

## مطالعه تأثیر بایو [6-bromoindirubin-3'-oxim (BIO)] بر تکثیر و تمایز به استخوان سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان موش صحرایی

دکتر محمدرضا باغبان اسلامی نژاد\*، فریمه سلامی\*\*، دکتر ملک سلیمانی مهرنجانی\*\*\*، دکتر محمدحسین آبنوسی\*\*\*

دریافت: ۸۷/۹/۲۱ ، پذیرش: ۸۸/۲/۹

### چکیده:

**مقدمه و هدف:** بر اساس شواهد موجود، یکی از مسیرهای مولکولی دخیل در تکثیر و تمایز به استخوان سلول ها مسیر سیگنال دهی Wnt است. از طرف دیگر مطالعات نشان داده است که 6-bromoindirubin-3'-oxim (BIO) قادر است این مسیر را فعال نماید. در مطالعه حاضر تأثیر BIO بر تکثیر و تمایز به استخوان سلول های بنیادی مزانشیمی بررسی شده است. **روش کار:** در مطالعه تجربی حاضر، از سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان موش صحرایی استفاده شد. ابتدا برخی غلظتهای BIO از لحاظ تأثیر بر توان زیستی سلولها ارزیابی گردید. سپس غلظتهای از BIO شامل ۰/۰۱، ۰/۱، ۱، ۱/۵ میکرومولار که تأثیرات منفی بر توان زیستی سلول ها نداشتند، انتخاب شدند و به عنوان مکمل به محیط کشت تکثیر و تمایز به استخوان سلولهای بنیادی مزانشیمی اضافه شدند. برای بررسی اثر BIO بر تکثیر سلولها، تعداد دوبرابر شدن جمعیت سلولی محاسبه شد. برای مطالعه اثر BIO بر تمایز به استخوان، میزان بیان نسبی ژن های ویژه استخوانی و میزان معدنی شدن کشت تمایز تعیین گردید. در تمامی این بررسیها، کشت بدون BIO به عنوان کنترل در نظر گرفته شد و برای ارزیابی داده از آزمون آماری ANOVA استفاده گردید. **نتایج:** نتایج تعیین دوبرابر شدگی جمعیت سلولی نشان داد که میزان این شاخص رشد در گروه ۱/۰ و ۱/۵ میکرومولار بطور معنی داری بیش از گروههای دیگر است ( $P < 0.05$ ). بررسی میزان تمایز نشان دهنده تأثیرات منفی BIO بر تمایز به استخوان سلول های بنیادی مزانشیمی بود. بطوریکه سلول ها در تمام غلظتهای مورد استفاده نسبت به گروه کنترل، ژن های استئوکلسین و آلکالین فسفاتاز را به میزان کمی بیان کردند و میزان معدنی شدن کشت آنها بطور معنی داری کمتر از گروه کنترل بود. **نتیجه نهایی:** روی هم رفته به نظر می رسد BIO تکثیر سلولهای بنیادی مزانشیمی را تحریک می نماید، در حالیکه تأثیرات مهباری بر تمایز به استخوان این سلول ها دارد.

**کلید واژه ها:** تمایز به استخوان / چربی / سلولهای بنیادی مزانشیمی / مسیر سیگنال دهی Wnt

### مقدمه:

۴ ساعت یا بیشتر سلول های غیر چسبنده رده خونساز را دور ریخت. او گزارش کرد که بخشی از سلول های چسبنده مغز استخوان که اتصالات محکمی با سطح دیش کشت برقرار کرده، دوکی شکل بوده و تجمعات دو تا چهار سلولی ایجاد می کند. بر اساس مشاهدات این محقق، تجمعات فوق به مدت ۲-۴ روز خاموش باقی ماندند و پس از آن به سرعت تکثیر یافتند. این سلول ها پس از چندین بار پاساژ به صورت یکدست دوکی ظاهر شدند (۲).

سلول بنیادی مزانشیمی طبق تعریف به سلولی گفته می شود که بتواند برای مدت نسبتاً طولانی تقسیمات خودتجدیدی داشته باشد و با فراهم شدن شرایط لازم به رده های اسکلتی متمایز شود (۱). اولین شواهد قطعی مبنی بر وجود سلول بنیادی مزانشیمی توسط فریدنشتین در اواسط سال ۱۹۷۰ ارائه شد. این محقق نمونه های مغز استخوان را در یک ظرف پلاستیکی کشت داد و پس از

\* دانشیار گروه سلولهای بنیادی مرکز تحقیقات علوم سلولی جهاد دانشگاهی (Eslami@royaninstitute.org)

\*\* کارشناس ارشد گروه زیست شناسی دانشکده علوم دانشگاه اراک

\*\*\* استادیار گروه زیست شناسی دانشکده علوم دانشگاه اراک

تحقیقات بعدی مشاهدات اولیه فریدنشتین و همکاران را تایید کرد (۳،۴).

براساس مطالعات پیشین، سلولهای بنیادی مزانشیمی در نمونه های مغز استخوان به تعداد بسیار محدودی وجود دارند. تعداد این سلول ها در حدود ۱۵-۱۰ سلول به ازای هر  $10^6$  سلول هسته دار مغز استخوان تخمین زده می شود. لذا تکثیر آزمایشگاهی این سلولها قبل از هر گونه کار تجربی یا بالینی اجتناب ناپذیر است (۱). از طرفی پتانسیل تمایز به استخوان از توانایی های مشخصه سلولهای بنیادی مزانشیمی بوده و با معرفی آن امید های زیادی برای درمان ضایعات بافت استخوان بوجود آمده است. تحقیقات پیشین ما کارایی این سلول ها را در باز سازی ضایعات وسیع استخوان به خوبی نشان داده است (۵،۶).

به منظور بهبود پروتکل های تمایز و تکثیر سلول بنیادی مزانشیمی، محققین علاقمند هستند که مسیرهای مولکولی در گیر در این فرآیندهای سلولی را بیشتر بررسی نمایند. یکی از مسیرهای سیگنال دهی که با تکثیر سلول و تمایز به استخوان در ارتباط است، مسیر Wnt است. شواهد مربوط به ارتباط مسیر Wnt با تمایز به استخوان را به خوبی می توان در جهش های مربوط به ژن LRP5 (Low density lipoprotein-related protein) انسان و موش مشاهده کرد. این مولکول در مسیر سیگنال دهی Wnt به عنوان کورسپتور گلیکوپروتئین Wnt ایفای نقش می کند. جهشهای فقدان عملکرد و کسب عملکرد در LRP5 انسانی به ترتیب باعث Osteoporosis (کاهش دانسیته استخوان) و Osteopetrosis (افزایش توده استخوان) می شود. در موش هایی که مولکول LRP5 آنها معیوب است تعداد استئوبلاستها کاهش می یابد (۱۰-۷). در ارتباط با دخالت مسیر Wnt در تکثیر و تمایز به استخوان سلول های بنیادی مزانشیمی اطلاعات بسیار اندک است.

مسیر سیگنال دهی کانونیکال Wnt یک مکانیزم حفظ شده در تمام جانوران پر سلولی است. (۱۱). در این مسیر گلیکوپروتئینهای ترشحی Wnt بر روی رسپتور frizzled و کورسپتور LRP5/6 نشسته و سبب فسفوریلاسیون (فعال شدن) پروتئین Disheveled می شوند. Disheveled فعال شده، سبب مهار  $\beta$  Glycogen Synthase Kinas-3 می شود که نتیجه آن فسفوریله نشدن  $\beta$ -catenin (GSK3- $\beta$ ) و جدا شدن آن از APC است.  $\beta$ -catenin در

سیتوپلاسم تجمع یافته، در نهایت وارد هسته می شود و در آنجا با اتصال به فاکتورهای نسخه برداری ویژه (TCF/LEF)، ژنهای هدف وابسته به Wnt را فعال می کند. در صورت فعال نشدن این مسیر،  $\beta$ -catenin فسفریله شده، سریعاً توسط یوبی کوئیتین-پروتئازوم تخریب می شود (۱۳-۱۱).

تحقیقات نشان داده است که ماده ای موسوم به 6-Bromoindirubin-3'-Oxime (BIO) که یکی از مشتقات ایندیروبین است و از یک نرم تن دریایی به نام Trypan purple به دست می آید، می تواند بر مسیر سیگنال دهی Wnt تاثیر گذار باشد. (۱۴). این ماده در فرورفتگی اتصال ATP به مولکول GSK3- $\beta$  قرار گرفته و با مهار GSK3- $\beta$  در فعال کردن مسیر سیگنال دهی کانونیکال Wnt موثر است (۱۵). تا به حال تاثیرات BIO در بهبود رشد سلولهای نظیر سلولهای عصبی هیپوکامپ (۱۶)، سلول های لوله پروکسیمال کلیه (۱۷) و سلولهای بنیادی جنینی انسان و موش بررسی شده است (۱۸). همچنین زاراگوسی و همکاران در سال ۲۰۰۸ با افزودن BIO به غلظت ۰/۵ میکرومولار در محیط کشت سلول های بنیادی مشتق از چربی انسان به این نتیجه رسیدند که BIO تکثیر و تمایز به استخوان سلول های بنیادی چربی را مهار می کند (۱۹). در ارتباط با تاثیر BIO بر رشد و تمایز به استخوان سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان گزارشی در دست نیست. لذا مطالعه حاضر به این موضوع پرداخته است. هدف این مطالعه، تعیین تأثیر BIO بر تکثیر و تمایز به استخوان سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان موش صحرایی در محیط کشت است. فرضیه ما این است که BIO با تاثیر بر مسیر سیگنال دهی Wnt، میزان تکثیر و تمایز به استخوان سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان موش صحرایی را در محیط کشت، تحت تاثیر قرار می دهد.

### روش کار:

جداسازی و کشت سلولهای مغز استخوان: در این مطالعه تجربی از ۷ سر موش صحرایی نر نژاد Wistar با سن تقریبی ۲ ماهه استفاده شد. پیش از آغاز مطالعه، مجوز لازم جهت استفاده از این تعداد حیوان آزمایشگاهی از کمیته اخلاق پزشکی پژوهشکده رویان اخذ شد. موش ها با روش در رفته کردن مهره های گردنی قربانی شدند. بافتهای نرم اطراف استخوان های درشت نی و ران با

پس از ۱-۱/۵ ساعت انکوباسیون در 37°C و ۵٪ CO<sub>2</sub> کریستالهای فورمازون تشکیل شد. پس از حل کردن کریستالها در ۳۰۰ میکرولیتر DMSO (Germany/Sigma) میزان جذب طول موج (540-630) نانومتر توسط دستگاه ELISA-reader اندازه گیری شد.

تاثیر BIO بر تکثیر سلول های بنیادی مزانشیمی: برای این منظور سلول های بنیادی مزانشیمی از پاساژ سوم، به تعداد ۱۰<sup>۵</sup> سلول در فلاسک های ۲۵ سانتیمتر مربعی و در محیط DMEM حاوی ۱۰٪ سرم گاوی و آنتی بیوتیک کشت شد. ۲۴ ساعت پس از آغاز کشت محیط سلول ها با محیط حاوی غلظتهای ۰/۱، ۰/۱، ۱، ۱/۵ میکرومولار BIO (این غلظت ها براساس نتایج MTT انتخاب شد) تعویض شد. کشت با محیط DMEM بدون BIO به عنوان کنترل در نظر گرفته شد. کشت سلول به مدت ۵ روز ادامه یافت و در پایان این مدت سلول ها ترپسینه شدند و مورد شمارش قرار گرفتند و با استفاده از فرمول  $PDN = (\log N/N_0) \times 3.31$  میزان دوبرابر شدن جمعیت سلولی برای غلظت های مختلف BIO و گروه کنترل محاسبه گردید در این فرمول N تعداد سلول ها در پایان دوره و N<sub>0</sub> تعداد سلول ها در آغاز کشت است.

کشت تمایز به استخوان: سلولهای پاساژ ۳ در ظروف ۶ چاهکی کشت داده شده بودند و پس از آنکه به تراکم تقریباً ۸۰٪ رسیدند، محیط برخی چاهک ها با محیط تمایز به استخوان فاقد BIO (گروه کنترل) و برخی دیگر با محیط تمایز به استخوان حاوی غلظت های ۰/۱، ۰/۱، ۱، ۱/۵ میکرو مولار BIO تعویض شد. محیط تمایز شامل محیط DMEM حاوی ۱۰٪ سرم گاوی، ۱۰ میلی مولار بتاگلیسرول فسفات، ۱۰<sup>۸</sup> مولار دگزامتازون، ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر اسکوربیک-۳ فسفات بود. محیط کشت هر ۳ روز یکبار به مدت سه هفته تعویض شد. در پایان دوره تمایز، گروههای مختلف از لحاظ بیان استئوکلسین و آلکالین فسفاتاز و معدنی شدن کشت مقایسه شدند.

RT-PCR نیمه کمی برای اندازه گیری بیان نسبی ژنهای استخوانی: پس از لیز نمودن سلول ها به کمک محلول RNAex (CinaGen Inc., Tehran, Iran) و استخراج RNA سلولی، با استفاده از RevertAid TM H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas) از روی RNA حاصل cDNA در حجم بالا ساخته شده و سپس PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر با dNTPs (Fermentas) به حجم

اسکالپل و قیچی جدا شد، آنگاه استخوان ها در محیط Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM (Gibco, Germany) حاوی ۱۵٪ سرم گاوی (Fetal Bovin Serum, Gibco, Germany) در فالكون ۱۵ قرار گرفتند و باقی مراحل استخراج در زیر هود استریل انجام شد. ابتدا دو سر استخوان بریده شد و با استفاده از یک سرنگ، محیط DMEM حاوی ۱۵٪ سرم به داخل کانال استخوانی هدایت شد تا محتویات مغز استخوان آن شسته شود (عمل flushing). مغز استخوان در داخل لوله های استریل جمع آوری شد و تحت ۱۲۰۰ g به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ گردید. آنگاه محیط رویی تخلیه و پلت سلولی با ۱۰ میلی لیتر محیط DMEM واجد ۱۵٪ سرم FBS و ۱۰۰ واحد بین المللی آنتی بیوتیک پنی سلین و ۱۰۰ واحد بین المللی استرپتومایسین (Gibco; Germany) تازه معلق گردید و پس از شمارش با تراکم ۱۰<sup>۵</sup> سلول در سانتیمتر مربع در فلاسکهای ۲۵ سانتیمتر مربعی کشت شد. کشت اولیه سلول تا زمان پر شدن کف فلاسک ادامه یافت، در این زمان سلول ها ترپسینه شدند و با انجام چند پاساژ تکثیر گردیدند.

کشت سلول در غلظت های مختلف BIO و بررسی توان زیستی سلول های حاصل: در مطالعات پیشین نشان داده شده است برخی غلظت های Bio، در کشت سلولهای پوششی کلیه و سلول های بنیادی جنینی، غلظت های غیر توکسیک هستند (۱۷، ۱۸). برای تعیین اینکه این غلظت ها در کشت سلول های بنیادی مزانشیمی نیز همان تاثیرات غیر سمی را دارد یا نه، از تست MTT استفاده شد. بدین ترتیب که، سلول های پاساژ ۳ به تعداد ۱۰<sup>۵</sup> × ۵ سلول در هر خانه پلیت ۲۴ خانه ای و در حضور چندین غلظت BIO شامل ۰/۱، ۰/۱، ۱، ۱/۵ و ۲ میکرو مولار کشت شد و بعد از ۷ روز، توان زیستی سلول ها با روش MTT ارزیابی گردید. روش MTT بر اساس فعالیت متابولیکی سلول استوار است. در این روش تترازولیوم زرد (2,5-dimethylthiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) توسط سیستم سوکسینات - تترازولیوم ردوکتاز متعلق به زنجیره تنفسی میتوکندریایی که تنها در سلولهای زنده فعال است به کریستالهای فورمازان بنفش رنگ غیر قابل حل در آب تبدیل می شود. برای انجام MTT، محیط رویی پلیت با ۶۰ میکرولیتر محلول MTT (۵ میلی گرم در میلی لیتر) تعویض گردید.

مدت ۱۰ دقیقه رنگ شد. در مرحله بعدی کشت سلولی با آب مقطر شستشو شد. سپس ماتریکس قرمز رنگ در اسید استیک ۱۰٪ حل شد. در انتها تراکم اپتیکیال محلول های حاصل در طول موج ۴۰۵ نانومتر ثبت شد و با تراکم اپتیکیال غلظت های مشخص آلیرلین رد که به همراه کیت آلزارین رد توسط کارخانه سازنده ارائه شده بود، مقایسه گردید.

ارزیابی تمایز به چربی سلول های مورد مطالعه: در این مطالعه برای اینکه از ماهیت بنیادی مزانشیمی سلول های مورد بررسی اطمینان حاصل کنیم، پتانسیل تمایز به چربی آنها بررسی گردید. بدین ترتیب که سلولهای پاساژ سوم مورد شمارش قرار گرفته و به تعداد  $10^5$  سلول در هر چاهک پلیت ۱۲ چاهکی کشت شدند بعد از اینکه بیش از ۸۰٪ کف چاهک توسط سلولها اشغال شد محیط کشت سلول با محیط تمایز آدیپوژنیک شامل DMEM حاوی ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر اسکوربیک اسید ۳-فسفات، ۱۰۰ نانومولار دگزامتازون و ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر ایندومتاسین جایگزین شد (۵،۲۰). محیط کشت سلول ها هر ۳ روز یکبار تعویض شد و ۲۱ روز بعد از آغاز کشت، وقوع تمایز با رنگ آمیزی اوایل رد بررسی شد. برای رنگ آمیزی اوایل رد، سلولها بمدت یک ساعت در دمای اتاق با فرمالین ۴ درصد فیکس شدند و سپس با الکل ۷۰ درصد شسته شدند. آنگاه، یک میلی لیتر محلول ۰/۵ درصد اوایل رد در ایزوپروپانل ۹۹٪ (Sigma, USA) بر روی سلول ها اضافه شد. پس از ۱۵-۱۰ دقیقه، محلول رنگی خارج گردید و سلول ها، سه بار با الکل ۷۰ درصد شستشو داده شدند و با میکروسکوپ مشاهده شدند.

بررسی های آماری: آزمون آماری ANOVA برای ارزیابی داده ها استفاده شد تفاوت های با  $P < 0/05$  معنی دار فرض شد. داده ها به صورت میانگین  $\pm$  انحراف از استاندارد (SD) بیان شدند.

۱۰ میکرولیتر (۲۰۰ نانومولار)،  $MgCl_2$  به حجم ۳ میکرولیتر (۱/۵ میلی مولار) و آنزیم Taq DNA polymerase (Fermentas) به حجم ۲/۵ میکرولیتر و ۱۰ پیکومول از پرایمرهای ژن های اختصاصی انجام شد. پرایمر های مورد استفاده به همراه دمای Annealing هر کدام در جدول ۱ نشان داده شده است. محصول PCR درون چاهکهای ژل ریخته شد (در این مرحله، محصول PCR ژن رفرانس در گروههای مختلف به اندازه ۲ برابر رقیق شده و درون چاهکهای ژل آگارز ۱/۷٪ ریخته شد). بعد از الکتروفورز، ژل ها با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شده و تصویر آن گرفته شد. با استفاده از نرم افزار UVIBANDMAP میزان بیان ژنهای مورد نظر نسبت به ژن رفرانس ارزیابی شد. بطوریکه بیان ژن رفرانس ۱۰۰ در نظر گرفته شده و بیان ژنهای هدف بر مبنای آن محاسبه شد. برنامه PCR به شرح زیر بود:

۱- دمای denaturing ابتدایی ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۴ دقیقه ۲- دمای denaturing ثانویه ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۴۵ ثانیه ۳- دمای annealing مطابق جدول ۱ به مدت ۴۵ ثانیه ۴- دمای extension ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۴۵ ثانیه ۵- دمای extension نهایی ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه. مرحله ۲ تا انتهای مرحله ۴ به تعداد ۳۲ سیکل تکرار شد.

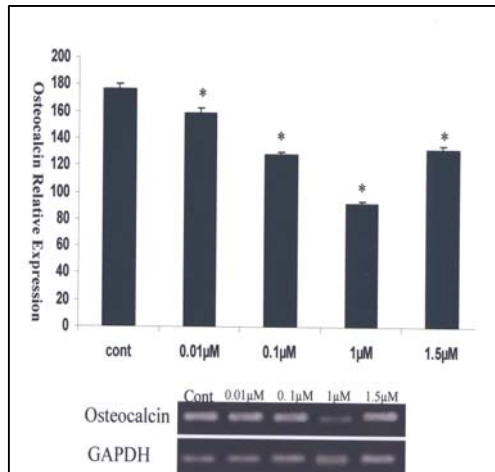
اندازه گیری میزان مینرالیزاسیون کشت تمایز: آلیرلین رد ماده ای است که بطور اختصاصی ماتریکس معدنی شده را رنگ می کند، بطوریکه شدت رنگ پذیری بافت با میزان مواد معدنی موجود در ماتریکس آن ارتباط مستقیم دارد. در مطالعه حاضر کشت تمایز به استخوان با کیت کمی سازی آلیرلین رد (Chemicon, USA) مورد ارزیابی قرار گرفت. نحوه کار بر اساس دستور کارخانه سازنده بود. بطور خلاصه، ابتدا کشت سلولی با فرمالین ۱۰٪ به مدت ۱۵ دقیقه فیکس شدو سپس با محلول رنگی آلیرلین رد به

جدول ۱: پرایمرهای مورد استفاده در RT-PCR

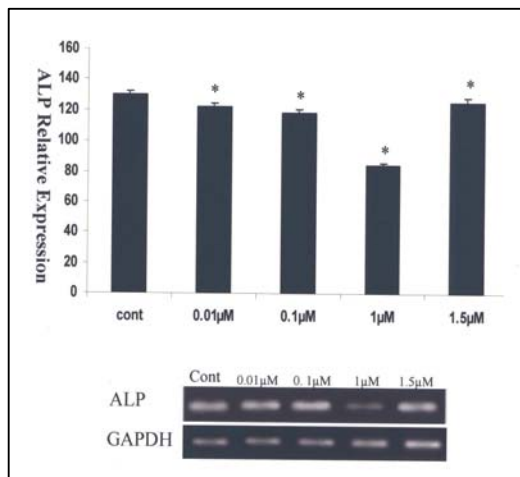
Genes	Primers	Annealing Temperature (°C)	Product Size (bp)	Accession Number
ALP	F: CGGACCCTGCCTTACCAACTCATTTGTGC R:CGCACGCGATGCAACACCACTCAGG	72	396	J03572.1 (NCBI)
osteocalcin	F: GATTATAGTGACACAGAC R:AGCAGGAATACTAAGTGC	56	287	ENSRNO600000019607 (ENSEMBL)
GAPDH	F: TGCTGAGTATGTCGGGAGTC R:AAAGGTGGAAGAATGGGAG	53	612	BC059110.1 (NCBI)

**نتایج:**

آنالیز RT-PCR نیمه کمی: در همه گروههای مورد مطالعه ژن های استئوکلسین و آلکالین فسفاتاز (ALP) بیان شد. در تمام گروههای BIO این میزان بطور معنی داری کمتر از کنترل بود (شکل ۲و ۳).



شکل ۲: بالا: نمودار مربوط به میزان بیان نسبی ژن استئوکلسین در کشت تمایز به استخوان سلول های بنیادی مزانشیمی در حضور غلظت های مختلف Bio. پایین: باندهای مربوط به Semi-quantitative RT-PCR. \* نشان دهنده تفاوت معنی دار گروه BIO با کنترل است ( $P < 0.05$ )

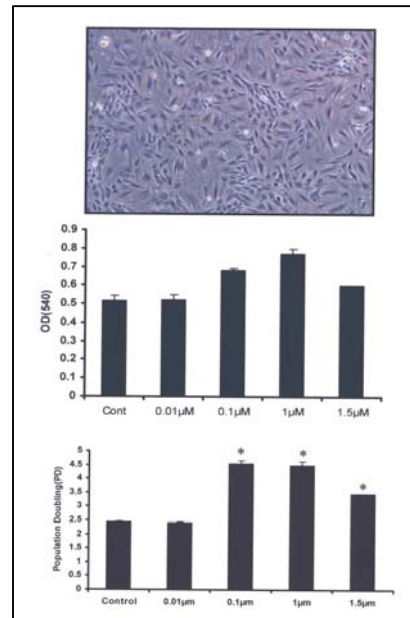


شکل ۳: بالا: نمودار مربوط به میزان بیان نسبی ژن آلکالین فسفاتاز (ALP) در کشت تمایز به استخوان سلول های بنیادی مزانشیمی در حضور غلظت های مختلف Bio. پایین: باندهای مربوط به Semi-quantitative RT-PCR. \* نشان دهنده تفاوت معنی دار گروه BIO با کنترل است ( $P < 0.05$ )

کشت سلول: سلول های مغز استخوان در طی کشت اغلب ظاهر فیبروبلاستی داشتند و این مورفولوژی را در طی پاساژها حفظ کردند (شکل ۱، بالا).

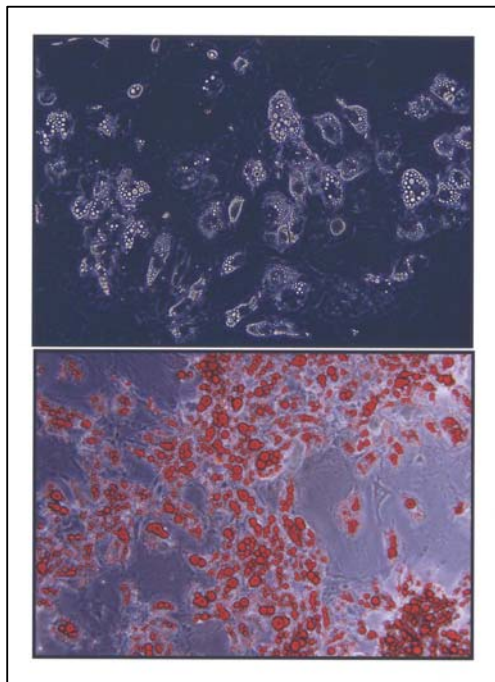
توان زیستی سلول ها در حضور BIO: بر اساس نتایج بدست آمده در غلظت های ۰/۰۱، ۰/۱، ۱ و ۱/۵ میکرو مولار BIO سلول های بنیادی مزانشیمی زنده ماندند و رشد کردند (شکل ۱، وسط)، در حالیکه غلظت ۲ میکرو مولار سبب مرگ سلولها شد.

تکثیر سلولی: بر اساس نتایج، در حضور BIO سرعت تکثیر سلولی بطور قابل توجهی افزایش یافت. بیشترین PDN مربوط به غلظتهای ۱ و ۰/۱ بوده و تفاوت آنها با گروههای دیگر از جمله گروه کنترل و گروه های ۱/۵ و ۰/۰۱ میکرومولار از لحاظ آماری معنی دار بود ( $P < 0.05$ ). از این نظر دو غلظت ۱ و ۰/۱ در مقایسه با همدیگر تفاوت بسیار اندکی داشتند (شکل ۱، پایین). همچنین گروه ۰/۰۱ BIO تفاوتی با گروه کنترل نداشت ولی تفاوت آن با غلظت ۱/۵ میکرومولار BIO معنی دار بود ( $P < 0.05$ ).



شکل ۴: بالا: سلول های بنیادی مزانشیمی جداسده از مغز استخوان موش صحرایی عمدتا مورفولوژی فیبروبلاستی داشتند. وسط: نمودار مربوط به MTT برای سنجش میزان توان زیستی سلولها. پایین: نمودار مربوط به میزان دو برابر شدن جمعیت سلول های بنیادی مزانشیمی در حضور غلظتهای مختلف BIO

\*نشان دهنده تفاوت معنی دار گروه BIO با کنترل است ( $P < 0.05$ )

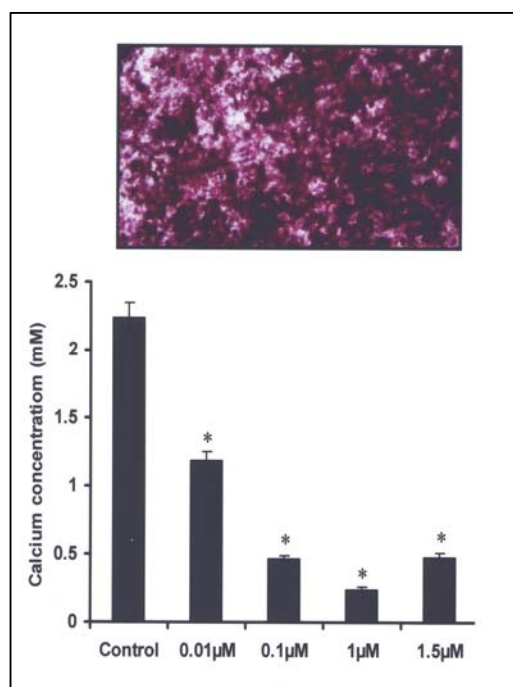


شکل ۵: کشت تمایز به چربی، ۲۱ روز پس از آغاز کشت. بالا: کشت بدون رنگ آمیزی پایین: کشت با رنگ آمیزی اویل رد. توان تمایز به رده آدیپوسیتی در کنار تمایز به استخوان حاکی از ماهیت بنیادی مزانشیمی سلول های مورد مطالعه بود.

#### بحث:

در مطالعه حاضر نقش مسیر سیگنال دهی wnt در تکثیر و تمایز به استخوان سلول های بنیادی مزانشیمی، با استفاده از BIO که با مهار GSK3 $\beta$  مسیر Wnt را فعال می سازد، مورد بررسی قرار گرفت. نتایج بدست آمده نشان داد که غلظت های ۰/۱، ۱ و ۱/۵ میکرومولار BIO، بطور معنی داری تکثیر سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان موش صحرایی را تقویت می کند. همچنین یافته های ما نشان داد که در دامنه غلظتی ۰/۱، ۰/۱، ۱ و ۱/۵ میکرومولار تمایز به استخوان سلول ها در کشت استئوژنیک مهار می شود. به هر حال اینکه BIO بر کشت سلول های بنیادی مزانشیمی تاثیرات میتوژنیک دارد، یافته ارزشمندی است. زیرا از این خاصیت BIO می توان در استراتژیهای سلول درمانی و مهندسی بافت استفاده کرد و با افزودن آن به محیط کشت سلول های بنیادی مزانشیمی و با تقویت تکثیر سلولی، سلول به تعداد کافی برای این فناوریهای پیشرفته تامین نمود. در ارتباط با تاثیر BIO بر میزان تمایز استخوانی، گزارش های متفاوتی ارائه شده است. مطالعات جهش ژنی

این نتایج حاکی از تاثیرات مهاری BIO بر تمایز به استخوان سلول ها بود. در گروههای BIO غلظت ۱ میکرومولار بیشترین تاثیرات مهاری را داشت بطوریکه کمترین میزان بیان ژن های ویژه استخوانی در این گروه اتفاق افتاده بود. میزان رسوب مواد معدنی: بر اساس نتایج بدست آمده، در کشت با BIO میزان مینرالیزاسیون بطور معنی داری کمتر از گروه کنترل بود ( $P < 0.001$ ). از این نظر کمترین میزان به کشت با غلظت ۱ میکرومولار تعلق داشت و بیشترین مینرالیزاسیون در کشت با ۰/۱ میکرومولار مشاهده شد (شکل ۴).



شکل ۴: بالا: رنگ آمیزی آلیزارین رد کشت استئوژنیک. پایین: نمودار مربوط به میزان کلسیم رسوب کرده در کشت استئوژنیک سلول های بنیادی مزانشیمی در حضور غلظت های مختلف Bio. \* نشان دهنده تفاوت معنی دار گروه BIO با کنترل است ( $P < 0.05$ )

تمایز به چربی: به دنبال رنگ آمیزی اویل رد، دانه های چربی تشکیل شده در کشت تمایز به چربی قرمز رنگ شد. (شکل ۵). در مجموع توان تمایز به چربی در کنار ظرفیت تمایز به استخوان سلول ها، نشان دهنده هویت مزانشیمی سلولهای مورد مطالعه بود.

یافته های آنها مخالف است. البته باید به خاطر داشت که این پژوهشگران سلول های بنیادی مشتق از چربی انسانی را مطالعه کردند و ما از سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان موش صحرایی استفاده کردیم.

یافته های درآوید نشان داد که گلیکوپروتئین Wnt با فعال کردن مسیر  $\beta$  catenin و فعال شدن فاکتورهای نسخه برداری TCF (T Cell Factor) سبب بیان دو گروه ژنی می گردد: ۱- ژن های IFG II که سبب فعال شدن مسیر PI3K/AKT شده و بقای سلولی را افزایش می دهد ۲- ژن های سیکل سلولی از قبیل ژن Myc، ژن سیکلین D1 و ژن MSX 1 که نتیجه نهایی آن افزایش تکثیر است. اگرچه بیان این ژنها در مطالعه حاضر بررسی نشد ولی تاثیرات تکثیری BIO به عنوان آگونیست سنتزی Wnt در پژوهش حاضر می تواند از طریق این مکانیسم و با بیان ژن های سیکل سلولی نامبرده، تامین شده باشد (۲۲).

در مطالعه ای بین و همکاران با بررسی نقش مسیر Wnt بر تمایز به استخوان رده سلولی C3H10T1/2 به این نتیجه رسیدند که در سطوح پایین سیگنال دهی Wnt، تمایز استئوژنیک مهار شده و تکثیر استئوپروژنیوتورها تحریک می شود و در سطوح بالای فعالیت این مسیر، تمایز استئوژنیک تحریک می شود (۲۳). این یافته با این اعتقاد که تمایز و تکثیر دو پدیده مخالف هم هستند هم خوانی دارد (۲۴). با توجه به یافته های تحقیق حاضر، BIO در دامنه غلظتی ۱/۵-۰/۱ میکرومولار تاثیرات تکثیری بر کشت سلول های بنیادی مزانشیمی نشان داد ولی تاثیرات آن در این دامنه غلظتی بر کشت تمایز به استخوان از نوع مهاری بود. در مطالعه حاضر به دلیل اینکه غلظت های بالای ۲ میکرومولار توکسیک بود، بررسی سطوح بالای فعالیتی مسیر Wnt با افزایش غلظت BIO میسر نشد.

اگرچه تلاش های زیادی در جهت شناسایی مارکرهای سطحی سلول های بنیادی مزانشیمی انجام شده است، با این وجود مارکر ویژه منفردی معرفی نشده است. در این ارتباط چندین مارکر از جمله CD133، Low (LNGFR، affinity nerve growth factor receptor و STRO-1) برای سلول های بنیادی مزانشیمی انسانی پیشنهاد شده است ولی برای سلول های بنیادی مزانشیمی حیوانی مارکر اختصاصی ذکر نشده است (۲۷-۲۵). به همین دلیل در مطالعات پیشین از توان تمایز سلولی برای ارزیابی ماهیت بنیادی مزانشیمی استفاده شده است (۳۰-۲۸). در

در انسان نشان داده است که بین فعال شدن Wnt و افزایش استخوان سازی ارتباط مستقیمی وجود دارد، در حالیکه زاراگوسی و همکاران عنوان کرده اند که BIO به عنوان فعال ساز مسیر Wnt، تمایز به استخوان سلول های بنیادی جدا شده از چربی انسان را مهار می کند (۱۹). یافته های مطالعه حاضر مبنی بر تاثیرات مهاری BIO بر تمایز به استخوان سلول های بنیادی مزانشیمی، موافق با یافته های مطالعه فوق است، ولی با مطالعه جهش های ژنی مغایرت دارد. با توجه به اینکه مطالعات جهش ژنی در محیط *in vivo* انجام شده، این احتمال وجود دارد که علت تفاوت در نتایج، تفاوت شرایط آزمایشگاهی و محیط بدن باشد. محیط بدنی ساختار پیچیده ای است که در آن سلول ها در یک محیط سه بعدی و در تعامل با یکدیگر و ماتریکس خارج سلولی قرار دارند. تحت چنین شرایطی، مسیرهای سیگنال دهی متعددی می تواند در یک سلول فعال شود که برآیند آنها عامل تعیین کننده تمایز سلولی است. در حالیکه در محیط آزمایشگاهی که سلول ها به صورت تک لایه کشت می شوند، اغلب تعامل های یاد شده در شرایط *in vivo* وجود ندارد (۲۱). زاراگوسی و همکاران با افزودن BIO به میزان ۰/۵ میکرومولار به محیط تکثیر و تمایز به استخوان سلول های بنیادی مشتق از بافت چربی انسان دریافتند که این ماده تاثیرات مهاری بر تکثیر و تمایز سلولی دارد (۱۹). این محققین به این دلیل غلظت ۰/۵ میکرومولار را انتخاب کردند که مطالعات اولیه آنها نشان داد که این غلظت سبب تجمع  $\beta$ -catenin در هسته سلولی می شود در حالیکه غلظت ۰/۱ میکرومولار هیچگونه تاثیری بر تجمع  $\beta$  catenin در هسته ندارد و غلظت ۵ میکرومولار سبب مرگ سلولی می شود. در مطالعه حاضر نیز برخی غلظتهای BIO که در مطالعات پیشین در کشت سلول های دیگر نیز استفاده شده بود، انتخاب شد (۱۷، ۱۸) و تاثیر آنها بر توان زیستی سلول ها آزمایش گردید. و غلظت هایی از آن که با زنده بودن سلول منافات داشت حذف گردید و مابقی از لحاظ اثر بر تکثیر و تمایز به استخوان سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان موش صحرایی بررسی شد. نتایج بررسیهای ما از این نظر که BIO سبب مهار تمایز به استخوان سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان می شود با کار زاراگوسی و همکاران مطابقت دارد ولی از نظر تاثیر بر تکثیر سلولی با

9. Little RD, Carulli JP, Del Mastro RG, Dupuis J, Osborne M, Folz C, et al. A mutation in the LDL receptor-related protein 5 gene results in the autosomal dominant high-bone-mass trait. *Am J Hum Genet.* 2002; 70:11-19.
10. Kato M, Patel MS, Levasseur R, Lobov I, Chang BH, Glass DA, et al. Cbfa1-independent decrease in osteoblast proliferation, osteopenia, and persistent embryonic eye vascularization in mice deficient in Lrp5, a Wnt coreceptor. *J Cell Biol* 2002; 15:303-314.
11. Stefan H, Claire LK. Wnt signalling: variety at the core. *J Cell Sci* 2007; 120: 385-393.
12. Cadigan KM, Nusse R. Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes Dev* 1997; 15 :3286-3305.
13. Smalley MJ, Dale TC. Wnt signalling in mammalian development and cancer. *Cancer Metastasis Rev* 1999;18: 215-230.
14. Meijer L, Skaltsounis AL, Magiatis P, Polychronopoulos P, Knockaert M, Leost M, et al. GSK-3-selective inhibitors derived from Tyrian purple indirubins. *Chem Biol* 2003;10:1144-1146.
15. Atilla-Gokcumen GE, Williams DS, Bregman H, Pagano N, Meggers E. Organometallic compounds with biological activity: a very selective and highly potent cellular inhibitor for glycogen synthase kinase 3. *Chembiochem* 2006; 7:1443-1450.
16. Kim WY, Zhou FQ, Zhou J, Yokota Y, Wang YM, Yoshimura T, et al. Essential roles for GSK-3s and GSK-3-primed substrates in neurotrophin-induced and hippocampal axon growth. *Neuron* 2006; 52: 981-996.
17. Sinha D, Wang Z, Ruchalski KL, Levine JS, Krishnan S, Lieberthal W, et al. Lithium activates the Wnt and phosphatidylinositol 3-kinase Akt signaling pathways to promote cell survival in the absence of soluble survival factors. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005; 288: F703-13.
18. Sato N, Meijer L, Skaltsounis L, Greengard P, Brivanlou AH. Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor. *Nat Med* 2004; 10: 10:23-24.
19. Zaragosi LE, Wdziekonski B, Fontaine C, Villageois P, Peraldi P, Dani C. Effects of GSK3 inhibitors on in vitro expansion and differentiation of human adipose-derived stem cells into adipocytes. *BMC Cell Biol* 2008; 13: 9-11.
20. Eslaminejad MB, Nikmahzar A, Thagiyar L, Nadri S, Massumi M. Murine mesenchymal stem cells isolated by low density primary culture system. *Dev Growth Differ* 2006; 48,361-370.
21. Freshney RA. Culture of animal cells: a manual of basic technique. 5th ed. New Jersey: John Wiley, 2005.

این تحقیق نیز با تمایز سلول های مورد بررسی به رده های استخوان و چربی ماهیت بنیادی مزانشیمی آنها به اثبات رسید.

### نتیجه نهایی :

ماده BIO به عنوان آگونیست سنتزی Wnt در غلظت های بالای ۲ میکرو مولار توکسیک بوده و سبب مرگ سلولی می گردد. این ماده در دامنه غلظتی ۰/۰۱، ۰/۱، ۱/۵ میکرومولار بر کشت سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان موش صحرایی تاثیرات میتوژنیکی داشته و در عین حال در این غلظت ها بیان ژنهای استخوانی و همچنین مینرالیزاسیون کشت را مهار می نماید.

### منابع :

1. Baksh D, Davis JE, Zandstra PW. Adult human bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells are capable of adhesion-independent survival and expansion. *Exp Hematol* 2003;31:723-732.
2. Friedenstein AJ Chailakhjan 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.
3. Arnhold SJ, Goletz I, Klein H, Stumpf G, Beluche LA, Rohde C, et al. Isolation and characterization of marrow derived equine mesenchymal stem cells. *Am J Vet Res* 2007; 68 (10): 1095-1105.
4. Abdallah BM, Kassem M. Human mesenchymal stem cells: from basic biology to clinical applications. *Gene Ther* 2007; 15 (2):109-116.
5. Khojasteh A, Eslaminejad MB, Nazarian H. Mesenchymal stem cells enhance bone regeneration in rat calvarial critical size defect more than platelete rich plasma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodont* 2008 ; 106: 356-362.
6. Jafarian M, Eslaminejad MB, Khojasteh A, Mashhadi Abbas F, Dehgan MM, Hassanizadeh R, et al. Marrow-derived mesenchymal stem cells-directed bone regeneration in the dog mandible: A comparison between Biphasic calcium phosphate and Natural bone mineral. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodont* 2008; 105: e14-e24.
7. Boyden LM, Mao J, Belsky J, Mitzner L, Farhi A, Mitnick MA, et al. High bone density due to a mutation in LDL-receptor-related protein 5. *N Engl J Med* 2002; 16:1513-1521.
8. Gong Y, Slee RB, Fukai N, Rawadi G, Roman-Roman S, Reginato AM, et al. LDL receptor-related protein 5 (LRP5) affects bone accrual and eye development. *Cell* 2001; 16:513-523.



22. Dravid G, Ye Z, Hammond H, Chen G, Pyle A, Donovan P et al. Defining the role of Wnt/beta-catenin signaling in the survival, proliferation, and self-renewal of human embryonic stem cells. *Stem Cells* 2005; 23: 1489-1501.
23. Bain G, Müller T, Wang X, Papkoff J. Activated beta-catenin induces osteoblast differentiation of C3H10T1/2 cells and participates in BMP2 mediated signal transduction. *Biochem Biophys Res Com* 2003; 31: 84-91.
24. Potten CS, Lajtha LG. Stem cells versus stem lines. *Ann N Y Acad Sci* 1982;10:49-61.
25. 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.
26. 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.
27. Gronthose 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.
28. 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.
29. 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.
30. 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.