Archive of SID

مقاله تحقیقی

بررسی اثر کلرید لیتیوم بر میزان تکثیر سلولهای بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان موش صحرایی در محیط کشت

محمدرضا باغبان اسلامی نژاد*و*Ph.D.، محمود تلخابی**M.Sc.، بهمن زینلی**Ph.D.، پوپک افتخاری یزدی***Ph.D.**

* گروه سلولهای بنیادی مرکز تحقیقات علوم سلولی جهاد دانشگاهی پژوهشکده رویان

** بخش زیست شناسی دانشگاه تهران

*** گروه جنین شناسی مرکز تحقیقات پزشکی تولید مثل پژوهشکده رویان جهاد دانشگاهی

تاریخ وصول: خردادماه ۸۷، تاریخ پذیرش: تیر ماه ۸۷

چکیده

هدف: بررسی تاثیر کلرید لیتیوم بر میزان تکثیر سلولهای بنیادی مزانشیمی در محیط کشت

مواد و روشها: در مطالعه تجربی حاضر، مغز استخوان ۸ سر موش صحرایی با تراکم ۱۰۵×۵ سلول در سانتیمتر مربع با تیمارهای ۱، ۲، ۵، ۷ و ۱۰ میلی مولار کلرید لیتیوم کشت و طی سه پاساژ متوالی تکثیر شد. دوازده روز پس از آغاز کشت اولیه، کشت سلول در گروههای مختلف با کریستال ویولت رنگ آمیزی و تعداد و قطر کلونیها اندازه گیری و مقایسه شد. همچنین طی پاساژ ۳-۱ گروههای مختلف از لحاظ دو برابر شدن جمعیت سلولی بررسی و مقایسه شدند. در این مطالعه، برای سلولهای پاساژ سوم گروههای مختلف منحنی رشد ترسیم شد . در انتهای دوره کشت سلولها از لحاظ توان تمایز به استخوان و چربی بررسی شدند.

یافته‌ها: تعداد و قطر کلونیهای ایجاد شده در کشت اولیه درگروه ۵ میلی مولار بیش از گروه کنترل و دیگر گروههای تیمار بود ($p<0.001$). جمعیت سلولی تحت تاثیر غلظت ۵ میلی مولار کلرید لیتیوم طی پاساژ ۳-۱ به طور متوسط ۰/۰٤۲۲۵±۱۲/۰۲۲۵ بار دو برابر شد که این میزان با تفاوت معنی داری بیش از گروههای دیگر بود. سلولهای گروه ۵ میلی مولار در مقایسه با سایر گروهها، در زمان کوتاهی (٤/۹ روز) به مرحله پلاتو رسیدند ($p<0.001$). رنگ آمیزی آلیزارین رد برای استخوان و اویل رد برای چربی نشان داد که سلولهای گروههای مختلف توان تمایز خود را حفظ کرده‌اند.

نتیجه گیری: روی هم رفته می‌توان گفت که حضور کلرید لیتیوم با غلظت ۵ میلی مولار در کشت سلولهای مغز استخوان موش صحرایی با حفظ توان تمایز به استخوان و چربی، سبب افزایش سرعت رشد سلول می‌شود.

کلیدواژه‌ها: سلولهای بنیادی مزانشیمی، لیتیوم کلراید، تکثیر، دو برابر شدن جمعیت سلولی

آدرس مکاتبه: تهران، مرکز تحقیقات علوم سلولی جهاد دانشگاهی، پژوهشکده رویان، گروه سلولهای بنیادی، صندوق پستی ٤٦٤٤-۱۹۳۹۵

E-mail: eslami@royaninstitute.org

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

سلولهای بنیادی مزانشیمی برای اولین بار توسط فریدن‌استاین (Friedenstein) و همکاران از مغز استخوان جدا سازی و معرفی شد [۱]. این سلولها که در اصل نوعی سلول بنیادی بزرگسال محسوب می‌شوند، واجد چندین ویژگی هستند از جمله اینکه در زمان کشت کلونی ایجاد می‌کنند، به سطح کشت می‌چسبند و قادرند با فراهم شدن شرایط مناسب به سه رده استئوبلاست، آدیپوسیت و کندروسیت تمایز یابند [۳-۱]. سلولهای بنیادی مزانشیمی به راحتی از مغز استخوان قابل جداسازی بوده و دستکاریهای ex vivo به راحتی روی آنها انجام پذیر است. به علاوه این سلولها طی سالها با اسامی مختلفی از قبیل سلولهای استرومای مغز استخوان، سلولهای پروژنیتور مزانشیمی و سلولهای مزانشیمی مغز استخوان نامگذاری شده اند [٤]. سلول بنیادی مزانشیمی تاکنون از بافتهای مختلفی از قبیل چربی،کبد، مایع آمنیوتیک، استخوان ترابکولار، پرده سینویال، عضله اسکلتی و دندان شیری و خون بند ناف جدا شده اند [۱۳-۵]. امروزه از سلولهای بنیادی مزانشیمی به عنوان یک ابزار سلولی مناسب در مطالعات مهندسی بافت، ژن درمانی و سلول درمانی استفاده وسیعی می‌شود.

در استراتژیهای مهندسی بافت، سلول درمانی و ژن درمانی، معمولا نیاز است که سلول به تعداد زیاد در اختیار باشد. این در حالیست که سلولهای بنیادی مزانشیمی به تعداد بسیاراندک در منابع بافتی وجود دارد [۳]. بنابراین پیش از هر کار تجربی با این سلولها، کشت و تکثیر آنها به عنوان اولین قدم، امری اجتناب ناپذیر است. یکی از مشکلات اصلی استفاده از این سلولها برای اهداف فوق کاهش پتانسیل تکثیری آنها در محیط کشت است، به طوری که جانگ (Jung) و همکاران در سال ۲۰۰٦ گزارش کردند که تکثیر سلولهای بنیادی مزانشیمی با افزایش دوره کشت کاهش یافته و حتی از نظر نشانگرهای سطحی و مورفولوژی نیز تغییراتی در این سلولها ایجاد می‌شود [١٤].

تکثیر سلولها توسط مسیرهای سیگنال دهی مختلفی کنترل می‌شود. یکی از این مسیرها، مسیر سیگنال دهی wnt است که یک مکانیزم مولکولی حفظ شده در تمام جانوران پر سلولی است. این مسیر علاوه بر تکثیر سلولی سایر خصوصیات سلولی از قبیل تعیین سر نوشت، تمایز، آپوپتوزیس و مهاجرت سلولی را نیز کنترل می‌کند [۱۵]. در این مسیر مولکولهای ترشحی Wnt با اتصال به گیرنده خود، سبب فعال شدن مکانیزمی می‌شود که نتیجه نهایی آن فعال شدن ژن‌های هدف است.. مطالعات نشان داده اند که لیتیوم می‌تواند عملکرد پروتئینهای Wnt را تقلید کند [١٦].

تا به حال گزارش‌های متفاوتی از عملکرد لیتیوم بر تکثیر سلولی گزارش شده است. در سال ۱۹۸۷ یوشینو (Yoshino) و همکاران گزارش کردند که لیتیوم قادر است فعالیت میتوژنیک سلولهای شوان را در محیط کشت افزایش دهد. و این تاثیرات وابسته به دوز است [۱۷]. برخلاف این محققین، اسمیت (Smits) در سال ۲۰۰۳ نشان داد که لیتیوم تکثیر سلولهای P19 را مهار می‌نماید [۱۸]. در ارتباط با تاثیر لیتیوم بر تکثیر سلولهای بنیادی مزانشیمی مطالعات بسیار اندک است. در این ارتباط می‌توان به تحقیق دبائر (De Boer) و همکاران اشاره کرد که در مطالعه خود بیشتر بر تاثیر کلرید لیتیوم بر تمایز سلولهای بنیادی مزانشیمی متمرکز بودند. نتایج این محققین نشان داد که حضور کلرید لیتیوم در محیط کشت سلولهای بنیادی مزانشیمی انسان، سبب مهار تمایز به چربی و شروع تمایز به استخوان سلولها می‌شود. همچنین این محققین سلولهای پاساژ یافته را به مدت ٤ روز در حضور کلرید لیتیوم کشت دادند و بررسی‌های آنها نشان دهنده تاثیرات مثبت کلرید لیتیوم بر تکثیر سلولی بود [۱۹]. در مطالعه حاضر تاثیر کلرید لیتیوم بر کشت سلولهای بنیادی مزانشیمی در یک دوره

www.SID.ir

Archive of SID

طولانی کشت بررسی شده است. هدف مطالعه حاضر کشت و تکثیر سلولهای مغز استخوان موش صحرایی از کشت اولیه تا پاساژ سوم در حضور لیتیوم و بررسی تاثیر آن بر برخی شاخص‌های کمی تکثیر نظیر کلون زایی، دو برابر شدن جمعیت سلولی در طول دوره کشت و زمان آن و رسم منحنی رشد برای سلولهای بنیادی مزانشیمی در حضور کلرید لیتیوم و مقایسه آن با محیط کنترل (بدون حضور لیتیوم) است.

مواد و روشها

جداسازی و کشت سلولهای بنیادی مزانشیمی مغز استخوان

در این مطالعه از ۸ سرموش صحرایی، نژاد ویستار با سن تقریبی ۲ ماه استفاده شد. غذای حیوان، پلیت‌های آماده تهیه شده از شرکت به پخش بود. موش‌ها ابتدا با کلروفرم بیهوش شدند. سپس استخوانهای ران و ساق جدا شد. بافتهای اطراف استخوان‌ها به طور کامل پاک شد و استخوانها داخل محیط DMEM(Dulbecco Modified Eagle Medium, Gibco, UK) حاوی ۱۵٪ FBS(Fetal Bovine Serum, Gibco, UK) با دمای٤ درجه سانتی گراد قرار گرفت و به زیر هود منتقل شد. دو سر استخوانها با یک قیچی کاملا استریل بریده شد و مغز استخوان از داخل کانال استخوانی با عمل Flush خارج شد. بدین ترتیب که ابتدا سرسوزن شماره۲۲ متصل به سرنگ حاوی محیط DMEM دارای ۱۵٪ سرم FBS، ۱۰۰ واحد بین المللی پنی سیلین(Gibco, UK) و ۱۰۰ واحد بین المللی استرپتومایسن(Gibco, UK) از سر استخوان وارد کانال استخوانی شد. سپس با فشار پیستون، محیط داخل سرنگ به داخل کانال هدایت شد، به طوری که تحت این عمل مغز استخوان شتشو شده از سر دیگر استخوان خارج شد. مغز استخوان به داخل لوله‌های ۱۵ میلی لیتری هدایت شد و به مدت ۵ دقیقه با دور۱۲۰۰ در دقیقه سانتریفوژ شد. سپس محیط رویی خارج و رسوب سلولی در ۱ میلی لیتر محیط تازه معلق شد. سلولها با استفاده از لام نئوبار شمارش شدند و به تعداد ۱۰۵×۵ سلول در سانتیمترمربع در فلاسک‌های ۲۵ سانتیمتر مربعی کشت شدند. دو روز پس از آغاز کشت، محیط کشت دور ریخته شد و محیط تازه حاوی لیتیوم کلراید با غلظتهای ۱، ۲، ۵، ۷ و ۱۰ میلی مولار اضافه شد. تعویض محیط هر ۳ روز یک بار انجام شد. سلولها با انجام سه پاساژ متوالی تکثیر گردیدند. تراکم سلولی برای شروع پاساژ سلولی ۱۰۵ سلول در سانتیمتر مربع بود. به ازای سلولهای مغز استخوان هر موش صحرایی، چندین فلاسک تهیه شد. برخی از این فلاسک‌ها برای انجام سنجش تعداد CFU-F در کشت اولیه استفاده شد. برخی در مراحل پاساژ سلولی برای تعیین میزان دوبرابر شدگی جمعیت سلولی مصرف شد و بالاخره برخی دیگر در پاساژ سه برای تعیین منحنی رشد استفاده شد.

سنجش پتانسیل کلونی زایی

دوازده روز پس از آغاز کشت اولیه، به کشت سلول در گروههای مختلف با غلظت‌های مختلف کلرید لیتیوم و کنترل (بدون لیتیوم) با انجام رنگ آمیزی کریستال ویولت (۰/۵٪ کریستال ویولت در متانول) خاتمه داده شد.. کلون‌های تشکیل شده در گروههای تیمار و کنترل در زیر میکروسکوپ نوری مشاهده شده و عکس برداری شد. سپس کلونیها مورد شمارش قرار گرفته، قطر آنها نیز اندازه گیری شد.. در این مطالعه سنجش پتانسیل کلنی زایی برای سلولهای ۸ سر موش تکرار شد.

تعداد دو برابر شدگی جمعیت سلولی

Population Doubling Number (PDN)

اندازه‌گیری PDN برای تعیین پاسخ سلولها به شرایط کشتی

www.SID.ir

Archive of SID

حاوی مواد محرک یا بازدارنده از قبیل تغییر در غلظت مواد غذایی، آثار هورمونی یا داروهای سمی استفاده می‌شود. در این مطالعه، تعداد دو برابر شدگی جمعیت برای سلولهای پاساژهای اول، دوم و سوم بررسی شد. بدین ترتیب که ۷ روز پس از آغاز پاساژ سلولی، کشت سلول تریپسینه شد و سلولها با لام نئوبار شمارش و طبق فرمول (PDN=(logN/N0 3.31×دوبرابر شدن جمعیت سلولی محاسبه شد. در این فرمول N تعداد سلول در پایان دوره کشت و N0 تعداد سلول در آغاز دوره کشت است. تعداد دو برابر شدن جمعیت کل، تحت تأثیر غلظتهای مختلف کلرید لیتیوم ونمونه کنترل در کل دوره کشت شامل پاساژهای اول، دوم و سوم طبق فرمول Total population doubling= PDp1+PDp2+PDp3 محاسبه شد

زمان دو برابر شدن جمعیت

مدت زمان لازم برای اینکه تعداد سلولهای بنیادی مزانشیمی تحت تیمارهای خاص دوبرابر شوند طبق فرمول زیر برای کل دوره کشت محاسبه شد.

$$Doubling\ Time = \frac{Total\ Time\ of\ cell\ culture}{Total\ Population Doubling}$$

منحنی رشد

سلولها بعد از کشت از طریق یک الگوی رشد شامل فاز lag ، فاز log یا تکثیر و فاز پلاتو یا سکون پیش می‌روند. در این مطالعه سلولهایی که تحت تیمارهای مختلف کلرید لیتیوم تا پاساژ سوم کشت شده بودند از لحاظ منحنی رشد مورد مقایسه قرار گرفتند.. برای رسم منحنی رشد، ابتدا سلولها به تعداد ٤×١٠٤ سلول در هر چاهک پلیت ٦ چاهکی کشت شدند. بعد از ۱۲ ساعت که سلولها به کف ظرف چسبیدند و مورفولوژی طبیعی خود را پیدا کردند با غلظتهای ۲،۱ ، ۵ ،۷ و۱۰میلی مولار کلرید لیتیوم تیمار شدند. کشت سلول به مدت ۷ روز ادامه یافت و به طور روزانه تعداد سلولها شمارش و ثبت شد. براساس تعداد سلول در هر روز منحنی رشد ترسیم شد.

آنالیزهای آماری

در مطالعه حاضر آزمون آماری ANOVA و DUNCAN برا ی مقایسه نتایج استفاده شد. نتایج به دست آمده حاصل میانگین ۸ بار تکرار آزمایش بود. داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف از استاندارد(SD) بیان شدند. تفاوت‌های با $p<0.05$ معنی دار در نظر گرفته شد.

تمایز به استخوان و چربی

به منظور اثبات ماهیت مزانشیمی سلولهای مورد مطالعه، از آزمایش تمایز به استخوان و چربی استفاده شد. برای این منظور از سلولهای پاساژ سوم استفاده شد. حدود ۲۰۰ هزار سلول شمارش شده و در هر چاهک پلیت ٦ چاهکی، در محیط DMEM/%15FBS حاوی آنتی بیوتیک کشت شدند. بعد از اینکه کف چاهکها توسط سلولها پوشیده شد، محیط سلولها با محیط حاوی القاء کننده‌های تمایز تعویض شد. محیط تمایز به استخوان شاملDMEM محتوی ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر اسکوربیک اسید ۳-فسفات (Sigma, USA)، ۱۰نانومولار دگزامتازون (Sigma, USA) و ۱۰ میلی مولار بتا گلیسرول فسفات (Sigma, USA) بود. محیط تمایز به چربی شامل DMEM حاوی ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر اسکوربیک اسید ۳-فسفات (Sigma, USA)، ۱۰۰ نانومولار دگزامتازون (Sigma, USA) و ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر ایندومتاسین بود (Sigma, USA) [۲۰]. ارزیابی تمایز سه هفته بعد از القا انجام شد. بدین منظور از رنگ آمیزی آلیزارین رد برای استخوان و از رنگ آمیزی اویل رد برای چربی استفاده شد.

www.SID.ir

Archive of SID

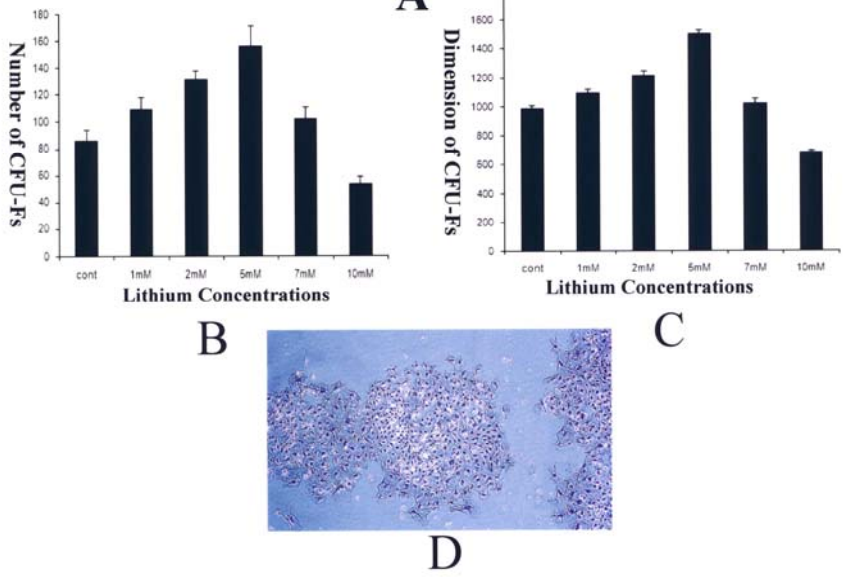
یافته‌ها

پتانسیل کلونی زایی سلولهای بنیادی مزانشیمی

آزمون کلنی زایی برای سلولهای بنیادی مزانشیمی در کشت اولیه انجام شد. میانگین تعداد و قطر کلونیها در گروههای مختلف تیمار و گروه کنترل در شکل ۱A نشان داده شده است. بر اساس این نتایج تعداد کلونیها (شکل ۱B) در گروههای مختلف تیمار و گروه کنترل به طور معنی داری متفاوت بودند ($p<0.001$) و فقط بین گروه ۱و ۷ میلی مولار اختلاف معنی داری برقرار نبود. بررسی قطر کلونیها (شکل ۱C) نشان داد، بزرگترین کلونیها در گروه ۵ میلی مولار با قطر۲۷/۸۳±۱۵۰۱/۰۵ میکرومترو(شکل ۱D) و کوچکترین در گروه ۱۰ میلی مولار با قطر ۲۱/۶۲ ±۶۷۹/۱۰ میکرومتر ایجاد شدند. میانگین قطر کلونی در گروه کنترل ۲۳/۶۱ ±۹۸۶/۶۲ بود ($p<0.001$). قطر کلونیها در گروه ۷ میلی مولار با قطر آن در گروه کنترل اختلاف معنی داری نداشت.

	تعداد کلونی ها	قطر کلون ها
۱ میلی مولار	۱۰۹/۱۲±۸/۶۴	۱۰۹۴/۰۱± ۲۹/۵۷
۲ میلی مولار	۱۳۱/۵۰ ±۵/۹۷	۱۲۱۲/۰۵± ۳۱/۰۸
۵ میلی مولار	۱۵۶/۲۵±۱۴/۹۰	۱۵۰۱/۰۵±۲۷/۸۳
۷ میلی مولار	۱۰۱/۸۷± ۸/۶۵	۱۰۲۲/۲۷± ۳۱/۶
۱۰ میلی مولار	۵۳/۲۵±۵/۸۰	۶۷۹/۱۰± ۲۱/۶۲
کنترل	۸۶/۰۰± ۷/۸۳	۹۸۶/۶۲± ۲۳/۶۱

A



B C

D

شکل ۱. A: میانگین تعداد و قطر کلونیهای ایجاد شده در گروه کنترل و گروههای تیمار با غلظت های مختلف کلرید لیتیوم. B: گراف مربوط به مقایسه تعداد کلونیها. C: گراف نشان دهنده تفاوتهای گرو هها ی مختلف و کنترل از لحاظ قطر کلونیهای تشکیل شده. D: کلونیهای رنگ شده با کریستال ویولت. اختلاف معنی داری بین میانگین تعداد کلونیها و همچنین قطر کلونیها در گروههای تیمار و گروه کنترل وجود دارد ($p<0.001$)

تعداد دو برابر شدگی جمعیت (PDN)

میانگین تعداد دوبرابر شدن در گروههای مختلف تیمار و گروه کنترل در کل دوره کشت (پاساژ اول، دوم و سوم) در شکل ۲A نشان داده شده است. بر اساس آنالیز آماری اختلاف

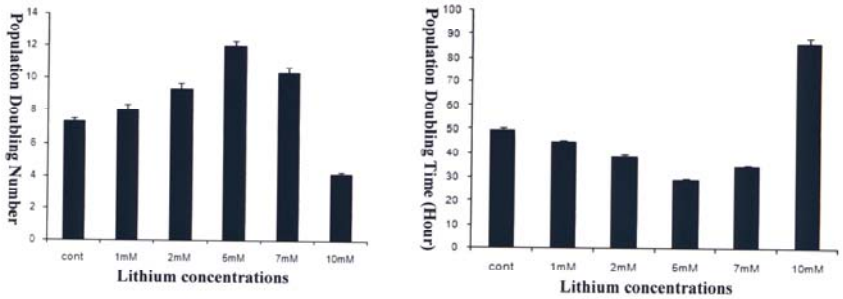
www.SID.ir

Archive of SID

معنی داری بین میانگین PDN کـل(شـکل 2B) در گروههـای مورد مطالعه وجود داشت (p<0.001). نتایج نـشان داد کـه از این نظر بهترین غلظت، ۵ میلی مولار لیتیوم بوده که تحت این غلظـت، سـلولها در طـول دوره کـشت بـه طـور متوسـط ۱۲/۰۲±۰/۱۱۹ بـار دوبرابـر شـدند. در نمونـه کنتـرل تعـداد دوبرابر شدن به طور متوسط ۷/۳۰±۰/۱۵۳ بود (شکل 2B).

	پاساژ اول	پاساژ دوم	پاساژ سوم	مجموع
۱ میلی مولار	۲/۲۹±۰/۰۵۳	۲/۵۸±۰/۰۵٤	۳/۱۸±۰/۰٦۹	۸/۰۱±۰/۱۲۹
۲ میلی مولار	۲/۴۹±۰/۰۷۰	۲/۸۳±۰/۰٦۹	۳/۸۳±۰/۰۸۲	۹/۳۴±۰/۳۱٤
۵ میلی مولار	۳/۱۹±۰/۰٤۷	۳/۹۸±۰/۱۰۲	٤/۸۰±۰/۰۹۰	۱۲/۰۲±۰/۱۱۹
۷ میلی مولار	۲/۷۹±۰/۰۳۸	۳/۳۰±۰/۰۷۸	٤/۳۳±۰/۰۷۱	۱۰/۳۲±۰/۳٦٦
۱۰ میلی مولار	۱/۲۵±۰/۰٤۲	۱/۳۰±۰/۰٦۳	۱/٦۵±۰/۰۷۱	۴/۱۷±۱/۱٤۱
کنترل	۲/۱۴±۰/۰٦۷	۲/۴۲±۰/۰٦۱	۲/۷۳±۰/۰۸۱	۷/۳۰±۰/۱۵۳

A



B C

شکل ۲. A: میانگین PDN در گروههای مختلف در طی پاساژهای ۳-۱ و میانگین PDN کل. B: گراف مربوط به مقایسه میـانگین PDN کـل در گروههـای مختلف. اختلاف معنی داری بین میانگین دوبرابر شدن جمعیت سلولی در کل دوره کشت در گروههای مختلف تیمار و گروه کنتـرل وجـود دارد (p<0.001). C: گراف مربوط به مقایسه میانگین زمان هر PDN . از این نظر نیز بین گروههای مختلف اختلاف معنی دار است (p<0.001). بهترین غلظت ۵ میلی مـولار لیتیوم بوده و غلظت ۱۰ میلی مولار باعث کاهش تکثیر می شود

زمان دو برابر شدن جمعیت

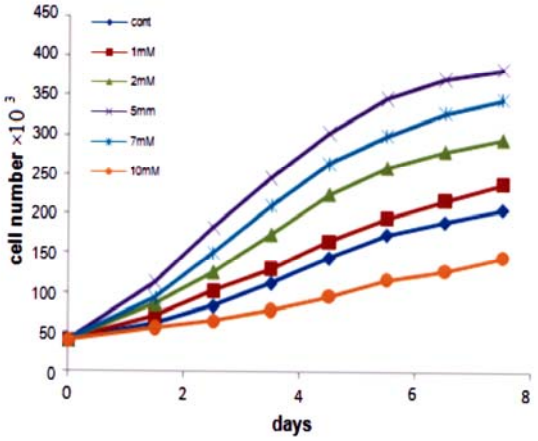
زمان دو برابر شدن جمعیت سلولی برای سلولهای تیمار شـده با غلظتهای مختلف لیتیوم در طـول دوره کـشت (پاسـاز اول، دوم و سوم) محاسبه شد. نتایج نشان داد که سـلولهای کـشت شده در غلظتهای ۱، ۲، ۵، ۷ و ۱۰ میلی مولار کلرید لیتیوم به ترتیـب هـر ٤٤/۸۹±۰/۷۳٤، ۳۸/۵۸±۱/۲۳ ، ۲۹/۳۰±۰/۳۰۲ ، ۳٤/٦۵±۰/٦۳۲ و ۸٦/۲٤±۲/۹٤ ساعت یک بار دوبلـه شـده و نمونه کنترل به طور متوسط هر ٤۹/۳۰±۱/۰۵ ساعت یک بـار دوبرابر شده بود. بر اساس انالیز آماری کمترین زمان به گـروه ۵ میلی مولار اختصاص داشت که از این نظـر بـا گـروههـای دیگر تفاوت آماری داشت (شکل 2C). تفاوت بین گروههای دیگر نیز معنی دار بود. (p<0.001).

منحنی رشد

بررسی رشد روزانه سلولهای پاساژ سوم طی هفت(شکل 3C) روز نشان داد که انتهای فاز log در گروه ۲، ۵ و۷ میلی مـولار به ترتیب ٦/۵ ، ٤/۹ و٦/۵ روز بعد از کشت است که اختلاف معنی داری بین گروه ۵ میلی مولار با دو گـروه دیگـر برقـرار بود (p<0.001). اما گروههـای کنتـرل،۱ و۱۰ میلـی مـولار در مدت کشت در فاز log با سرعت رشد پایین قـرار داشـتند. در منحنی رسم شده که بر اساس شمارش روزانه سـلول ترسـیم شده بود. فاز Lag به چشم نمی خـورد. بـه عبـارتی در تمـام گروههای مورد مطالعه از همان ابتدای کشت منحنی رشد یک شیب ملایمی داشت که البته این شـیب در گـرو ههـای ۲ ، ۵ و۷ میلی مولار تندتر بود.

www.SID.ir

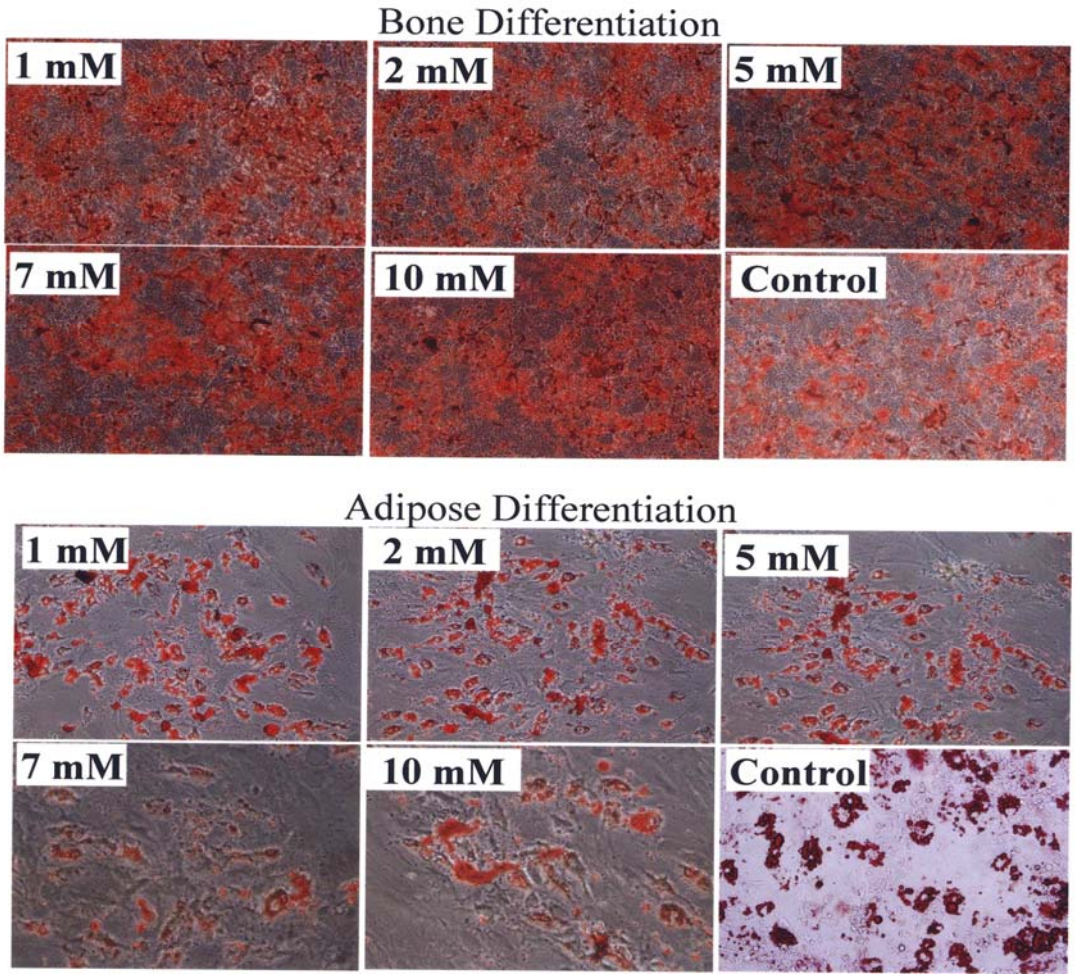
Archive of SID



شکل ۳. منحنی رشد سلولها تحت غلظتهای مختلف لیتیوم. نمودار نشان می دهد که سلولها در گروه ۲، ۵ و ۷ میلی مولار لیتیوم رشد بیشتری نسبت به گروه کنترل و دیگر گروههای لیتیوم دارند. در این گروهها منحنی شیب بیشتری دارد و سریع تر به فاز plateau می رسد. گروه کنترل ،۱ و ۱۰ میلی مولار د ر مدت کشت به فاز plateau نمی‌رسند.

بررسی تمایز

سلولهای بنیادی مزانشیمی پاساژ سوم که به مدت سه هفته تحت تاثیر محیط استئوژنیک و آدیپوژنیک قرار کرفته بودند با استفاده از رنگ آمیزی آلیزارین رد برای استخوان و رنگ آمیزی اویل رد برای چربی مورد رنگ آمیزی قرار گرفتند. ماتریکس معدنی ایجاد شده در محیط استئوژنیک، به وسیله آلیزارین رد به رنگ قرمز در آمدند. لیپیدهای داخل سلولهای چربی نیز به وسیله اویل رد قرمز رنگ شدند. پتانسیل تمایز به استخوان و چربی نشان دهنده هویت مزانشیمی سلولهای مورد مطالعه بود.



شکل ٤. تمایز به استخوان و چربی سلولهای تکثیر یافته در حضور غلظت های مختلف کلرید لیتیوم و کنترل. تمایز استخوانی با آلیزارین رد و تمایز به چربی با اویل رد رنگ شده است.

www.SID.ir

Archive of SID

بحث

از آنجـا کـه تکثیـر سـلولهای بنیـادی مزانـشیمی در شـرایط آزمایشگاهی در اثر کشت طولانی مدت کاهش می‌یابد [١٤] و از طرفی برای مطالعات آزمایشگاهی و کاربردهای درمانی بـه تعداد زیـادی از سـلولها نیـاز اسـت در مطالعـه حاضـر آثـار میتوژنیکی کلرید لیتیوم بـر افـزایش تکثیـر سـلولهای بنیـادی مزانشیمی مغز استخوان رت بررسی شد. نتایج حاصـل نـشان داد که حضور کلرید لیتیوم با غلظت ۵، ۲ و ۱ میلی مـولار در محیط کشت سلولهای بنیادی مزانشیمی سبب افزایش سرعت رشد سلولی در مقایسه با گـروه کنتـرل (محـیط فاقـد کلریـد لیتیوم) می‌شود. در این میان سـرعت رشـد در گـروه ۵ میلـی مولار بیش از سایر گروهها بود.. افزایش توان تکثیر سـلولهای بنیادی مزانشیمی از مدت‌ها پیـشتر مـورد توجـه پژوهـشگران بوده است بـه طـوری کـه تـا بـه حـال بـرای ایـن منظـور از روش‌های مختلفی از جمله افزودن برخـی فاکتورهـای رشـد نظیرFibroblast Growth Factor به محـیط کـشت ایـن سـلولها استفاده شده است [٢١]. مطالعـه حاضـر نیـز تلاشـی در ایـن راستا بوده و با افزودن کلرید لیتیوم بـه عنـوان محـرک مـسیر Wnt سعی بر این داشت که میزان و سـرعت تکثیـر سـلولهای بنیادی مزانشیمی را افزایش دهد.

به دنبال مطالعه ای در سال ٢٠٠٤ عنـوان شـد کـه فعالـسازی مسیر Wnt به وسـیله کلریـد لیتیـوم و محـیط حـاوی Wnt3A سبب افزایش تکثیر سلولهای بنیادی مزانشیمی انسانی می‌شود [١٩]. طبق این گزارش تکثیر سلول بنیـادی مزانـشیمی انـسان وابسته به دوز کلرید لیتیوم بوده و غلظـت بـالاتر از ١٠ میلـی مولار سبب کاهش تکثیـر شـده و در ایـن ارتبـاط مناسـبترین غلظت ٤ میلی مولار گزارش شد. در مطالعه حاضر ۵ غلظـت متفاوت شامل ١، ٢، ٥ ، ٧ و ١٠ میلی مـولار از کلریـد لیتیـوم انتخاب شد و غلظت‌هایی که در مطالعه پیشین گـزارش شـده بود تکثیر را مهار می‌نمایند (غلظت‌های بالای ١٠ میلی مولار) حذف شد. این غلظت‌ها در کشت اولیه تا پاساژ سوم سـلولها به محیط کشت اضافه شد و تاثیر آن بر تکثیر سلولی بررسـی شد نتایج نشان داد که غلظت‌های زیر ٤ میلی مولار شامل ١ و ٢ میلی مولار نیز تاثیرات میتوزنیک بر کـشت سـلولهای مغـز استخوان دارد.

در مطالعـه پیـشین دبـائر (De Boer) و همکـاران [١٩] تـاثیر حضور کلرید لیتیوم بر کشت اولیه و کلـونی زایـی سـلولهای مغز استخوان را نادیده گرفتند که این امـر در مطالعـه حاضـر بررسی شد. بر اساس نتایج به دسـت آمـده ، در کـشت اولیـه گروههای تیمار با کلرید لیتیوم و کنترل، تعداد کلونیهای ایجاد شده متفاوت بود. بیشترین تعـداد کلـونی در غلظـت ۵ میلـی مولار و کمترین تعداد آنها در غلظت ١٠ میلـی مـولار وجـود داشت. با توجه به اینکه تعداد کلونیها در کشت اولیه نماینـده تعداد سلولهای بنیادی مزانشیمی با خاصیت کلـونی زایـی در مغز استخوان است به نظر می‌رسد که در غلظت ۵ میلی مولار کلرید لیتیـوم تعـداد بیـشتری از سـلولهای بنیـادی مزانـشیمی موجود در مغز استخوان تحریک بـه تکثیـر و تـشکیل کلـونی شده اند. تاثیرات تکثیری کلرید لیتیوم نتیجه ای از خاصیت آن در مهار GSK-3β است که سبب فعال شدن مسیر Wnt شده ، در نهایت تکثیر سلولی تحریک مـی‌شـود [١٦-١٥]. تـاثیرات تکثیری کلرید لیتیوم در اندازه کلونیهـای ایجـاد شـده نیـز بـه خوبی مشهود بود.

همچنین در مطالعـه حاضـر بـر خـلاف De Boer و همکـاران [١٩]، برای سلولهای حاصل از پاساژ سوم گروههای مختلـف منحنی رشد رسم شد و فاز لگاریتمی آنها با هم مقایـسه شـد. بر اساس نتایج سلولهای تکثیر یافته در حضور غلظت ۵ میلی مولار طی ٤/٩ روز فاز لگاریتمی را طـی کـرده و بـه مرحلـه اشباع رسیدند. این در حالی بود که طی این مدت گروه کنترل و غلظت‌های ١ و ١٠ میلی مولار هنـوز در مرحلـه Log قـرار داشتند. از طرف دیگر شاخص‌های PDN و DT نـشان دهنـده

www.SID.ir

Archive of SID

این واقعیت بود که سرعت تکثیر سلولهای مغز استخوان در گروه‌های تیمار با غلظت‌های۲، ۵ و ۷ میلی مولار نیز افزایش یافته است. تمام این نتایج نشانگر تاثیرات میتوژنیک کلرید لیتیوم بر کشت سلولهای مغز استخوان است و بیانگر نتایج دبائر (De Boer) و همکاران است.

اگر چه تلاشهای زیادی برای شناسایی نشانگرهای سطحی سلولهای بنیادی مزانشیمی انجام شده است، با این وجود نشانگر ویژه منفردی معرفی نشده است. در این ارتباط چندین نشانگر از جمله CD133 ، LNGFR(Low affinity nerve growth factor receptor) و STRO-1 برای سلولهای بنیادی مزانشیمی انسانی پیشنهاد شده است ولی برای سلولهای بنیادی مزانشیمی حیوانی نشانگر اختصاصی ذکر نشده است [۲۴-۲۲]. به همین دلیل در مطالعات پیشین از توان تمایز سلولی برای ارزیابی بنیادی مزانشیمی استفاده شده است [۲۷-۲۵]. در این مطالعه نیز با تمایز سلولهای جدا شده به رده‌های استخوان و چربی ماهیت بنیادی مزانشینمی آنها به اثبات رسید. بر اساس نتایج رنگ آمیزی به نظر رسید که در گروه‌های تیمار شده با کلرید لیتیوم در مقایسه با گروه کنترل ماتریکس معدنی بیشتری تشکیل شده است. این نتایج نشان دهنده این است که تمایز به استخوان سلولهای تکثیر شده در حضور کلرید لیتیوم تا حدودی در مقایسه با گروه بدون کلرید لیتیوم (گروه کنترل) تقویت می‌شود. البته اثبات این موضوع به مطالعه بیشتری نیاز دارد. به عبارتی دیگر روش بررسی تمایز به استخوان در مطالعه حاضر که یک روش کیفی بود به تنهایی کاهش پتانسیل تمایز به استخوان را اثبات نمی کند بلکه برای اثبات این موضوع به کار گیری روشهای کمی تمایز ضرورت دارد.

روی هم رفته به نظر می‌رسد با حضور غلظتهای ۲، ۵ و ۷ میلی مولار کلرید لیتیوم در کشت سلولهای مغز استخوان موش صحرایی میزان کلونیهای ایجاد شده در کشت اولیه افزایش یافته و PDN و DT به عنوان شاخص سرعت رشد بهبود می‌یابد. این در حالی است که توان تمایز به استخوان و چربی این سلولها حفظ می‌شود.

References

1. **Friedenstein AJ, Chailakhajan RK, Lalykina KS.** The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. Cell Tissue Kinet 1970: 3:393-403.
2. **Periera RF, Halford KW, OHara 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 Nalt Acad Sci 1995; 92: 4857-61.
3. **Pittenger MF, Makay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD et al.** Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science 1999; 248:143-147.
4. **Nardi NB, Meirelles Ld.** Mesenchymal stem cells: isolation, in vitro expansion and characterization. Handb Exp Pharmacol 2006; 174:249-82.
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

www.SID.ir

Archive of SID

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. **Noth U, Osyczka AM, Tuli R, Hickok NJ, Danielson KG, Tuan RS.** Multilineage mesenchymal differentiation of human trabecular bone-derived cells. J Ortho Res 2002; 20: 1060-1069.
10. **Wickham MQ, Erickson GR, Gimble JM, Vail TP, Guilak F.** Multipotent stromal cells derived from infrapatellar fat pad of knee. Clin Ortho 2003; 196-212.
11. **Jankowsk RJ, Deasy BM, Huard J.** Muscle-derived stem cells. Gene therapy 2002; 9:642-647.
12. **Miura M, Grothos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robery PG et al.** Stem cells from human exfoliated deciduous teeth. Proceed nation acad Sci USA 2003; 100: 5807-5812.
13. **De bari C, Dell'Accio F, Tylzanowski P, Luyten FP.** Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. J cell Biol 2001; 44: 1928- 1942.
14. Yeon Lim J, Jeun SS, Lee KJ, Oh JH, Kim SM, Park SI, et al. Multiple stem cell traits of expanded rat bone marrow stromal cells. Experimental Neurology 2006; 199:416-426.
15. **Stefan H, Claire LK**. Wnt signalling: variety at the core. J cell science 2007; 120: 385-393.
16. **Stambolic V, Ruel L,Woodgett JR.** Lithium inhibits glycogen synthase kinase-3 activity and mimics wingless signalling in intact cells. Curr Bio 1996; 6:1664–1668.
17. **Yoshino JE, DeVries GH.** Effect of lithium on Schwann cell proliferation stimulated by axolemma- and myelin-enriched fractions. J Neurochem 1987; 481270-7.
18. **Smits VA, Essers MA, Loomans DS, Klompmaker R, Rijksen G, Medema RH.** Inhibition of cell proliferation by lithium is associated with interference in cdc2 activation. FEBS Lett 1999; 20;457:23-7.
19. **De Boer J, Wang HJ, Van Blitterswijk C.** Effects of Wnt signaling on proliferation and differentiation of human mesenchymal stem cells. Tissue Engineering 2004; 10:393-401.
20. **Peister A, Mellad JA, Larson BA, Hall BM, Gibson LF, Prockop DJ.** Adult stem cells from bone marrow (MSCs) isolated from different strains of inbredmice vary in surface epitopes, rates of proliferation, and differentiation potential. Blood 2004;103:1662-8.
21. **Martin I, Muraglia A, Campanile G, Cancedda R, Quarto R.** Fibroblast growth factor-2 supports ex vivo expansion and maintenance of osteogenic precursors from human bone marrow. Endocrin 1997; 138: 4456-4462.
22. **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; 3:869-876.
23. **Quirici N, Soligo D, Bossolasco P, Servida F, Lumini C, Deliliers GL.** Isolation of bone marrow mesenchymal stem cells by anti-nerve growth factor receptor antibodies. Exp Hematol 2002; 7:783-791.
24. **Gronthose S, Simmons PJ.** The growth factor requirements of STRO-1-positive human bone marrow stromal precursors under serum-derived condisions in vitro. Blood 1995; 85: 929-940.
25. **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.
26. **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: 1662-1668.
27. **Sun S, Guo Z, Xiao X, Liu B, Liu X, Tang P-H et al.** Isolation of mouse marrow mesenchymal progenitors by a novel and reliable methods. Stem cells 2003; 21: 527-535.

www.SID.ir