

Effects of Lithium Chloride on in vitro Proliferation Rate of Rat Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells

Eslaminejad M.R, Ph.D.*, Talkhabi M., M.Sc., Zeinali B., Ph.D., Eftekhari-Yazdi P., Ph.D.

**P.O.Box: 19395-4644, Stem Cell Department, Cell Sciences Research Center, Royan Institute, ACECR, Tehran, Iran*

Abstract

Purpose: To evaluate the effects of lithium chloride on MSCs in vitro expansion rate.

Materials and Methods: In this experimental study, bone marrow from 8 rats was plated at 5×10^5 -cells/cm² in the presence of 1,2,5,7 and 10 mM Lithium chloride and expanded through 3 passages. Twelve days after initial culture, the cells of different groups were stained with crystal violet in order to compare the number and diameter of the colonies. Also the cells from different groups were compared in terms of the population doubling (PD) during the 1-3 passages. Different groups of growth curves were plotted for the third passage cells. At the end of cultivation period, the cells were examined whether they could differentiate into bone and adipose cells.

Results: The Number and diameter of the colonies in primary cultures treated with 5mM lithium chloride were significantly higher than those of control and other groups ($P < 0.001$). The cell population in the culture with 5 mM lithium chloride was doubled in average 12.02 ± 0.04 times during 1-3 passages that was significantly higher than other groups. Compared to other groups, the cells from 5 mM group were reached plateau in a short time (4.9 days) ($P < 0.001$). Alizarin red staining for bone and oil red for adipose cells indicated that the cells in different studied groups preserved their differentiation potential.

Conclusion: Finally, it seems that the presence of 5 mM lithium chloride in the cultures of rat bone marrow cells enhances the MSC in vitro expansion rate while maintaining their bone and adipose differentiation potential.

Key words: Mesenchymal Stem Cells, Lithium Chloride, Proliferation, Population Doubling

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

✉ محمد رضا باغبان اسلامی نژاد***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 5×10^5 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 کلونیاها اندازه گیری و مقایسه شد. همچنین طی پاساژ ۱-۳ 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 کلونیهایی ایجاد شده در کشت اولیه در گروه 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 ۱-۳ به طور متوسط $0.4225 \pm 0.12/0.225$ 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 (۹/۴ روز) به مرحله پلاتو رسیدند ($p < 0.001$). رنگ آمیزی آلیزارین رد برای استخوان و اوایل 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 ۱۹۳۹۵-۴۶۴۴

E-mail: eslami@royaninstitute.org

مقدمه

سلولهای بنیادی مزانشیمی برای اولین بار توسط فریدن استاین (Friedenstein) و همکاران از مغز استخوان جدا سازی و معرفی شد [۱]. این سلولها که در اصل نوعی سلول بنیادی بزرگسال محسوب می شوند، واجد چندین ویژگی هستند از جمله اینکه در زمان کشت کلونی ایجاد می کنند، به سطح کشت می چسبند 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 پروژنیاتور مزانشیمی و سلولهای مزانشیمی مغز استخوان نامگذاری شده اند [۴]. سلول بنیادی مزانشیمی تاکنون از بافتهای مختلفی از قبیل چربی، کبد، مایع آمنیوتیک، استخوان تراکولار، پرده سینویال، عضله اسکلتی و دندان شیری و خون بند ناف جدا شده اند [۵-۱۳]. امروزه از سلولهای بنیادی مزانشیمی به عنوان یک ابزار سلولی مناسب در مطالعات مهندسی بافت، ژن درمانی و سلول درمانی استفاده وسیعی می شود.

در استراتژیهای مهندسی بافت، سلول درمانی و ژن درمانی، معمولاً نیاز است که سلول به تعداد زیاد در اختیار باشد. این در حالیکه سلولهای بنیادی مزانشیمی به تعداد بسیار اندک 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 ۲۰۰۶ 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 می شود [۱۴].

تکثیر سلولها توسط مسیرهای سیگنال دهی مختلفی کنترل می شود. 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 می کند [۱۵]. در این مسیر مولکولهای ترشحی Wnt با اتصال به گیرنده خود، سبب فعال شدن مکانیزمی می شود که نتیجه نهایی آن فعال شدن ژنهای هدف است. مطالعات نشان داده اند که لیتیم می تواند عملکرد پروتئینهای Wnt را تقلید کند [۱۶].

تا به حال گزارش های متفاوتی از عملکرد لیتیم بر تکثیر سلولی گزارش شده است. در سال ۱۹۸۷ یوشینو (Yoshino) و همکاران گزارش کردند که لیتیم قادر است فعالیت میتوزیک 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 لیتیم تکثیر سلولهای P19 را مهار می نماید [۱۸]. در ارتباط با تاثیر لیتیم بر تکثیر سلولهای بنیادی مزانشیمی مطالعات بسیار اندک است. در این ارتباط می توان به تحقیق دبائر (De Boer) و همکاران اشاره کرد که در مطالعه خود بیشتر بر تاثیر کلرید لیتیم بر تمایز سلولهای بنیادی مزانشیمی متمرکز بودند. نتایج این محققین نشان داد که حضور کلرید لیتیم در محیط کشت سلولهای بنیادی مزانشیمی انسان، سبب مهار تمایز به چربی و شروع تمایز به استخوان سلولها می شود. همچنین این محققین سلولهای پاساژ یافته را به مدت ۴ روز در حضور کلرید لیتیم کشت دادند و بررسی های آنها نشان دهنده تاثیرات مثبت کلرید لیتیم بر تکثیر سلولی بود [۱۹]. در مطالعه حاضر تاثیر کلرید لیتیم بر کشت سلولهای بنیادی مزانشیمی در یک دوره

مدت ۵ دقیقه با دور ۱۲۰۰ 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 5×10^5 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 لیتيوم 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 لیتيوم و کنترل (بدون لیتيوم) 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 کلونهای 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)

اندازه گیری PDN برای تعیین پاسخ سلولها به شرایط کشتی

طولانی کشت بررسی شده است. هدف مطالعه حاضر کشت و تکثیر سلولهای مغز استخوان موش صحرایی از کشت اولیه تا پاساژ سوم در حضور لیتيوم 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 لیتيوم و مقایسه آن با محیط کنترل (بدون حضور لیتيوم) 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 کلروفورم 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 دمای ۴ درجه سانتی گراد قرار گرفت و به زیر هود منتقل شد. دو سر استخوانها با یک قیچی کاملاً استریل بریده شد و مغز استخوان از داخل کانال استخوانی با عمل Flush خارج شد. بدین ترتیب که ابتدا سرسوزن شماره ۲۲ متصل به سرنگ حاوی محیط DMEM دارای ۱۵٪ سرم FBS، ۱۰۰ واحد بین المللی پنی سیلین (Gibco, UK) و ۱۰۰ واحد بین المللی استرپتومایسین (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 شتسو شده از سر دیگر استخوان خارج شد. مغز استخوان به داخل لولههای ۱۵ میلی لیتری هدایت شد و 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 برای مقایسه نتایج استفاده شد. نتایج به دست آمده حاصل میانگین ۸ بار تکرار آزمایش بود. داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ 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 ۶ چاهکی، در محیط DMEM/15%FBS 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 شامل DMEM محتوی ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر اسکورییک اسید ۳-فسفات (Sigma, USA)، ۱۰ نانومولار 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 اسکورییک 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 آلزارین رد برای استخوان و از رنگ آمیزی اوایل رد برای چربی استفاده شد.

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 ترپسینه شد و سلولها با لام ثوبار شمارش و طبق فرمول $PDN = (\log N/N_0) \times 3.31$ دو برابر شدن جمعیت سلولی محاسبه شد. در این فرمول N تعداد سلول در پایان دوره کشت و N_0 تعداد سلول در آغاز دوره کشت است. تعداد دو برابر شدن جمعیت کل، تحت تأثیر غلظتهای مختلف کلرید لیتیموم و نمونه کنترل در کل دوره کشت شامل پاساژهای اول، دوم و سوم طبق فرمول $\text{Total population doubling} = PDp1 + PDp2 + PDp3$ محاسبه شد

زمان دو برابر شدن جمعیت

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

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

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 لیتیموم تا پاساژ سوم کشت شده بودند از لحاظ منحنی رشد مورد مقایسه قرار گرفتند. برای رسم منحنی رشد، ابتدا سلولها به تعداد 4×10^4 سلول در هر چاهک پلیت ۶ 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 و ۱۰ میلی مولار کلرید لیتیموم تیمار شدند. کشت سلول به

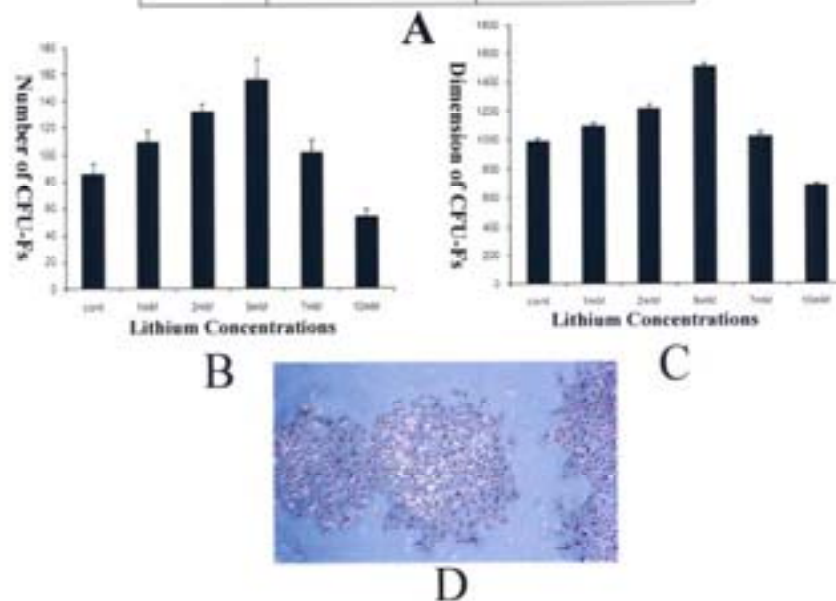
یافته‌ها

پتانسیل کلونی زایی سلولهای بنیادی مزانشیمی

آزمون کلنی زایی برای سلولهای بنیادی مزانشیمی در کشت اولیه انجام شد. میانگین تعداد و قطر کلونیه‌ها در گروههای مختلف تیمار و گروه کنترل در شکل ۱A نشان داده شده است. بر اساس این نتایج تعداد کلونیه‌ها (شکل ۱B) در گروههای مختلف تیمار و گروه کنترل به طور معنی داری متفاوت بودند ($p < 0.001$) و فقط بین گروه ۷ میلی مولار

اختلاف معنی داری برقرار نبود. بررسی قطر کلونیه‌ها (شکل ۱C) نشان داد، بزرگترین کلونیه‌ها در گروه ۵ میلی مولار با قطر 150.1 ± 27.83 میکرومتر (شکل ۱D) و کوچکترین در گروه ۱۰ میلی مولار با قطر 67.9 ± 21.62 میکرومتر ایجاد شدند. میانگین قطر کلونی در گروه کنترل 98.6 ± 23.61 بود ($p < 0.001$). قطر کلونیه‌ها در گروه ۷ میلی مولار با قطر آن در گروه کنترل اختلاف معنی داری نداشت.

قطر کلون ها	تعداد کلونی ها	
109.1 ± 29.87	109.1 ± 29.87	۱ میلی مولار
121.2 ± 31.08	131.5 ± 5.97	۲ میلی مولار
150.1 ± 27.83	156.2 ± 11.90	۵ میلی مولار
102.2 ± 31.76	101.8 ± 8.75	۷ میلی مولار
67.9 ± 21.62	83.2 ± 5.80	۱۰ میلی مولار
98.6 ± 23.61	86.0 ± 7.83	کنترل



شکل ۱. A: میانگین تعداد و قطر کلونیه‌های ایجاد شده در گروه کنترل و گروههای تیمار با غلظت‌های مختلف کلرید لیتیم. B: گراف مربوط به مقایسه تعداد کلونیه‌ها. C: گراف نشان دهنده تفاوت‌های گروه‌های مختلف و کنترل از لحاظ قطر کلونیه‌های تشکیل شده. D: کلونیه‌های رنگ شده با کریستال ویولت. اختلاف معنی داری بین میانگین تعداد کلونیه‌ها و همچنین قطر کلونیه‌ها 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

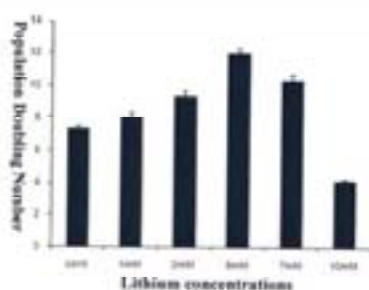
گروه کنترل در کل دوره کشت (پاساز اول، دوم و سوم) در شکل ۲A نشان داده شده است. بر اساس آنالیز آماری اختلاف

غلظت، سلولها در طول دوره کشت به طور متوسط $119 \pm 0.2 \times 12$ بار دوبرابر شدند. در نمونه کنترل تعداد دوبرابر شدن به طور متوسط $153 \pm 0.3 \times 7$ بود (شکل ۲B).

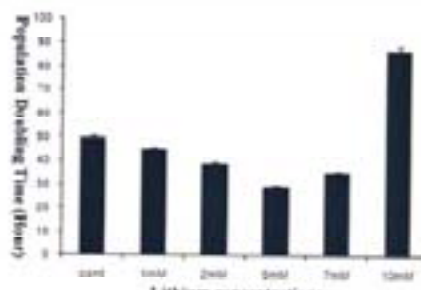
معنی داری بین میانگین PDN کل (شکل ۲B) در گروههای مورد مطالعه وجود داشت ($p < 0.001$). نتایج نشان داد که از این نظر بهترین غلظت، ۵ میلی مولار لیتیوم بوده که تحت این

مجموع	پاساژ سوم	پاساژ دوم	پاساژ اول
$161 \pm 1.4 \times 10^4$	$164 \pm 0.7 \times 10^4$	$155 \pm 0.7 \times 10^4$	$143 \pm 0.2 \times 10^4$
$131 \pm 0.3 \times 10^4$	$137 \pm 0.7 \times 10^4$	$133 \pm 0.7 \times 10^4$	$129 \pm 0.7 \times 10^4$
$119 \pm 0.1 \times 10^4$	$110 \pm 0.9 \times 10^4$	$108 \pm 0.7 \times 10^4$	$119 \pm 0.7 \times 10^4$
$139 \pm 0.3 \times 10^4$	$137 \pm 0.7 \times 10^4$	$130 \pm 0.7 \times 10^4$	$129 \pm 0.7 \times 10^4$
$111 \pm 0.1 \times 10^4$	$115 \pm 0.7 \times 10^4$	$113 \pm 0.7 \times 10^4$	$112 \pm 0.7 \times 10^4$
$153 \pm 0.3 \times 10^4$	$141 \pm 0.7 \times 10^4$	$142 \pm 0.7 \times 10^4$	$147 \pm 0.7 \times 10^4$
$153 \pm 0.3 \times 10^4$	$141 \pm 0.7 \times 10^4$	$142 \pm 0.7 \times 10^4$	$147 \pm 0.7 \times 10^4$

A



B



C

شکل ۲. A: میانگین PDN در گروههای مختلف در طی پاساژهای ۱-۳ و میانگین PDN کل. B: گراف مربوط به مقایسه میانگین PDN کل در گروههای مختلف. اختلاف معنی داری بین میانگین دوبرابر شدن جمعیت سلولی در کل دوره کشت در گروههای مختلف تیمار و گروه کنترل وجود 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 مولار لیتیوم بوده و غلظت ۱۰ میلی مولار باعث کاهش تکثیر می شود

زمان دو برابر شدن جمعیت

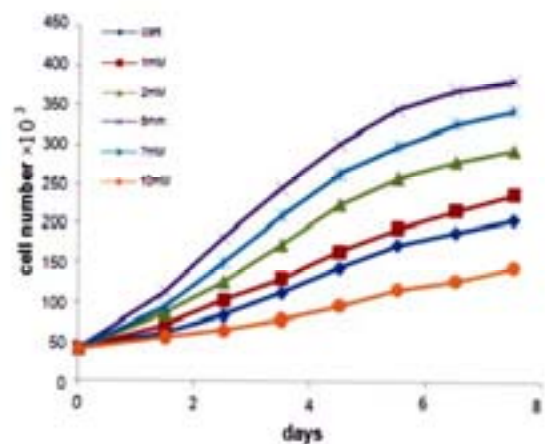
زمان دو برابر شدن جمعیت سلولی برای سلولهای تیمار شده با غلظتهای مختلف لیتیوم در طول دوره کشت (پاساژ اول، دوم و سوم) محاسبه شد. نتایج نشان داد که سلولهای کشت شده در غلظتهای ۱، ۲، ۵، ۷ و ۱۰ میلی مولار کلرید لیتیوم به ترتیب هر $23.4 \pm 1.8/84$ ، $23.8 \pm 1.5/84$ ، $29.3 \pm 0.3/30$ ، $29.3 \pm 0.3/30$ و $32.6 \pm 0.7/32$ ساعت یک بار دوبله شده و نمونه کنترل به طور متوسط هر $30.5 \pm 1.0/30$ ساعت یک بار دوبرابر شده بود. بر اساس آنالیز آماری کمترین زمان به گروه ۵ میلی مولار اختصاص داشت که از این نظر با گروههای دیگر تفاوت آماری داشت (شکل ۲C). تفاوت بین گروههای دیگر نیز معنی دار بود. ($p < 0.001$).

منحنی رشد

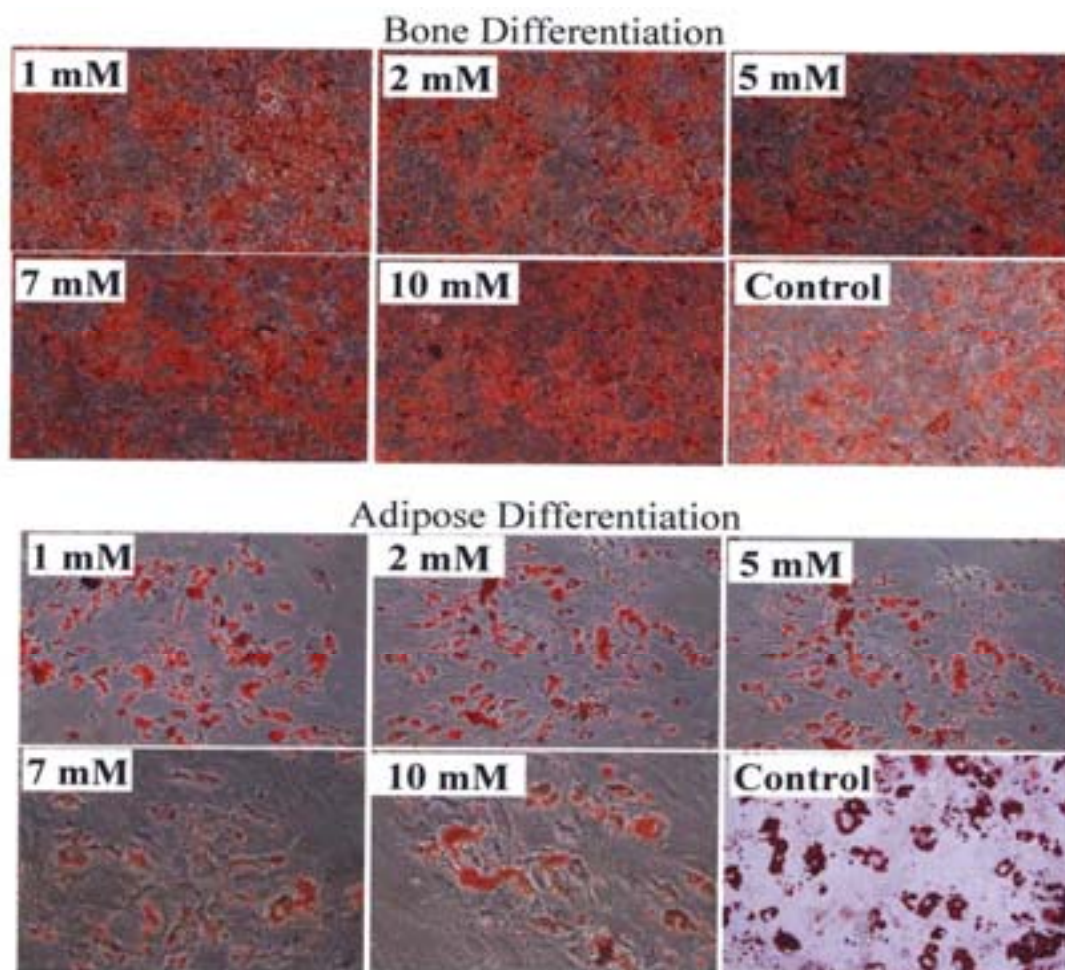
بررسی رشد روزانه سلولهای پاساژ سوم طی هفت (شکل ۳C) روز نشان داد که انتهای فاز log در گروه ۲، ۵ و ۷ میلی مولار به ترتیب ۶/۵، ۴/۹ و ۶/۵ روز بعد از کشت است که اختلاف معنی داری بین گروه ۵ میلی مولار با دو گروه دیگر برقرار بود ($p < 0.001$). اما گروههای کنترل، ۱ و ۱۰ میلی مولار در مدت کشت در فاز log با سرعت رشد پایین قرار داشتند. در منحنی رسم شده که بر اساس شمارش روزانه سلول ترسیم شده بود. فاز Lag به چشم نمی خورد. به عبارتی در تمام گروههای مورد مطالعه از همان ابتدای کشت منحنی رشد یک شیب ملایمی داشت که البته این شیب در گروههای ۲، ۵ و ۷ میلی مولار تندتر بود.

بررسی تمایز

سلولهای بنیادی مزانشیمی پاساژ سوم که به مدت سه هفته تحت تاثیر محیط استئوژنیک و آدیپوژنیک قرار گرفته بودند با استفاده از رنگ آمیزی آلیزارین رد برای استخوان و رنگ آمیزی اوایل 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 اوایل رد قرمز رنگ شدند. پتانسیل تمایز به استخوان و چربی نشان دهنده هویت مزانشیمی سلولهای مورد مطالعه بود.



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



شکل ۴. تمایز به استخوان و چربی سلولهای تکثیر یافته در حضور غلظت های مختلف کلرید لیتیم و کنترل. تمایز استخوانی با آلیزارین رد و تمایز به چربی با اوایل رد رنگ شده است.

بمٲ

از آنجا كه تكثير سلولهای بنيادی مزانشيمي در شرايط آزمایشگاهی در اثر كشت طولانی مدت كاهش می‌یابد [۱۴] و از طرفی برای مطالعات آزمایشگاهی و کاربردهای درمانی به تعداد زیادی از سلولها نیاز است در مطالعه حاضر آثار ميتوژنيکی كلريد ليتيوم بر افزايش تكثير سلولهای بنيادی مزانشيمي مغز استخوان رت بررسی شد. نتايج حاصل نشان داد كه حضور كلريد ليتيوم با غلظت ۵، ۲ و ۱ ميلي مولار در محيط كشت سلولهای بنيادی مزانشيمي سبب افزايش سرعت رشد سلولی در مقایسه با گروه كنترل (محيط فاقد كلريد ليتيوم) می‌شود. در اين میان سرعت رشد در گروه ۵ ميلي مولار بیش از ساير گروهها بود. افزايش توان تكثير سلولهای بنيادی مزانشيمي از مدت‌ها پيشتر مورد توجه پژوهشگران بوده است به طوری كه تا به حال برای اين منظور از روش‌های مختلفی از جمله افزودن برخی فاكٲورهای رشد نظير Fibroblast Growth Factor به محيط كشت اين سلولها استفاده شده است [۲۱]. مطالعه حاضر نیز تلاشی در اين راستا بوده و با افزودن كلريد ليتيوم به عنوان محرک مسير Wnt سعی بر اين داشت كه میزان و سرعت تكثير سلولهای بنيادی مزانشيمي را افزايش دهد.

به دنبال مطالعه ای در سال ۲۰۰۴ عنوان شد كه فعالسازي مسير Wnt به وسيله كلريد ليتيوم و محيط حاوی Wnt3A سبب افزايش تكثير سلولهای بنيادی مزانشيمي انسانی می‌شود [۱۹]. طبق اين گزارش تكثير سلول بنيادی مزانشيمي انسان وابسته به دوز كلريد ليتيوم بوده و غلظت بالاتر از ۱۰ ميلي مولار سبب كاهش تكثير شده و در اين ارتباط مناسبترين غلظت ۴ ميلي مولار گزارش شد. در مطالعه حاضر ۵ غلظت متفاوت شامل ۱، ۲، ۵، ۷ و ۱۰ ميلي مولار از كلريد ليتيوم انتخاب شد و غلظت‌هایی كه در مطالعه پيشين گزارش شده بود تكثير را مهار می‌نمایند (غلظت‌های بالای ۱۰ ميلي مولار)

حذف شد. اين غلظت‌ها در كشت اولیه تا پاساژ سوم سلولها به محيط كشت اضافه شد و تأثير آن بر تكثير سلولی بررسی شد نتايج نشان داد كه غلظت‌های زیر ۴ ميلي مولار شامل ۱ و ۲ ميلي مولار نیز تاثيرات ميتوژنيك بر كشت سلولهای مغز استخوان دارد.

در مطالعه پيشين دبائر (De Boer) و همكاران [۱۹] تاثير حضور كلريد ليتيوم بر كشت اولیه و كلونی زایی سلولهای مغز استخوان را نادیده گرفتند كه اين امر در مطالعه حاضر بررسی شد. بر اساس نتايج به دست آمده، در كشت اولیه گروههای تيمار با كلريد ليتيوم و كنترل، تعداد كلونیهای ايجاد شده متفاوت بود. بيشترين تعداد كلونی در غلظت ۵ ميلي مولار و كمترين تعداد آنها در غلظت ۱۰ ميلي مولار وجود داشت. با توجه به اينكه تعداد كلونیها در كشت اولیه نماینده تعداد سلولهای بنيادی مزانشيمي با خاصيت كلونی زایی در مغز استخوان است به نظر می‌رسد كه در غلظت ۵ ميلي مولار كلريد ليتيوم تعداد بيشتری از سلولهای بنيادی مزانشيمي موجود در مغز استخوان تحريك به تكثير و تشكيل كلونی شده اند. تاثيرات تكثيری كلريد ليتيوم نتيجه ای از خاصيت آن در مهار GSK-3 β است كه سبب فعال شدن مسير Wnt شده، در نهايت تكثير سلولی تحريك می‌شود [۱۶-۱۵]. تاثيرات تكثيری كلريد ليتيوم در اندازه كلونیهای ايجاد شده نیز به خوبی مشهود بود.

همچنين در مطالعه حاضر بر خلاف De Boer و همكاران [۱۹]، برای سلولهای حاصل از پاساژ سوم گروههای مختلف منحنی رشد رسم شد و فاز لگاریتمی آنها با هم مقایسه شد. بر اساس نتايج سلولهای تكثير یافته در حضور غلظت ۵ ميلي مولار طی ۴/۹ روز فاز لگاریتمی را طی کرده و به مرحله اشباع رسیدند. اين در حالی بود كه طی اين مدت گروه كنترل و غلظت‌های ۱ و ۱۰ ميلي مولار هنوز در مرحله Log قرار داشتند. از طرف ديگر شاخص‌های PDN و DT نشان دهنده

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 نمی‌کند بلکه برای اثبات این موضوع به کارگیری 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.

این واقعیت بود که سرعت تکثیر سلولهای مغز استخوان در گروه‌های تیمار با غلظتهای ۲، 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، Low affinity nerve (LNGFR)، 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 مزانشیمی آنها به اثبات رسید. بر اساس نتایج رنگ آمیزی به نظر رسید که در

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. **Pieterella S, Anker SA, Kleijburg-van der keur C, Noort WA, Class FH, Willemze R, et al.** Amniotic fluid as a novel source of mesenchymal

- stem cells for therapeutic transplantation. *Blood* 2003; 102:1548-9
8. **Erices A, Conget P, Minguell JJ.** Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br J Haematol* 2000; 109:235-42.
9. **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; 48:1270-7.
18. **Smits VA, Essers MA, Loomans DS, Klomp maker 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 inbred mice 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. **Gronthos S, Simmons PJ.** The growth factor requirements of STRO-1-positive human bone marrow stromal precursors under serum-derived conditions in vitro. *Blood* 1995; 85: 929-940.
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.