Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 14:21 +0430 on Sunday April 8th 2018

Arak Medical University Journal (AMUJ) *Original Article*
2018; 21(130): 40-51

Evaluation of the Effects of Different Concentrations All-trans Retinoic Acid on the Survival of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells

Maryam Salem[1], Abolfazl Bayrami[2*], Tooba Mirzapour[3], Mohsen Sagha[4]

1. MS.c of Animal Physiology, Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran
2. Assistant Professor, Ph.D. in Animal Systematic, Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran
3. Assistant Professor, Ph.D. in Animal Development, Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran
4. Associate Professor, Ph.D. in Anatomy, Department of Anatomical Sciences, Faculty of Medicine, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran

Received: 9 Jan 2018, Accepted: 26 Feb 2018

Abstract

Background: According to application of Retinoic acid in differentiation of the stem cells to different cells and its role in apoptotic of cancer cells, the selection of appropriate dose for differentiation of stem cells is important. Thus in this study the effects of Retinoic acid in different concentrations on viability stem cells to select the appropriate dose for differentiation was investigated.

Materials and Methods: In this study, bone marrow mesenchymal stem cells were affected by different concentrations of Retinoic acid. Survival of cells was investigated after 3, 10 and 15 days of culture by MTT assay. DAPI staining was used to evaluate the number of apoplectic nuclei in treated cells after 10 and 15 days.

Results: After three days of culture, the results showed that a large number of cells are destroyed at concentrations of 10^{-4}, 10^{-3} and 10^{-2}M of Retinoic acid, while in 10^{-5} and 10^{-6} M of Retinoic acid, it is not observed many apoptosis. Amount of 10^{-5}M Retinoic acid after 10 days showed significant apoptosis, while the concentration of 10^{-6} M Retinoic acid after 15 days showed significant apoptosis compared to the control group ($p<0.05$).

Conclusion: It looks that 10^{-6} M Retinoic acid is an appropriate concentration for differentiation of mesenchymal stem cells.

Keywords: Apoptosis, Bone marrow mesenchymal stem cell, Retinoic acid

*Corresponding Author:
Address: Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran
Email: abolfazlbayrami@gmail.com

Archive of SID

www.SID.ir

مقاله پژوهشی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک

سال ۲۱، شماره ۱ (شماره پیاپی ۱۳۰)، فروردین۱۳۹۷، ۵۱-۴۰

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 14:21 +0430 on Sunday April 8th 2018

بررسی تأثیرات غلظت‌های مختلف رتینوئیک اسید بر روی بقای سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان

مریم سالم[۱]، ابوالفضل بایرامی[۲*]، طوبی میرزاپور[۳]، محسن سقا[۴]

۱.کارشناس ارشد فیزیولوژی جانوری، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

۲.استادیار، دکتری سیستماتیک جانوری، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

۳. استادیار، دکتری تکوین، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

۴. دانشیار، دکتری علوم تشریح، گروه علوم تشریحی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران

تاریخ دریافت: ۹۶/۱۰/۱۹، تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۲/۷

چکیده

زمینه و هدف: با توجه به اهمیت رتینوئیک اسید در تمایز سلول‌های بنیادی به رده‌های مختلف سلولی و نقش آن در آپوپتوز سلول‌های سرطانی، تعیین دوز مناسب برای تمایز سلول‌های بنیادی ضروری است. بنابراین در این مطالعه، اثرات غلظت‌های مختلف رتینوئیک اسید بر حیات سلول‌های بنیادی بررسی شد تا دوز مناسب جهت تمایز انتخاب شود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه، سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان تحت تاثیر غلظت های مختلف رتینوئیک اسید قرار گرفتند. بقای سلول‌ها پس از گذشت ۳، ۱۰و ۱۵ روز از کشت با تست MTT بررسی شده و جهت بررسی تعداد هسته‌های آپوپتیک در سلول‌های تیمار شده پس از گذشت ۱۰ و ۱۵ روز از رنگ‌آمیزی DAPI استفاده شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که پس از گذشت ۳ روز از کشت، غلظت‌های 10^{-2} ، 10^{-3} و 10^{-4} مولار رتینوئیک اسید جمعیت تعداد زیادی از سلول‌ها را از بین می‌برد، در حالی که غلظت‌های 10^{-5} و 10^{-6} مولار رتینوئیک اسید آپوپتوز چندانی نشان نمی‌دهد. غلظت 10^{-5} مولار رتینوئیک اسید بعد از ۱۰ روز آپوپتوز معنی‌داری رانشان داد، در حالی که غلظت10^{-6} مولار رتینوئیک اسید بعد از ۱۵ روز آپوپتوز معنی‌داری نسبت به گروه کنترل نشان داد($p<0/05$).

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد که غلظت 10^{-6} مولار رتینوئیک اسید، غلظت مناسبی برای تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی باشد.

واژگان کلیدی: سلول بنیادی مزانشیمی مغز استخوان، رتینوئیک اسید، آپوپتوز

***نویسنده مسئول:** ایران، اردبیل، دانشگاه محقق اردبیلی، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی

Email: abolfazlbayrami@gmail.com

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 14:21 +0430 on Sunday April 8th 2018

مقدمه

سلول بنیادی نوعی سلول تمایزنیافته در بین سلول‌های تخصص‌یافته‌ی یک بافت یا ارگان است و این توانایی را در تمامی طول عمر خود حفظ می‌کند(۱). سلول‌های بنیادی منشأ انواع سلول‌ها در بدن بوده و دارای دو ویژگی مهم پرتوانی (تبدیل به انواع سلول‌ها) و خودنوسازی (تبدیل به سلول تمایزنیافته مشابه خود) می‌باشند(۲). توانایی تمایز سلول‌ها به انواع دیگر سلول‌ها را پتاسیل تمایزی می‌گویند. سلول‌های بنیادی بر اساس توان تمایزی به دیگر سلول‌ها به انواع سلول‌های همه‌توان، چندتوان وپرتوان تقسیم می‌شوند(۳). هم‌چنین سلول‌های بنیادی بر اساس منشا به دوصورت جنینی و بالغ هستند. سلول‌های بنیادی بالغ سلول‌هایی هستند که از بافت‌های بالغ به دست می‌آیند. این سلول‌ها در بسیاری از بافت‌ها و اندام‌ها شامل مغز، مغز استخوان، ماهیچه اسکلتی، شبکیه، قرنیه چشم، پالپ دندان و غیره وجود دارند(۲). پتانسیل تمایزی آن‌ها نسبت به پتانسیل تمایزی سلول‌های بنیادی جنینی محدود می‌باشد. برای تولید سلول‌های بنیادی بالغ همانند سلول‌های بنیادی جنینی نیازی به تخریب بافت نیست. از طرفی سلول‌های بنیادی بالغ را می توان از خود فرد تحت درمان نیز جداسازی کرد. در این حالت پیوند به صورت اتوگرافت بوده و خطر رد پیوند کاهش می‌یابد(۴). سلول‌های بنیادی می‌توانند به صورت مزانشیمی یا غیر مزانشیمی باشند. سلول‌های مزانشیمی در حقیقت سلول‌هایی هستند که دارای سه ویژگی می‌باشند: اول، در شرایط کشت معمولی در ظروف کشت پلاستیکی به کف ظرف می چسبند. دوم، شاخص‌های سطحی CD90، CD73 وCD105 را بیان می‌کنند و نسبت به بیان شاخص‌های هماتوپویتیک مثل CD79، CD19، CD45، CD34، CD14 و CD11b منفی می‌باشند. سوم، توانایی تمایز به سلول‌های چربی، غضروف و استخوان را در شرایط آزمایشگاهی دارند(۵).

سلول‌های بنیادی مزانشیمی اولین بار در سال ۱۹۷۶ توسط فردنشتاین کشف شد. هر چند که این سلول‌ها معمولاً از مغز استخوان استخراج می‌شوند، اما در سایر بافت‌ها مثل چربی، غشاء سینوویال، مایع‌سینوویال، ماهیچه اسکلتی، پوست، خون بند ناف، جفت، کبد، طحال و تیموس نیز یافت می گردند(۶). از آن‌جایی که سلول‌های بنیادی مغز استخوان در تماس مستقیم با خون محیطی هستند و هم‌چنین پتانسیل تمایز و توان تکثیر برای مدت طولانی را دارا می‌باشند، باعث شده است که این سلول بنیادی یک انتخاب مناسب برای بررسی اثرات مواد مختلف بر روی آن‌ها باشد. از طرفی پیوند اتوگرافت سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان، باعث شده خطرات رد پیوند کمتری نسبت به بافت‌های جنینی داشته باشد. بنابراین می‌توان از این بافت در موارد پیوند به بافت‌های مختلف بدن استفاده کرد(۷). سلول‌های بنیادی مزانشیمی به دلیل دارا بودن خاصیت خودتجدیدی و توان تمایز به بافت‌های مختلف منبع مناسبی برای درمان تعدادی از بیماری‌ها تلقی می‌شوند. کارآیی این سلول‌ها در درمان بیماری‌های ژنتیکی و بهبود خون‌سازی، بیماران سرطانی تحت درمان، بازسازی استخوان، ترمیم بافت نکروز شده، بیماران انفارکتوس قلبی و درمان بیماری‌های مفصلی به خوبی نشان داده شده است(۸). گزارشات متعددی در زمینه توان تمایز سلول‌های بنیادی به انواع مختلف سلول‌های تمایز یافته مانند پیش‌سازهای عصبی، آدیپوسیت‌ها و سلول‌های مشابه اسپرم وجود دارد که با به کارگیری فاکتورهای تمایزی مناسب مانند رتینوئیک اسید صورت می گیرد(۹).

ویتامین A (رتینول) شامل گروهی از مواد شیمیایی است که در شرایط طبیعی در لومن روده هیدرولیز و پس از جذب توسط شیلو میکرون وارد جریان خون می‌شود و در اثر اکسیداسیون در روده به رتینوئیک اسید تبدیل می‌شود. رتینوئیک اسید مولکول لیپوفیلیکی کوچکی است که در تکامل اندام‌های گوناگون بینایی، اسکلت، سیستم عصبی، روده و تکوین جنینی نقش دارند. RA وارد هسته شده و از

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 14:21 +0430 on Sunday April 8th 2018

طریق رسپتورهای هسته‌ای به طور مستقیم در بیان ژن‌ها نقش دارند(۱۰). عملکرد رتینوئیک اسید از طریق دو خانواده از رسپتورهای RAR (Retinoic Acid Receptore) که همه‌ی ترانس رتینوئیک‌اسیدها را شناسایی می‌کند و RXRs (Rrtinoic Acid X Receptore) که فقط ۹-سیس رتینوئیک‌اسیدها را شناسایی می‌کنند صورت می‌گیرد، به طوری که هر خانواده از رسپتورها نیز شامل نوع α، β و γ می‌باشند(۱۱). تحقیقات مختلف نشان دادند که رتینوئیک اسید باعث القای تمایز و آپوپتوز در سلول‌های نرمال و سرطانی می‌شود(۱۲). از طرفی، تعیین غلظت و زمان مناسب برای تمایز سلول‌های بنیادی می‌تواند باعث کاهش درصد سلول‌های آپوپتیک باشد. در اغلب تحقیقات، بررسی تاثیر غلظت‌های مختلف رتینوئیک اسید بر حیات سلول‌های بنیادی در مدت زمان کمتری بررسی شده است، در صورتی که سلول های بنیادی با تیمار طولانی مدتی با رتینوئیک اسید به سلول‌های مختلف تمایز می‌یابند. از آن‌جا که در اغلب تحقیقات مدت زمان تیمار با رتینوئیک اسید برای تمایز سلولی ۱۰ و ۱۵ روز است، بنابراین در مطالعه ما تاثیر رتینوئیک اسید بر حیات سلول‌های بنیادی مزانشیمی بعد از ۳، ۱۰ و ۱۵ روز بررسی شد. تاثیر غلظت‌های مختلف رتینوئیک اسید بر حیات سلول‌های بنیادی در مطالعات مختلف بررسی شده است. کاروالهو و همکاران با بررسی حیات سلول‌های بنیادی مغز استخوان بعد از ۷۲ ساعت از تیمار، نشان دادند که حیات سلول‌های بنیادی در غلظت‌های ۰/۵ و ۵ میکرو مولار رتینوئیک اسید تغییری نمی‌کند، در حالی که در غلظت ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار به طور معنی‌داری کاهش می‌یابند(۱۳). تحقیقات دیگری که بر روی حیات سلول‌های بنیادی فولیکول موی موش سوری تحت تاثیر رتینوئیک اسید انجام شد، نشان داد که غلظت‌های بالاتر از ۱۰ میکرومولار رتینوئیک اسید باعث مرگ آپوپتوز یا نکروز این سلول‌ها می‌شود(۱۴). وی و همکاران نیز با تیمار سلول‌های بنیادی مزانشیمی بندناف با غلظت‌های مختلف رتینوئیک اسید به مدت ۲۴ ساعت نشان دادند که دوزهای ۰/۲۵ و ۰/۵ میکرومولار چندان تاثیری درآپوپتوز سلول‌ها ندارد، اما دوز ۱، ۲ و ۴ میکرومولار باعث آپوپتوز سلول ها نسبت به گروه کنترل می‌شود(۱۵). هدف از این مطالعه نیز بررسی تاثیر غلظت‌های مختلف رتینوئیک اسید بر روی بقای سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان پس از گذشت ۳، ۱۰ و ۱۵ روز از کشت می‌باشد.

مواد و روش‌ها

حیوانات

این مطالعه از نوع تجربی بوده و در سال ۱۳۹۴ در آزمایشگاه تحقیقاتی جنین شناسی و سلول‌های بنیادی علوم پزشکی اردبیل انجام شد. در این مطالعه برای استخراج سلول‌های بنیادی مغز استخوان از موش‌های صحرایی نژاد ویستار استفاده شد. در کار با حیوانات، موازین اخلاقی بر اساس پروتکل دانشگاه علوم پزشکی اردبیل رعایت گردید و موش‌ها در قفس‌های استاندارد نگهداری شدند. اتاق نگهداری دارای شرایط نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد بود.

استخراج سلول‌های بنیادی مغز استخوان

موش صحرایی نژاد ویستار به تعداد یک عدد به کمک کلروفرم بیهوش شد. با احتیاط پوست پاها کاملاً جدا گردید و بافت و ماهیچه‌های اطراف ران و درشت‌نی حذف شدند، به طوری که استخوان‌ها نمایان گردیدند. سپس استخوان‌های فمور ران و تیبیای درشت نی جدا شدند و بعد با PBS شستشو شدند. موش پس از نمونه برداری حذف شد. در زیر هود یک سر استخوان ران و ساق درشت نی پا با قیچی استریل قطع شدند و با سرنگ حاوی محیط کشت DMEM (Biowest) که حاوی۲۰ درصد سرم جنین گاوی FBS (Biowest) و ۱ درصد پنی سیلین استرپتومایسین (Biowest) بود، سلول‌های بنیادی از مغز استخوان به آرامی بیرون کشیده شدند. سپس محتویات سرنگ داخل فالکون ریخته شده و سانتریفوژ گردید. به

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 14:21 +0430 on Sunday April 8th 2018

رسوب سلولی ۴ میلی لیتر محیط کشت اضافه شده و در نهایت به فلاسک ۲۵ میلی‌لیتر تخلیه شدند. بعد از ۴۸ ساعت از کشت، تعویض محیط صورت گرفت. محیط رویی فلاسک خارج شده و سلول‌های چسبیده به کف ظرف با PBS شستشو داده شدند و سپس محیط کشت جدید به سلول‌ها اضافه گردید. زمانی که سلول‌ها تقریباً ۸۰ درصد فلاسک را پر کردند به داخل فلاسک‌های جدید پاساژ داده شدند. برای این کار محیط کشت فلاسک به طور کامل خارج شده و با PBS شستشو داده شد. به هر فلاسک ۲۵ سانتی‌متری، ۵۰۰ میکرولیتر تریپسین ۲۵ درصد 1X اضافه شده و به مدت ۳ دقیقه در داخل انکوباتور قرار داده شدند. سپس سلول‌ها با پیپت پاستور به آرامی از فلاسک خارج شده و به یک لوله فالکون استریل منتقل شدند. سلول‌ها به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۸۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس محلول رویی خارج شده و به رسوب سلولی چند میلی لیتر محیط کشت (بسته به تعداد سلول‌ها) اضافه شد تا مخلوط به صورت سوسپانسیون تک سلولی درآید. سپس سوسپاسیون سلولی به دو یا چند فلاسک منتقل گردید.

گروه بندی

در این مطالعه از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان که در مرحله پاساژ سوم بودند استفاده شد. پس از آن‌که تراکم آن‌ها در محیط کشت به طور تقریبی به ۸۰ درصد رسید، پلیت حاوی سلول‌ها با استفاده از تریپسین - EDTA تریپسینه شد. با استفاده از لام هموسایتومتر شمارش سلولی انجام شد. برای کنترل سلامت و زنده بودن سلول‌ها، از تریپان بلو به نسبت ۱:۱ برای شمارش استفاده شد. بدین منظور ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی با۱۰ میکرولیتر از محلول تریپان بلو مخلوط شد و به مدت ۵ دقیقه در یخچال قرار گرفت. یک قطره از سوسپانسیون بر روی صفحه مشبک لام هموسایتومتر قرار داده شد. پس از شمارش سلولی و تعیین درصد سلول‌های زنده، سلول‌ها به طور یکنواخت با غلظت ۷×۱۰^{-۴} در خانه‌های یک پلیت شش خانه توزیع شدند و در حضور DMEM و ۱۵ درصد سرم جنین گاوی کشت شدند. دو روز پس از چسبیدن سلول‌ها به کف پلیت، محیط کشت خارج شد و بر اساس گروه‌بندی ذکر شده در پایین محیط کشت‌های جدید اضافه شد.

گروه اول: سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان در حضور محیط کشت DMEM به همراه ۹ درصد سرم جنین گاوی (FBS) و ۱ درصد آنتی‌بیوتیک (گروه کنترل)

گروه دوم: سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان در حضور محیط کشت DMEM به همراه ۹ درصد سرم جنین گاوی (FBS) و ۱ درصد آنتی بیوتیک و ایجاد پنج زیر گروه با غلظت‌های مختلف رتینوئیک اسید ($۱۰^{-۲}$، $۱۰^{-۳}$، $۱۰^{-۴}$، $۱۰^{-۵}$، $۱۰^{-۶}$مولار)

هر سه روز یکبار محیط کشت سلول‌ها با محیط جدید تعویض شده و حیات سلول‌های پنج گروه تیمار شده با غلظت‌های مختلف رتینوئیک اسید ($۱۰^{-۲}$، $۱۰^{-۳}$، $۱۰^{-۴}$، $۱۰^{-۵}$، $۱۰^{-۶}$مولار) و گروه کنترل بعد از ۳ روز، دو گروه تیمار شده با غلظت $۱۰^{-۵}$، $۱۰^{-۶}$مولار رتینوئیک اسید و گروه کنترل بعد از ۱۰ روز و گروه تیمار با غلظت $۱۰^{-۶}$ مولار رتینوئیک اسید و گروه کنترل بعد از ۱۵ روز با استفاده از تست MTT (SiGma-ALDRich) بررسی شد.

مراحل انجام روش سنجش MTT به این ترتیب است که ابتدا سلول‌های پاساژ سوم مغز استخوان توسط محلول حاوی Trypsin (EDTA1X) از کف فلاسک جدا شده و با PBS شستشو و به تعداد ۱۰۰۰ سلول در داخل پلیت ۹۶ خانه کشت داده شد. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند تا سلول‌ها به کف بچسبند. سپس یک ردیف از پلیت ۹۶ خانه به عنوان بلانک و ردیف‌های بعدی به عنوان گروه کنترل و گروه‌های تحت تیمار بودند. بعد از سپری شدن زمان تیمار به هر چاهک مقدار ۲۰۰ میکرو لیتر محیط کشت اضافه شده و به مدت ۲۴ ساعت انکوبه گردید. در مرحله بعد، به هر چاهک، ۱۸۰ میکرولیتر محیط کشت کامل به همراه ۲۰ مکرولیتر محلول غلیظ MTT اضافه شد و به مدت ۴ ساعت

Archive of SID
www.SID.ir

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 14:21 +0430 on Sunday April 8th 2018

انکوبه گردید. در نهایت پس از چهار ساعت، محیط کشت هر چاهک تخلیه و برای انحلال رنگ ایجاد شده در هر چاهک ۲۰۰ میکرولیتر DMSO اضافه و پلیت‌ها به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه شیکر شدند و جذب سلول‌ها در طول موج ۵۷۰ توسط الایزا ریدر اندازه گیری شد.

مورفولوژی هسته و سیتوپلاسم جهت تعیین آسیب DNA در پایان روزهای ۱۰ و ۱۵ کشت با انجام رنگ‌آمیزی DAPI (SiGma-9542) بررسی شد. رنگ آمیزی سلول‌ها با رنگ DAPI یکی از روش‌های معمول برای بررسی وضعیت هسته در آن‌ها می‌باشد. این رنگ با اتصال به نواحی غنی از نوکلئوتیدهای A و T در DNA، رنگ آبی فلورسنس منعکس می‌کند. هسته‌هایی با رنگ براق وروشن اشاره به سلول‌های مرده دارد. جهت رنگ‌آمیزی با DAPI ابتدا پلیت‌های ۱۲ خانه‌ای حاوی سلول به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شدند. سپس محیط کشت سلول‌ها برداشته شده و سلول‌ها با PBS شستشو یافتند و با پارافرمالدهید ۴ درصد به مدت ۱۰ تا ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد ثابت شدند. سپس پارافرمالدهید خارج شد، سلول‌ها با PBS شستشو شدند و رنگ DAPI (۱۰ واحدگرم بر میلی‌لیتر) به آن‌ها افزوده گردید و در این حالت به مدت ۳ دقیقه در محیط تاریک قرار گرفتند و بعد DAPI خارج شده و با PBS شستشو شد. در ادامه به منظور شمارش هسته‌های آپوپتیک با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت (OLYMPUS 1X71) از سلول‌های هر چاهک در ۱۵ میدان دید با بزرگنمایی X ۲۰ عکس گرفته شد و میانگین تعداد هسته‌های آپوپتیک به صورت درصد از تعداد کل هسته‌های رنگ‌گرفته گزارش شد.

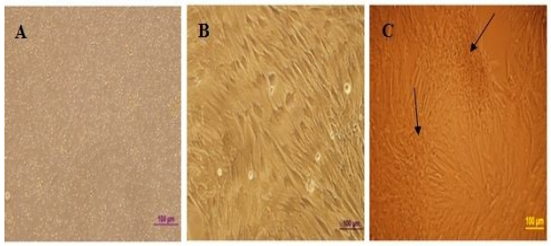
تحلیل آماری

تمامی اطلاعات کمی در این پژوهش به شکل میانگین ± انحراف معیار ارائه و به کمک تست آماری آنووای یک طرفه تجزیه و تحلیل شدند. سطح معنی‌داری در مقایسه بین گروه‌ها $p<۰/۰۵$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

کشت سلول‌های بنیادی مغز استخوان

سلول‌های استخراج شده از مغز استخوان نیز در کشت اولیه به شکل گروه‌های سلولی ناهمگن و هتروژن به همراه لخته‌های خونی مشاهده شدند(شکل A۱). طی تعویض محیط کشت و در پاساژهای بعدی، سلول‌ها تقریباً کنفورماسیون یکنواختی پیدا کرده و به شکل دوکی و کشیده ظاهر شدند(شکل B۱). در واقع تعویض پی در پی محیط کشت مانع از چسبیدن سلول‌های غیر مزانشیمی و خونی به کف فلاسک کشت می‌شود. سلول‌هایی که به کف فلاسک چسبیدند به تدریج کلونی‌هایی با اندازه‌های مختلف در محیط کشت ظاهر کردند (شکل C۱).



شکل ۱. کشت سلول‌های بنیادی مغز استخوان. A: روز دوم B: روز هشتم C: روز دهم (کلنی‌ها با پیکان مشخص شده است. درشت نمایی×۱۰۰).

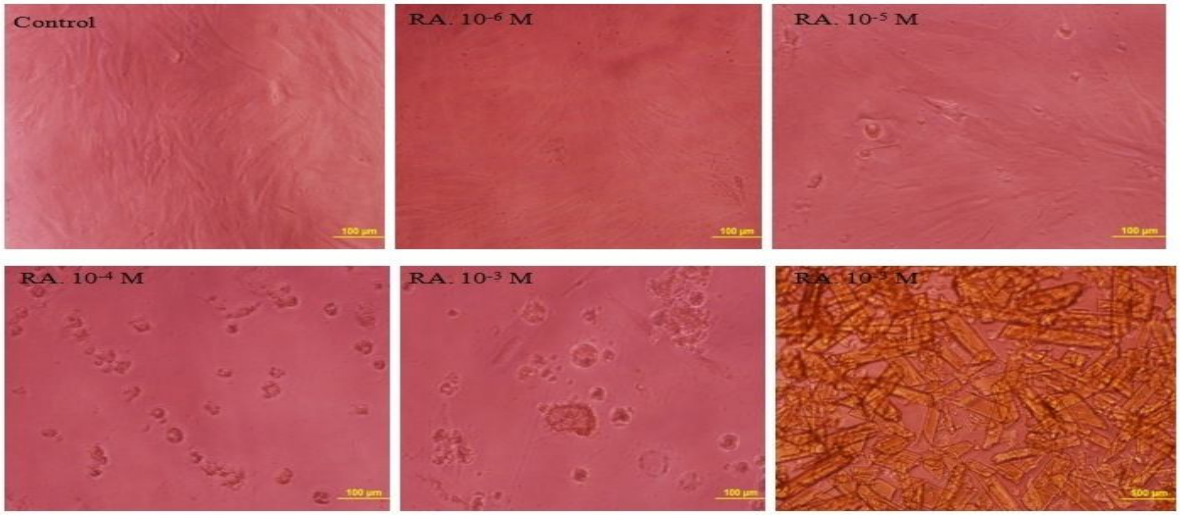
پس از ۳ روز از تیمارسلول‌های بنیادی مزانشیمی با غلظت‌های مختلف رتینوئیک اسید تیمار شدند. سپس نتایج حاصل از انجام تست MTT پس از سه روز از تیمار نشان داد که غلظت های $۱۰^{-۴}$ و $۱۰^{-۳}$و $۱۰^{-۲}$ مولار رتینوئیک اسید جمعیت زیادی از سلول‌ها را ازبین می برد (شکل ۲). به طوری که درصد حیات سلول‌ها در گروه‌های تیمار شده با غلظت‌های $۱۰^{-۴}$ و $۱۰^{-۳}$و $۱۰^{-۲}$ مولار رتینوئیک اسید به ترتیب ۷/۵±۳۷، ۱±۲۱ و ۱±۱۰ بودند که با گروه کنترل اختلاف آماری معنی‌داری را نشان می‌دهند($p<۰/۰۵$).

در سلول‌های تیمار شده با غلظت‌های $۱۰^{-۵}$ و $۱۰^{-۶}$ مولار رتینوئیک اسید آپوپتوز چندانی مشاهده نشد(نمودار۱).

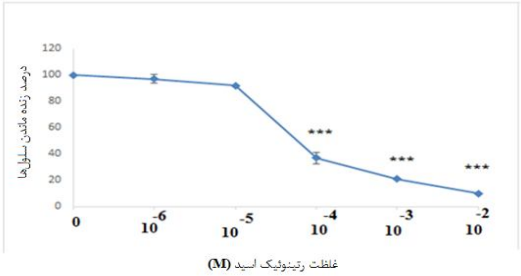
Archive of SID
www.SID.ir

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 14:21 +0430 on Sunday April 8th 2018

بنابراین کشت سلول‌ها در حضور دوزهای 10^{-5} و 10^{-6} رتینوئیک اسید برای ۷ روز دیگر ادامه یافت تا پس از گذشت ۱۰ روز تاثیر این دوزها بر روی بقای سلول‌ها سنجیده شود.



شکل۲. تغییرات مورفولوژی پس از تاثیر دوزهای مختلف رتینوئیک اسید بر بقا سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان پس ار گذشت ۳ روز از کشت(درشت نمایی ×۱۰۰).



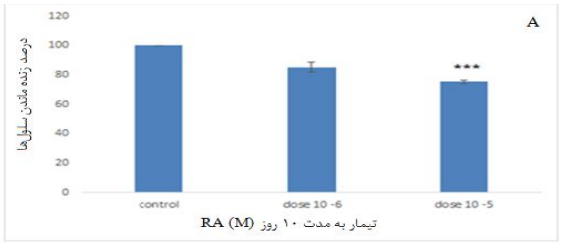
نمودار۱. بررسی درصد حیات سلول‌ها در سلول‌های بنیادی مزانشیمی تیمار شده با غلظت‌های مختلف رتینوئیک اسید پس از گذشت ۳ روز از تیمار

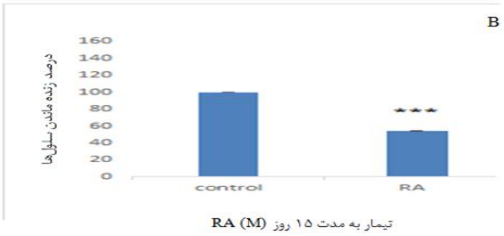
در مرحله اول سلول‌های بنیادی مزانشیمی به مدت ۱۰ روز تحت تیمار با غلظت‌های 10^{-5} و 10^{-6} مولار رتینوئیک اسید قرار گرفتند. نتایج حاصل نشان داد پس از ۱۰ روز از تیمار سلول‌ها با غلظت 10^{-5} مولار رتینوئیک اسید، حیات سلول‌ها کاهش یافت که با درصد حیات ۱/۷± ۷۵ اختلاف آماری معنی‌داری را با گروه کنترل نشان داد($p<0/05$). در حالی که غلظت 10^{-6} مولار رتینوئیک اسید با درصد حیات ۶/۰ ± ۸۵ تاثیر زیادی بر آپوپتوز سلول‌های بنیادی نداشت و اختلاف معنی‌داری را با گروه کنترل نشان نداد (نمودار ۲).

بعد از این‌که معنی دار بودن کاهش سلول ها با غلظت ۵ تا ۱۰ مولار رتینوئیک اسید بعد از گذشت ۱۰ روز از کشت مشخص شد، در مرحله بعد سلول‌های بنیادی مزانشیمی به مدت ۱۵ روز تحت تیمار با غلظت 10^{-6} مولار رتینوئیک اسید قرار گرفتند. نتایج حاصل نشان داد که پس از گذشت ۱۵ روز از تیمار، سلول‌های بیشتری با غلظت 10^{-6} مولار رتینوئیک دچار آپوپتوز شدند و با درصد حیات ۳/۰۵ ± ۵۱ اختلاف آماری معنی‌داری را با گروه کنترل نشان دادند ($p<0/05$). بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که غلظت‌های کم رتینوئیک اسید(10^{-6} مولار) با افزایش زمان تیمار به مدت ۱۵ روز، باعث آپوپتوز سلول‌های بنیادی مزانشیمی می‌شود، در حالی که بعد از گذشت ۳ روز از تیمار چندان تغییری در کاهش سلول‌ها نسبت به گروه کنترل مشاهده نمی‌شود (نمودار ۲).

Archive of SID
www.SID.ir

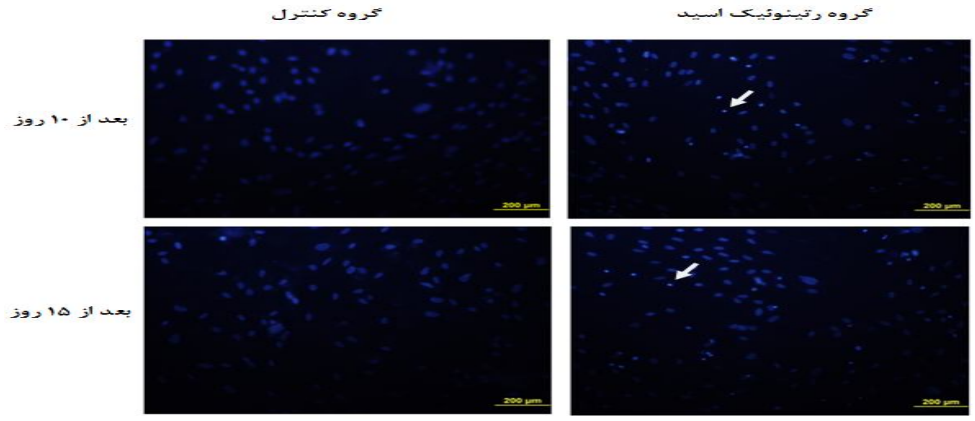
Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 14:21 +0430 on Sunday April 8th 2018





نمودار ۲. بررسی درصد حیات سلول‌های بنیادی مزانشیمی تیمار شده با رتینوئیک اسید، A: تیمار با غلظت 10^{-5} و 10^{-6} مولار رتینوئیک اسید به مدت ۱۰ روز، B: تیمار با غلظت 10^{-6} به مدت ۱۵ روز.

برای بررسی هسته و سیتوپلاسم سلول‌ها در دو گروه تیمار شده با 10^{-6} مولار رتینوئیک اسید و گروه کنترل پس از گذشت ۱۰ و ۱۵ روز از کشت، از رنگ‌آمیزی DAPI استفاده شد. هسته‌های روشن و براق نشان دهنده سلول‌های مرده در رنگ آمیزی DAPI می‌باشد. با توجه به شکل ۳ تعداد این نوع هسته‌ها در گروه رتینوئیک اسید (RA) بیشتر از گروه کنترل مشاهده شد. پس از گذشت ۱۰ و ۱۵ روز درصد سلول‌های آپوپتیک در گروه تیمار شده با غلظت 10^{-6} مولار رتینوئیک اسید به ترتیب ۷/۹ ± ۱۴/۲۹ و ۷/۹ ± ۱۷/۴۶ بودند که در مقایسه با گروه کنترل بیشتر بود، اما این اختلاف به صورت معنی دار مشاهده نشد.



شکل۳: مقایسه میزان آپوپتوز در گروه‌های تیمار شده با غلظت رتینوئیک اسید و کنترل پس از گذشت ۱۰ و ۱۵ روز از تیمار با استفاده از رنگ آمیزی DAPI (درشت نمایی ×۲۰۰)

بحث

در این مطالعه، مرگ سلولی ناشی از غلظت‌های مختلف رتینوئیک اسید در زمان‌های مختلف روی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان بررسی شد. مطالعه‌ی ما نشان داد که اثرات رتینوئیک اسید روی سلول‌های بنیادی مغز استخوان وابسته به غلظت و زمان است و با افزایش غلظت و زمان رشد سلول‌های بنیادی مهار شده و دچار آپوپتوز می‌شوند. در این مطالعه، سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان، مشابه روش فردنشتاین با استفاده از خاصیت چسبندگی سلول‌ها استخراج شد(۱۶). سپس دوزهای مختلف رتینوئیک اسید (10^{-2}، 10^{-3}، 10^{-4}، 10^{-5}، 10^{-6}مولار) بر روی سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان تاثیر داده شد. نتایج نشان داد غلظت‌های 10^{-4}، 10^{-3}، 10^{-2}مولار رتینوئیک اسید پس از ۳ روز از کشت باعث کاهش حیات سلول‌های بنیادی مزانشیمی

www.SID.ir

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 14:21 +0430 on Sunday April 8th 2018

شده و مرگ سلولی را افزایش می‌دهد. در صورتی که غلظت‌های 10^{-5}، 10^{-6}مولار چندان تاثیری در کاهش حیات سلول‌ها نشان ندادند. بر اساس نتایج مطالعات گذشته به نظر می‌رسد که رتینوئیک اسید با کاهش سطح بیان تنظیم-کننده‌های چرخه سلولی مانند cdk2، cyclinE، cyclin A و القای بیان ژن‌های ضد تکثیری مانند p27Kip1 و p16INK4A رشد سلولی را مهار کرده و عبور از مرحله ی G1 به S چرخه سلولی را متوقف می کند(۱۷). تحقیقات مختلف نشان داده است که تاثیررتینوئیک اسید در سلول‌های مختلف سرطانی و در انواع سلول‌های بنیادی مزانشیمی متفاوت است.

اولین گروه از تحقیقات نشان داده است که غلظت‌های مختلف رتینوئیک اسید باعث آپوپتوز سلول‌های بنیادی جنینی یا مزانشیمی می‌شوند(۱۸). علیرغم این‌که وی و همکاران با تیمار سلول‌های بنیادی مزانشیمی بندناف با غلظت های مختلف (صفر، ۱، ۲، ۴، ۰/۵ و ۵/۲۵ میکرومولار) رتینوئیک اسید به مدت ۲۴ ساعت نشان دادند که دوزهای ۰/۲۵و۰/۵ میکرومولار چندان تاثیری درکاهش حیات سلول‌ها ندارد، اما دوز ۱، ۲ و ۴ میکرومولار باعث کاهش معنی‌دار حیات سلول ها نسبت به گروه کنترل می‌شود. بدین صورت دوز ۰/۵ میکرومولار را به عنوان دوز مناسب برای تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی بند ناف معرفی کردند(۱۵). زینگلی و همکاران نیز در سال ۲۰۰۵ غلظت‌های ۱، ۵ و ۱۰میکرومولار رتینوئیک اسید را به مدت ۷۲ ساعت روی سلول‌های بنیای جنینی اثر دادند و نتایج داده‌های حاصل نشان داد که این غلظت‌ها باعث کاهش قابل توجهی در بیان ژن‌های Cyclin E وCyclin D و نیز باعث کاهش فسفریله شدن ژن PRB می‌شود(۱۹). از طرفی، زاناتو و همکاران در سال ۲۰۰۸ غلظت‌های مختلف RA (۰/۰۰۱، ۰/ ۰۱، ۰/۱، ۰/۵، ۱و ۱۰ میکرو مولار) را به مدت ۲۴ ساعت روی سلول‌های سرتولی تاثیر دادند و نشان دادند که کاهش وابسته به دوزی در سلول‌های زنده در دوزهای ۰/۵ تا ۱۰ میکرومولار وجود دارد(۲۰). تحقیقات دیگری اثرات غلظت‌های مختلف رتینوئیک اسید را به مدت ۷۲ ساعت بر روی سلول‌های بنیادی مغز استخوان بررسی کرده و نشان داده اند که حیات سلول‌ها در غلظت‌های ۰/۵ و ۵ میکرومولارتغییری نمی‌کند، در حالی که در غلظت ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار به طور معنی‌داری کاهش می‌یابد(۲۱). در تحقیقات نجف‌زاده و همکارن نیز تاثیر رتینوئیک اسید بر روی سلول‌های بنیادی فولیکول مو نشان داد که سلول‌های بنیادی فولیکول موی موش سوری در صورتی که تحت تاثیر غلظت‌های بالاتر از ۱۰ میکرومولار قرار گیرند، با مرگ آپوپتوز یا نکروز از بین می روند(۱۴). نتایج داده‌های مطالعه ما نیز همسو با این تحقیقات بوده و نشان داده که غلظت‌های 10^{-4}، 10^{-3}، 10^{-2} مولار) رتینوئیک اسید بعد از سه روز باعث آپوپتوز سلول‌ها می‌شود، البته این بررسی از نظر مدت تیمار، نوع غلظت و نوع سلول بنیادی با برخی تحقیقات متفاوت است.

دومین گروه تحقیقات در مورد اثرات رتینوئیک اسید روی سلول‌های سرطانی نشان داده است که غلظت‌های مختلف رتینوئیک اسید باعث آپوپتوز سلول‌های بنیادی سرطانی یا انواع دیگر سلول‌های سرطانی پستان و معده شده و در درمان افراد مبتلا به سرطان موثر است(۲۲، ۲۳). تحقیقات لیم و همکاران در سال ۲۰۱۲ مشخص کرد که غلظت ۲۰ میکرومولار رتینوئیک اسید روی سلول های بنیادی سرطانی سر و گردن بعد از ۴۸ ساعت باعث کاهش رشد این سلول‌ها و کاهش بیان ژن‌های تنظیم کننده‌ی چرخه سلولی مانند سایکلین A، B، D و E می‌شود(۲۴).

سومین گروه تحقیقات نشان داده است که رتینوئیک اسید باعث افزایش تکثیر و افزایش بیان پروتین‌های تحریک کننده‌ی تکثیر سلولی در انواع مختلف سلول‌های بنیادی می‌شود. هم‌چنین، هوی و همکاران در سال ۲۰۱۶ با کشت سلول‌های بنیادی جنینی بر روی لایه تغذیه کننده‌ی فیبروبلاستی تحت تاثیر غلظت ۱۰ میکرو مولار رتینوئیک نشان دادند که تعداد کلنی‌های سلولی پس از ۴، ۶، و ۸ روز از

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 14:21 +0430 on Sunday April 8th 2018

تیمار، به طور قابل توجهی افزایش می‌یابد(۱۶). تحقیقات خفاقا و همکاران در سال ۲۰۱۷ نیز نشان داد که دکستروبیسین باعث آپوپتوز و نکروز در سلول‌های بافت ماهیچه‌ی قلبی می‌شود، اما اضافه کردن رتینوئیک اسید باعث افزایش خاصیت آنتی‌اکسیدانی و آنتی‌آپوپتوزی در مقابل اثرات آپوپتوزی دکستروبیسین بر روی این سلول‌ها می‌شود(۲۵). نتایج حاصل از این پژوهش با گروه سوم مطالعات غیر همسو می‌باشد و افزایش تکثیر سلولی در هیچ کدام از گروه‌های مورد مطالعه‌ی ما مشاهده نشد. برخی از مطالعات به بررسی تاثیر رتینوئیک اسید در مهاجرت سلولی پرداخته است. چنان چه تحقیقات پورجعفر و همکاران نشان داده است، تیمار سلول‌های بنیادی مغز استخوان به مدت ۴۸ ساعت تحت اثر غلظت‌های ۱۰ و ۱۰۰ میکرو مولار رتینوئیک اسید باعث افزایش بقای سلول و مهاجرت سلولی می‌شود(۲۶).

برخی از مطالعات نیز نشان داده است که تیمار سلول ها با غلظت‌های بالای رتینوئیک اسید باعث آپوپتوز سلولی و تیمار با برخی غلظت‌های پایین رتینوئیک اسید باعث افزایش تکثیر سلولی می‌شود. برای مثال، تحقیقات فریرا و همکاران در سال ۲۰۱۵ نشان داد که تیمار سلول‌های اندوتلیال به مدت ۲۴ ساعت با غلظت‌های بالای۱۰ میکرومولار رتینوئیک اسید باعث آپوپتوز سلولی و غلظت‌های پایین ۰/۵ و ۱ میکرومولار رتینوئیک اسید باعث افزایش معنی‌داری در رشد سلول‌های اندوتلیال می‌شود(۲۷). اکثر مطالعاتی که در زمینه‌ی تاثیر رتینوئیک اسید بر روی حیات سلول‌های بنیادی مزانشیمی صورت گرفته است، حیات سلول‌ها را بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بررسی کرده است، ولی از آن جایی‌که در اکثر مطالعات گذشته، تمایز سلول های بنیادی به سلول های مختلف بعد از ۱۰ و ۱۵ روز با رتینوئیک اسید تیمار شده اند، بنابراین در مطالعه ما، دوزهای 10^{-4} ،10^{-3} و 10^{-2} مولار رتینوئیک اسید حذف شده و این بار تیمار سلول‌ها با غلظت‌های 10^{-5} و 10^{-6} مولار) رتینوئیک اسید برای ۷ روز دیگر ادامه یافت تا پس از گذشت ۱۰ روز تاثیر این دوزها بر روی بقای سلول‌ها سنجیده شود. نتایج نشان داد که حیات در گروهی از سلول‌ها که تحت تاثیر دوز 10^{-6} مولار بودند نسبت به دوز10^{-5}مولار بیشتر است. بنابراین دوز 10^{-6} مولار به عنوان دوز مناسب برای تمایز سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان انتخاب شد. حیات سلول‌های تیمار شده با غلظت 10^{-6} مولار رتینوئیک اسید نسبت به گروه کنترل پس از ۱۵ روز از کشت نیز بررسی شد که نشان داد سلول‌های زنده در گروه تیمار شده با 10^{-6} مولار رتینوئیک اسید نسبت به گروه کنترل به طور معنی داری کمتر می‌شود. هم‌چنین مورفولوژی هسته و سیتوپلاسم بعد از ۱۵ روز با رنگ آمیزی DAPI نیز بررسی شد.

یافته‌های ما نشان داد که هم در روز دهم و هم در روز پانزدهم تمایز، درصد سلول‌های آپوپتیک افزایش یافته است. با این‌که درصد سلول‌های آپوپتوز شده بین گروه‌های آزمایشی و گروه کنترل اختلاف معنی داری را نشان نداد، اما انتظار می رود که با افزایش مدت زمان تیمار، درصد سلول‌های آپوپتوز شده افزایش یابد. در واقع با توجه به استفاده فراوان از رتینوئیک اسید برای تمایز سلول‌ها در مطالعات گذشته، این مطالعه نشان داد که تاثیر غلظت 10^{-6} مولار رتینوئیک‌اسید مناسب‌ترین غلظت برای ایجاد تمایز می باشد و علت این مطلب این است که کمترین سلول‌های آپوپتیک را نسبت به سایر غلظت‌های رتینوئیک اسید ایجاد کرد. از طرفی با افزایش زمان تیمارسلول‌های تحت تاثیر رتینوئیک اسید حیات سلول‌ها کاهش می یابد و انتظار می‌رود تمایزسلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان به سلول‌های مختلف تحت تاثیر رتینوئیک اسید، به مدت بیش از ۱۵ روز بتواند درصد آپوپتوز در سلول‌های تمایزیافته را افزایش دهد.

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این تحقیق نشان می‌دهد که اثرات رتینوئیک اسید روی تکثیر و بقای سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان وابسته به غلظت و زمان است. به نظر

Archive of SID
www.SID.ir

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 14:21 +0430 on Sunday April 8th 2018

می‌رسد که غلظت اندک ۱ میکرومولار رتینوئیک اسید در مدت زمان کم (۳ روز) چندان تاثیری در آپوپتوز سلول‌ها نداشته باشد، در حالی که با افزایش زمان (۱۵روز) همین غلظت اندک ۱ میکرومولار رتینوئیک اسید باعث کاهش حیات سلول‌ها و شروع آپوپتوز سلول‌ها می‌گردد. از آن‌جایی که سلول‌های تیمار شده با غلظت 10^{-6} مولار رتینوئیک اسید پس از ۱۵ روز از تیمار کاهش معنی‌داری در حیات سلول‌ها را نشان دادند، بنابراین افزایش زمان تمایز بیش از ۱۵ روز، اثرات آپوپتوزی بیشتری بر روی حیات سلول‌ها دارد.

تشکر و قدردانی

این مقاله تحقیقی حاصل پایان نامه دانشجویی در مقطع کارشناسی ارشد در دانشگاه علوم پزشکی اردبیل می‌باشد. از مسئولین آزمایشگاه تحقیقاتی که در فراهم کردن شرایط لازم برای انجام این کار ما را حمایت کردند تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

1. Afsartala Z, Rezvanfar MA, Hodjat M, Tanha S, Assadollahi V, Bijangi K, et al. Amniotic membrane mesenchymal stem cells can differentiate into germ cells in vitro. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal. 2016;52(10):1060-71.
2. Deng Y, Yang Y ,Wei S. Peptide-decorated nanofibrous niche augments in vitro directed osteogenic conversion of human pluripotent stem cells. Biomacromolecules. 2017;18(2):587-98.
3. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. cell. 2006;126(4):663-76.
4. Lee KD, Kuo TKC, Whang□Peng J, Chung YF, Lin CT, Chou SH, et al. In vitro hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells. Hepatology. 2004;40(6):1275-84.
5. Ridge SM, Sullivan FJ, Glynn SA. Mesenchymal stem cells: key players in cancer progression. Molecular cancer. 2017;16(1):31.
6. Sandhaanam SD, Pathalam G, Dorairaj S, Savariar V. Mesenchymal stem cells (MSC): identification, proliferation and differentiation. PeerJ PrePrints; 2013. Report No.: 2167-9843.
7. Kermani S, KARBALAEI K, MADANI H, Jahangirnezhad A, NASRESFAHANI MH, BAHARVAND H. Bone marrow-mesenchymal stem cells as a suitable model for assessment of environmental pollution. 2008.
8. Li M, Ikehara S. Bone-marrow-derived mesenchymal stem cells for organ repair. Stem cells international. 2013;2013.
9. Griswold MD, Hogarth CA, Bowles J, Koopman P. Initiating meiosis: the case for retinoic acid. Biology of reproduction. 2012;86(2):35, 1-7.
10. Makoolati Z, Movahedin M, Forouzandeh-Moghadam M. Proliferation in culture of primordial germ cells derived from embryonic stem cell: induction by retinoic acid. Bioscience reports. 2016;36(6):e00428.
11. Li H, Kim KH. Retinoic acid inhibits rat XY gonad development by blocking mesonephric cell migration and decreasing the number of gonocytes. Biology of reproduction. 2004;70(3):687-93.
12. Ghaem Maghami R, Mirzapour T, Bayrami A. Differentiation of mesenchymal stem cells to germ□like cells under induction of Sertoli cell□ conditioned medium and retinoic acid. Andrologia. 2017.
13. de Carvalho Schweich L, de Oliveira EJT, Pesarini JR, Hermeto LC, Camassola M, Nardi NB, et al. All-trans retinoic acid induces mitochondria-mediated apoptosis of human adipose-derived stem cells and affects the balance of the adipogenic differentiation. Biomedicine & Pharmacotherapy. 2017;96:1267-74.
14. Najafzadeh N, Heydari Tajadod S, Tata N. The effect of different concentrations of all-trans retinoic acid on the growth and survival of mouse hair follicle stem cells. Journal of Zanjan

Archive of SID
www.SID.ir

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 14:21 +0430 on Sunday April 8th 2018

University of Medical Sciences and Health Services. 2013;21(88.(
15. Jin W, Xu Y-P, Yang A-H, Xing Y-Q. In vitro induction and differentiation of umbilical cord mesenchymal stem cells into neuron-like cells by all-trans retinoic acid. International journal of ophthalmology. 2015;8(2):250.
16. Friedenstein A, Piatetzky-Shapiro I, Petrakova K. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. Development. 1966;16(3):381-90.
17. Oliva A, Borriello A, Zeppetelli S, Di Feo A, Cortellazzi P, Ventriglia V, et al. Retinoic acid inhibits the growth of bone marrow mesenchymal stem cells and induces p27Kip1 and p16INK4A up-regulation. Molecular and cellular biochemistry. 2003;247(1-2):55-60.
18. Salem M, Mirzapour T, Bayrami A, Sagha M, Asadi A. The Effects of Sertoli Cells Condition Medium and Retinoic Acid on the Number of Colonies of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. Journal of Ardabil University of Medical Sciences. 2017;17(1):7-21.
19. Yu Z, Lin J, Xiao Y, Han J, Zhang X, Jia H, et al. Induction of cell-cycle arrest by all-trans retinoic acid in mouse embryonic palatal mesenchymal (MEPM) cells. Toxicological Sciences. 2004;83(2):349-54.
20. Tan H, Wang J-J, Cheng S-F, Ge W, Sun Y-C, Sun X-F, et al. Retinoic acid promotes the proliferation of primordial germ cell–like cells differentiated from mouse skin-derived stem cells in vitro. Theriogenology. 2016;85(3):408-18.
21. de Carvalho Schweich L, de Oliveira EJT, Pesarini JR, Hermeto LC, Camassola M, Nardi NB, et al. All-trans retinoic acid induces mitochondria-mediated apoptosis of human adipose-derived stem cells and affects the balance of the adipogenic differentiation. Biomedicine & Pharmacotherapy. 2017.
22. Bernardo AR, Cosgaya JM, Aranda A, Jiménez-Lara AM. Pro-apoptotic signaling induced by Retinoic acid and dsRNA is under the control of Interferon Regulatory Factor-3 in breast cancer cells. Apoptosis. 2017:1-13.
23. Najafzadeh N, Mazani M, Abbasi A, Farassati F, Amani M. Low-dose all-trans retinoic acid enhances cytotoxicity of cisplatin and 5-fluorouracil on CD44+ cancer stem cells. Biomedicine & Pharmacotherapy. 2015;74:243-51.
24. Lim YC, Kang HJ, Kim YS, Choi EC. All-trans-retinoic acid inhibits growth of head and neck cancer stem cells by suppression of Wnt/β-catenin pathway. European Journal of Cancer. 2012;48(17):3310-8.
25. Khafaga AF, El-Sayed YS. All-trans-retinoic acid ameliorates doxorubicin-induced cardiotoxicity: in vivo potential involvement of oxidative stress, inflammation, and apoptosis via caspase-3 and p53 down-expression. Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology. 2017:1-12.
26. Pourjafar M, Saidijam M, Mansouri K, Ghasemibasir H, Najafi R. All□trans retinoic acid preconditioning enhances proliferation, angiogenesis and migration of mesenchymal stem cell in vitro and enhances wound repair in vivo. Cell proliferation. 2017;50(1.(
27. Ferreira R, Fonseca M, Santos T, Sargento-Freitas J, Tjeng R, Paiva F, et al. Retinoic acid-loaded polymeric nanoparticles enhance vascular regulation of neural stem cell survival and differentiation after ischaemia. Nanoscale. 2016;8(15):8126-37.

Archive of SID

www.SID.ir