

## نقش حفاظتی کلرید لیتیوم در مقابل القای آپوپتوزیس در سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان موش صحرایی در محیط کشت

محمد رضا باغبان اسلامی نژاد\*، محمود تلخابی<sup>۱</sup>، بهمن زینلی<sup>۱</sup>، پوپک افتخاری یزدی<sup>۲</sup>

### چکیده

**اهداف.** هدف این تحقیق، بررسی اثرات حفاظتی کلرید لیتیوم در مقابل آپوپتوزیس القا شده در کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی موش صحرایی است.

**روش‌ها.** در مطالعه تجربی حاضر، سلول‌های مغز استخوان موش صحرایی در غلظت‌های ۲، ۵ و ۱۰ میلی مولار کلرید لیتیوم، تا پاساژ سوم کشت شد و در پایان این دوره، تعداد سلول‌های زنده در گروه‌های مختلف با روش رنگ‌آمیزی پروپیدیوم یدید (PI) و انجام فلوسیتومتری تعیین و مقایسه گردید. همچنین در کشت سلول‌های پاساژ سوم با اعمال محرومیت سرم و افزودن  $TNF-\alpha$  آپوپتوزیس القا شد و همزمان کشت سلولی با غلظت‌های یادشده‌ی لیتیوم تیمار شد. میزان آپوپتوزیس بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت با استفاده از رنگ‌آمیزی آکریدین اورنج و اتیدیوم بروماید بررسی شد.

**یافته‌ها.** پراکنش فلوسایتومتری سلول‌های مرده و زنده پس از رنگ‌آمیزی با PI نشان داد که تیمار سلول‌ها با غلظت‌های مختلف لیتیوم سبب افزایش تعداد سلول‌های زنده شده است. از این نظر بیشترین تعداد سلول زنده در گروه ۵ میلی مولار بود ( $p < 0/05$ ). درصد سلول‌های آپوپتوتیک بعد از ۲۴ ساعت برای گروه‌های کنترل، ۲، ۵ و ۱۰ میلی مولار لیتیوم کلراید به ترتیب برابر با ۱۹/۳۴، ۱۳/۵۵، ۵/۷۵ و ۱۰/۳۱ بود که با گذشت زمان (ساعت ۴۸ و ۷۲) تفاوت این درصدها بیشتر شد. از این نظر کمترین درصد سلول‌های آپوپتوتیک به گروه ۵ میلی مولار تعلق داشت ( $p < 0/001$ ).

**نتیجه‌گیری.** لیتیوم کلراید به ویژه در غلظت ۵ میلی مولار به‌طور قابل توجهی میزان آپوپتوز القا شده در کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی را کاهش می‌دهد.

**کلیدواژه‌ها:** سلول‌های بنیادی مزانشیمی موش صحرایی، آپوپتوزیس، حذف سرم،  $TNF-\alpha$

## مقدمه

سلول‌های بنیادی مزانشیمی، سلول‌های چندتوانی هستند که توانایی تمایز به دودمان‌های بافت همبند از جمله آدیپوسیت، کندروسیت و استئوسیت را دارند. این سلول‌ها قادرند برای مدت طولانی تقسیمات خودتجدیدی را ادامه داده و در عین حال توانایی تمایز را حفظ نمایند [۱، ۲]. وجود سلول‌های بنیادی مزانشیمی با ظرفیت تمایز به استخوان و دیگر سلول‌های بافت همبند برای اولین بار توسط فریدنشتاین (Friedenstein) عنوان شد. این محقق خصوصياتی از جمله تشکیل درصد بسیار کمی از سلول‌های مغز استخوان، خاصیت تکثیر بالا در شیشه، قابلیت کلون‌زایی، تشکیل کلونی‌هایی با اشکال نامنظم و مترکم و حفظ توان تشکیل استخوان حتی پس از گذراندن پاساژهای متعدد را برای این سلول‌ها برشمرد [۳، ۴]. سلول‌های بنیادی مزانشیمی تاکنون از بافت‌های مختلفی از قبیل چربی [۵]، کبد [۶]، مایع آمنیوتیک [۷] و خون بندناف [۸] جدا شده‌اند. این سلول‌ها، به دلیل پتانسیل تکثیری بالا در محیط کشت، یکی از ابزارهای سلولی مورد توجه در مهندسی بافت، ژن‌درمانی و سلول‌درمانی محسوب می‌شوند [۹].

برخی مطالعات نشان داده است که سلول‌های بنیادی مزانشیمی پس از لانه‌گزینی در بافت آسیب‌دیده، سیتوکین‌ها و فاکتورهای تروفیک که اثرات مفیدی در ترمیم بافتی دارند، ترشح می‌کنند. این ویژگی سبب شده تا این سلول‌ها کاندید مناسبی برای عمل پیوند به‌منظور درمان بیماری‌های تخریبی مانند تحلیل عصبی به شمار آیند [۱۰، ۱۱]. اما یکی از مشکلات به‌کارگیری این سلول‌ها، وقوع مرگ‌سلولی به دنبال پیوند به ناحیه آسیب‌دیده است. در این ارتباط، تحقیقات مگنی (Magni) و همکاران نشان داده است که حدود ۷۰٪ سلول‌های بنیادی مزانشیمی تزریق‌شده به ناحیه مرزی بطن چپ ایسکمیک موش صحرایی طی ۲۴ ساعت به‌واسطه آپوپتوزیس از بین می‌روند [۱۲]. همچنین گنگ (Geng) گزارش کرده است که بیش از ۹۰٪ سلول‌های بنیادی مزانشیمی تزریق‌شده به بطن چپ موش بالغ طی ۴ روز بعد از تزریق دچار مرگ می‌گردند [۱۳]. با توجه به این موارد به‌نظر می‌رسد که حمایت سلول‌های بنیادی مزانشیمی در برابر آپوپتوزیس برای درمان موفقیت‌آمیز ضایعات بافتی امری حیاتی است [۱۴].

به‌طور کلی دو مسیر عمومی برای القای آپوپتوزیس وجود دارد. مسیر خارجی آپوپتوزیس با اتصال لیگاندهای مرگ به گیرنده‌های غشایی فعال می‌شود و نتیجه نهایی آن فعال شدن کاسپاز ۸ و شروع آپوپتوزیس است. مسیر داخل سلولی را که مرگ سلولی غیرفعال نیز می‌گویند، در نتیجه از دست رفتن محرک‌های بقا ایجاد می‌شود که اشاره بر این دارد که بسیاری از سلول‌ها برای مرگ برنامه‌ریزی شده‌اند، مگر این‌که از طریق محرک‌های بقا حفاظت شوند. در مسیر داخلی آپوپتوزیس، میتوکندری نقش

اصلی را ایفا می‌کند چون دارای تعداد زیادی از پروتئین‌های پیش‌آپوپتوزی از قبیل AIF، Endo G، Smac/DIABLO، Htr/Omi و سیتوکروم C بوده و این فاکتورها بعد از ایجاد منفذ در غشای میتوکندری که در اثر عملکرد پروتئین‌های پیش‌آپوپتوزی خانواده bcl-2 ایجاد می‌شود، آزاد می‌شوند. در انتهای مسیر، سیتوکروم C به کمک پروتئین Apaf-1 کمپلکس پروتئینی به نام آپوپتوزوم را ایجاد می‌کند که باعث فعال‌سازی کاسپاز ۹ شده و آپوپتوزیس شروع می‌شود [۱۵، ۱۶].

مسیرهای سیگنال‌دهی متفاوتی در کنترل مرگ‌سلولی نقش دارند. مسیر سیگنال‌دهی Wnt یکی از مسیرهای مهم در تمام جانوران پر سلولی است. این مسیر، بسیاری از خصوصیات سلولی از قبیل تعیین سرنوشت، تکثیر، تمایز، آپوپتوزیس و مهاجرت سلولی را کنترل می‌کند. این مسیر با مولکول‌های ترشحي Wnt شروع می‌شود که با اتصال به گیرنده خود در سطح غشا سبب مهار گلیکوژن سنتازکیناز (GSK-3 $\beta$ ) می‌شوند، که نتیجه آن فسفریله نشدن بتاکتین و تجمع آن در سیتوپلاسم است. بتاکتین وارد هسته شده و در آنجا با اتصال به فاکتورهای نسخه‌برداری TCF/LEF، ژن‌های هدف وابسته به Wnt را فعال می‌کند [۱۷].

بسیاری از مطالعات نشان داده است که کلریدلیتیوم تاثیرات مهمی بر GSK-3 $\beta$  داشته و در نتیجه تاثیراتی مشابه بر مولکول‌های ترشحي Wnt دارد [۱۸، ۱۹]. کلریدلیتیوم باعث حمایت سلول‌های عصبی در مقابل حملات پیش‌آپوپتوزی ناشی از محرومیت پتاسمی [۲۰]،  $\beta$ -آمیلوئید [۲۱]، فنی‌توئین [۲۲] و پلی‌گلوتامین [۲۱] می‌شود. این ماده، در سلول‌های اندوتلیالی آئورت باعث بیان و پایداری p53 شده و چرخه سلولی را در G<sub>2</sub>/M متوقف می‌کند [۲۳]. کلریدلیتیوم در کلیه‌ها با فعال کردن Akt [۲۴] و در سلول‌های ماهیچه‌ای با کاهش فعالیت کاسپاز ۳ [۲۵] سبب مهار آپوپتوزیس و در بعضی از سلول‌ها از قبیل آدیپوسیت‌ها سبب بیان ژن‌های آنتی‌آپوپتوزی (IGF-I) می‌شود [۲۶]. همچنین اثرات بازدارندگی کلریدلیتیوم در نورون‌های مخچه‌ای موش صحرایی نشان داده شده است [۲۷]. تاکنون هیچ‌گونه گزارشی مبنی بر تاثیر کلریدلیتیوم بر آپوپتوزیس سلول‌های بنیادی مزانشیمی ارایه نشده است. در مطالعه حاضر این موضوع مورد توجه قرار گرفته است. فرضیه این مطالعه این است که حضور لیتیوم در محیط کشت سبب افزایش تعداد سلول‌های زنده و کاهش وقوع آپوپتوزیس می‌شود. برای بررسی این موضوع سلول‌های مغز استخوان موش صحرایی در حضور غلظت‌های مختلف لیتیوم و کنترل (فاقد لیتیوم) کشت شده و در انتهای دوره کشت، گروه‌های مختلف از لحاظ تعداد سلول‌های زنده مقایسه گردیده‌اند. برای آزمون نقش حفاظتی لیتیوم در برابر وقوع آپوپتوزیس، کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی با محرومیت سرمی و افزودن TNF- $\alpha$  تحریک به آپوپتوز شده و با تیمار همزمان با لیتیوم، اثر آنتی‌آپوپتوتیک لیتیوم بررسی شده است.

## مواد و روش‌ها

## جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان

هشت سر موش صحرایی نژاد ویستار با سن تقریبی ۸ هفته با کلروفورم بیهوش شدند. استخوان‌های ران و ساق آنها جدا شده و از بافت‌های پیوندی اطراف استخوان‌ها به‌طور کامل پاک گردید. روش جداسازی بر اساس روش لنون (Lennon) و همکاران (با اندکی تغییر) انجام گرفت [۲۸]. ابتدا استخوان‌ها در محیط کشت DMEM (Gibco, UK) حاوی ۱۵٪ سرم (Gibco, FBS) UK در دمای ۴° سانتی‌گراد قرار گرفته، به زیر هود منتقل شدند. دو سر استخوان‌ها با قیچی استریل قطع گردید و مغز استخوان با عمل فلاشینگ خارج شد. بدین ترتیب که ابتدا سرسوزن شماره ۲۲ متصل به سرنگ حاوی محیط DMEM دارای ۱۵٪ سرم FBS، ۱۰۰ واحد بین‌المللی پنی‌سیلین (Gibco, UK) و ۱۰۰ واحد بین‌المللی استرپتومایسن (Gibco, UK) از سر استخوان وارد کانال استخوانی شد. سپس با فشار پیستون، محیط داخل سرنگ به داخل کانال استخوانی هدایت شد، به‌طوری‌که با این عمل، مغز استخوان شست‌وشو شده و از سر دیگر استخوان خارج گردید. مغز استخوان به داخل دو لوله ۱۵ میلی‌لیتری حاوی محیط کامل (DMEM) دارای ۱۰٪ FBS هدایت شد و به مدت ۵ دقیقه در ۱۲۰۰ rpm سانتریفوژ شد. سپس محیط رویی خارج و رسوب سلولی در ۱ میلی‌لیتر محیط تازه معلق گردید. سلول‌ها با استفاده از لام نئوبار شمارش شدند و به تعداد  $5 \times 10^5$  سلول در سانتیمتر مربع در چهار فلاسک ۲۵ سانتیمتر مربع کشت و در انکوباتور CO<sub>2</sub> دار (۳۷°C، ۵٪ O<sub>2</sub>، ۹۵٪ CO<sub>2</sub>) انکوبه شدند. دو روز پس از آغاز کشت، محیط رویی که دارای سلول‌های غیرچسبیده بود، خارج شده و سلول‌ها با محیط کامل شست‌وشو شدند و محیط تازه حاوی غلظت‌های ۲، ۵ و ۱۰ میلی‌مولار لیتیم کلراید به سلول‌ها اضافه شد (سلول‌های یک فلاسک به عنوان کنترل انتخاب شده و لیتیم دریافت نکردند). تعویض محیط هر ۳ روز یکبار به مدت ۱۲ روز انجام شد. سپس سلول‌ها با استفاده از Trypsin/EDTA از کف فلاسک‌ها جدا شده و به نسبت ۳:۱ در فلاسک‌های ۲۵ سانتیمتر مربعی پاساژ داده شدند. سلول‌ها تا پاساژ ۳ تحت تاثیر محیط‌های حاوی لیتیم کلراید با غلظت‌های یادشده کشت شدند. در پایان دوره کشت، سلول‌های حاصل از لحاظ تعداد سلول‌های مرده و زنده با روش رنگ‌آمیزی پروپیدیوم یدید (PI) بررسی شدند. همچنین در کشت این سلول‌ها، با استفاده از حذف سرم گاوی و افزودن TNF- $\alpha$  آپوتوزیس القا شد و همزمان، تیمار با لیتیم کلراید (غلظت‌های ۲، ۵ و ۱۰ میلی‌مولار) انجام شد. کشت گروه‌های مختلف پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، از لحاظ تعداد سلول‌های آپوتوتیک مورد بررسی قرار گرفت.

## رنگ‌آمیزی پروپیدیوم‌یدید و انجام فلوسایتومتری

از خاصیت نفوذپذیر شدن غشای سلول‌های مرده می‌توان برای تعیین تعداد سلول‌های مرده و زنده استفاده کرد. در رنگ‌آمیزی با محلول فلورسنت PI، از این خاصیت استفاده می‌شود و هسته سلول‌های مرده رنگ‌آمیزی می‌گردد [۲۹]. در این مطالعه از این رنگ‌آمیزی برای تعیین تعداد سلول‌های مرده کشت گروه‌های مختلف استفاده شد. برای این منظور، سلول‌های پاساژ سوم از کشت یکنواخت‌شده (Confluent) گروه‌های تیمار با لیتیم کلراید و گروه کنترل با تریپسینه کردن جدا و تحت ۵۰۰g به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق سانتریفوژ شدند. سپس سلول‌ها با PBS سرد شسته و در ۱۰۰ میکرولیتر بافر PI که شامل PBS، BSA ۲٪ و آزید سدیم ۱٪ بود (همگی محصول Sigma ایالات‌متحده)، معلق شدند. آنگاه ۱۰ میکرولیتر از محلول PI به سوسپانسیون سلولی اضافه شد و محلول حاصل به مدت ۵ دقیقه در تاریکی قرار گرفت. پس از آن، ۱ میلی‌لیتر از بافر PI اضافه شد و برای بررسی با فلوسایتومتری به بخش مربوطه منتقل گردید.

## القای آپوتوزیس

در این مطالعه از سلول‌های پاساژ سوم برای بررسی آپوتوزیس استفاده شد. سلول‌های پاساژ سوم که در غلظت‌های ۲، ۵ و ۱۰ میلی‌مولار لیتیم کلراید کشت شده بودند، تریپسینه شده و شمارش گردیدند. تعداد ۳۰۰ هزار سلول در هر چاهک پلیت عچاهکی در محیط DMEM حاوی ۱۰٪ سرم گاوی کشت داده شدند. بعد از ۲۴ ساعت، محیط کشت سلول‌ها خارج گردید، سلول‌ها با محیط فاقد سرم شست‌وشو شدند و محیط فاقد سرم حاوی ۵۰۰ U/ml فاکتور القاکننده تومور (TNF- $\alpha$ ; Sigma, USA) به کشت سلول‌ها اضافه شد [۳۰، ۳۱]. همزمان با القا آپوتوزیس، سلول‌ها با غلظت‌های ۲، ۵ و ۱۰ میلی‌مولار لیتیم کلراید تیمار شدند. گروه بدون لیتیم به‌عنوان کنترل در نظر گرفته شد. میزان آپوتوزیس بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت با استفاده از رنگ‌آمیزی آکریدین اورنج و اتیدیوم بروماید بررسی شد.

## رنگ‌آمیزی آکریدین اورنج

به‌طور خلاصه، سلول‌ها با استفاده از Trypsin/EDTA از کف چاهک جداسازی شده، به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق در ۱۴۰۰ rpm سانتریفوژ شدند. سپس سلول‌ها با PBS سرد شسته شده و در ۱۰۰ میکرولیتر از محیط DMEM حاوی ۱۵٪ سرم گاوی معلق شدند. ۱۰ میکرولیتر مخلوط رنگ آکریدین اورنج/اتیدیوم بروماید (AO/EB) (شامل مقدار مساوی ۱۰۰  $\mu$ g/ml از هر کدام) به سوسپانسیون سلولی اضافه گردید. ۵ میکرولیتر از

سوسپانسیون سلولی بر روی لام منتقل و با میکروسکوپ فلورسنت بررسی شد [۳۲، ۳۳]. از هر نمونه ۱۰ عکس گرفته و تعداد سلول‌های آپوپتوتیک و زنده شمارش شد.

**آنالیزهای آماری**

در مطالعه حاضر آزمون آماری ANOVA برای مقایسه نتایج استفاده شد. نتایج به‌دست‌آمده، حاصل میانگین ۸ بار تکرار آزمایش بود. داده‌ها به صورت "میانگین ± انحراف از استاندارد" (SD) بیان شدند.  $p < 0.05$  معنی‌دار در نظر گرفته شد.

**تمایز به استخوان و چربی**

برای اثبات ماهیت مزانشیمی سلول‌های مورد مطالعه، از آزمایش تمایز به استخوان و چربی استفاده شد. به این منظور از کشت یکنواخت‌شده‌ی سلول‌های پاساژ سوم که تحت تاثیر غلظت‌های ۲، ۵ و ۱۰ میلی‌مولار لیتیوم کلراید و محیط فاقد لیتیوم کلراید قرار گرفته بودند استفاده شد. محیط تمایز به استخوان شامل DMEM حاوی ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر آسکوربیک اسید ۳- فسفات (Sigma, USA)، ۱۰ نانومولار دگزامتازون (Sigma, USA) و ۱۰ میلی‌مولار بتاگلیسرول فسفات (Sigma, USA) بود. در محیط تمایز به چربی، DMEM حاوی ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر آسکوربیک اسید ۳- فسفات، ۱۰۰ نانومولار دگزامتازون (Sigma, USA) و ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر ایندومتاسین (Sigma, USA) وجود داشت [۳۴، ۳۵]. ارزیابی تمایز، سه هفته بعد از القا انجام شد. بدین منظور از رنگ‌آمیزی قرمز آلیزارین برای استخوان و از رنگ‌آمیزی قرمز اوایل چربی استفاده شد. همچنین برای بررسی بیان ژن‌های ویژه استخوان و چربی از RT-PCR استفاده شد. به‌منظور رنگ‌آمیزی قرمز آلیزارین، تک‌لایه سلولی با PBS شسته شده و به‌مدت ۱۰ دقیقه با متانول (Merck, Germany) فیکس شد و سپس رنگ‌آمیزی با محلول رنگی (۱٪ قرمز آلیزارین در آب آمونیاکی ۲۵٪) (Sigma, USA) به‌مدت ۲ دقیقه انجام شد [۳۴، ۳۵]. در ادامه سلول‌ها با آب مقطر شسته شدند و پس از خشک شدن با میکروسکوپ معکوس مشاهده شدند. برای رنگ‌آمیزی قرمز اوایل، سلول‌ها به‌مدت یک ساعت در دمای اتاق با فرمالین ۴٪ فیکس و سپس با الکل ۷۰٪ شسته و به‌مدت ۱۰-۱۵ دقیقه با محلول ۵٪ قرمز اوایل و ۹۹٪ الکل ایزوپروپانل (Sigma, USA) رنگ‌آمیزی شدند و در انتها محلول رنگی حذف شده و سه بار با الکل ۷۰٪ شست‌وشو و با میکروسکوپ مشاهده شد.

### RT-PCR

در روش RT-PCR، پس از لیز نمودن سلول‌ها به‌کمک محلول RNAX (CinaGen Inc., Iran) و استخراج RNA سلولی با استفاده از کیت Revert Aid<sup>TM</sup> H<sup>-</sup> First Strand

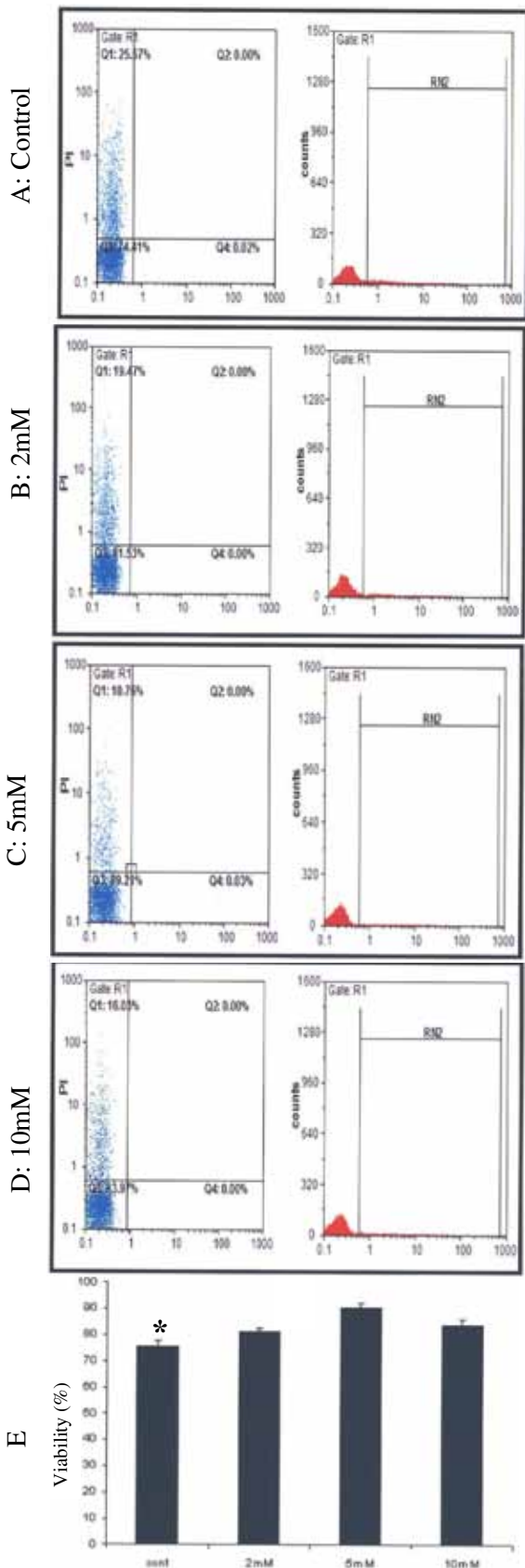
جدول ۱) توالی پرایمرهای مورد استفاده

نام ژن	توالی پرایمر	پهنای باند اتصال دمای	bp
ALP	F: 5'-CGGACCCTGCCTTAA CCAACCTCATTGTGTC-3' R: 5'-CGCACGCGATG CAACACCACTCAGG-3'	۷۲	۳۹۶
Osteocalcin	F: 5'-GATTATA GTGACACAGAC-3' R: 5'-AGCAGGA ATACTAACTGC-3'	۵۶	۲۸۷
GAPDH	F: 5'-TGCTGAGTA TGTCGTGGAGTC-3' R: 5'-AAAGGTGG AAGAATGGGAG-3'	۵۳	۶۱۲
PPAR- $\alpha$	F: 5'-CCCTGCCCTTC CCTGTGAACTGAC-3' R: 5'-GGGACTCATCT GTACTGGTGGGGAC-3'	۷۰	۳۶۳
PPAR- $\gamma$	F: 5'-GGTGA CTCTGGGAGATCC-3' R: 5'-TGAGGGAG TTTGAAGACTCTTC-3'	۵۷	۴۰۰

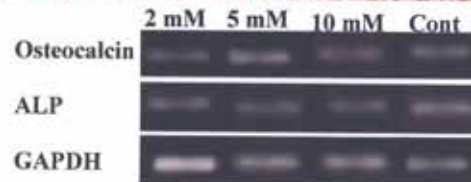
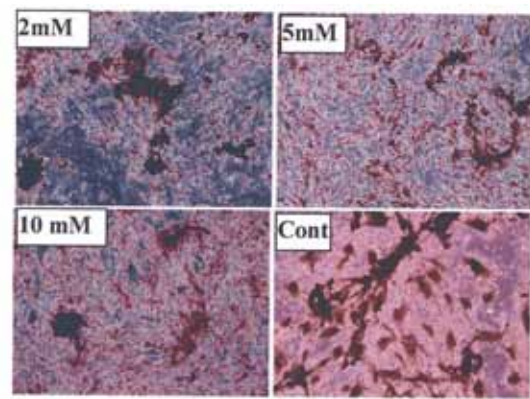
## نتایج

### تمایز

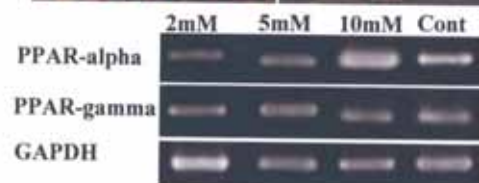
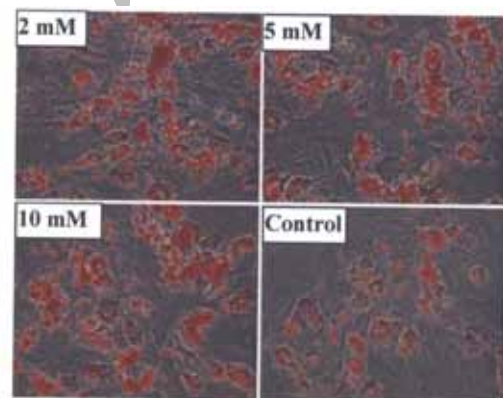
بر اساس نتایج رنگ‌آمیزی‌های اختصاصی انجام‌شده، ماتریکس معدنی ایجادشده در کشت تمایز به استخوان، به‌وسیله قرمز آلیزارین به رنگ قرمز در آمده (شکل ۱) و دانه‌های چربی ایجادشده در کشت تمایز به چربی نیز به‌وسیله قرمز اوایل، قرمز رنگ شده بود (شکل ۲). بررسی‌های RT-PCR نشان‌دهنده بیان ژن‌های استئوکلسین و آلکالین فسفاتاز در کشت استئوژنیک تمام گروه‌ها (شکل ۱) و ژن‌های PPAR- $\alpha$  و PPAR- $\gamma$  در کشت آدیپوژنیک تمام گروه‌های تیمار و کنترل بود (شکل ۲). ژن گلیسرآلدهید ۳- فسفات‌دهیدروژناز (GAPDH) به‌عنوان "خانه‌دار" در کشت‌های تمایزی بیان شده است. در مجموع تمایز به استخوان و چربی نشان‌دهنده هویت مزانشیمی سلول‌های مورد مطالعه بود.



شکل ۳) پراکنش فلوسایتومتريک سلول‌های زنده و مرده با استفاده از PI. درصد سلول‌های زنده در گروه کنترل و گروه‌های ۲، ۵ و ۱۰ میلی‌مولار کلريد ليتيوم به ترتيب در شکل‌های A، B، C و D نشان داده شده است. شکل E نمایانگر میانگین درصد سلول‌های زنده در گروه‌های مختلف تیمار کنترل است (Mean values±SD). \*نشانگر درصد پایین سلول‌های زنده گروه کنترل در مقایسه با گروه‌های تیمار است (p<۰/۰۵).



شکل ۱) رنگ‌آمیزی قرمز آلبزارین برای بررسی بیان ژن‌های اختصاصی سلول‌های استخوانی ۲۱ روز پس از آغاز تمایز در محیط استئوژنیک



شکل ۲) رنگ‌آمیزی قرمز اوپل برای بررسی بیان ژن‌های اختصاصی سلول‌های چربی، ۲۱ روز پس از آغاز تمایز در محیط آدیپوژنیک

بررسی حیات سلولی با استفاده از رنگ‌آمیزی پروپیدیوم یدید پراکنش فلوسایتومتريک سلول‌های مرده و زنده بعد از رنگ‌آمیزی سلول‌ها با PI نشان داد که تیمار سلول‌ها در غلظت‌های مختلف ليتيوم می‌تواند بر حیات سلول‌ها در مقایسه با نمونه کنترل تاثیر بگذارد. میانگین درصد سلول‌های زنده از ۸ تکرار در گروه‌های ۲، ۵ و ۱۰ میلی‌مولار ليتيوم به ترتيب ۸۱/۳۲±۱/۲۵۱، ۹۰/۶۵±۱/۷۰۷ و ۸۴/۲۱±۱/۷۰۳ بود (شکل ۳) که این میزان در گروه کنترل ۷۵/۹۱±۱/۶۳ گزارش شد. تفاوت بین گروه‌های تیمار و کنترل از لحاظ آماری معنی‌دار بود (p<۰/۰۵).

اولین بررسی ۲۴ ساعت بعد از القای آپوپتوزیس انجام شد که نشان‌دهنده کمترین تعداد سلول‌های آپوپتوتیک در گروه ۵ میلی‌مولار بود. میزان پیشرفت آپوپتوز ۴۸ ساعت و ۷۲ ساعت بعد از تیمار نیز مورد ارزیابی قرار گرفت. چنانچه در جدول ۲ مشاهده می‌شود، با گذشت زمان و افزایش این درصدها، تفاوت‌ها عمیق‌تر شد. از این نظر کمترین درصد سلول‌های آپوپتوتیک به گروه ۵ میلی‌مولار تعلق داشت ( $p < 0.001$ ). تفاوت گروه ۲ میلی‌مولار و ۱۰ میلی‌مولار لیتیوم، بعد از ۴۸ ساعت معنی‌دار نبود.

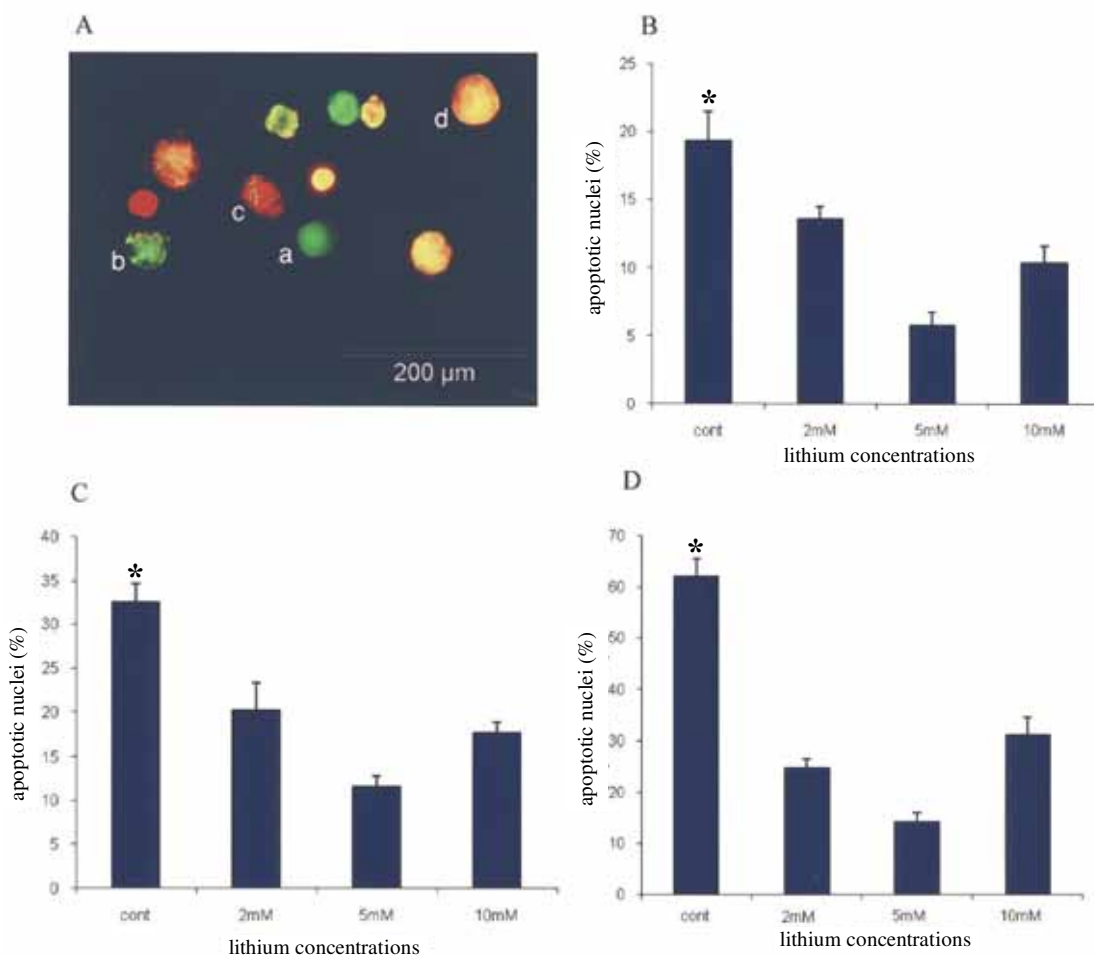
جدول ۲) میانگین درصد سلول‌های آپوپتوتیک

زمان بعد از تیمار	۱۰ میلی‌مولار	۵ میلی‌مولار	۲ میلی‌مولار	کنترل
۲۴ ساعت	۱۰/۳۱	۵/۷۵	۱۳/۵۵	۱۹/۳۴
۴۸ ساعت	۱۷/۶۳	۱۱/۵۸	۲۰/۲۳	۳۲/۵۳
۷۲ ساعت	۳۱/۰۴	۱۴/۲۲	۲۴/۷۵	۶۲/۰۹

### آپوپتوزیس سلول‌های بنیادی مزانشیمی

آکریدین اورنج به‌طور طبیعی از هر نوع غشایی عبور کرده و هسته‌ها را به رنگ سبز رنگ‌آمیزی می‌کند. هسته سلول‌های زنده فاقد هرگونه فشردگی و هسته‌های آپوپتوزی دارای فشردگی‌ها و بریدگی‌هایی هستند. اتیدیوم بروماید تنها از غشاهایی که مجروح باشند عبور می‌کند و در حالت طبیعی نمی‌تواند از غشای سلولی عبور کند. اتیدیوم بروماید هسته را به رنگ نارنجی در می‌آورد و اگر هسته‌ها دارای فشردگی و قطعه‌قطعه‌شدگی باشند، بیانگر مراحل آخر آپوپتوزیس است. در صورتی‌که هسته متورم بوده و رنگ اتیدیوم بروماید را به خود گرفته باشد، سلول دچار نکروزیس شده است.

نتایج به‌دست‌آمده از بررسی آپوپتوزیس با استفاده از رنگ‌آمیزی همزمان با آکریدین اورنج و اتیدیوم بروماید نشان داد که القای آپوپتوزیس با استفاده از محرومیت سرم و به‌کارگیری  $TNF-\alpha$  می‌تواند به‌وسیله تیمار همزمان با غلظت‌های مناسب لیتیوم، تا حدی کنترل شده و کاهش یابد (شکل ۴).



شکل ۴) میانگین درصد سلول‌های آپوپتوتیک بعد از القای آپوپتوزیس به‌وسیله محرومیت سرم و به‌کارگیری  $TNF-\alpha$ . سلول‌ها همزمان با القای آپوپتوزیس با غلظت‌های ۲، ۵ و ۱۰ میلی‌مولار لیتیوم تیمار شدند. (A) هسته سلول‌های آپوپتوتیک با استفاده از رنگ‌آمیزی آکریدین اورنج و اتیدیوم بروماید مورد ارزیابی قرار گرفتند. (a) سلول زنده، (b) سلول در مراحل ابتدایی آپوپتوزیس، (c) سلول در مراحل انتهایی آپوپتوزیس و (d) سلول نکروتیک است. نمودارهای B، C و D میزان وقوع آپوپتوزیس را به ترتیب بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت نشان می‌دهد. \* در نمودارها نشانگر این است که در هر سه غلظت لیتیوم، تعداد سلول‌های آپوپتوتیک به‌طور معنی‌داری کمتر از گروه کنترل است ( $p < 0.001$ ).

## بحث

سیگنال دهی را با کارایی بالا فعال نمایند. به هر حال این موضوع به مطالعه بیشتری نیاز دارد.

آپوپتوزیس می‌تواند از طریق مسیرهای داخلی و خارجی القا شود [۱۵]. ما در این مطالعه با به کارگیری TNF- $\alpha$  و حذف سرم (فاکتورهای بقا) مسیرهای داخلی و خارجی را به‌طور همزمان فعال کردیم. القای همزمان از طریق دو مسیر می‌تواند سبب القای موثرتر و مطمئن‌تر آپوپتوزیس شود. برای بررسی آپوپتوزیس از رنگ‌آمیزی همزمان آکریدین اورنج و اتیدیوم بروماید استفاده شد که روشی سریع و مناسب برای بررسی آپوپتوزیس است. زیرا در این روش شناسایی سلول‌های زنده، سلول‌های آپوپتوتیک (در مراحل ابتدایی و انتهایی آپوپتوزیس) و سلول‌های نکروتیک بر اساس رنگ و مورفولوژی هسته به راحتی امکان‌پذیر است [۳۲، ۳۳]. بر اساس نتایج، تیمار با کلراید لیتیوم قادر است از آپوپتوز سلول‌های بنیادی مزانشیمی تا حد زیادی ممانعت کند. حال اینکه درک تفاوت نقش حفاظتی کلراید لیتیوم در مقابل آپوپتوز القا شده از مسیر داخلی با نقش حفاظتی آن در مقابل آپوپتوز القا شده از مسیر خارجی به مطالعه بیشتری نیاز دارد.

تاکنون هیچ گزارشی مبنی بر دخالت مسیر سیگنال دهی Wnt بر آپوپتوزیس سلول‌های بنیادی مزانشیمی ارایه نشده است. اما گزارشات متعددی مبنی بر نقش این مسیر در مهار آپوپتوزیس در سلول‌های مختلف وجود دارد [۲۱، ۲۶]. بر اساس نتایج به دست آمده، کمترین میزان آپوپتوزیس در غلظت ۵ میلی‌مولار لیتیوم مشاهده شد و با افزایش غلظت مهار آپوپتوزیس کاهش یافت. همچنین با پیشرفت زمان تعداد سلول‌های آپوپتوتیک افزایش یافت و تفاوت‌ها عمیق‌تر شد. البته علت این امر می‌تواند ناشی از افزایش استرس در شرایط آپوپتوتیک باشد. در این پژوهش به‌طور مستقیم، نحوه عملکرد مسیر Wnt در مهار آپوپتوزیس مورد بررسی قرار نگرفت که البته این موضوع سزاوار مطالعه بیشتر است.

در تحقیق حاضر علاوه بر القای آپوپتوزیس در کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی و مطالعه تاثیر کلراید لیتیوم بر مهار آپوپتوزیس در این کشت که هدف اصلی مطالعه بود، تاثیرات کلراید لیتیوم بر تعداد سلول‌های زنده در کشت نیز مورد توجه قرار گرفت؛ بدین ترتیب که سلول‌های بنیادی مزانشیمی که در حضور کلراید لیتیوم از کشت اولیه تا پاساژ سوم تکثیر شده بودند با روش رنگ‌آمیزی PI مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج یافته‌های فلوسایتومتریک نشان داد که میزان سلول‌های زنده در گروه‌های تیمار با کلراید لیتیوم بیش از کنترل است و از این نظر، گروه ۵ میلی‌مولار لیتیوم وضعیت بهتری داشت. این نتایج نشان می‌دهد که حضور لیتیوم در محیط کشت با جلوگیری از مرگ سلولی سبب افزایش تعداد سلول‌های زنده می‌گردد.

در تحقیق حاضر، سلول‌های بنیادی مزانشیمی از مغز استخوان موش صحرایی در حضور غلظت‌های متفاوتی از کلراید لیتیوم و محیط بدون لیتیوم جداسازی و تکثیر شد. بررسی‌ها نشان داد که در کشت سلول‌های تیمار شده با کلراید لیتیوم تعداد سلول‌های زنده بیش از تعداد آنها در کشت بدون حضور کلراید لیتیوم است. به علاوه نکته مهم آن بود که سلول‌های کشت تیمار شده با کلراید لیتیوم در برابر القای تجربی آپوپتوزیس مقاومت نشان دادند، به طوری که تعداد سلول‌های آپوپتوتیک در این نوع کشت‌ها به‌طور معنی‌داری کمتر از گروه کنترل بود. این نتایج نشان دهنده تاثیرات آنتی آپوپتوتیک کلراید لیتیوم بر کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی است. اهمیت این یافته به این است که در تحقیقات پیشین نشان داده شده است که به دنبال پیوند سلول‌های بنیادی مزانشیمی حدود ۷۰٪ سلول‌ها به دلیل آپوپتوزیس از بین می‌روند [۱۲]. بنابراین یافتن راه جلوگیری از آپوپتوزیس سلولی که موضوع مورد مطالعه تحقیق حاضر بود، امری ضروری به نظر می‌رسد.

در مطالعه‌ای، نوناکا (Nonaka) و همکاران نشان دادند که کلراید لیتیوم در مقابل تاثیرات آپوپتوتیک فنی‌توئین و کاربامازپین از سلول‌های گرانول مغزی موش صحرایی محافظت می‌کند. یافته‌های آنها نشان داد که این تاثیرات کلراید لیتیوم در غلظت‌های ۱ تا ۱۰ میلی‌مولار اتفاق می‌افتد [۲۲]. در تحقیق مشابهی، جوردا (Jorda) و همکاران دریافتند که کلراید لیتیوم قادر است از تاثیرات آپوپتوتیک کلسی‌سین در سلول‌های گرانول مغزی موش صحرایی ممانعت کند. یافته‌های این محققین نیز حاکی از این بود که کلراید لیتیوم در غلظت‌های ۱ تا ۵ میلی‌مولار این تاثیرات را دارد [۲۸]. با توجه به این مطالعات در تحقیق حاضر برخی غلظت‌های واقع در دامنه ۱ تا ۱۰ میلی‌مولار شامل غلظت‌های ۲، ۵ و ۱۰ میلی‌مولار انتخاب شد و تاثیرات آنتی آپوپتوتیک آنها مورد بررسی قرار گرفت. یافته‌ها نشان دهنده این بود که غلظت ۵ میلی‌مولار به‌طور معنی‌داری بیش از غلظت‌های ۲ و ۱۰ میلی‌مولار تاثیرات آنتی آپوپتوتیک دارد.

شاید علت تاثیرات آنتی آپوپتوتیک بیشتر غلظت ۵ میلی‌مولار کلراید لیتیوم، تداخل مسیرهای سیگنال دهی مختلف باشد. بدین معنی که احتمال دارد در غلظت‌های ۲ و ۱۰ میلی‌مولار کلراید لیتیوم، مسیرهای دیگری غیر از مسیر Wnt فعال شوند و تداخل آنها با مسیر Wnt سبب کاهش تاثیرات آنتی آپوپتوتیک گردد. توجه دیگری این است که شاید برای فعال شدن موثر مسیر Wnt، غلظت خاص و معینی از کلراید لیتیوم لازم است به طوری که غلظت‌های بالا و پایین این غلظت ویژه قادر نیستند مسیر

10- Hofstetter CP, Schwarz EJ, Hess D, Widenfalk J, El Manira A, Prockop DJ, et al. Marrow stromal cells form guiding strands in injured spinal cord and recovery. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002;99:2199-204.

11- Mahmood A, Lu D, Chopp M. Intravenous administration of marrow stromal cells (MSCs) increases the expression of growth factors in rat brain after traumatic brain injury. *J Neurotrauma*. 2004;21:33-9.

12- Mangi AA, Noiseux N, Kong D, He H, Rezvani M, Ingwall JS, et al. Mesenchymal stem cells modified with Akt prevent remodeling and restore of infarcted hearts. *Nature medicine*. 2003;9:1195-201.

13- Geng YJ. molecular mechanisms for cardiovascular stem cell apoptosis and growth in the hearts with atherosclerotic coronary disease and ischemic heart failure. *Ann N Y Acad Sci*. 2003;1010:687-97.

14- Zhang M, Method D, Poppa V, Fujio Y, Walsh K, Murry CE. Cardiomyocyte grafting for cardiac repair: graft cell death and anti-death strategies. *J MOL Cell Cardiol*. 2001;33:907-21.

15- Sartorius U, Schmitz I, Krammer PH. Molecular mechanisms of death-receptor-mediated apoptosis. *Chembiochem*. 2001;2:20-9.

16- Salvesen GS, Renatus M. Apoptosome: the seven-spoked death machine. *Dev Cell*. 2002;2:256-7.

17- Stefan H, Claire LK. Wnt signalling: variety at the core. *Journal of cell science*. 2007;120:385-93.

18- Stambolic V, Ruel L, Woodgett JR. Lithium inhibits glycogen synthase kinase-3 activity and mimics wingless signalling in intact cells. *Curr Bio*. 1996;6:1664-8.

19- Todd DG, Husseini KM. Glycogen synthase kinase-3: a putative molecular target for lithium mimetic drugs. *Neuropsychopharmacology*. 2005;30:1223-37.

20- Mora A, Sabio G, Gonzalez-Polo RA, Cuenda A, Alessi DR, Alonso JC, et al. Lithium inhibits caspase-3 activation and dephosphorylation of PKB and GSK3 induced by K<sup>+</sup> deprivation in cerebellar granule cells. *J Neurochem*. 2001;78:199-206.

21- Carmichael J, Sugars KL, Bao YP, Rubinsztein DC. Glycogen Synthase Kinase-3 $\beta$  Inhibitors Prevent Cellular Polyglutamine Toxicity Caused by the Huntington's Disease Mutation. *J Biol Chem*. 2002 Sep 13;277(37):33791-8.

22- Nonaka S, Katsube N, Chuang DM. Lithium protects rat cerebellar granule cells against apoptosis induced by anticonvulsants, phenytoin and carbamazepine. *J Pharm Exp Therap*. 1998;286:539-47.

23- Mao CD, Hoang P, DiCorleto PE. Lithium Inhibits Cell Cycle Progression and Induces Stabilization of p53 in Bovine Aortic Endothelial Cells. *J Biol Chem*. 2001;276:26180-8.

24- Sinha D, Wang Z, Ruchalski KL, Levine JS, Krishnan S, Lieberthal W, et al. Lithium activates the Wnt and phosphatidylinositol 3-kinase Akt signaling pathways to promote cell survival in the absence of soluble survival factors. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2005;288:F703-F713.

25- Kuemmerle JF. Endogenous IGF-1 protect human intestinal smooth muscle cells from apoptosis by regulation of GSK3 activity. *Am j Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2005;288:G101-G110.

26- Longo KA, Kennell JA, Ochociska Mj, Ross ES. Wnt signaling protects 3T3-L1 preadipocytes from apoptosis through induction of insulin-like growth factor. *J Biol Chem*. 2002;277:38239-44.

27- Jorda EG, Verdaguer E, Morano A, Jimenez A, Canudas AM, Camins A, et al. Lithium prevents colchicine-induced apoptosis in rat cerebellar granule neurons. *Bipolar Disorder*. 2004;6:144-9.

اگر چه تلاش‌های زیادی در جهت شناسایی مارکرهای سطحی سلول‌های بنیادی مزانشیمی انجام شده اما مارکر ویژه منفردی معرفی نشده است. در این ارتباط چندین مارکر از جمله (Low Affinity LNGFR, CD133 (Nerve Growth Factor Receptor و STRO-1) برای سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسانی پیشنهاد شده است ولی برای سلول‌های بنیادی مزانشیمی حیوانی مارکر اختصاصی ذکر نشده است [۳۶، ۳۸]. به همین دلیل در مطالعات پیشین از توان تمایز سلولی برای ارزیابی بنیادی مزانشیمی استفاده شده است [۳۳، ۴۱]. در این مطالعه نیز با تمایز سلول‌های جدا شده به رده‌های استخوان و چربی ماهیت بنیادی مزانشیمی آنها به اثبات رسید.

## نتیجه‌گیری

به نظر می‌رسد که لیتیوم به‌ویژه با غلظت ۵ میلی‌مولار، از سلول‌های بنیادی مزانشیمی در محیط کشت در مقابل آپوپتوزیس القایی به‌وسیله حذف سرم و افزودن TNF- $\alpha$  محافظت می‌کند. به‌علاوه، کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی تکثیرشده در حضور کلرید لیتیوم، بیش از گروه کنترل (فاقد کلرید لیتیوم) حاوی سلول‌های زنده است.

## منابع

1- Majumdar MK, Thiede MA, Mosa JD, Moorman M, Gerson SL. Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells. *J Cell Physiol*. 1998;176:57-66.

2- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999;248:143-7.

3- Friedenstein AJ, Deriglasova UF, Kulagina NN, Panasuk AF, Rudakowa SF, Luriá EA, et al. Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay methods. *Exp Hematol*. 1974;2: 83-92.

4- Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Latsinik NV, Panansyuk AF, Keiliss-Borok IV. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hematopoietic tissues, Cloning in vitro and retransplantation in vivo. *Transplantation*. 1974;17:331-40.

5- Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang G, Futrell JW, Katz AJ, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: Implication for cell-based therapies. *Tissue Eng*. 2001;7:211-28.

6- Campagnoli C, Roberts IA, Kumar S, Bennett PR, Bellantuono I, Fisk NM. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver and bone marrow. *Blood*. 2001;98:2396-402.

7- Pieternella S, Anker SA, Kleijburg-van der keur C, Noort WA, Class FH, Willemze R, et al. Amniotic fluid as a novel source of mesenchymal stem cells for therapeutic transplantation. *Blood*. 2003;102:1548-9.

8- Erices A, Conget P, Minguell JJ. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br J Haematol*. 2000;109:235-42.

9- Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for non-hematopoietic tissues. *Science*. 1997;276:711-74.



- phosphate/alginate/gelatin scaffolds. *J Tissue Eng Reg Med.* 2007; 6: 417-24.
- 36- Kuçi S, Wessels JT, Bühring HJ, Schilbach K, Schumm M, Seitz G, et al. Identification of a novel class of human adherent CD34- stem cells that give rise to SCID-repopulating cells. *Blood.* 2003;3:869-76.
- 37- Quirici N, Soligo D, Bossolasco P, Servida F, Lumini C, Delilieri GL. Isolation of bone marrow mesenchymal stem cells by anti-nerve growth factor receptor antibodies. *Exp Hematol.* 2002;7:783-91.
- 38- Gronthos S, Simmons PJ. The growth factor requirements of STRO-1-positive human bone marrow stromal precursors under serum-derived conditions in vitro. *Blood.* 1995;85:929-40.
- 39- Tropel P, Noel D, Platet N, Legrand P, Benabid AL, Berger F. Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from adult mouse bone marrow. *Exp Cell Res.* 2004;295:395-406.
- 40- Peister A, Mellad JA, Larsen LL, Hall BM, Gibson LF, Prockop DJ. Adult stem cells from bone marrow (MSCs) isolated from different strains of inbred mice vary in surface epitopes, rates of proliferation and differentiation potential. *Blood.* 2004;103:1662-8
- 41- Sun S, Guo Z, Xiao X, Liu B, Liu X, Tang PH, et al. Isolation of mouse marrow mesenchymal progenitors by a novel and reliable methods. *Stem cells.* 2003;21:527-35.
- 28- Lennon DP, Caplan AI. Isolation of rat marrow-derived mesenchymal stem cells. *Exp Hematol.* 2006;34:1606-7.
- 29- Wrobel K, Claudio E, Segade F, Ramos S, Lazo PS. Measurement of cytotoxicity by propidium iodide staining of target cell DNA. Application to the quantification of murine TNF-alpha. *J Immunol Methods.* 1996;89:243-9.
- 30- Zhu W, Chen J, Cong X, Hu S, Chen X. Hypoxia and serum deprivation-induced apoptosis in mesenchymal stem cells. *Stem Cells.* 2006;24:416-25.
- 31- Muscari C, Bonafé F, Stanic I, Flamigni F, Stefanelli C, Farruggia G, et al. Polyamine depletion reduces TNFalpha/MG132-induced apoptosis in bone marrow stromal cells. *Stem Cells.* 2005;23:983-91.
- 32- Ribble D, Goldstein NB, Norris DA, Shellman YG. A simple technique for quantifying apoptosis in 96-well plates. *BMC Biotechnol.* 2005;10:5-12.
- 33- Darzynkiewicz Z, Bruno S, Del Bino G, Gorczyca W, Hotz MA, Lassota P, et al. Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. *Cytometry* 1992;13:795-808.
- 34- Eslaminejad MB, Nikmahzar A, Thagiyar L, Nadri S, Massumi M. Murine mesenchymal stem cells isolated by low density primary culture system. *Develop Growth Diff.* 2006;48:361-70.
- 35- Eslaminejed MB, Mirzadeh H, Mohamadi Y, Nickmahzar A. Bone differentiation of the marrow-derived mesenchymal stem cells using tricalcium

## Protective role of lithium chloride against induced apoptosis in mesenchymal stem cells derived from rat marrow at the culture

Eslaminejad M. R. B. <sup>\*</sup>, Talkhabi M. <sup>1</sup>, Zeynali B. <sup>1</sup>, Eftekhari P. Y. <sup>2</sup>

### Abstract

**AIMS.** The objective of this study is to examine the protective effects of lithium chloride against induced apoptosis in rat Mesenchymal Stem Cells (MSCs) culture.

**METHODS.** In this experimental study, rat bone marrow cells were plated in 2, 5 and 10 mM of lithium chloride and expanded for three successive subcultures. At the end of cultivation period, the number of viable cells in treatment groups and control (without lithium chloride) was determined and compared using propidium Iodide (PI) staining. Furthermore, at passaged-3 cultures, the cells were induced by serum deprivation and TNF $\alpha$  addition and concomitantly treated by the mentioned concentration of lithium chloride. At 24, 48 and 72 hours after apoptosis induction, the cultures were stained with Acridine Orange and Ethidium Bromide.

**RESULTS.** Flowcytometric distribution of dead and living cells after PI staining indicated that treatment of cells with varying concentration of Lithium cause the increase in number of viable cells compared to that of control. In this term, the highest number of viable cells belongs to culture with 6 mM Lithium chloride ( $p < 0.05$ ). Percentages of apoptotic cells for control, 2, 5 and 10 mM lithium were respectively, 19.34, 13.55, 5.75 and 10.31 after 24h that increased by time advancement (48 and 72 hours), cause more differences. In this regards, the least percentages belongs to culture with 5 mM of lithium ( $p < 0.001$ ).

**CONCLUSION.** Lithium chloride, especially at 5 mM concentration, can decrease the amount of apoptotic cells at MSCs cultures that are induced to undergo apoptosis.

**KEYWORDS:** Rat Mesenchymal Stem Cells, Apoptosis, Serum Deprivation, TNF- $\alpha$

---

Submission Date:

Revision Date:

Acceptation Date:

\* Correspondence address: Department of Stem Cells, Cell Sciences Research Center, Royan Institute, Tehran, Iran  
eslami@royaninstitute.org

<sup>1</sup> College of Biology, Faculty of Sciences, Tehran University, Tehran, Iran

<sup>2</sup> Department of Embryology, Medical Research Center of Reproduction, Royan Institute, Tehran, Iran