تحقیقی

تعیین میزان تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمال مواجهه یافته با هایپوکسی القاء شده توسط کلریدکبالت

مرضیه پولادی[۱]، دکتر ایرج امیری[۲]، دکتر زهره علیزاده[۳]، فهیمه طالب زاده[٤]، یوسف عباسی[۵]، دکتر آمنه محمدی روشنده*[۳]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد رشته علوم تشریحی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان. ۲- استاد، گروه علوم تشریحی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان.
۳- دانشیار، گروه علوم تشریحی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان. ٤- کارشناس، مرکز تحقیقات پزشکی مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان.
۵- دانشجوی دکتری علوم تشریحی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان.

چکیده

زمینه و هدف : *کاربرد سلول‌های بنیادی با مشکلاتی همچون پایین بودن بقای آنها بعد از تزریق به بدن و آپوپتوزیس همراه است که علت آن آماده نبودن سلول‌های تزریق شده در مواجهه با عوامل توکسیک مانند هایپوکسی، تغییرات دمایی، استرس اکسیداتیو و فقرغذایی است. این مطالعه به منظور تعیین میزان تکثیر سلول‌های بنیادی مواجهه یافته با هایپوکسی القاء شده توسط کلریدکبالت در موش صحرایی انجام شد.*

روش بررسی : *در این مطالعه تجربی سلول‌های بنیادی از مغز قرمز استخوان ۲ سر موش صحرایی ٦ هفته‌ای از نژاد ویستار جدا شد. پس از ٤ بار پاساژ، در پلیت‌های ۹٦ خانه ای با مقادیر مختلف و در زمان‌های ٦ ، ۱۲ ، ۲٤ و ٤۸ ساعت با کلریدکبالت به میزان صفر (کنترل) ۵، ۱۰، ۲۰، ۵۰، ۷۰، ۹۰، ۱۰۰، ۱۲۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میکرومولار کلریدکبالت تیمار شدند. برای ارزیابی تکثیر سلولی از روش MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-Yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide] استفاده گردید.*

یافته ها : *سلول‌های بنیادی پس از استحصال از مغز قرمز استخوان در محیط کشت گسترش یافتند. همچنین کشت سلول‌ها با مقادیر مختلف کلریدکبالت تغییری در مورفولوژی آنها ایجاد نکرد. پیش‌شرطی کردن سلول‌ها پس از ٦ ساعت با دوز ۱۲۰ میکرومولار، ۱۲ ساعت و ۲٤ ساعت با دوز ۲۰ میکرومولار و در ٤۸ ساعت با دوز ۵ میکرومولار میزان تکثیر سلولی را بعد از مواجهه با هایپوکسی به‌طور معنی‌داری افزایش داد ($P<0/05$).*

نتیجه‌گیری : *هایپوکسی سبب افزایش میزان تکثیر سلولی در سلول‌های بنیادی مزانشیمال می‌گردد.*

کلید واژه‌ها : *هایپوکسی ، کلرید کبالت ، سلول‌های بنیادی ، تکثیر سلولی ، موش صحرایی*

* نویسنده مسؤول : دکتر آمنه محمدی روشنده ، پست الکترونیکی a.mohammadiroshandeh@umsha.ac.ir
نشانی : همدان، دانشگاه علوم پزشکی همدان، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریحی، تلفن ۰۸۱-۳۸۳۸۰٤٦۲ ، نمابر ۳۸۳۸۰۲۰۸
وصول مقاله : ۱۳۹۳/۳/۲۵ ، اصلاح نهایی : ۱۳۹٤/۲/٦ ، پذیرش مقاله : ۱۳۹٤/۲/۷

مقدمه

سلول‌های بنیادی مزانشیمی یا سلول‌های بنیادی غیرخونساز، سلول‌هایی چندتوان هستند که توانایی تمایز به انواع دودمان‌های بافت همبند از جمله آدیپوسیت، کندروسیت و استئوسیت را دارا هستند و در محیط in vitro نیز ظرفیت تمایزی خود را حفظ می‌کنند. این سلول‌ها توسط عوامل رشد خاص و ایجاد شرایط مناسب به سلول‌های استخوان ساز، غضروف ساز، سلول‌های اندوتلیال عروق و یا سلول‌های قلبی متمایز می‌شوند (۴-۱). این سلول‌ها التهاب منطقه را سرکوب کرده و شروع به تولید عوامل رشد محلی و سایتوکین‌های مورد نیاز برای بازسازی می‌کنند (۵). به‌همین جهت استفاده از این سلول‌ها در درمان بسیاری از بیماری‌ها از جمله بیماری‌های قلبی، پارکینسون، MS، بیماری‌های مفصلی و آلزایمر کاربرد دارد (۶و۷). علی‌رغم مفید بودن استفاده از این سلول‌ها در بیماری‌های مختلف، محققین با چالش‌های زیادی پس از تزریق این سلول‌ها به بدن مواجه هستند. سلول‌ها پس از تزریق به بدن بایستی با عواملی همانند هایپوکسی، استرس‌های گرمایی، التهاب ناحیه و فقر غذایی مبارزه کنند. غلبه بر هایپوکسی محیطی یکی از مهم‌ترین چالش‌های سلول‌های بنیادی مزانشیمال است. هایپوکسی شرایط را برای مرگ سلول‌های تزریق شده فراهم می‌کند و تنها در چند ساعت پس از تزریق بسیاری از آنها از بین رفته و کارایی خود را از دست می‌دهند. روش‌های متعددی برای افزایش کارایی سلول‌های بنیادی به منظور استفاده در حیطه سلول

Archive of SID
www.SID.ir

درمانی به‌کار رفته است که از میان آنها می‌توان به راه‌های مقابله با هایپوکسی با استفاده از روش پیش شرطی کردن اشاره نمود (۸). سلول‌های مذکور از طریق پیش‌شرطی شدن قادر به بیان ژن‌هایی می‌شوند که آنها را برای قرار گیری در آن محیط آماده می‌کند. به‌نظر می‌رسد این روند از طریق بیان ژن‌هایی صورت می‌پذیرد که تحمل سلول را برای زنده ماندن در شرایط کمبود اکسیژن بالا می‌برند (۹و۱۰). یکی از روش‌های القاء کننده شرایط هایپوکسی در محیط کشت استفاده از کلریدکبالت است (۱۱). از کلریدکبالت به عنوان عاملی که شرایط تقلیدی هایپوکسی (hypoxic mimetic) را ایجاد می‌کند؛ استفاده می‌شود. این مطالعه به منظور تعیین میزان تکثیر سلول‌های بنیادی مواجهه یافته با هایپوکسی القاء شده توسط کلریدکبالت در موش صحرایی انجام شد.

روش بررسی

این مطالعه تجربی روی ۲ سر موش صحرایی از نژاد ویستار با سن ۶ هفته خریداری شده از انستیتو پاستور ایران انجام شد.

جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمال: پس از قربانی موش های صحرایی، تیبیا و فمور خارج شد و انتهای پروکسیمال و دیستال آنها جدا گردید. مجرای استخوان توسط محیط کشت فلاش شدند و سلول‌های حاصله در محیط کشت DMEM Low glucose همراه با Fetal Bovine Serum ۱۰ درصد و آنتی‌بیوتیک کشت داده شدند. سلول‌ها پس از چهار بار پاساژ مورد استفاده قرار گرفتند.

تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمال به استخوان و چربی: به منظور اثبات قابلیت تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمال از کیت Stem pro®osteogenesis, adipogenesis differentiation media (invitrogen) استفاده شد. سلول‌ها در پلیت‌های ۲۴ خانه ای کشت داده شدند و با محیط‌های تمایزی چربی به مدت ۱۲ روز و برای محیط تمایزی استخوان به مدت ۲۱ روز تیمار شدند. هر سه روز محیط تمایزی تعویض گردید.

تیمار با کلرید کبالت: سلول‌ها در پلیت ۹۶ خانه‌ای کشت داده شدند و پس از چسبیدن سلول‌ها به کف پلیت، طی زمان‌های ۶، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت در مواجهه با مقادیر صفر (کنترل)، ۵، ۱۰، ۲۰، ۵۰، ۷۰، ۹۰، ۱۰۰، ۱۲۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میکرومولار کلریدکبالت قرار گرفتند (۱۱). پس از گذشت زمان‌های مذکور محیط‌های کشت تعویض شد و تمام گروه‌ها در معرض ۳۰۰میکرومولار کلریدکبالت (دوز لتال) قرار گرفتند تا میزان مقاومت سلول‌ها ارزیابی گردد. پس از گذشت ۲۴ ساعت از مواجهه سلول‌ها با دوز لتال، سلول‌ها با محیط معمولی شامل DMEM Lg همراه با ۱۰ درصد FBS، تیمار شدند و به آنها اجازه داده شد تا ۲۴ ساعت با همین محیط تکثیر یابند. پس از گذشت این زمان میزان تکثیر آنها ارزیابی شد.

بررسی تکثیر سلولی: برای تهیه محلول MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-Yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide] میزان ۵۰ میلی‌گرم MTT را در ۱۰ میلی‌لیتر PBS حل و از فیلتر ۰/۲۲ µm رد کرده و در ویال‌های ۱/۵ پیچیده شده با فویل در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری کردیم.

روش کار MTT: پس ازگذشت ۶، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت کل محیط را از روی سلول‌هاخارج کرده و محیط DMEM I تازه را اضافه کردیم. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از محیط را خارج و ۱۵ میکرولیتر از MTT را اضافه نموده و سلول‌ها را به همراه محلول آن به مدت ۲ ساعت در انکوباتور قراردادیم. سپس پلیت را از انکوباتور خارج کرده و ۱۰۰ میکرولیتر از محیط را خارج کرده و ۲۰۰ میکرولیتر از DMSO را به آن اضافه کرده و پلیت ها توسط دستگاه الایزاریدر با طول موج ۵۷۰ خوانده شد.

آنالیز آماری: داده ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS-20 و آزمون one-way ANOVA تجزیه و تحلیل شدند و سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

سلول‌های بنیادی پس از کشت به صورت دوکی گسترده شدند (شکل ۱ –A). کشت سلول‌ها با مقادیر مختلف کلریدکبالت تغییری در ظاهر مورفولوژیک آنها ایجاد نکرد و سلول‌ها به صورت دوکی شکل در سطح فلاسک گسترده شدند (شکل ۱ – B).

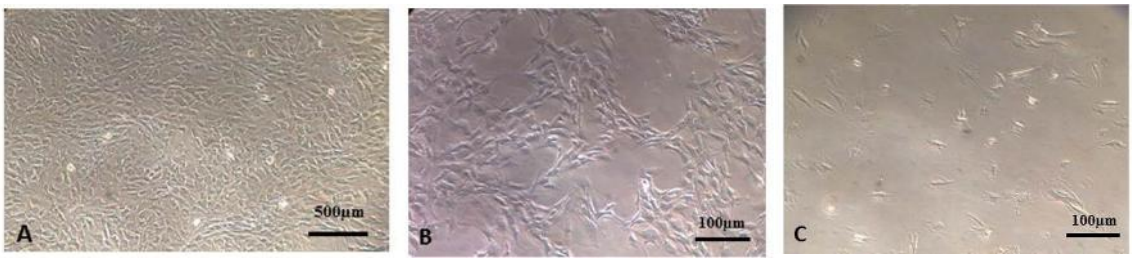
نتایج کشت سلول‌های بنیادی با محیط تمایزی چربی و استخوان نشان داد که این سلول‌ها قابلیت تمایز به استخوان و چربی را دارند و پس از گذشت دو هفته سلول‌های چربی (شکل–A ۲) و استخوان مشاهده شد (شکل ۲–B).

نتایج حاصل از پیش شرطی کردن سلول‌های مزانشیمال با مقادیر مختلف کلرید کبالت پس از ۶ ساعت نشان داد که میزان تکثیر در تمام دوزهای به‌کار رفته نسبت به گروه کنترل افزایش یافته است و این افزایش در دوز ۱۲۰ میکرومولار معنی‌دار بود (P<۰/۰۵). میزان تکثیر در دوز ۲۰۰ که بالاترین دوز بود؛ نسبت به گروه کنترل کاهش آماری معنی‌داری یافت (P<۰/۰۵) (شکل ۳–A).

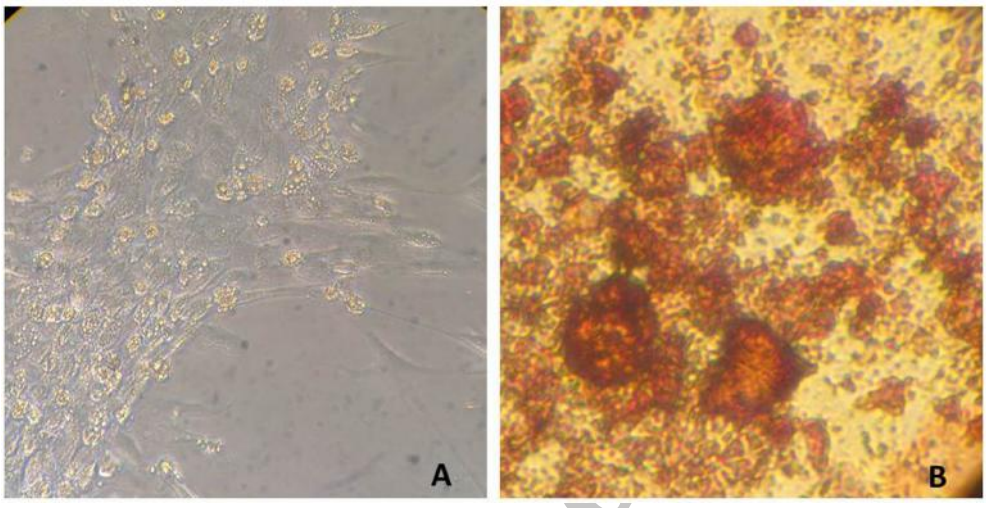
نتایج حاصل از پیش شرطی کردن سلول‌های مزانشیمال با مقادیر مختلف کلرید کبالت پس از ۱۲ ساعت نشان داد میزان تکثیر در تمام دوزهای به کار رفته نسبت به گروه کنترل افزایش یافته است و این افزایش در دوز ۲۰ میکرومولار معنی‌دار بود (P<۰/۰۵). میزان تکثیر در دوز ۲۰۰ که بالاترین دوز بود؛ نسبت به گروه کنترل کاهش آماری معنی‌داری یافت(P<۰/۰۵) (شکل ۳–B).

نتایج حاصل از پیش شرطی کردن سلول‌های مزانشیمال با مقادیر مختلف کلرید کبالت پس از ۲۴ ساعت نشان داد میزان تکثیر در تمام دوزهای به‌کار رفته نسبت به گروه کنترل افزایش یافته است (شکل ۱–B) و این افزایش در دوز ۲۰ میکرومولار معنی‌دار بود (P<۰/۰۵). میزان تکثیر در دوز ۲۰۰ که بالاترین دوز بود نسبت به

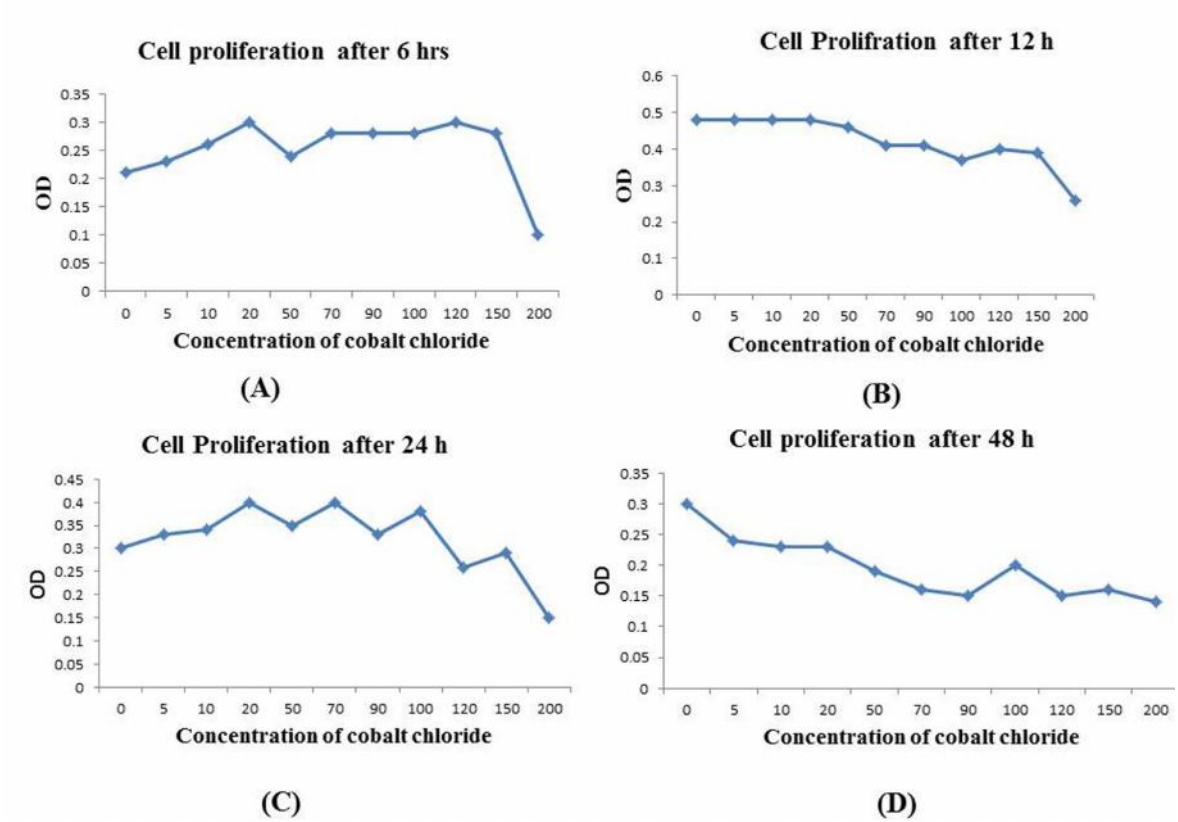
Archive of SID
www.SID.ir



شکل ۱ – A: سلول‌های بنیادی مزانشیمال با ظاهری همانند فیبروبلاست و گسترده شده به آسانی در محیط کشت؛ B: سلول‌های بنیادی مزانشیمال مواجهه یافته با کلریدکبالت و عدم تغییر در مورفولوژی؛ C: سلول‌های مزانشیمالی پیش‌شرطی نشده با تعداد کاهش یافته



شکل ۲ : تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمال به چربی (A) و استخوان (B)



شکل ۳ – A: میزان تکثیر سلول‌های بنیادی پس از ٦ ساعت مواجهه با هایپوکسی؛ B: میزان تکثیر سلول‌های بنیادی پس از ۱۲ ساعت مواجهه با هایپوکسی؛ C: میزان تکثیر سلول‌های بنیادی پس از ٢٤ ساعت مواجهه با هایپوکسی؛ D: میزان تکثیر سلول‌های بنیادی پس از ٤٨ ساعت مواجهه با هایپوکسی

www.SID.ir

گروه کنترل کاهش آماری معنی‌داری نشان داد (P<۰/۰۵) (شکل ۳-C).

نتایج حاصل از پیش شرطی کردن سلول‌های مزانشیمال با مقادیر مختلف کلرید کبالت پس از ۴۸ ساعت نشان داد میزان تکثیر در تمام دوزهای به‌کار رفته نسبت به گروه کنترل افزایش یافته است و این افزایش در دوز ۵ میکرومولار معنی‌دار بود (P<۰/۰۵). میزان تکثیر در دوز ۷۰ میکرومولار نسبت به گروه کنترل کاهش آماری معنی‌داری یافت (P<۰/۰۵) (شکل ۳-D).

بحث

با توجه به نتایج مطالعه حاضر پیش شرطی کردن سلول‌های بنیادی مزانشیمال با عامل هایپوکسی میزان تکثیر سلولی را افزایش داد و در زمان‌های متفاوت به غلظت‌های متفاوتی از کلرید کبالت واکنش نشان داد. کشت سلول‌های مزانشیمال در شرایط مناسبی از اکسیژن (۲۰ درصد) انجام می شود. در حالی که این سلول‌ها باید پس از تزریق در شرایط هایپوکسی قرار گیرند که خود عاملی برای از بین رفتن آنها محسوب می‌شود. برعکس کشت سلول‌ها در شرایط پایین اکسیژن (۱-۰/۵ درصد) موجب کاهش آپوپتوزیس، افزایش اثرات پاراکرین و بهبود خواص رژنراتیو سلول‌ها می‌شود (۱۲). اثرات پاراکرین سلول‌های بنیادی مزانشیمال بر تکثیر و همچنین ترمیم بافت‌های آسیب دیده اثبات شده است. این اثرات در مواقعی که این سلول‌ها تحت پیش شرطی شدن قرار گرفته باشند؛ بیشتر مشخص می‌شوند. در مطالعاتی نشان داده شده تکثیر سلول‌های بنیادی هماتوپویتیک در صورتی که همزمان با سلول‌های بنیادی مزانشیمال پیش شرطی شده از قبل توسط هایپوکسی، کشت داده شده باشند را افزایش می‌دهد و علت آن به دلیل ترشح بیشتر اینترلوکین‌ها و عوامل القای هایپوکسی (HIF-a) توسط سلول‌های پیش‌شرطی شده است (۱۳و۱۴).

تحقیق حاضر نشان داد که استفاده از هایپوکسی میزان بقای سلول‌ها را در محیط کشت افزایش می دهد. در مطالعه Theus و همکاران انجام پیش‌شرطی با هایپوکسی، کاهش ۳۰ تا ۴۰ درصدی در وقوع آپوپتوزیس و کاهش فعالیت کاسپاز ۳ را به دنبال داشت (۱۵). در مطالعه Hu و همکاران پیش شرطی کردن سلول‌های بنیادی مزانشیمال با هایپوکسی بیان عوامل Pro-survival و Pro-angiogenic شامل Hypoxia-induced factor1، Angiopoitin1، Vascular endothelial growth factor و رسپتور آن اریتروپویتین، Bcl-2 و Bcl-xl را افزایش داد. در مقابل فعالیت کاسپاز ۳ به طور معنی‌داری کاهش یافت (۱۲). بیان این عوامل که در شرایط خارج بدن و همچنین داخل بدن رخ داده است؛ موجب مقاومت بالای سلول‌ها و افزایش کارایی آنها پس از تزریق شده است (۱۲). همچنین با قرار دادن سلول‌های بنیادی مزانشیمال در برابر شرایط هایپوکسی ۳-۱ درصدی میزانmotility و مهاجرت سلول‌ها و بقای آنها افزایش یافته است. تصور می‌شود بیان بالای عامل رشد هپاتوسیت توسط این فرایند می‌تواند نقش زیادی در افزایش کارایی سلول‌ها داشته باشد (۱۰). در مطالعه Yu و همکاران پیش شرطی کردن سلول‌های بنیادی مزانشیمی با هایپوکسی میزان مهاجرت سلولی را بیشتر و میزان درمان با سلول‌های بنیادی را افزایش داد. سلول‌های مزانشیمی در معرض ۲۰۰ میکرومولار کبالت به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شدند و با گروه کنترل مقایسه گردید. در واقع هایپوکسی به طور معنی‌داری بیان ژن‌های HIF-1 الفا و CXCR4 و مهاجرت سلولی در محیط in vitro را افزایش داد (۱۱).

هرچند نتایج مطالعه ما در ارتباط با افزایش کارایی سلول‌ها پس از پیش‌شرطی کردن در راستای نتایج مطالعه Yu و همکاران (۱۱)؛ اما میزان غلظت به کار رفته کلریدکبالت در مطالعه ما متفاوت است. به‌نظر می‌رسد نوع کلرید کبالت استفاده شده و یا شماره پاساژ سلول‌های بنیادی به‌کار گرفته شده در دو مطالعه متفاوت باشد.

از آنجایی که استفاده از سلول درمانی در بیماری‌های مختلف همانند اختلالات قلبی – عروقی، دیابت، پارکینسون و آلزایمر ذهن محققین را به خود مشغول ساخته است؛ استفاده از روش‌های آماده‌سازی سلول برای این منظور از ضروریات است (۶و۷). به‌نظر می‌رسد استفاده از پیش شرطی کردن سلول‌ها می‌تواند به عنوان یک راه حل بسیار مناسب قبل از تزریق سلول‌ها به داخل بدن مورد استفاده قرار گیرد. با این حال انتخاب بهترین روش آماده‌سازی، زمان مواجهه با این عوامل و همچنین مکانیسم‌های اثر پیش شرطی کردن از مسایلی است که هنوز به نقطه قطعیت نرسیده و نیازمند مطالعات بیشتری است. لازم به ذکر است با توجه به محدودیت‌های موجود شناسایی سلول‌های بنیادی با استفاده از روش مورفولوژی سلول و روش قابلیت تمایز این سلول‌ها در مطالعه حاضر انجام گردید و انجام فلوسایتومتری مقدور نبود.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که هایپوکسی میزان تکثیر سلولی را در سلول‌های بنیادی مزانشیمال افزایش می‌دهد. افزایش تکثیر سلولی در اثر آماده شدن سلول‌ها بعد از مواجهه با مقادیر مختلف کلرید کبالت به عنوان ماده ایجادکننده هایپوکسی حاصل شد که نشان از اثرگذاری و دخالت برخی عوامل در سلول‌ها است.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه خانم مرضیه پولادی برای اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته علوم تشریحی از دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی همدان بود.

Archive of SID
www.SID.ir

References

1. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science. 1999 Apr; 284(5411):143-7.

2. Heino TJ, Hentunen TA. Differentiation of osteoblasts and osteocytes from mesenchymal stem cells. Curr Stem Cell Res Ther. 2008 May;3(2):131-45.

3. Pereira RF, Halford KW, O'Hara MD, Leeper DB, Sokolov BP, Pollard MD, et al. Cultured adherent cells from marrow can serve as long-lasting precursor cells for bone, cartilage, and lung in irradiated mice. Proc Natl Acad Sci U S A. 1995 May; 92(11):4857-61.

4. Yue WM, Liu W, Bi YW, He XP, Sun WY, Pang XY, et al. Mesenchymal stem cells differentiate into an endothelial phenotype, reduce neointimal formation, and enhance endothelial function in a rat vein grafting model. Stem Cells Dev. 2008 Aug; 17(4):785-93. doi: 10.1089/scd.2007.0243.

5. Djouad F, Plence P, Bony C, Tropel P, Apparailly F, Sany J, et al. Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals. Blood. 2003 Nov; 102(10):3837-44.

6. Segers VF, Lee RT. Stem-cell therapy for cardiac disease. Nature. 2008 Feb; 451(7181):937-42. doi: 10.1038/nature06800.

7. Rossi F, Cattaneo E. Opinion: neural stem cell therapy for neurological diseases: dreams and reality. Nat Rev Neurosci. 2002 May;3(5):401-9.

8. Tang YL, Tang Y, Zhang YC, Qian K, Shen L, Phillips MI. Improved graft mesenchymal stem cell survival in ischemic heart with a hypoxia-regulated heme oxygenase-1 vector. J Am Coll Cardiol. 2005 Oct; 46(7):1339-50.

9. Chacko SM, Ahmed S, Selvendiran K, Kuppusamy ML, Khan M, Kuppusamy P. Hypoxic preconditioning induces the expression of prosurvival and proangiogenic markers in mesenchymal stem cells. Am J Physiol Cell Physiol. 2010 Dec; 299(6):C1562-70. doi: 10.1152/ajpcell.00221.2010.

10. Rosová I, Dao M, Capoccia B, Link D, Nolta JA. Hypoxic preconditioning results in increased motility and improved therapeutic potential of human mesenchymal stem cells. Stem Cells. 2008 Aug;26(8):2173-82. doi: 10.1634/stemcells.2007-1104.

11. Yu X, Lu C, Liu H, Rao S, Cai J, Liu S, et al. Hypoxic preconditioning with cobalt of bone marrow mesenchymal stem cells improves cell migration and enhances therapy for treatment of ischemic acute kidney injury. PLoS One. 2013 May; 8(5):e62703. doi: 10.1371/journal.pone.0062703.

12. Hu X, Yu SP, Fraser JL, Lu Z, Ogle ME, Wang JA, et al. Transplantation of hypoxia-preconditioned mesenchymal stem cells improves infarcted heart function via enhanced survival of implanted cells and angiogenesis. J Thorac Cardiovasc Surg. 2008 Apr; 135(4):799-808. doi: 10.1016/j.jtcvs.2007.07.071.

13. Hammoud M, Vlaski M, Duchez P, Chevaleyre J, Lafarge X, Boiron JM, et al. Combination of low O(2) concentration and mesenchymal stromal cells during culture of cord blood CD34(+) cells improves the maintenance and proliferative capacity of hematopoietic stem cells. J Cell Physiol. 2012 Jun; 227(6):2750-8. doi: 10.1002/jcp.23019.

14. Amiri F, Jahanian-Najafabadi A, Roudkenar MH. In vitro augmentation of mesenchymal stem cells viability in stressful microenvironments : In vitro augmentation of mesenchymal stem cells viability. Cell Stress Chaperones. 2015 Mar; 20(2):237-51. doi: 10.1007/s12192-014-0560-1.

15. Theus MH, Wei L, Cui L, Francis K, Hu X, Keogh C, Yu SP. In vitro hypoxic preconditioning of embryonic stem cells as a strategy of promoting cell survival and functional benefits after transplantation into the ischemic rat brain. Exp Neurol. 2008 Apr; 210(2):656-70. doi: 10.1016/j.expneurol.2007.12.020.

Archive of SID

www.SID.ir

Original Paper

Mesenchymal stem cells proliferation exposed to hypoxia

**Pooladi M (B.Sc)[1], Amiri I (Ph.D)[2], Alizadeh Z (Ph.D)[3], Talebzadeh F (B.Sc)[4]
Abbasi Y (M.Sc)[5], Mohammadi Roushandeh A (Ph.D)*[3]**

[1]M.Sc Student in Anatomy, Anatomical Sciences Department, Medicine Faculty, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran. [2]Professor, Anatomical Sciences Department, Medicine Faculty, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran. [3]Associate Professor, Anatomical Sciences Department, Medicine Faculty, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran. [4]Research Center for Molecular Medicine, Medicine Faculty, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran. [5]Ph.D Candidate in Anatomy, Anatomical Sciences Department, Medicine Faculty, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran.

Abstract

Background and Objective: Some problems such as low viability and apoptosis after injection to the body because of exposure to toxic factors such as hypoxia, thermal stress, oxidative stress and food deprivation are encountered with stem cell application. It is suggested that preconditioning of the cells with cytotoxic factors before injection could enhance their efficiency. This study was done to determine the mesenchymal stem cell proliferation exposed to hypoxia by cobalt chloride.

Methods: In this experimental study, Mesenchymal stem cells were isolated from rat bone marrow and cultured at least for four times. The cells were cultured in 96 well plates and treated with different concentration (0, 5, 10, 20, 50, 70, 90, 100, 120, 150 and 200 µM) of cobalt chloride for 6, 12, 24 and 46 hours. Cell proliferation was detected by MTT assay [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-Yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide].

Results: The cells isolated from bone marrow were propagated easily in culture condition. The cells morphology was not altered after exposure to cobalt chloride. Preconditioning of mesenchymal stem cells with 120 µM for 6 hours, 20µM for 12 and 24 hours and 5µM for 48 hours significantly improved cell proliferation after hypoxia in cell culture ($P<0.05$).

Conclusion: Hypoxia preconditioning increases proliferation of mesenchymal stem cell.

Keywords: Hypoxia, Cobalt chloride, Stem cells, Cell proliferation, Rat

*** Corresponding Author: Mohammadi Roushandeh A (Ph.D)**
E-mail: a.mohammadiroshandeh@umsha.ac.ir

Received 15 Jun 2014 **Revised** 26 Apr 2015 **Accepted** 27 Apr 2015

Archive of SID

Cite this article as: Pooladi M, Amiri I, Alizadeh Z, Talebzadeh F, Abbasi Y, Mohammadi Roushandeh A. [Mesenchymal stem cells proliferation exposed to hypoxia]. J Gorgan Uni Med Sci. 2015; 17(3): 69-74. [Article in Persian]

www.SID.ir