کارگاه های آموزشی مرکز اطلاعات علمی جهاد دانشگاهی

کارگاه آنلاین آشنایی با پایگاه های اطلاعات علمی
بین المللی و
ترفند های جستجو

کارگاه آنلاین
روش تحقیق و مقاله نویسی علوم انسانی

کارگاه آنلاین
پرپوزال نویسی و پایان نامه نویسی

مطالعه اثر Leukemia Inhibitory Factor بر روی تمایز و همانندسازی سلولهاي بنیادی مزانشیمی در محیط کشت

مرتضي جبارپور بنيادي*[۱و۲]، نگار مهدوي[۱]
[۱]دانشکده علوم طبیعی دانشگاه تبریز، [۲]مرکز تحقیقات کاربردي دارويي و مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه علوم پزشکي تبریز
تاریخ پذیرش: ۸۴/۷/۱۶ ، تاریخ دریافت: ۸۴/۵/۳

The effect of Leukemia Inhibitory factor on self-renewal and differentiation of mesenchymal stem cells in vitro

*Jabbarpour Bonyadi M.[1,2], Mahdavi N.[1]
[1]Faculty of Natural Sciences, University of Tabriz, [2]Drug Applied Research Center & Biotechnology Research Center, Tabriz University of Medical sciences
Received: 2005/7/25 , Accepted: 2005/10/8

Objectives: Multipotent mesenchymal stem cells (MSc) have been known for a long period of time. These cells are adherent, clonogenic and fibroblastic and can be isolated from bone marrow stroma of postnatal organisms. Under appropriate conditions, these cells can give rise to broad spectrum of fully differentiated connective tissues including cartilage, bone, adipose tissues and muscle cells. Upon the isolation of cells in vitro, these cells tend to differentiate and it is very difficult to direct these cells into self-renewal in order to get more Multipotent MSc for medical purposes. In this study, the effect of leukemia inhibitory factor (LIF) on MSc has been investigated. In the presence of LIF, embryonic stem cells proliferate without differentiation. However the effect of LIF on MSc has not been fully investigated. **Methods:** Bone marrow stroma cells were extracted from 2-month-old and 8-month-old mice. These cells were cultured in a medium containing LIF. After formation of colonies, cells were stained by methylen blue. The activity of alkaline Phosphatase was also investigated. To study the effect of LIF on self-renewal ability of MSc, cells were cultured in a primary culture containing LIF. Colonies formed in the primary cultures, were harvested and re-cultured. The number and size of colonies compared with these cultured without LIF. **Results:** In the presence of LIF, cells tend to express alkaline phosphatase enzyme more than control cells. However, in the presence of LIF in primary culture, there was no difference in the number of colonies. The size and number of colonies in secondary culture were significantly increased among those cells grown in the presence of LIF in primary culture. The number and quality of colonies did not show any significant difference among those cells extracted from 2-month-old and 8-month-old mice. **Conclusion:** The presence of LIF in primary culture does not affect the number of colonies formed. However, most of the cells in the primary culture express alkaline phosphatase. These cells tend to differentiate into bones. The presence of LIF in primary culture increases the self renewal ability of cells. Also these cells have more proliferation ability in comparison with control cells. The numbers of mesenchymal stem cells with aging do not decrease. Therefore, mesenchymal stem cells do not age and their number stays constant during the lifetime.
Key words: *LIF, MSc, Alkaline Phosphatase, Self-renewal, differentiation.*

زمینه و هدف: سلولهاي مزانشیمي بنیادي که قابل استخراج از مغز قرمز استخوان در حیوانات بالغ بوده و سالها پیش شناسایی شده اند، توانائي همانندسازي و تمایز به سلولهاي متعددي نظیر سلولهاي چربي، استخواني، غضروفي و ماهیچه اي در شرایط خاص را دارا میباشند. این سلولها قابلیت چسبیدن، توانايي تشکیل کلونی و ایجاد سلولهای مشابه فیبروبلاستی را دارا هستند. به محض استخراج و کشت در محیط کشت آزمایشگاهی، این سلولها تمایل زیاد به تمایز یافتن داشته و وادار کردن آنها به همانندسازی جهت کاربرد در امور پزشکی و درمانی خیلی دشوار است. جهت وادار کردن این سلولها به همانندسازي در محیط کشت آزمایشگاهي و جلوگیري از تمایز ناخواسته آنها، تاثیر فاکتور Leukemia Inhibitory Factor (LIF) نوترکیب در مراحل مختلف مورد مطالعه قرار گرفت. اثر فاکتور LIF بر روی سلولهای بنیادی جنینی در وادار کردن آنها به همانندسازی، مشخص بوده ولی تاثیر آن بر روی سلولهای مزانشیمی بنیادی بطور کامل بررسي نشده است. همچنین در این مطالعه تاثیر پیري بر روي تعداد و رفتار سلولهاي مزانشیمي بنیادي بررسی گردید. **روشها:** مغز قرمز استخوان از موشهاي جوان ۲ ماهه و نسبتاً پیر ۸ ماهه استخراج و در شرایط کاملاً استریل در محیط کشت آلفا مینیموم استشیال مدیوم (αMEM) که حاوي فاکتور LIF با غلظت ۱۰۰۰U/ml بود، کشت داده شد. تعداد کلونیهاي حاصل شده و نوع سلولهاي تشکیل دهنده آنها با استفاده از رنگ آمیزي هاي متیلن بلو و الکالین فسفاتاز در زیر میکروسکوپ نوری مطالعه و این سلولها با سلولهاي کنترل که در همان محیط کشت در غیابLIF رشد داده بودند، مقایسه گردیدند. تاثیر پیري بر روي توانائی سلولهاي بنیادي مزانشیمي در تکثیر و همانندسازی آنها با استفاده از سلولهای بنیادی مزانشیمی استخراج شده از استخوانهای موشهای پیر مورد مطالعه قرار گرفت. **یافته ها:** تعداد سلولهاي بنیادي مزانشیمي در کشت اولیه حاوي فاکتور LIF با غلظت ۱۰۰۰U/ml تفاوتي با سلولهاي کنترل نشان نداده ولي این سلولها اکثراً الکالین فسفاتاز را بیان میکردند. حضور فاکتور LIF در محیط کشت اولیه، باعث افزایش معني دار در تعداد کلونیها و اندازه آنها در محیط کشت ثانویه گردید. تعداد و رفتار سلولهاي مزانشیمي بنیادي استخراج شده از موشهاي جوان و پیر تفاوتي نداشتند. **نتیجه گیري:** فاکتور LIF باعث افزایش قابلیت همانندسازي و تقسیم سلولهاي مزانشیمي میگردد. در حضور فاکتور LIF سلولها بیشتر آلکالین فسفاتاز را بیان کرده و تمایل به تمایز یافتن در جهت سلولهاي استئوبلاست را دارند. پیري تاثیر قابل توجهي در تعداد سلولهاي بنیادی مزانشیمي و رفتار آنها نداشته است.
واژه هاي کلیدي: *LIF، همانندسازي* (Self-Renewal)، Alkaline Phosphatase، *سلولهاي بنیادي مزانشیمي* (MSc).

*نویسنده مسئول: دکتر مرتضي جبارپور بنیادي، استادیار، دانشکده علوم طبیعی دانشگاه تبریز، مرکز تحقیقات کاربردي دارويي و مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه علوم پزشکي تبریز،تلفن: ۳۳۶۳۲۳۴، نمابر: ۳۳۶۳۲۳۱

**Corresponding Author: Dr Morteza Jabbarpour Bonyadi, Assistant Professor of Molecular Medical Genetics, Faculty of Natural Sciences, University of Tabriz, Drug Applied Research Center, Tabriz University of Medical sciences, Tel:3363234; Fax: 3363231; E-mail:bonyadim@tbzmed.ac.ir*

۱- مقدمه

سلولهاي بنيادي، توانائي منحصر به فرد همانندسازي و تمايز يافتن به اكثر سلولهاي مختلف بدني را دارا هستند. بر اساس محل استخراج، اين سلولها را به دو گروه سلولهاي بنيادي جنيني Embryonic Stem Cells و سلولهاي بنيادي بالغ Adult Stem Cells تقسيم بندي ميكنند. سلولهاي بنيادي جنيني توانائي تمايز يافتن به تمامي انواع سلولهاي مختلف بدني را دارا بوده و اين سلولها را سلولهاي Pluripotent مينامند در صورتيكه سلولهاي بنيادي بالغ تنها توانائي تمايز به تعداد محدودي از سلولها را دارا ميباشند كه بر اين اساس سلولهاي بنيادي بالغ سلولهاي Multipotent ناميده ميشوند (۱).

جايگاه سلولهاي بنيادي مزانشيمي در مغز قرمز استخوان بوده و اين سلولها توانائي تمايز به سلولهاي استئوبلاست، سلولهاي چربي، سلولهاي ماهيچه‌اي، و سلولهاي غضروفي (۳-۲) را دارند. هرگونه نقص در عملكرد اين سلولها ميتواند منجر به بروز عوارض و بيماريهايي نظير پوكي استخوان و يا استئوپروزيز گردد (۴). سلولهاي بنيادي مزانشيمي (MSc) از سال ۱۹۶۸ (۵) تحت بررسي بوده اند. در آن سال، محققين به سلولهايي از مغز قرمز استخوان دسترسي يافتند كه قابليت چسبيدن به سطح ديشهاي محيط كشت و ايجاد كلونيهاي مشابه كلوني فيبروبلاست داشتند. بر اين اساس كه اين سلولها توانائي تشكيل كلوني را دارند، آنها را CFU يا Colony Forming Unite مينامند. CFUها در شرايط مناسب آزمايشگاهي توانائي تمايز به كلونيهايي از سلولهاي استخواني، ماهيچه اي، چربي و غضروفي را دارا هستند. به اين دليل اكثراً عقيده بر Multipotent بودن سلولهاي تشكيل دهنده كلونيها بوده و CFU هاي تشكيل يافته در محيط كشت را همسان با سلولهاي بنيادي مزانشيمي مي دانند (۷-۶).

مطالعات وسيعي در جهت تكثير و تمايز سلولهاي بنيادي بالغ به سلولهاي خاص و مورد نظر در محيط كشت صورت پذيرفته است. سلولهاي بنيادي مزانشيمي در شرايط معمولي محيط كشت، سريعاً تمايز يافته و تكثير و وادار كردن اين سلولها جهت همانند سازي Self-Renewal در محيط آزمايشگاهي به صورتيكه از تمايز آنها جلوگيري گردد با توان علمی و آزمايشگاهی فعلي مقدور نميباشد (۸). سلول هاي بنيادي جنيني موش، در شرايط خاص محيط آزمايشگاهي و در حضور هورمون Leukemia Inhibitory Factor (LIF) از تمايز باز مانده و وادار به همانند سازي (Self Renewal) گرديده و در نتيجه سلولهايي كاملاً مشابه خود كه Pluripotent و Totipotent هستند، بوجود مي آورند (۹). فاكتور LIF نظير ديگر ليگاندها با اتصال به گيرنده های خاص خود در سطح سلولي باعث تحريک مسيرهای خاص سيگنالی ميگردد. اين سيگنالها جهت اعمال اثر خود به هسته سلول منتقل و منجر به كاهش يا افزايش بيان يكسری از ژنها ميگردند. مسير سيگنالی فاكتور LIF در سلولهای بنيادی جنينی در سالهای اخير بطور زيادی تحت مطالعه بوده است. بر اساس اين مطالعات مشخص شده است كه سيگنال ايجاد شده توسط كمپلكس گيرنده های LIF (gp130-LIFR) از مسير سيگنالی JAK-STAT منجر به همانندسازی اين سلولها گرديده و از تمايز آنها ممانعت بعمل می آورد (۱۵-۱۷). همچنين بلوكه كردن مسير سيگنالی SHP-2 و ERK باعث تحريک قابليت همانندسازی در سلولهای بنيادی جنينی موش ميگردد (۱۸). مسير سيگنالي LIF در سلولهاي بنيادي مزانشيمي بطور كامل مطالعه نشده و آگاهي به اين مسير سيگنالي و نحوه عملكرد آن در دستكاريهاي اين سلولها و نحوه كشت آنها در محيط كشت آزمايشگاهی براي كاربردهاي پزشكي و درماني خيلي مفيد واقع خواهد شد.

در اين مطالعه، تاثير هورمون LIF بر روي سلولهاي بنيادي مزانشيمي در محيط آزمايشگاهي مورد بررسي قرار گرفت. در حضور اين فاكتور، سلولهاي بنيادي مزانشيمي بر خلاف سلولهاي بنيادي جنيني، تمايل بيشتر به تمايز يافتن و تكثير به سلولهاي اوليه اي كه بيان كننده آلكالين فسفاتاز CFU-ALP هستند را دارند. همچنين در اين مطالعه اثر LIF بر روی قابليت همانندسازی اين سلول ها بررسي شد. حضور فاكتور مذكور در محيط كشت اوليه باعث افزايش توان همانند سازی سلولهای بنيادی مزانشيمی مي گردد.

جهت مطالعه تاثير سن و پيری در تعداد و رفتار سلولهای بنيادی مزانشيمی، سلولهای مزانشيمی استخراج شده از موشهای جوانتر و مسن تر مورد بررسي قرار گرفتند.

۲- مواد و روشها

۲-۱: تهيه سلولهاي مغز قرمز استخوان

در شرايط كاملاً استريل، موش ها (از نژاد C57BL/6) به طريق جابجائی نخاعی كشته شده و با الكل پوست آنها شستشو داده مي شد. سپس توسط قيچي های استريل جراحی، پوست استخوان فمور آنها جدا و گوشت های اطراف اين استخوان تا حد امكان جدا مي شد. استخوان فمور در محلول استريل حاوی 10x آنتی بيوتيک (۱۰۰۰ ميكروگرم در ميلی ليتر پنيسلين G تهيه شده از سيگما، ۵۰۰ ميكروگرم در ميلی ليتر جنتامايسين سولفات تهيه شده از سيگما، ۳ ميكروگرم در ميلی ليتر فانجی زون) قرار داده مي شد. در شرايط كاملاً استريل و زير هود، استخوان جدا شده بطور كامل از گوشتهای اطراف خود تميز شده و دو سر استخوان توسط قيچی استريل قطع گرديد. استخوان بعد از تميز شدن به درون محلول تميز و جديد حاوی 10x آنتی بيوتيک منتقل گرديد. توسط سرنگ مقداری محلول كشت αMEM (حاوی: ۱۵% FBS و ۱۰% آنتی بيوتيک) برداشته شده و مغز قرمز استخوان بدرون پتری ديش استريل و حاوی محلول كشت αMEM خالی گرديد.

با استفاده از سرنگ و سر سوزن 18G، سلولهای به هم چسبیده مغز قرمز استخوان استخراج شده بطور کامل در محلول کشت از هم جدا گردیدند.

در هر کدام از آزمایشات مغز قرمز استخوان از ۶ الی ۱۰ موش از يك نژاد خاص (C57BL/6) که همه در یک سن خاص ولی مخلوطی از نر و ماده بودند استخراج شد. بدین طریق، از اثر احتمالی جنسیت و نژاد (Genetic Background) در سرعت رشد و تعداد کلونیهای تشکیل یافته CFU تاثیری در نتیجه آزمایشات پیشگیری گردید. تعداد موشهایی که در دو جمعیت مورد استفاده قرار گرفتند، همواره یکسان بود.

۲-۲: شمارش سلولهای هسته دار

جهت شمارش سلولها از هماتوسیتومتر استفاده گردید. استفاده از دستگاه کانتر در این مرحله توصیه نمي گردد. بدلیل اینکه، دستگاه کولتر کانتر تعداد تمام سلولها (هم حاوی هسته و هم فاقد هسته) را تهیه میکند، در حالیکه در سلولهای مغز قرمز استخوان، تنها تعداد سلولهایی که دارای هسته هستند مد نظر بود.

جهت بدست آوردن تعداد سلولها، ۲۰ میکرولیتر از محلول سلولهای استخراج شده، برداشت شده و با ۲۰ میکرولیتر محلول تریپان آبی (Trypan Blue) در یک میکروتیوپ مخلوط گردیده و حدود ۱۰ میکرولیتر از این مخلوط بر روی شیشه هماتوسیتومتر منتقل گردید. در زیر میکروسکوپ، تعداد سلولهای حاوی هسته شمرده شده و کل تعداد سلولها در محلول سلولی مغز قرمز استخوان محاسبه گردید.

۲-۳: کاشت سلولها

بـه تـعداد 10^4 عدد سلول هسته دار به درون یک دیش کوچک (۲ میلی متر) که حاوی ۲ سی سی محلول کشت αMEM (۱۰% FBS و آنتي بيوتيك) بود در زیر هود منتقل گردید. دیشهای مذکور به آرامی به انکوباتور CO_2 ، ۳۷ درجه سانتیگراد منتقل گردیدند.

جهت کشت سلولها در محیط کشت حاوی LIF، این سلولها بعد از استخراج از مغز قرمز استخوان در محیط کشت αMEM حاوی ۱۰۰۰U/ml LIF (Gibco-BRL $1x10^5$ U/μg) کشت داده شدند.

۲-۴: تعویض محیط کشت

محیـط کشت دیش ها هر روز در شرایط کاملاً استریل با برداشتن محیط کشت قبلی و اضافه کردن محیط کشت تازه تعویض میگردید.

۲-۵: برداشت سلولها

سلولهایی که به سطح محیط کشت چسبیده بودند بعنوان سلولهای مزانشیمی بنیادی محسوب گردیده و جهت مطالعه مورد استفاده قرار گرفتند. سلولهايي که توانائی چسبیدگی را نداشتند، در هنگام تعویض محیط کشت، از سلولهای مزانشیمی جدا گردیدند. این سلولها با استفاده از محلول تریپسین از محیط کشتها برداشت گردید. جهت اینکه از اثرات جانبی تریپسین بر روی سلولها کاسته گردد، مدت تاثیر تریپسین در حد امکان کاسته شد. به محیط کشت تریپسین اضافه و محیط کشت در بنماری ۳۷ درجه سانتگراد برای مدت ۱۰ دقیقه نگهداری شده و توسط میکروسکوپ، سلولها هر ۵ دقیقه بررسی میشدند. سلولهای به محض گرد شدن در زیر میکروسکوپ، محیط کشت یا سرم به محیط سلولها اضافه شد تا اثر تریپسین خنثی شده و سپس سلولها برداشت شده و شمارش گردیدند.

۲-۶: رنگ آمیزی سلولها برای مطالعه آلکالین فسفاتاز

محیط کشت از دیش سلولها بطور کامل برداشته شد. محیط کشت توسط PBS سرد بطور کامل شسته شد تا دبری و سلولهای مرده بطور کامل شسته شوند. سلولها برای مدت ۱۵ دقیقه توسط محلول فیکس کننده یا NFB 10% (فرم آلین ۱۰۰ سی سی، Na2HPO4 ۱٦ گرم، NaH2PO4 ۴ گرم، آب استریل یک لیتر) فیکس شد. محلول فیکس کننده بعد از زمان مقرر بطور کامل دور ریخته شده و سپس به محیط کشت سلولها برای مدت ۱۵ دقیقه آب سرد استریل اضافه شد. بعد از این زمان، سلولها توسط محلول رنگ امیزی کننده (نفتال MX-PO4، DMF، TRIS-HCL، Red Violet LB Salt) رنگ آمیزی شد. برای رنگ آمیزی کامل، سلولها بمدت ۴۵ دقیقه در این محلول نگهداری شدند. بعد از مدت مذکور، سلولها بطور کامل توسط آب شسته شده و برای مطالعه زیر میکروسکوپ نوری آماده میباشند. سلولهايي که در آنها آلکالین فسفاتاز بیان شده بود، برنگ قرمز درآمده و زیر میکروسکوپ نوری قابل مطالعه بودند.

۲-۷: رنگ آمیزی متیلن بلو

جهت دسترسی به تعداد کلنی های CFU-F، سلولها توسط متیلن بلو رنگ آمیزی میشدند. محلول ۱۰ درصد متیلن بلو جهت رنگ آمیزی برای مدت ۱۰ الی ۲۰ دقیقه بر روی سلولها اضافه شده و سپس کلنی ها زیر میکروسکوپ مورد مطالعه قرار گرفتند.

۲-۸: شمردن CFU

جهت شمردن تعداد کلنی های CFU ، بعد از رنگ آمیزی مورد نیاز، زیر میکروسکوپ نوری کلونیهایی که بیش از ۱۵ عدد سلول داشته اند شمرده مي شدند. کلونیهايي که تعداد سلولهاي آنها بیشتر از ۱۵ عدد بودند، بعنوان يك کلوني محسوب میگردیدند. جهت دسترسي به تعداد کلوني ها، کلونیهاي حاصله در ۷ الي ۱۰ دیش از هرکدام از آزمایشات، زیر میکروسکوپ مطالعه گردیده و میانگین آن ها به همراه Standard Deviation محاسبه (با استفاده از برنامه Excel) گردید.

جهت مطالعه تعداد کلوني هاي $CFU\text{-}ALP^+$، کلوني ها بعد از رنگ آمیزی مورد نیاز، زیر میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفتند. هر کلونـی که حداقل ۱۵ عدد سلول تـشکیـل دهنده آن در اثر رنـگ آمـیزی به رنگ قرمز درآمـده بود (که نشانگر بیان آلکالین فسفاتاز توسط آن سلول است) بعنوان یک کلونی

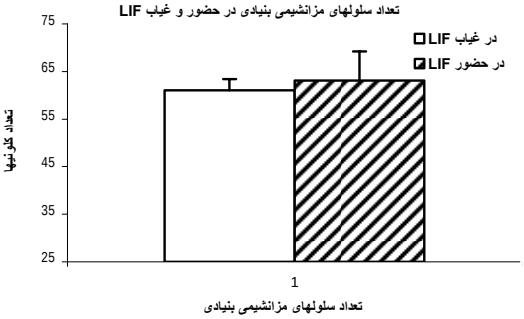
CFU-ALP+ محسوب و در غير اين صورت بعنوان CFU-ALP- محسوب گرديد.

۲-۹: مطالعه همانندسازي يا Self-Renewal (كشت ثانويه)

جهت مطالعه توانائي همانندسازي سلول هاي بنيادي مزانشيمي استخراج شده از مغز قرمز استخوان، اين سلول هاي در محيط كشت اوليه (۱۰% FBS، αMEM، ويتامين C ۵۰μg/ml، آنتي بيوتيك) به مدت ۶ الي ۹ روز كشت داده شده و پس از تشكيل كلوني، سلول ها برداشت شده و دوبـاره شمرده شده و بـه تعداد مشخصي از سلول ها در محيط كشت ثانويه كه تركيب محيط كشت اوليـه را داشتـه، كشت داده شدنـد. جهت دستـرسي بـه تعداد كلوني ها، كلوني هاي حاصله در ۷ الـي ۱۰ ديـش از هركدام از آزمايشات، زير ميكروسكوپ مطالعه گرديده و ميانگين آنها به همراه Standard Deviation محاسبه (با استفاده از برنامه Excel) گرديد.

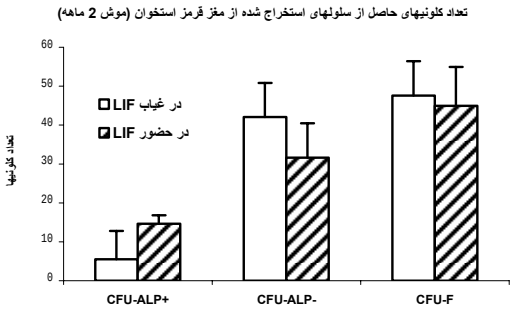
۳- نتايج

تعداد سلولهاي بنيادي مزانشيمي در كشت اوليه در بين محيطهاي كشت فاقد فاكتور LIF و حاوي فاكتور LIF تفاوت معني داري نشان نداده است (شكل ۱). در اين آزمايش، تعداد ميانگين CFU-F تشكيل يافته بين دو محيط كشت در آزمايشات متعدد (ميانگين ۷ الي ۱۰ آزمايش) يكسان بوده است. از هر ده ميليون سلول مزانشيمي هسته دار استخراج شده، تنها حدوداً ۶۵ سلول توانائي تشكيل CFU-F را داشته كه اين تعداد نشانگر تعداد كل سلولهاي بنيادي مزانشيمي در بين تعداد سلولهاي مورد مطالعه است. بطور درصدي ۰/۰۰۰۶۵ سلولهاي هسته دار مغز قرمز استخوان را سلولهاي بنيادي مزانشيمي تشكيل داده اند.



شكل ۱: تعداد كلونيهايي كه در محيط كشت اوليه در حضور و يا بدون فاكتور LIF حاصل شده اند. ده ميليون سلول هسته دار استخراج شده از مغز قرمز استخوان در محيط كشت اوليه رشد داده شده كه از اين تعداد سلول تقريباً ۶۵ عدد سلول توانائي تشكيل كلوني CFU را داشته است.

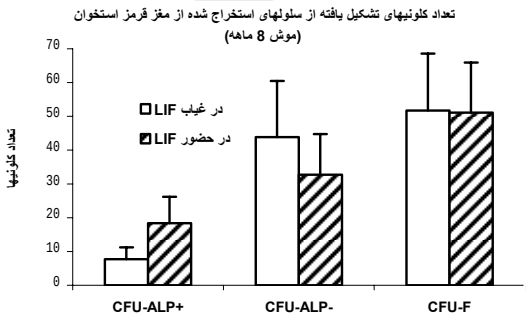
اگرچه در محيط كشت اوليه حاوي فاكتور LIF تعداد سلولهاي بنيادي مزانشيمي افزايش و يا كاهش نشان نداده ولي تعداد كلونيهاي CFU-ALP+ (Colony Forming Unit Alkaline Phosphatase positive) كه در آنها بيشتر سلولهاي تشكيل دهنده كلوني آلكالين فسفاتاز بيان كرده اند، افزايش معني داري نشان داده است (شكل ۲) كه اين افزايش همراه با كاهش تعداد كلونيهاي CFU-ALP- بوده است. از ۸ ميليون سلول هسته دار كه در محيط كشت كنترل كشت داده شده بود، بطور متوسط ۴۷ عدد كلونی CFU-F تشكيل يافته كه از اين تعداد بطور متوسط ۵ كلونی بيان كننده آلكالين فسفاتاز بوده و بقيه نسبت به بيان آلكالين فسفاتاز منفی بودند. از همين تعداد سلول هسته دار كشت داده شده در محيط كشت حاوی فاكتور LIF، بطور متوسط ۴۵ كلونی CFU-F تشكيل يافته و از اين تعداد نيز بطور متوسط ۱۴ كلونی بيان كننده آلكالين فسفاتاز بودند. بنابراين، در حضور فاكتور LIF تعداد كلونيهای بيان كننده آلكالين فسفاتاز به حدود سه برابر افزايش يافته بود در حاليكه تعداد كل كلونيهاي CFU-F تغيير معنی داری نشان نداده بود.



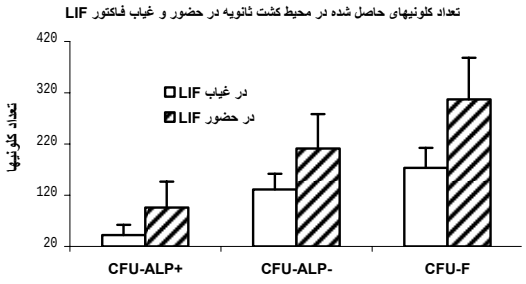
شكل ۲: تعداد كلونيهايي كه در محيط كشت اوليه در حضور و يا غياب LIF تشكيل يافته است. در حضور فاكتور LIF، تعداد كل كلونيها (CFU-F) با تعداد كل كلونيها در ديشهاي كنترل كه در محيط فاقد LIF رشد كرده بودند، يكسان بوده است. ولي تعداد كلونيهاي CFU-ALP مثبت (كلونيهايي كه الكالين فسفاتاز را بيان كردند) در بين كلونيهاي رشد كرده در حضور LIF بيشتر بوده است.

تعداد سلولهای بنيادی مزانشيمی موجود در مغز قرمز استخوان استخراج شده از موش هايی با سن بيشتر (موش های ۸ ماهه) و عكس عمل آنها در برابر فاكتور LIF در محيط كشت اوليه مورد مطالعه قرار گرفت كه تعداد و عكس العمل اين سلولها تفاوت معنی داری با سلول های استخراج شده از مغز قرمز استخوان موش های جوان تر (موش های ۲ ماهه) نشان ندادند (شكل ۳). جهت مطالعه توانائي همانند سازي Self-Renewal سلول هاي بنيادي مزانشيمي، سلول هاي حاصله در محيط كشت اوليه برداشت شده و دوباره كاشت داده شدند تا توانائي تشكيل كلوني در اين سلول ها بر اساس تعداد كلوني هايي كه تشكيل ميدادند، مورد مطالعه قرار بگيرد. سلولهايي كه در محيط كشت اوليه حاوي فاكتور LIF رشد داده شده بودند، تعداد كلوني CFU-F بيشتري را در محيط كشت ثانويه در مقايسه با محيط كشت كنترل

که در آن سلولها در محیط کشت اولیه فاقد LIF رشد داده شده بودند، تشکیل دادند (شکل ٤). سی هزار عدد سلول از سلولهایی که در محیط کشت اولیه کنترل بوده بعد از برداشت به محیط کشت ثانویه منتقل گردید که از این تعداد سلول، بطور متوسط ۱۷۳ عدد کلونی CFU-F تشکیل یافت و از این تعداد بطور متوسط ۴۲ عدد کلونی $CFU\text{-}ALP^{+}$ (کلونیهاي بیان کننده الکالین فسفاتاز) بودند. براي بررسي اثر فاکتور LIF، دوباره سی هزار عدد سلول از سلولهایی که در محیط کشت اولیه و در حضور فاکتور LIF رشد کرده بودند، برداشت و به محیط کشت ثانویه منتقل گردید.

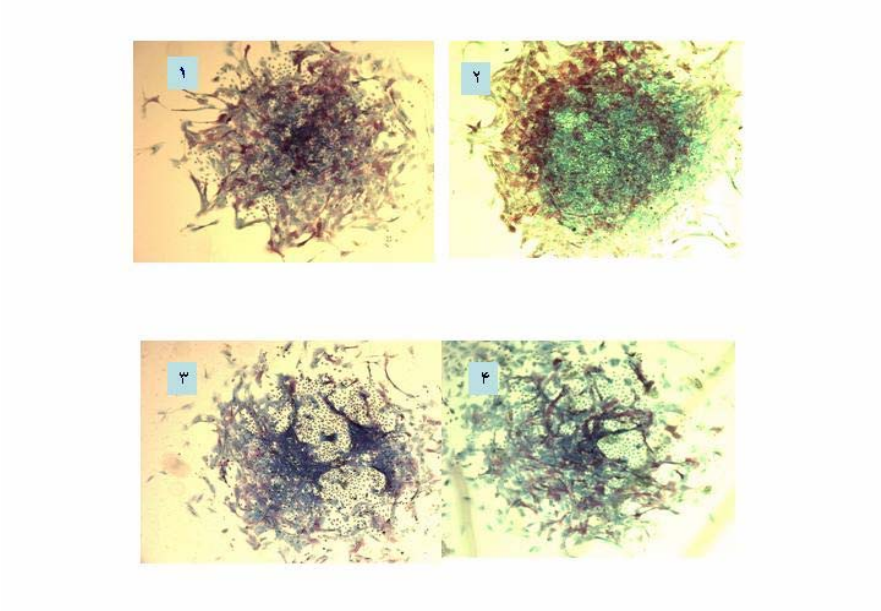


شکل ۳: تعداد و رفتار سلولهاي بنیادی مزانشیمي استخراج شده از موش هاي ۸ ماهه تقریباً مشابه با سلول هاي بنیادی مزانشیمي استخراج شده از موش هاي ۲ ماهه مي باشد.



شکل ۴: مطالعه توانائی سلولهاي مزانشیمي بنیادي در همانندسازی (Self-Renewal) بعد از اضافه کردن فاکتور LIF به محیط کشت در کشت اولیه. سلولهایی که در محیط کشت اولیه در حضور فاکتور LIF رشد کرده بودند، توانائی همانندسازی بیشتري در مقایسه با سلولهای بنیادی مزانشیمی کنترل داشتند.

از این تعداد سلول، بطور متوسط ۳۰۷ عدد کلونی CFU-F تشکیل یافت که ۹۵ عدد از این کلونیها، $CFU\text{-}ALP^{+}$ بودند. افزایش تعداد کل کلونیها (CFU-F) در این کشت در حدود دو برابر کشت کنترل بود. لازم به ذکر است که همسو با این افزایش، تعداد کلونیهای بیان کننده آلکالین فسفاتاز CFU-ALP+ و کلونیهای فاقد آلکالین فسفاتاز CFU-ALP- به نسبت یکسان افزایش یافته بود (شکل ٤). در این بررسی مشاهده گردید که اندازه کلونیهای حاصله از سلولهایی که در محیط کشت اولیه در حضور LIF بودند، به مراتب بزرگتر بوده که این ناشی از افزایش تکثیر سلولهای مذکور مي باشد (شکل ۵).



شکل ۵: مطالعه تاثیر فاکتور LIF در دانسیته و تقسیم سلولی Cell Proliferation سلولهای بنیادی مزانشیمی و پروژنیتورهاي اولیه در هنگام تشکیل کلونی. عکسهای شماره یک و دو، کلونیهایی هستند که سلولهای تشکیل دهنده آنها در محیط کشت اولیه در حضور فاکتور LIF رشد کرده و سپس به محیط کشت ثانویه که فاقد LIF هست انتقال داده شده اند و اجازه داده شده که تشکیل کلونی بدهند. عکسهای شماره سه و چهار از کلونیهای کنترل هستند که در غیاب LIF رشد داده شده اند. سلولهاي قرمز رنگ، سلولهایی هستند که آلکالین فسفاتاز را بیان نموده و سلولهای آبی رنگ فاقد آلکالین فسفاتاز میباشند.

٤- بحث

سلول های MSc سلولهای Multipotent بوده و در موارد ضروری در In Vivo نظیر نیاز به ترمیم صدمه دیدگی و یا هموستازی استخوان، تـحریک شده و به سلول های مــورد نیاز بدن تمایز مي يابند. بنابراين، هرگونه نقص در تعداد اين سلولها يا توانائی این سلولها در تمایز به سلولهای استخوانی منجر به پوکی استخوان میگردد (۴). در مطالعات پیشین نشان داده ایم که نقص در توانائی همانندسازی Self-Renewal این سلولها در مدل آزمایشگاهی منجر به بروز پوکی استخوان از نوع پوکی استخوان (Age Dependent Osteoporosis) ناشی از پیری که هم در مردها و هم زنها دیده میشود، مي گردد (۴).

از سلول هاي MSc در جهت مهندسي بافتي و سلول درماني استفاده هاي متعددي مي گردد (۱۱-۱۰). تشخیص و تمیز این سلولها از سلولهاي ديگر در مغز قرمز استخوان، بدليل عدم دسترسي به ماركر خاص و منحصر به فردي كه در سلولهاي MSc بيان شود، با اطلاعات كنوني خيلي مشكل و در مواردي امكان ناپذير است. بنابراين، جهت استخراج اين سلولها، از قابليت چسبندگي آنها به سطح ديشهاي تقسيم استفاده كرده و سپس در محيط آزمايشگاهي مورد مطالعه قرار مي گيرند (۵).

در این مطالعه، تعداد سلولهای MSc در موشهایی که خیلی جوان بوده و در حدود ۲ ماه طول عمر داشته اند، مورد مطالعه قرار گرفت. تعداد این سلولها در موشهای جوان ۶۵ عدد سلول در بین ده میلیون سلول هسته دار موجود در مغز قرمز استخوان میباشد که این نشانگر تعداد بسیار کم این سلولها در بدن میباشد. هرچند که تعداد این سلولها خیلی کم مي باشد ولی این سلولها در موانع ضروری توانائی تکثیر و همانندسازی (Self-Renewal) داشته و همواره تعداد خود را در بافت مورد نظر ثابت نگه میدارند. تعداد این سلولها در سن پیری (در موشهای ۸ ماهه) نیز مورد مطالعه قرار گرفت. این مطالعه نشان داده است که تعداد این سلولها در طول عمر، همواره ثابت مانده و تغییر محسوسی پیدا نمیکند. عدم کاهش در تعداد این سلولها به همراه پيري نشانگر این است که گذشت زمان و پيري در كميت و كيفيت اين سلولها تاثيري نگذاشته و اگر نقص ژنتيكي خاصي در اين سلولها بروز ندهد، اين سلولها توانائي همانندسازي و تمايز خود را نگه ميدارند. پيري در سطح سلولهاي بنيادي بالغ موضوعي است كه مطالعات وسيعي بر روي آنها صورت پذيرفته است (۱۹-۲۱). تعدادي از اين مطالعات نشانگر وجود پروسه پيري در سطح سلولهاي بنيادي خوني (HSc)، ماهيچه اي و روده اي ميباشد (۲۱). همچنين مطالعات پيشين نشانگر اين است كه پروسه پيري در سطح سلولهاي بنيادی خونی تحت كنترل عوامل ژنتيكي بوده به صورتيكه در موشهاي نژاد C57Bl/6 پروسه پيري خيلي كندتر از نژادهاي ديگر موشي است. با استفاده از روش مطالعه لينكاژ، تعدادي از اين ژنها (QTLs) شناسايي گرديده‌اند (۱۹، ۲۲-۲۵). مطالعه‌اي كه در اين تحقيق انجام داده‌ايم، بر روي موشهاي نژاد C57Bl/6 صورت پذيرفته و نتايج حاصل كه نشانگر عدم تفاوت كمی و كيفی سلولهای بنيادی مزانشيمی استخراج شده از موشهای جوان و پير است، در راستاي تحقيقات قبلي ميباشد. نتايج مطالعه ما نشان مي دهد كه سلولهای بنيادی مزانشيمی نظير سلولهای بنيادی خونی در نژاد موشی C57Bl/6 متحمل تغييرات قابل مشاهده در اثر پيری نمي گردند. مطالعاتي كه توسط محققين ديگر بر روي توان سلولهاي بنيادي مزانشيمي در ترميم استخوان رتهاي پير صورت گرفته، نشانگر عدم كاهش توان اين سلولها با افزايش سن ميباشد (۲۶-۲۷). نتايج حاصله از مطالعه ما نيز بطور غير مستقيم با نتايج مطالعه مذكور همسو بوده و موید آن ميباشد.

سلولهاي بنيادي مزانشيمي (MSc) در صورت تكثير و تمايز يافتن در محيط كشت (In Vitro) كاربردهاي زيادي در پيوند بافتهاي استخواني و غضروفي دارند. ولي اين سلولها در محيط كشت سريعاً تمايز يافته و قابليت همانندسازي خود را از دست ميدهند. مطالعاتي كه قبلاً صورت پذيرفته، نشانگر اين است كه تلومر سلولهاي MSc در محيط كشت سريعاً كوتاه شده و در نهايت اين سلولها در محيط كشت آزمايشگاهي سريعاً مبتلا به پيري ميگردند (۱۳-۱۲). فاكتور LIF با غلظت ۱۰۰۰ U/ml در محيط كشت سلولهاي بنيادي جنيني باعث تكثير آنها گرديده و از تمايز آنها ممانعت بعمل مي‌آورد. پاسخ سلولها نسبت به فاكتورهاي رشد موجود در محيط كشت وابسته به نوع گيرنده‌هاي موجود در سطح آنها و سيگنالهای ايجاد شده دارد. مطالعات پيشين نشانگر اين است كه فعال شدگي گيرنده فاكتور LIF (LIFR) در سلولهاي بنيادي عصبي تاثيري در توان همانند سازي آنها نداشته ولي باعث افزايش توان اين سلولها در تشكيل كلوني ميگردد (۲۸). در بررسي كه ما انجام داديم، سلولهای بنيادی مزانشيمی را در حضور فاكتور LIF كشت داده و تاثير آنرا تحت نظر قرار گرفتيم. حضور فاكتور LIF در محيط كشت اوليه سلولهای بنيادی مزانشيمی تاثيری در افزايش و يا كاهش تعداد اين سلولهای نداشت. ولی اين سلولها در حضور فاكتور مذكور در محيط كشت اوليه، اكثراً به سلولهايی كه قابليت بيان آلكالين فسفاتاز را داشتند، تمايز يافتند. در مطالعه‌اي كه قبلاً انجام داده‌ايم، نشان داده شده است كه سلولهای بيان كننده آلكالين فسفاتاز، جزو سلولهای پروژنيتور استئوبلاست بوده و تمايل بيشتری در تمايز به سلولهای استخوانی دارند (۴). نتايج تحقيق فعلي نيز نشانگر اين است كه فاكتور LIF باعث پيشبرد سلولهاي بنيادي مزانشيمي در مسير تمايز به پروژنيتورهاي استئوبلاست يا سلولهاي اوليه استخوان ساز ميگردد.

سلولهای MSc استخراج شده از مغز قرمز استخوان موشهای پير نيز همين رفتار را نشان داده كه نشانگر عدم تغيير محسوس در

این عملکرد سلولها بعد از پیر شدگي حیوان است که موید نتایج حاصل از آزمایشات صورت گرفته دیگر مي باشد (۲۶).

در ایـن مطالعه همـچنین تـاثیر LIF در قابلیت همانندسازی (Self-Renewal) سلولهای بنیادی مزانشیمی مورد بررسي قرار گرفت. جهت نیل به این هدف، سلولها بلافاصله بعد از استخراج از مغز قرمز استخوان در محیط کشت اولیه حاوی غلضت مناسبی از فاکتور LIF رشد داده شدند. بعد از زمان خاصی، این سلولها استخراج و در محیط کشت جدیدی که فاقد فاکتور LIF بود دوباره کشت داده شدند. در این محیط تعداد کلونیهای تشکیل یافته به مراتب افزایش یافته بود که نشانگر تاثیر فاکتور مذکور در افزایش سلولهای CFU-F بوده است. مطالعه دقیق این کلونیها نشان داد که سلولهاي تشکیل دهنده آنها، اکثراً از نوع سلولهای بیان کننده آلکالین فسفاتاز بوده اند. مقایسه اندازه کلونیهای تشکیل یافته در حضور فاکتور LIF، نشانگر افزایش چشمگیر این کلونیهای در مقایسه با کلونیهای کنترل بوده است. این نمایانگر تاثیر فاکتور LIF در جهت تحریک توان تقسیم یافتگی و Proliferation سلولها است. نتایج حاصله از این بررسی و مقایسه آن با مطالعات پیشین که اثر فاکتور LIF را بر روی سلولهای بنیادی بالغ نوع دیگر بررسی نموده اند، نشانگر این است که هر نوع از سلولهای بنیادی (سلولهای بنیادی جنینی موش، سلولهای بنیادی جنینی انسان و انواع مختلف سلولهای بنیادی بالغ) تفاوتهایی در واکنش به فاکتور LIF دارند (۹،۱۸،۲۸،۱). تمام این تفاوتها ناشي از سیگنالهای مختلف ایجاد شده توسط این فاکتور در سلولهای مذکور مي باشد (۱۴-۱۸). مطالعات بیشتری در این راستا مورد نیاز است تا مسیر سیگنالي تحریك شده توسط فاکتور LIF در سلولهاي بنیادي مزانشیمي مشخص گردد. این مسیر سیگنالي در سلولهاي بنیادي مزانشیمي بر خلاف سلولهاي بنیادي جنیني موش از تمایز آنها ممانعت بعمل نیاورده و باعث تمایز این سلولها در جهت استخوان سازي میگردد. یکي از مسیر هاي احتمالي که بررسي آن در این سلولها اطلاعات بیشتري را ارائه خواهد داد، مسیر سیگنالي MAP Kinase میباشد. در نیل به این هدف، این مسیر سیگنالي نیز در سلولهاي مذکور در دست بررسي میباشد.

۵- نتیجه گیري

فاکتور LIF باعث افزایش توان همانندسازی و تقسیم در سلولهای بنیادی مزانشیمی میگردد. در حضور این فـاکتور، اکثـر سـلولهای بنیادی مزانشیمی آنزیم آلکـالین فـسفاتاز را بیـان کـرده و باعـث افزایش تمایل این سلولها در تمایز به سلولهای اولیه استئوبلاست مي گردد. تعداد و عملکرد سلولهای بنیـادی مزانـشیمی بـا پیـری تغییر محسوسی نمی یابد.

۶- تقدیر و تشکر

مولفین از ریاست و دیگر همکاران در مرکز تحقیقات کاربردي دارویـــي دانشگاه علوم پزشکي تبریز کمال تشکر را دارند. بودجه تحقیقاتي این پـروژه تـــوسط مـرکز تحقیقات کاربردي دارویي دانشگاه علوم پزشکي تبریز با کد ۸۳-۲۵ تصویب و تامین شده است.

7- References:

1. Evans M.J., Kaufman M.H., Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. Nature 1981, 292. 154-156.
2. Bellows C.G., Wang Y. H., Heersche J.N.M., Aubin J.E. 1, 25-dihydroxyvitamin D3 stimulates adipocyte differentiation in cultures of fetal rat calvaria cells: comparison with the effects of dexamethasone, Endocrinology, 1994, 134, 2221–2229.
3. Aubin J. E. Bone stem cells. J. Cell Biochem. Suppl, 1998. 30/31, 73–82.
4. Bonyadi et al., Mesenchymal progenitor self-renewal deficiency leads to age-dependent osteoporosis in Sca-1yLy-6A null mice. PNAS 2003, 100, 10: 5840–5845.
5. Friedenstein A.J., Petrakova K.V., Kurolesova A.I., Frolova G.P. Heterotopic transplants of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. Transplantation, 1968. 6:230–247.
6. Owen M. Marrow stromal stem cells. J. Cell Sci. Suppl. 1988, 10:63–76.
7. Bianco P., Gehron R.P. Marrow stromal stem cells. J. Clin. Invest. . 2000, 105:1663–1668.
8. Bianco P., Robey P.G., Marrow stromal stem cells, The Journal of Clinical Investigation, 2000, 105, 12.
9. Smith A.G., Nichols J., Robertson M., Rathjen, P. D. Differentiation inhibiting activity (DIA/LIF) and mouse development, Dev. Biol., 1992, 151, 339–351.
10. Fodor William L. Tissue engineering and cell based therapies, from the bench to the clinic: The potential to replace, repair and regenerate. Reproductive Biology and Endocrinology 2003, 1, 102.
11. Deans R.J., Moseley A.B. Mesenchymal stem cells: Biology and potential clinical uses. Exp Hematol. 2000; 28 (8): 875–884.
12. Parsch D., Fellenberg J., Brummendorf T.H., Eschlbeck A.M., Richter W.J. Mol Med. Telomere length and telomerase activity during expansion and differentiation of human mesenchymal stem cells and chondrocytes. 2004, 82 (1): 49-55.
13. Takeda Y., Mori T., Imabayashi H., Kiyono T., Gojo S., Miyoshi S., Hida N., Ita M., Segawa K., Ogawa S., Sakamoto M., Nakamura S., Umezawa A. Can the life span of human marrow stromal cells

be prolonged by bmi-1, E6, E7, and/or telomerase without affecting cardiomyogenic differentiation? J Gene Med. 2004, 6 (8):833-45.
14. Nakashima K., Taga T. gp130 And the IL-6 family of cytokines: signaling mechanisms and thrombopoietic activities. Semin Hematol, 1998, 35: 210–221
15. Taupin J.L., Pitard V., Dechanet J., Miossec V., Gualde N., Moreau J.F. Leukemia inhibitory factor: part of a large ingathering family. Int Rev Immunol 16: 397–426.
16. Carter-Su C., Smit L.S. Signaling via JAK tyrosine kinases: growth hormone receptor as a model system. Recent Prog Horm Res, 1998, 53:61–82.
17. Darnell Jr J.E STATs and gene regulation. Science, 1997, 277: 1630–1635.
18. Burdon T., Stracey C., Chambers I., Nichols J., and Smith A. Suppression of SHP-2 and ERK Signalling Promotes Self-Renewal of Mouse Embryonic Stem Cells, Developmental Biology, 1999, 210, 30–43.
19. Van Zant G. Liang Y. The role of stem cells in aging. Hematol, 2003 Exp., 31, 659–672.
20. Geiger H., Van Zant, G. The aging of lympho-hematopoietic stem cells. Nat. Immunol., 2002, 3, 329–333.
21. Geiger H., Rennebeck G., Van Zant G. Regulation of hematopoietic stem cell aging in vivo by a distinct genetic element., 2005, 5, 102 (14), 5102-5107.
22. Kim M., Moon H.B. Spangrude G.J. Major age-related changes of mouse hematopoietic stem/progenitor cells. Ann. N.Y. Acad. Sci., 2003, 996, 195–208.
23. Chen J., Astle C. M., Harrison D.E. Genetic regulation of primitive hematopoietic stem cell senescence, Exp. Hematol. 2000, 28, 442–450.
24. Morrison S.J., Wandycz A.M., Akashi K., Globerson A., Weissman I.L. The aging of hematopoietic stem cells, Nat. Med., 1996, 2, 1011–1016.
25. Zijlmans J.M., Martens U.M., Poon S.S., Raap A.K., Tanke H.J., Ward R.K. and Lansdorp, P.M. Telomeres in the mouse have large inter-chromosomal variations in the number of T2AG3 repeats. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1997, 94, 7423–7428.
26. Dressler M.R., Butler D.L., Boivin G.P. Effects of age on the repair ability of mesenchymal stem cells in rabbit tendon. J Orthop Res., 2005; 23 (2): 287-93.
27. Conboy I., Rando T. Aging, Stem Cells and Tissue Regeneration: Lessons from Muscle. Cell Cycle. 2005, 7, 4 (3).
28. Pitman M., Emery B., Binder M., Wang S., Butzkueven H., Kilpatrick T.J. LIF receptor signaling modulates neural stem cell renewal. Mol Cell Neurosci., 2004, 27 (3): 255-66.

کارگاه های آموزشی مرکز اطلاعات علمی جهاد دانشگاهی

کارگاه آنلاین آشنایی با پایگاه های اطلاعات علمی بین المللی و ترفند های جستجو

کارگاه آنلاین
روش تحقیق و مقاله نویسی علوم انسانی

کارگاه آنلاین
پروپوزال نویسی و پایان نامه نویسی