقد فاکتور تمایزی انجام شد. روش کار به این صورت است که سلول‌های کشت داده شده در پلیت پس از شستشو با (Invitrogen, USA) PBS سرد توسط فرم آلدئید  $4\%$  (Sigma, USA) فیکس شدند. به دلیل اینکه نشانگرهای انتخاب شده از پروتئین‌های سیتوپلاسمی هستند، باید غشای سلول‌ها نفوذپذیرگردد تا آنتی بادی‌ها بتوانند به درون سلول نفوذ پیداکنند. بنابراین از Triton 100-X (Invitrogen, USA) دقیقه استفاده شد. بعد از ایجاد نفوذپذیری در غشا در Aین مرحله با استفاده از  $(1\%)$  bovine serum albumin in phosphate-buffer (sulin pbs/tween) بلاکینگ پروتئین‌های غیر اختصاصی صورت گرفت سپس آنتی بادی اولیه با [Dazl (SANTA CRUZ 1:50), Mvh (antibodies-online 1:50)] به خانه ها افزوده شد و سلول‌ها به مدت یک شب در دمای  $4^\circ\text{C}$  درجه سانتی گراد باقی ماندند. پس از شستشو سلول‌ها توسط PBS (سه بار و هر بار به مدت  $3$  دقیقه) آنتی بادی ثانویه با رقت مناسب [Rat anti-Rabbit IgG (antibodies-online, 1:100) and donkey anti-goat IgG (SANTA CRUZ 1:100)] بر روی سلول‌ها اضافه شد. سلول‌ها دو ساعت در تاریکی انکوبه شدند، سپس به آهستگی با PBS شستشو داده شدند تا آنتی بادی‌های اضافی شسته شود. به منظور رنگ آمیزی هسته سلول‌ها، از محلول DAPI USA استفاده شد. برای خشک نشدن PBS سلول‌ها در هر خانه در حد  $1$  میلی لیتر از Rivanol و در دمای  $4^\circ\text{C}$  درجه سانتی گراد (دروز فویل و دور از روشنایی) تا مشاهده زیر میکروسکوپ نگهداری شدند. سلول‌هایی که در اسکلت سلولی خود حاوی پروتئین‌های اختصاصی مورد نظر باشند در زیر میکروسکوپ فلوروسنس رنگ سبز درخشنan از خود نشان می‌دهند.

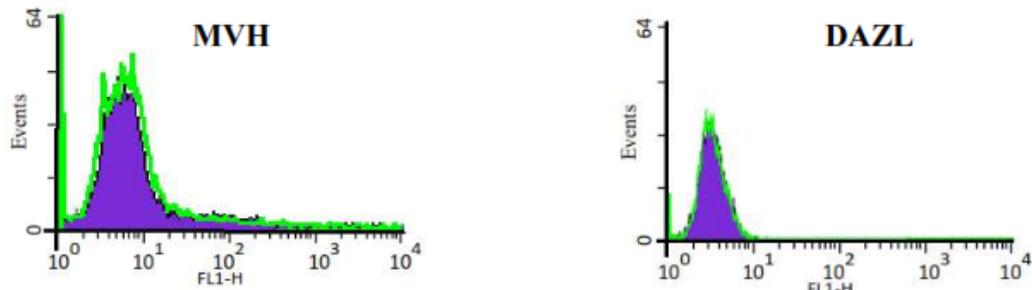
### آنالیز فلوسایتومتری: برای بررسی میزان تمایز



شکل ۱- سلول های بنیادی مزانشیمال بافت چربی (A) پیش از تمايز که دارای نمای دوکی شکل و شبیه فیبروبلاستی می باشند. سلول های بنیادی مزانشیمال بافت چربی (B) پس از قرار گیری در محیط کشت استئوبلاست تمايز یافته که با رنگ آمیزی Alizarin red S تأیید شده است. سلول های بنیادی مزانشیمال بافت چربی (C) پس از قرار گیری در محیط کشت لیپوژنیک حاوی قطرات چربی شده که با رنگ آمیزی Oil red-O تأیید شده است (بزرگ نمای ۴۰۰ X).



شکل ۲- بررسی فلوسیتومتریک، بیان مارکرهای سطحی در سلول های بنیادی استخراج شده از سلول های بنیادی مزانشیمال بافت چربی. مثبت بودن مارکرهای سطحی سلول های بنیادی (CD90 و CD44) و منفی بودن مارکرهای آندوتیال (CD45) و سلول های خونی (CD31) نشان داده شده است (کنترل ایزوتابیپ به رنگ بنفش می باشد).



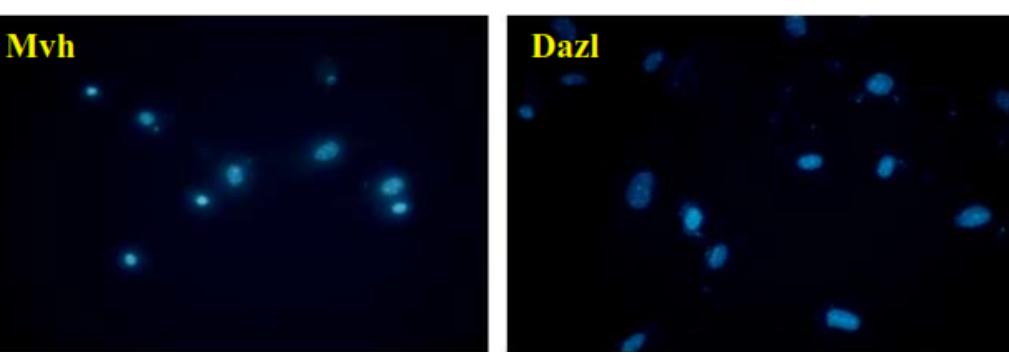
شکل ۳- بررسی فلوسیتومتریک سلول های بنیادی مزانشیمال بافت چربی پس از کشت در محیط فاقد فاکتور تمايزی به مدت ۷ روز (پس از چهارمین پاساز)، با انجام فلوسیتومتری مشخص شد که این سلول ها نسبت به مارکرهای سلول های زایا (Mvh) و DAZL منفی هستند (کنترل ایزوتابیپ به رنگ بنفش می باشد).

در گروه کنترل در محیط DMEM فاقد هرگونه فاکتور تمايزی کشت داده شدند. نتایج حاصل از رنگ آمیزی ایمونوفلوروسنس و آنالیز فلوسیتومتری نشان می دهند هیچ یک از سلول های این گروه نسبت به مارکرهای سلول های زایا (Mvh) و DAZL (DAZL) واکنش مثبت نشان ندادند (اشکال ۳ و ۴).

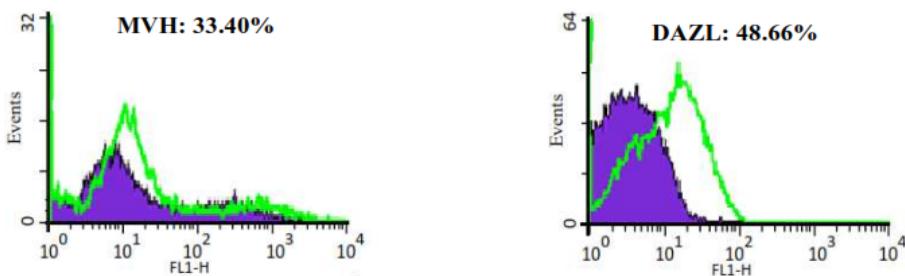
در گروه مورد مطالعه بعدی سلول ها در محیط کشت حاوی رتینوئیک اسید به مدت ۷ روز کشت

محیط لیپوژنیک با رنگ آمیزی Oil red-O مورد ارزیابی قرار گرفتند (شکل ۱C). و نتایج نشان می دهد که مارکرهای سطحی CD44، CD90 و CD31 در سلول های مثبت و دو مارکر CD45 و CD44 در سلول های مورد نظر منفی بوده است که نشان دهنده تأیید هویت سلول های بنیادی مزانشیمال می باشد (شکل ۲).

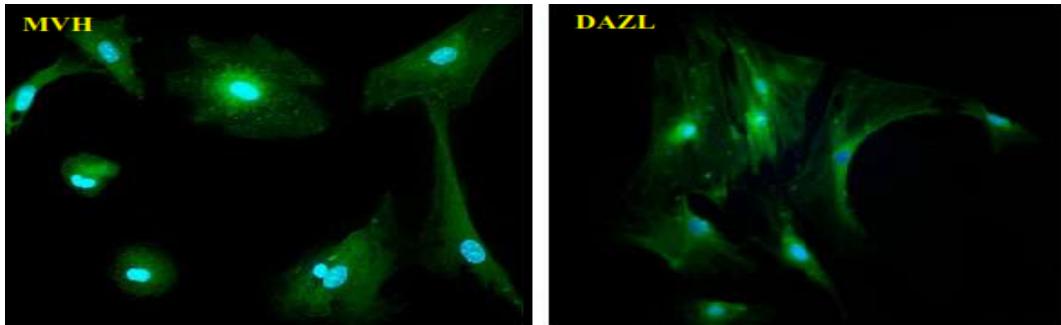
#### نتایج القاء سلولی: سلول های مزانشیمال موجود



شکل ۴- رنگ آمیزی ایمونوفلورسنس Mvh و DAZL (سبز) در سلول های بنیادی مزانشیمال و بافت چربی. هسته ها توسط DAPI (آبی) رنگ آمیزی شدند. گروه تمایزی بدون هیچ گونه فاکتور تمایزی. سلول ها نسبت به آنتی بادی MVH و DAZL منفی شدند. بزرگ نمائی  $\times 400$ .



شکل ۵- بررسی فلوسیتوometریک سلول های بنیادی مزانشیمال بافت چربی پس از تمایز به سلول های زایا توسط RA به مدت ۷ روز. با انجام فلوسیتوومتری مشخص شد که این سلول ها پس از تمایز نسبت به مارکرهای سلول های زایا (DAZL و Mvh) مثبت هستند (کنترل ایزوتابیپ به رنگ بنفش می باشد).



شکل ۶- رنگ آمیزی ایمونوفلورسنس Mvh و DAZL (سبز) در سلول های زایای مشتق از سلول های بنیادی مزانشیمال بافت چربی. هسته ها توسط DAPI (آبی) رنگ آمیزی شدند. گروه غنی شده به وسیله RA. بعد از لقاء تمایز یافته و نسبت به آنتی بادی MVH و DAZL مثبت شدند. بزرگ نمائی  $\times 400$ .

مزانشیمال حاصل از بافت چربی در تمایز به سمت سلول های رده زایا بررسی شد. در این مطالعه نشان داده شد که سلول های تمایز یافته از سلول های بنیادی مزانشیمال حاصل از بافت چربی قادر به بیان مارکرهای رده سلول های زایا یعنی Mvh و Dazl می باشند و این بیانگر این مطلب است که سلول های فوق به سمت سلول های زایا در محیط *In vitro* تکامل یافته اند. روش تمایزی مورد استفاده در این مطالعه روش نسبتاً تغییر یافته مطالعات پیشین بود (۵ و ۶-۸). سلول های

داده شدند. آنالیز فلو سایتومتری و رنگ آمیزی ایمونوفلوروسنس این گروه با بررسی دو مارکر رده سلول های زایا یعنی Mvh و DAZL انجام شد و نتایج به دست آمده نشان داد که سلول های این گروه نسبت به این دو مارکر واکنش مثبت نشان داده اند (اشکال ۵ و ۶).

**بحث و نتیجه گیری**  
در مطالعه حاضر با استفاده از فاکتور تمایزی رتینوئیک اسید قابلیت سلول های بنیادی

نشان دهنده این مطلب است که سلول‌های به دست آمده در این مطالعه جمعیت خالصی از سلول‌های بنیادی مزانشیمی می‌باشند (۲۷).

در مطالعه حاضر مدت زمان بسیار زیادی صرف می‌شد تا سلول‌های بنیادی مغز استخوان رشد و تکثیر یابند. حتی در صورت رسیدن به Confluence کامل نیز به تعداد پاساز بالاتر نمی‌رسیدند و به علت کم بودن میزان رشد و تکثیر سریعاً به سلول‌های چربی تمایز می‌شدند. سلول‌های گرفته شده از بافت چربی علاوه بر نمونه‌گیری آسان، سریع رشد و تکثیر می‌یافتد و همچنین با حداقل آسیب می‌توان به مقدار زیادی سلول دست یافت. به طور کلی در مطالعات قبلی نیز این مطلب تایید شده است که کار با سلول‌های بنیادی گرفته شده از بافت چربی راحت‌تر از کار با سلول‌های بنیادی گرفته شده از مغز استخوان و بنیادی جنینی بوده (۳۰ و ۳۱).

در مرحله بعد به روند تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی بافت چربی به سلول‌های زایا در محیط کشت حاوی رتینوئیک اسید پرداخته شد و توان تشکیل سلول‌های شبه زایا با آنالیز ایمونوفلوروسنس و فلوسايتومتری برسی شد.

نظر به اینکه اسید رتینوئیک در هر دو جنس در مژونفروز تولید می‌شود و موجب تصمیم‌گیری سلول‌های زایای پس مهاجر جهت ورود به مرحله میوز و یا توقف در مرحله میتوуз می‌شود (۲۳)، بنابراین به نظر می‌رسد که اسید رتینوئیک ممکن است سبب تسریع ورود سلول‌های زایا به مرحله میوز در ستیغ تناسلی گردد نکته قابل توجه این است که در In Vitro اسید رتینوئیک سبب القای تمایز سلول‌های بنیادی و تحیریک تقسیم میتوуз و تمایز سلول‌های بنیادی به سلول‌های جنسی می‌شود در این زمینه مطالعات متعددی انجام گرفته که تمامی آن‌ها موید این مطلب بوده است (۵، ۷ و ۲۳). البته RA یک فاکتور تمایزی چند منظوره می‌باشد و می‌تواند باعث تمایز سلول‌ها به سمت سلول‌ای عصبی، قلبی و کبدی نیز بشود (۱۱).

گزارشات متعددی از نقش RA در روند تشکیل سلول‌های بنیادی مزانشمال مغز استخوان و

بنیادی، سلول‌های تمایز نیافته با توانایی تکثیر و تولید سلول‌های تمایز یافته هستند. سلول‌های بنیادی مزانشیمی به عنوان یک منبع ایده آل برای سلول درمانی محسوب می‌گردد. استفاده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی جهت درمان بیماری‌ها بسیار رایج بوده است، این سلول‌ها قابلیت تزايد زیادی داشته و می‌توانند به چندین رده سلولی از قبیل سلول‌های اندوتیال، اپیتلیال، عضلانی، سلول‌های شبه شوآن، هپاتوسیت و نورون تمایز یابند (۲۵ و ۱۸).

در مطالعه حاضر سلول‌های شبه فیبروبلاست دوکی شکل به دست آمده از بافت چربی با استفاده از تغییر مداوم محیط کشت تکثیر داده شدند. نتایج این مطالعه نشان داد که تعویض پی در پی محیط کشت مانع از چسبیدن سلول‌های غیر مزانشیمی و خونی به فلاسک پلاستیکی کشت می‌شوند که مشابه گزارش سایر محققین بوده است (۲۶ و ۲۷).

جهت اثبات مزانشیمال بودن سلول‌ها مارکرهای سطحی بررسی شدند. از طرفی در این مطالعه مارکرهای CD44 و CD90 در حد قابل توجهی بیان شدند. نتایج حاصل از تحقیق حاضر، نتایج مطالعه انجام شده توسط Dominici و همکاران و Lee و همکاران را در بیان مارکرهای CD44 و CD31 و CD45 و CD90 عدم بیان مارکرهای CD45 و CD90 تایید می‌نماید و نشانگر بنیادی بودن سلول‌های حاصله می‌باشد (۲۶ و ۲۷).

جهت تایید چند توان بودن سلول‌های بنیادی مزانشیمی حاصل از بافت چربی اقدام به تمایز آن‌ها در محیط تمایزی آدیپوسیت و استئوبلاست نموده و با استفاده ازرنگ‌های Alizarin و Oil red-O و red S تمایز آن‌ها به ترتیب به آدیپوسیت و استئوبلاست نشان داده شد که در مطالعات قبلی نیز از این روش جهت تایید چند توان بودن استفاده شده است و نتایج مشابه نتایج گزارش های دیگر بوده است (۱۲ و ۲۹). در مجموع عدم بیان مارکرهای شاخص سلول‌های خونی و آندوتیال، بیان مارکرهای شاخص مزانشیمی، مورفولوژی دوکی سلول‌ها، توان تکثیر بالا و تمایز به دو دمان های مزانشیمی (استخوان و چربی)

سلول‌های زایا بررسی شد. سلول‌های مذکور به مدت ۷ روز در محیط کشت حاوی رتینوئیک اسید کشت داده شدند. رنگ آمیزی ایمونوفلورسنس و آنالیز فلوسیتومتریک نشان دادند که این سلول‌ها تحت تاثیر RA مارکرهای Mvh و DAZL را بیان می‌کنند.

گروهی از محققین نقش تمایزی و تکثیری RA در تمایز سلول‌های بنیادی مغز در *In vitro* را در تمایز سلول‌های زایا گزارش کردند. استخوان به سلول‌های زایا گزارش کردند. Nayernia و همکاران توانسته بودند در مطالعات *In vitro* به تمایز سلول‌های زایایی مذکور از سلول‌های بنیادی مزانشیمال مغز استخوان موشی و انسانی در محیط کشت حاوی RA دست یابند(۱۰ و ۹). در مطالعه‌ای دیگر Salvador و همکاران تمایز سلول‌های زایایی مذکور را از سلول‌های بنیادی جنینی موش در محیط کشت تمایزی حاوی RA و تستسترون گزارش کردند و موفق به مشاهده اووسیت‌هایی شدند که توسط ساختارهای شبه فولیکولی احاطه شده بودند(۳۴). همچنین Hua و همکاران موفق به تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمال مغز استخوان جنینی‌های سقط شده انسان به سلول‌های زایایی مذکور با اضافه کردن اسید رتینوئیک و عصاره بیضه (Testicular extraction) به محیط کشت شدند (۱۱).

بررسی‌هایی بر روی سلول‌های Mvh<sup>+</sup> به دست آمده از بافت چربی در اثر RA صورت نگرفته است، ولی نتایج تحقیق حاضر نشان دهنده اهمیت نقش تکثیری و تزایدی فاکتور RA در تمایز به سمت سلول‌های جنسی می‌باشد و هیچ مغایرتی با نتایج به دست آمده در تحقیقات انجام شده قبلی که بر روی سلول‌های بنیادی روبانی و مزانشیمی حاصل از مغز استخوان انجام شده، نداشته است.

تمایز سلول‌های بنیادی به سلول‌های زایا و گامت‌ها می‌تواند در ک محققین را نیز از نحوه تکامل سلول‌های زایا و سلول‌های جنسی مذکور و مؤنث عمیق‌تر و بر مشکلات تکنیکی و اخلاقی استفاده از این سلول‌ها در تحقیقات گوناگون به خصوص در نمونه‌های انسانی غلبه کند. همچنین مطالعات انجام شده در سال‌های اخیر و

رویانی در شرایط *in vitro* حفایت دارند. به طوریکه فقدان این فاکتور تمایزی منجر به تمایز بسیار کم سلول‌های مذکور به سلول‌های زایا شده بود (۳، ۵ و ۹-۱۳)، لذا نقش انکار ناپذیر فاکتور RA در تمایز سلول‌های بنیادی به سلول‌های زایا مبرهن می‌باشد.

در مطالعه حاضر برای شناسایی سلول‌های زایای تولید شده در شرایط *in vitro* از مارکرهای (Deleted in azoospermia-like) DAZL (mouse Vasa homolog gene) Mvh برده می‌باشد (۳۱). این مارکر یک RNA هلیکاز وابسته به ATP مخصوص رده سلول‌های زایا می‌باشد که تا کنون بیان آن در هیچ رده سلولی دیگر تایید نشده است. در هنگام مهاجرت سلول‌های زایا به سطیغ گنادی اولین مارکر بیان شده در این رده Mvh می‌باشد. با توجه به تحقیقات گسترده‌ای که بر روی سلول‌های زایا انجام شده است، در حال حاضر مطمئن‌ترین مارکر جهت تمایز سلول‌های رده زایا از سایر سلول‌ها مارکر Mvh می‌باشد (۳۲ و ۳۳). در گروه کنترل سلول‌های بنیادی بدون هیچ‌گونه فاکتور تمایزی مورد مطالعه قرار گرفتند. در این گروه همانطور که انتظار می‌رفت سلول‌های بنیادی مزانشیمی هیچ کدام از مارکرهای رده سلول‌های زایا (DAZL, Mvh) را در سطح پرتوئین بیان نکردند که این نتایج همانند نتایج به دست آمده در مطالعات انجام شده پیشین می‌باشند و نشان دهنده این مطلب بوده است که سلول‌های بنیادی مزانشیمی در محیط کشت فاقد فاکتور تمایزی به سلول زایا تمایز نمی‌یابند (۹-۱۱). با اینکه در مطالعاتی، گزارشاتی مبنی بر تمایز خود به خودی سلول‌های بنیادی جنینی موشی به سلول‌های زایا گزارش شده بود (۵ و ۳۳)، اما نتایج به دست آمده از این مطالعه بیانگر مطلبی خلاف می‌باشد، زیرا در گروه کشت داده شده بدون استفاده از هیچ‌گونه فاکتور رشد، هیچ یک از مارکرهای رده زایا بیانی نداشتند.

در گروه مورد مطالعه تمایزی تأثیر اسید رتینوئیک در تمایز سلولهای بنیادی بافت چربی به

4. Toyooka, Y., et al., Embryonic stem cells can form germ cells in vitro. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2003;100(20): 11457-62.
5. Geijsen, N., et al., Derivation of embryonic germ cells and male gametes from embryonic stem cells. Nature. 2003;427(6970):148-54.
6. Lacham Kaplan O, Chy H, Trounson A. Testicular cell conditioned medium supports differentiation of embryonic stem cells into ovarian structures containing oocytes. Stem Cells. 2005;24(2):266-73.
7. Nayernia, K., et al., In vitro-differentiated embryonic stem cells give rise to male gametes that can generate offspring mice. Developmental Cell. 2006; 11(1):125-32.
8. Molyneaux K, Wylie C. Primordial germ cell migration. International Journal of Developmental Biology. 2004; 48:537-44.
9. Drusenheimer, N., et al., Putative human male germ cells from bone marrow stem cells. Society of Reproduction and Fertility supplement. 2007;63: 69.
10. Nayernia, K., et al., Derivation of male germ cells from bone marrow stem cells. Laboratory investigation. 2006; 86(7):654-63.
11. Hua, J., et al., Derivation of male germ cell-like lineage from human fetal bone marrow stem cells. Reproductive biomedicine online. 2009;19(1): 99-105.
12. Mazaheri, Z., et al., Different doses of bone morphogenetic protein 4 promote the expression of early germ cell-specific gene in bone marrow mesenchymal stem cells. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal. 2011;47(8):521-5.
13. Dyce, P.W., et al., Stem cells with multilineage potential derived from porcine skin. Biochemical and biophysical research communications. 2004; 316(3):651-8.
14. Young HE, Black AC. Adult stem cells. The Anatomical Record Part A: Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology. 2003;276(1):75-102.
15. Wakitani, S., et al., Embryonic stem

پیشرفتهای صورت گرفته در تمایز سلول‌های بنیادی به انواع مختلف سلول‌ها، نگرش دانشمندان را به مبحث باروری و ناباروری تغییر داده است. می‌توان با ادامه تحقیقات و با ادامه تمایز سلول‌های بنیادی بافت چربی به سلول‌های جنسی مذکور و مؤنث (اووسیت و اسپرم) دریچه‌ای نو و امیدوارکننده برای درمان اختلالات باروری و غلبه بر ناباروری گشود.

در مطالعه حاضر سلول‌های بنیادی جدا شده از بافت چربی موش‌های نر جهت اثبات پرتوان بودن، در محیط‌های تمایزی مناسب به استئوبلاست و لیپوبلاست تمایز داده شدند. همچنین این سلول‌ها قادر به بیان مارکرهای سطحی سلول‌های بنیادی مزانشیمی بودند. در نهایت با استفاده از فاکتور تمایزی مناسب سلول‌های به دست آمده به سلول‌های زایا تمایز داده شدند. نتایج مثبت به دست آمده نشان می‌دهد که سلول‌های بنیادی پرتوان حاصل از بافت چربی قادر هستند به سلول‌های زایا متمایز شوند.

## تقدیر و تشکر

این پژوهه با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران با شماره ثبت ۹۰-۳۰۰۲-۱۲۹۴۲ انجام گرفته است.

## منابع

1. Valsangkar, S., et al., An evaluation of the effect of infertility on marital, sexual satisfaction indices and health-related quality of life in women. Journal of Human Reproductive Sciences. 2011;4(2):80.
2. Newson A, Smajdor A. Artificial gametes: new paths to parenthood? Journal of medical ethics. 2005;31(3):184-6.
3. Newson A, Smajdor, Artificial gametes: new paths to parenthood? Journal of medical ethics, 2005. 31(3): p. 184-186.
- Hübner, K., et al., Derivation of oocytes from mouse embryonic stem cells. Science. 2003;300(5623):1251-6.

- Cyotherapy. 2006;8(4):315-7.
27. Sun, S., et al., Isolation of mouse marrow mesenchymal progenitors by a novel and reliable method. *Stem Cells*. 2003;21(5):527-35.
  28. Lee, K.D., et al., In vitro hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Hepatology*. 2004;40(6):1275-84.
  29. Pittenger, M.F., et al., Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999;284(5411):143-7.
  30. Villageois, P., et al. Regulators of human adipose-derived stem cell self-renewal. *Am J Stem Cell*. 2012;1(1):42-7.
  31. Mizuno H, Tobita M, Uysal AC. Concise review: adipose derived stem cells as a novel tool for future regenerative medicine. *Stem Cells*. 2012; 30(5):804-10.
  32. West, F.D., et al., Human haploid cells differentiated from meiotic competent clonal germ cell lines that originated from embryonic stem cells. *Stem cells and development*. 2010;20(6):1079-88.
  33. Yamauchi, K., et al., In vitro germ cell differentiation from cynomolgus monkey embryonic stem cells. *PLoS One*. 2009;4(4):e5338.
  34. Salvador, L.M., et al., The promoter of the oocyte-specific gene, Gdf9, is active in population of cultured mouse embryonic stem cells with an oocyte-like phenotype. *Methods*. 2008;45 (2):172-81.
  - cells injected into the mouse knee joint form teratomas and subsequently destroy the joint. *Rheumatology*. 2003; 42(1):162-5.
  16. Brickman JM, Burdon TG. Pluripotency and tumorigenicity. *Nature genetics*. 2002;32(4):557-8.
  17. Zuk, P.A., et al., Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue engineering*. 2001;7(2):211-28.
  18. Jiang, L., et al., Differentiation of rat adipose tissue-derived stem cells into Schwann-like cells in vitro. *Neuroreport*. 2008;19(10):1015-9.
  19. Song, S.H., et al., Characterization of porcine multipotent stem/stromal cells derived from skin, adipose, and ovarian tissues and their differentiation in vitro into putative oocyte-like cells. *Stem cells and development*. 2011; 20(8):1359-70.
  20. Masui, S., et al. Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells. *Nature cell biology*. 2007; 9(6):625-35.
  21. Tolkunova, E., et al., The caudal-related protein Cdx2 promotes trophoblast differentiation of mouse embryonic stem cells. *Stem Cells*. 2006;24(1):139-44.
  22. Ross, S.A., et al., Retinoids in embryonal development. *Physiological reviews*. 2000;80(3):1021-54.
  23. Bowles, J., et al., Retinoid signaling determines germ cell fate in mice. *Science Signalling*. 2006;312(5773):596.
  24. Nayernia, K., et al., Stem cell based therapeutical approach of male infertility by teratocarcinoma derived germ cells. *Human molecular genetics*. 2004; 13(14):1451-60.
  25. De Ugarte, D.A., et al., Differential expression of stem cell mobilization-associated molecules on multi-lineage cells from adipose tissue and bone marrow. *Immunology letters*. 2003; 89(2):267-70.
  26. Dominici, M., et al., Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement.

## The effect of retinoic acid on differentiation of mouse adipose tissue derived mesenchymal stem cells into germ cells

**Maryam Hosseinzadeh Shirzeyli**, MSc. Department of Anatomy, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. m\_hoseinzadeh@razi.tums.ac.ir

**Parichehr Pasbakhsh**, PhD. Associate Professor of Anatomy, Department of Anatomy, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. pasbakhsh@hotmail.com

**Fardin Amidi**, PhD. Associate Professor of Anatomy, Department of Anatomy, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. amidifardin@yahoo.com

**Zohre Afsartala**, MSc. Department of Biology, School of Basic Science, Islamic Azad University, Tehran, Iran. zafsartala@yahoo.com

**\*Aligholi Sobhani**, Ph.D. Professor of Anatomy, Department of Anatomy, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran (\*Corresponding author). sobhania@tums.ac.ir

### Abstract

**Background:** Recent publications regarding the differentiation of stem cells to germ cells have motivated researchers to make new approaches in infertility. In vitro production of germ cells improves the understanding of differentiation process of male and female germ cells. Since using embryonic stem cells for this purpose has been associated with tumorigenesis and ethical criticisms, the mentioned cells were suggested to be replaced with some adult multipotent stem cells. In this study, we used Retinoic acid to induce the differentiation of stem cells into germ cells. To find appropriate non invasive source replacement for embryonic stem cells in this study; we evaluated differential potentials of Adipocyte Derived Mesenchymal Stem Cells (ADMSCs) to germ like cells.

**Methods:** To find the differentiation capability purified ADMSCs were obtained and differentiated to osteoblasts and adipocytes by using appropriate culture medium (Alizarin Red S and Oil red-O). Superficial markers for mesenchymal stem cells (expression of CD90 and CD44 and non-expression of CD45 and CD31) were investigated by flow cytometry to confirm mesenchymal lineage production. The cells were differentiated to germ cells in mediums containing Retinoic acid for 7 days. To evaluate germ cells characteristic markers (Mvh and Dazl) flow cytometry and imunofluorescence were used.

**Results:** Presence of stem cell superficial markers (CD90 and CD44) and absence of endothelial and blood cell markers (CD31 and CD45) were confirmative for the mesenchymal origin of these cells. The cells were able to differentiate into osteoblast and adipocyte cells. This fact was representative for the multipotential entity of the examined cells. After treating the cells with Retinoic acid, flow cytometry and imunofluorescence results showed remarkable expression of germ cells characteristic markers (Mvh and Dazl).

**Conclusions:** By this study, it was found that germ cell markers were expressed in ADMSCs after adding exogenous Retinoic acid into culture medium.

**Keywords:** Mesenchymal stem cells, Infertility, Germ cells, Retinoic acid