Original Article

Influence of alpha-lipoic acid on survival and proliferation of mesenchymal stem cells

Bashiri T, Ghorbanian MT*, Zavareh S

School of Biology and Institute of Biological Sciences, Damghan University, Damghan, I. R. Iran.

Received June 29, 2015; Accepted March 15, 2016

Abstract:

Background: Mesenchymal stem cells (MSCs) contribute to tissue repair in vivo and form an attractive cell source for tissue engineering. The regenerative potential of MSCs is impaired by oxidative stress-induced cellular senescence. Alpha-lipoic acid (ALA) is well-known for its antioxidant properties. The Ki-67 antigen is expressed during all phases of cell cycle (G_1, S, G_2 and M phase) except for G_0 phase and is commonly used as a proliferation marker. Herein, the aim of the present study was to investigate the impact of ALA on rat MSCs survival and proliferative potential in vitro.

Materials and Methods: Isolated rat bone marrow and derived mesenchymal stem cells were synchronized by serum starvation for 24h and the addition of hydroxyurea (2µM). Afterwards, the cells were cultured in the presence of ALA (1µM) for 48h. An MTT assay was used to investigate cell survival and proliferation. The expression of Ki-67, a proliferation marker, was also evaluated.

Results: The MMT assay showed a statistically significant increase in proliferation of MSCs in ALA-treated groups for 48 hours. Immunoctytochemistry of Ki-67 revealed significant differences between ALA- treated and Control groups.

Conclusion: In conclusion, ALA is effective in increasing the survival and cell proliferation of isolated rat bone marrow and derived mesenchymal stem cells.

Keywords: Mesenchymal Stem Cells, Proliferation, Alpha Lipoic Acid, Ki-67 protein

* **Corresponding Author.**
Email: ghorbanian@du.ac.ir
Tel: 0098 912 531 8732
Fax: 0098 233 522 0112

Conflict of Interests: ***No***

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, June, 2016; Vol. 20, No 2, Pages 133-140

Please cite this article as: Bashiri T, Ghorbanian MT, Zavareh S. Influence of alpha-lipoic acid on survival and proliferation of mesenchymal stem cells. ***Feyz*** 2016; 20(2): 133-40.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-10-22]

بررسی اثر آلفالیپوئیک اسید بر بقا و تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی

طاهره بشیری [۱]، محمدتقی قربانیان [۲*]، سعید زواره [۲]

خلاصه:

سابقه و هدف: سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSCs) در ترمیم بافت‌های بدن دخیل هستند و منبع سلولی جذابی را برای مهندسی بافت تشکیل می‌دهند. پتانسیل تجدیدی آن‌ها توسط پیری سلولی ناشی از استرس اکسیداتیو مختل می‌شود. آلفا لیپوئیک اسید (ALA) به‌دلیل خواص آنتی اکسیدانی به‌خوبی شناخته شده است. پروتئین Ki-67 در تمامی مراحل چرخه سلولی (G_1, S, G_2 & M) به‌جز G_0 بیان شده و به‌طور معمول به‌عنوان نشان‌گر تکثیر سلولی شناخته می‌شود. از این‌رو، هدف از مطالعه حاضر بررسی اثر ALA بر بقا و تکثیر MSCs در شرایط کشت آزمایشگاهی است.

مواد و روش‌ها: سلول‌های بنیادی جدا شده از مغز استخوان موش صحرایی در پاساژ چهارم به‌مدت ۲۴ ساعت در شرایط فقر سرم قرارداده شد و با افزودن هیدروکسی اوره به غلظت ۲ µM همزمانی سلولی انجام شد. پس از آن به‌مدت ۴۸ ساعت در حضور ALA ۱ µM کشت داده شدند. به‌منظور ارزیابی میزان بقا و تکثیر سلولی از روش‌های MTT و ایمنوسیتوشیمی برای نشان‌گر Ki-67 استفاده شد.

نتایج: در بخش MTT افزایش میزان تکثیر در گروه‌هایی که به‌مدت ۴۸ ساعت با ALA تیمار شده بودند، مشاهده شد. ارزیابی ایمنوسیتوشیمی برای نشان‌گر Ki-67 افزایش معنی‌داری را در گروه تیمار نسبت به گروه کنترل نشان داد.

نتیجه‌گیری: می‌توان گفت ALA در افزایش میزان بقا و تکثیر سلول‌های بنیادی جدا شده از مغز استخوان موش صحرایی موثر است.

واژگان کلیدی: سلول‌های بنیادی مزانشیمی، تکثیر سلولی، آلفا لیپوییک اسید، پروتئین Ki-67

دو ماه‌نامه علمی– پژوهشی فیض، دوره بیستم، شماره ۲، خرداد و تیر ۱۳۹۵، صفحات ۱۴۰-۱۳۳

مقدمه

بسیاری از بافت‌ها و اندام‌های بدن دارای جمعیت کوچکی از سلول‌های بنیادی و سلول‌های پیش‌ساز هستند. سلول-های بنیادی، سلول‌های تخصص نیافته‌ای هستند که به‌طرز شگفت-آوری توانایی خودتکثیری و هم‌چنین تمایز به یک یا چند نوع سلول تخصص یافته را دارند. این سلول‌ها نقش بسیار مهمی در هموستازی و ترمیم بافت ایفا می‌کنند. این سلول‌ها در دوران جنینی مسئول تولید و تکوین بافت و اندام‌های جنین هستند و در بزرگسالان در نگهداری از بافت و ترمیم بعد از جراحت نقش دارند [۳-۱]. سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSCs) سلول‌های بنیادی بزرگسالی هستند که به دودمان مزودرمی تعلق داشته و برای اولین‌بار به‌صورت سنتی در مغز استخوان یافت شده و سلول-های مزانشیمی مغز استخوان (Bone marrow mesenchymal stem cells) نامیده شدند.

سلول‌های بنیادی مزانشیمی از سایر بافت‌های مزانشیمی مثل بند ناف، خون بند ناف، درمیس، بافت چربی، خون محیطی، جفت و پالپ دندان، بافت همبند، تاندون، غشای سینوویال، مایع آمنیوتیک، خون قاعدگی و بافت لیمبال جدا شده‌اند [۸-۴]. برخلاف سایر سلول‌های بنیادی مثل سلول‌های بنیادی جنینی و سلول‌های بنیادی عصبی، سلول‌های بنیادی مزانشیمی را می‌توان از خود بیمار (Autocell-transplantation) و یا از دهنده سالم (Allo-transplantation) و از بافت‌های مزانشیمی مثل چربی، مغز استخوان و بند ناف تامین نمود. بنابراین، سلول‌های بنیادی مزانشیمی منبع مناسبی برای پزشکی ترمیمی محسوب می‌شوند [۸]. سلول‌های بنیادی در محیط‌های برون‌تنی و درون‌تنی علی‌رغم خودتکثیری به‌دلیل عوامل داخلی و خارجی به‌سوی پیری سوق داده می‌شوند. از انواع سلول‌های بنیادی، HSCها وMSCها در محیط برون‌تنی تحت تأثیر عوامل خارجی دچار فرآیند پیری می-گردند. سلول‌های بنیادی در محیط درون‌تنی به‌طور خودبه‌خود پیر می‌شوند. هم‌چنین، در محیط برون‌تنی باوجود خودتکثیری زیاد، کشت طولانی‌مدت آن‌ها با بروز علائم پیری شامل کاهش توانایی تکثیر و تمایز، کاهش تعداد CFUها، افزایش تعداد سلول‌های پهن و بزرگ، افزایش تشکیل هتروکروماتین غیرطبیعی، افزایش سوپر-اکسیدهای درون‌زا و توقف در چرخه سلولی می‌باشد[۱۱-۹]. همان‌گونه که برخی عوامل پیری را سرعت می‌بخشند، گروهی دیگر از عوامل موجب ممانعت از پیری می‌شوند که یکی از آن‌ها

[۱] کارشناسی ارشد بافت شناسی و جنین شناسی، گروه سلولی و مولکولی دانشکده زیست شناسی، دانشگاه دامغان

[۲] استادیار، گروه سلولی و مولکولی، دانشکده زیست شناسی و پژوهشکده علوم زیستی، دانشگاه دامغان

*نشانی نویسنده مسئول:

دامغان، دانشگاه دامغان، دانشکده زیست شناسی و پژوهشکده علوم زیستی، گروه سلولی و مولکولی

تلفن: ۰۹۱۲۵۳۱۸۷۳۲ دورنویس: ۰۲۳۳۵۲۲۰۱۱۲

پست الکترونیک: ghorbanian@du.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۴/۴/۸ تاریخ پذیرش نهایی: ۹۴/۱۲/۲۵

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-10-22]

ترکیبات آنتی‌اکسیدان هستند. آنتی‌اکسیدان درمانی، آنتی اکسیدانی است که از طریق غذا جذب می‌شود و به سادگی در بافت‌ها و سلول‌ها به‌صورت قابل استفاده تبدیل می‌شود. آلفا لیپوییک اسید همه این ویژگی‌ها را داشته و یک آنتی‌اکسیدان درمانی بالقوه است [۱۲]. ALA برای متابولیسم در میکروب‌ها تا انسان ضروری است و به‌عنوان یک کوفاکتور ضروری برای آلفاکتواسیددهیدروژناز میتوکندریایی می‌باشد [۱۶-۱۳]. ALA در آب و چربی حل می‌شود و به‌راحتی از غشا عبور کرده و خود را به تمام اجزای سلولی می‌رساند [۱۸،۱۷]. بنابراین، هدف این مطالعه بررسی اثر ALA بر بقا و تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی در شرایط برون‌تنی است.

مواد و روش ها

مراحل انجام آزمایش به‌ترتیب عبارت بودند از: جداسازی و کشت BMSCs از موش صحرایی بالغ نژاد ویستار و کشت آن تا پاساژ چهارم؛ هم‌زمان کردن سلول‌ها با روش ترکیبی: کشت سلول‌ها در محیط فاقد سرم به‌مدت ۲۴ ساعت و سپس اضافه کردن ماده هیدروکسی اوره (HU) با غلظت ۲ mM به‌مدت ۱۸ ساعت؛ شستن سلول‌ها با محلول فسفات بافر سالین (PBS) و تیمار سلولی در محیط حاوی ALA با غلظت ۱ µM به‌مدت ۴۸ ساعت؛ اثر آنتی اکسیدان ALA بر سلول‌های کشت داده شده که در دو بخش بررسی شد: بررسی بقا و تکثیر سلولی با استفاده از روش (Methylthiazoldiphenyl Tetrazolium Bromide; MTT)؛ و بررسی تکثیر سلول‌ها با نشانگر Ki-67

استخراج و کشت سلول‌ها

به‌منظور رعایت اصول اخلاقی کار بر روی حیوانات، کلیه مراحل تحقیق حاضر براساس دستور کار کمیته اخلاقی دانشکده زیست شناسی دانشگاه دامغان انجام شد. در این مطالعه تجربی از موش صحرایی بالغ نژاد ویستار استفاده گردید. حیوانات توسط کلروفرم (Merck) به‌صورت عمیق بیهوش شده و با رعایت شرایط استریل MSCs از مغز استخوان‌های فمور و تیبیا استخراج شد [۲۰،۱۹]. BMSCs پس از استخراج در محیط α-MEM (Gibco) غنی شده با ۱۰ درصد سرم (Fetal bovine serum- Gibco) و پنی سیلین-استرپتومایسین (Gibco) یک درصد در فلاسک $25cm^2$ (Falcon) کشت داده شده و به انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و CO_2 ۵ درصد انتقال داده شد. پس از ۷۲ ساعت با تعویض محیط سلول‌های شناور از سلول‌های چسبیده به کف فلاسک جدا گردیدند. پس از رسیدن سلول‌ها به تراکم ۸۰ تا ۹۰ درصد، به‌کمک تریپسین ۰/۲۵ درصد همراه با EDTA ۰/۰۲ درصد (Merck) سلول‌ها از کف فلاسک جدا شده و با تراکم 5×10^5 subculture تهیه شد. ارزیابی حیات سلولی به‌روش هموسایتومتر انجام شد (پنج بار تکرار). گروه‌های مورد بررسی در این بخش عبارت بودند از: گروه کنترل (اول): سلول‌ها از ابتدا تا پایان آزمایش در شرایط بدون تیمار کشت شدند؛ گروه تیمار (دوم): سلول‌ها به‌مدت ۴۸ ساعت بعد از هم-زمان شدن با ALA تیمار شدند؛ گروه تیمار (سوم): سلول‌ها پس از پاساژ چهارم با ALA تیمار شدند؛ گروه تیمار (چهارم): سلول-ها از ابتدا کشت تا زمان بررسی با ALA تیمار شدند؛ گروه تیمار (پنجم): سلول‌ها از ابتدا تا قبل از ۴۸ ساعت آخر با ALA تیمار شدند؛ و گروه تیمار (ششم): سلول‌ها از ابتدا تا قبل از هم‌زمانی با ALA تیمار شدند.

ارزیابی بقا و تکثیر سلولی به روش MTT

مقایسه ارزیابی حیات BMSCs به روش MTT (Sigma) انجام شد (بیش از پنج نمونه در هر گروه). به این منظور سلول‌های پاساژ ۲ با تراکم 2×10^4 سلول در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه کشت شد. سلول‌ها به‌مدت ۲۴ ساعت در محیط فاقد سرم قرار گرفته و بعد از گذشت این زمان به‌مدت ۱۸ ساعت در محیط حاوی سرم و ۲ میلی‌مولار از هیدروکسی اوره قرار داده شدند. پس از سپری شدن این زمان سلول‌ها با PBS شسته شده و به‌مدت ۴۸ ساعت در محیط حاوی ۱ میکرومولار از ماده ALA تیمار شدند. تنها سلول‌های گروه چهارم در تمام این مراحل ماده ALA را دریافت می‌کردند. سپس، محیط قبلی را خارج کرده و به هر کدام از چاهک یا خانه‌ها ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت MEM-α فاقد سرم به همراه ۱۰ میکرولیتر محلول MTT ۵ mg/ml را افزوده و در شرایط ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. پس از ۴ ساعت ۸۵ میکرولیتر از محیط رویی را برداشته و ۵۰ میکرولیتر دی‌متیل‌سولفوکساید (DMSO) اضافه گردید. مدت ۱۰ دقیقه انکوبه شده و سپس جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۴۰nm با دستگاه ELISA reader (BioTek) اندازه گیری شد. پس از بررسی نتایج MTT گروه‌هایی (اول، دوم و چهارم) که بیشترین میزان تکثیر سلولی را نشان دادند در بخش دوم انتخاب شدند.

ایمنوسیتوشیمی برای نشانگر Ki-67

برای انجام ایمنوسیتوشیمی علیه آنتی‌ژن Ki-67 ابتدا سلول‌ها با PBS شست‌وشو داده شده و سپس توسط پارافرمالدئید ۴ درصد ثبوت انجام شد. انکوباسیون سلول‌ها در محلول حاوی سرم بز ۱۰ درصد با تریتون ۰/۳ درصد و آنتی‌بادی اولیه

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-10-22]

۴C° (Abcam, ab16667) Ki-67 به‌مدت یک شب در دمای انجام گردید. پس از شست‌وشوی سلول‌ها با PBS در آنتی‌بادی ثانویه کونژوگه با FITC (Goat anti rabbit IgG- IP132F) در شرایط تاریکی و دمای ۳۷C° به‌مدت یک ساعت انکوبه شدند. با اضافه کردن DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) برای رنگ‌آمیزی هسته، سلول‌ها با میکروسکوپ فلورسنت (Nikon Eclipse, E 600, Japan) و به کمک سیستم تصویر برداری دوربین دیجیتال (Nikon, DXM 120, USA) مشاهده، شمارش (در بیست میدان دید میکروسکوپی) و تصویر برداری شدند. به‌منظور تایید شمارش سلولی تصاویر تهیه شده توسط نرم-افزار Image j ارزیابی کمی شد. DAPI یک نوع رنگ فلورسنت است که به نواحی غنی از آدنوزین-تیمیدین در DNA متصل می-شود. DAPI می‌تواند از غشای سلول‌های سالم عبور کرده و بنابراین برای رنگ‌آمیزی سلول‌های زنده و ثابت شده مورد استفاده قرار گیرد. برای بررسی میزان تکثیر و شمارش کل سلول‌ها از این رنگ‌آمیزی استفاده شد.

آنالیز آماری

برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار SPSS ویرایش ۱۶ استفاده شد. برای بررسی اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و به‌دنبال آن آزمون تکمیلی Tukey انجام گرفت و سطح معنی‌داری $P<۰/۰۵$ در نظر گرفته شد. در نهایت نمودارهای مربوطه توسط نرم افزار Excel 2013 رسم گردید.

نتایج

ویژگی‌های مورفولوژیکی، ماهیت و نیز توان تمایزی این سلول‌ها در مقالات قبلی گزارش شده است و از تکرار آن خودداری می‌شود [۲۲،۲۱]. بررسی معمولی تکثیر سلولی از نظر زمان به پاساژ رسیدن و نیز شمارش سلولی به‌روش هموسایتومتر نشان می‌دهد که گروه تیمار با ALA رشد سریع‌تری نسبت به گروه کنترل داشته است که با نتایج MTT هم‌خوانی دارد.

نتایج بررسی بقا و تکثیر سلولی با روش MTT

بقا و تکثیر سلول‌ها در ۶ گروه مورد بررسی قرار گرفت (نمودار شماره ۱). نتایج این بخش نشان داد که از نظر بقا و تکثیر سلولی همه گروه‌های تیمار شده به‌جز گروه تیمار دوم، نسبت به گروه کنترل افزایش داشته که این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار است. هم‌چنین، از نظر آماری گروه‌های تیمار اول و تیمار پنجم دارای اختلاف معنی‌دار بودند. گروه‌های تیمار اول، سوم و چهارم با یکدیگر تفاوت معنی‌داری نشان ندادند ($P<۰/۰۵$: جداول شماره ۱ و ۲ و نمودار شماره ۱). آنالیز واریانس یک‌طرفه نتایج حاصل از آزمایش MTT نشان داد که بین گروه‌های مختلف آزمایشی از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری وجود دارد: $P=۰/۰۰۰۱$؛ $F(۳۰;۵) = ۱۵۱/۶۷$

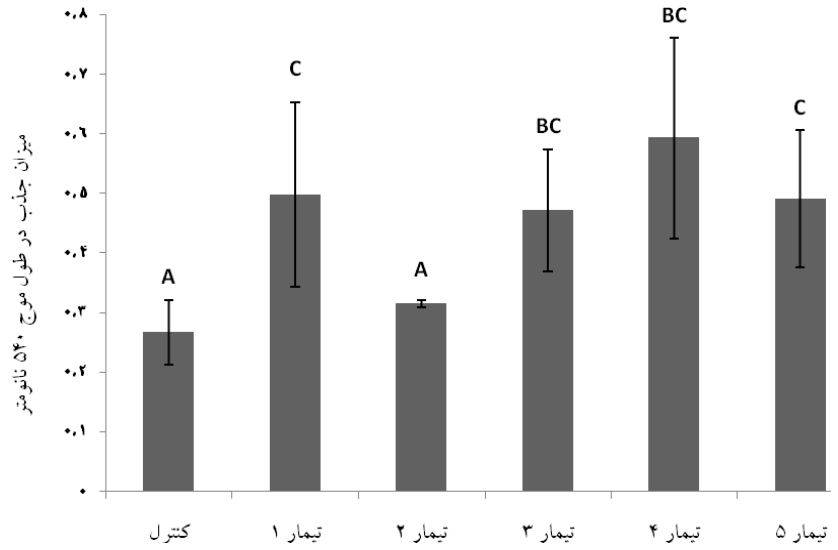
جدول شماره ۱- میانگین و انحراف معیار درصد بقا در گروه‌های مطالعه

گروه‌های آزمایش	میانگین	انحراف از معیار
کنترل	۰/۲۹۸۲	۰/۰۲
تیمار ۱	۰/۵۴۳۳	۰/۰۴
تیمار ۲	۰/۳۰۰۷	۰/۰۱
تیمار ۳	۰/۵۲۸۳	۰/۰۲
تیمار ۴	۰/۵۵۱۷	۰/۰۲
تیمار ۵	۰/۵	۰/۰۱

جدول شماره ۲- حالت‌های مختلف مقایسه بین گروهای آزمایشی (تست تکمیلی Tukey): P

گروه	کنترل	تیمار ۱	تیمار ۲	تیمار ۳	تیمار ۴	تیمار ۵
کنترل		<۰/۰۰۰۱	۱	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱
تیمار ۱	<۰/۰۰۰۱		۰/ ۱۳۸۷	۰/ ۱۳۸۷	۰/ ۱۳۸۷	۰/ ۱۳۸۷
تیمار ۲	۱	۰/ ۱۳۸۷		۰/ ۱۳۸۷	۰/ ۱۳۸۷	۰/ ۱۳۸۷
تیمار ۳	<۰/۰۰۰۱		۰/ ۱۳۸۷		۰/ ۱۳۸۷	۰/ ۱۳۸۷
تیمار ۴	<۰/۰۰۰۱		۰/ ۱۳۸۷	۰/ ۱۳۸۷		۰/ ۱۳۸۷
تیمار ۵	<۰/۰۰۰۱	۰/ ۱۳۸۷	۰/ ۱۳۸۷	۰/ ۱۳۸۷	۰/ ۱۳۸۷	

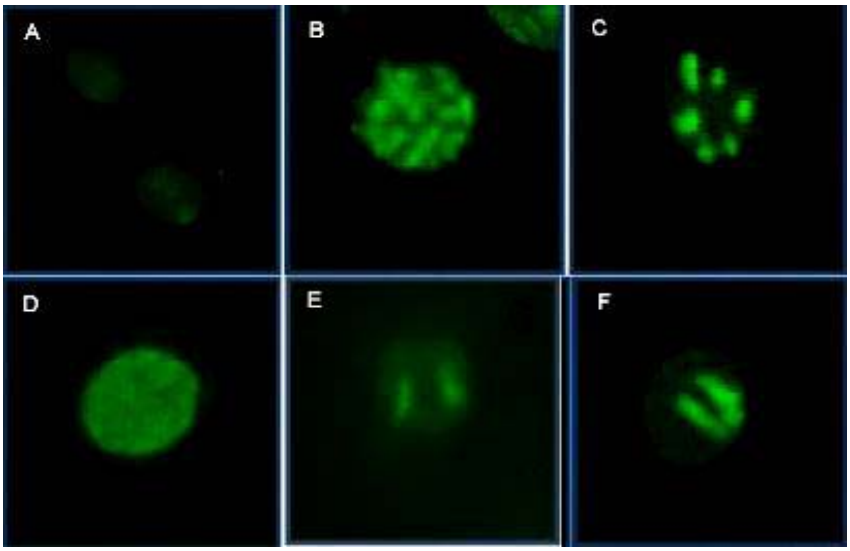
[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-10-22]



نمودار شماره ۱- مقایسه تکثیر سلول‌های BMSC به‌روش MTT در گروه‌های مطالعه. **ستون‌های A، B و C با یکدیگر اختلاف معنی‌دار دارند** ($P<۰/۰۵$).

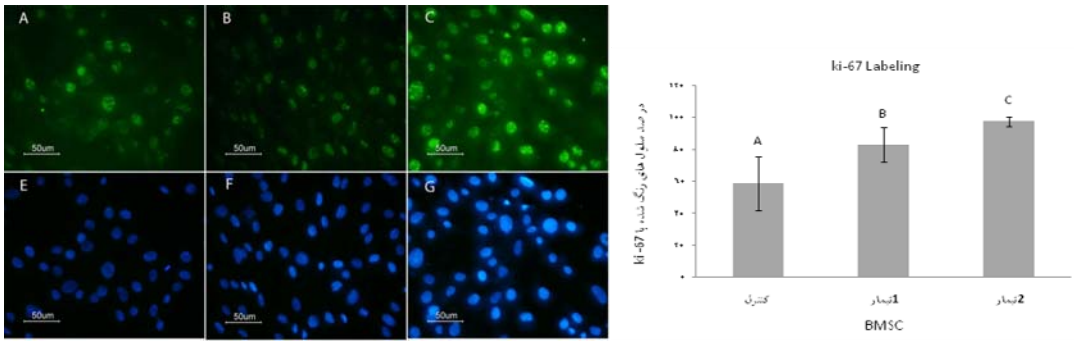
نتایج ایمنوسیتوشیمی برای نشان گر Ki-67

همان‌گونه که در تصاویر دیده می‌شود (تصاویر ۱، ۲ و ۳) هسته سلول‌های رنگ شده با آنتی‌بادی ثانویه کونژوگه با FITC به‌سادگی قابل شمارش هستند. در هر گروه ۲۰ میدان دید (فیلد میکروسکوپی) به‌صورت تصادفی مورد شمارش قرار گرفتند. تعداد کل سلول‌ها در هر میدان دید با شمارش هسته‌های رنگ شده با DAPI مشخص می‌باشند. میزان سلول‌های Ki-67 مثبت نسبت به کل سلول‌ها سنجیده شد. باتوجه به نتایج حاصل تعداد سلول‌های Ki-67 مثبت در BMSCs گروه‌های تیمار اول (به‌مدت ۴۸ ساعت در معرض تیمار با ALA بودند) و تیمار دوم (سلول‌ها از ابتدا کشت تا زمان بررسی با ماده ALA تیمار شدند) در مقایسه با گروه کنترل بیشتر بود که این افزایش از نظر آماری اختلاف معنی‌داری نشان داد. علاوه بر این، گروه‌های تیمار اول و دوم نیز باهم دارای اختلاف معنی دار بودند ($P<۰/۰۵$: نمودار تصویر ۱).

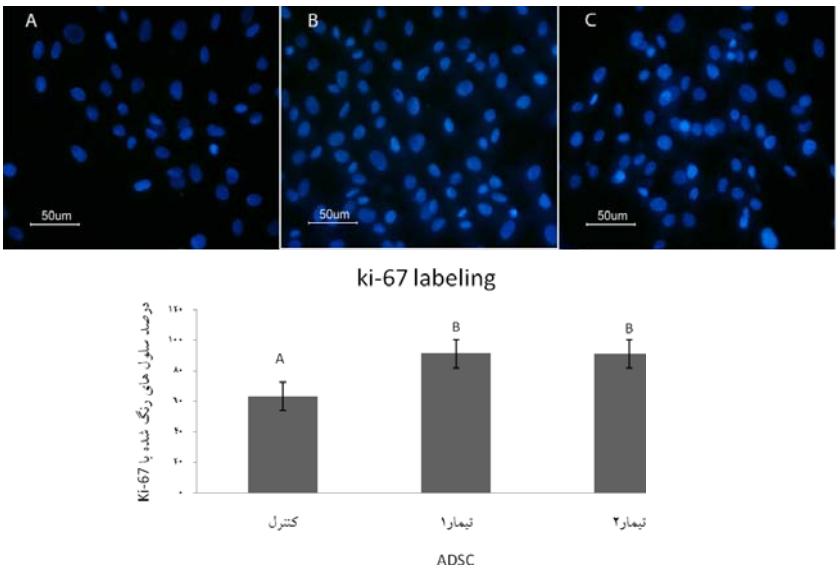


تصویر شماره ۱- نمای میکروسکوپ فلورسنت از مورفولوژی هسته سلول‌های نشان‌دار شده با Ki-67 در BMSCs. A: سلول‌ها در فاز G_0. B: سلول در فاز G_1 که ۱۰ تا ۵۰ نقطه ریز درخشان در هسته. C: سلول در فاز S که قطر دانه‌ها بیشتر و تعداد آن‌ها کمتر شده است. D: سلول در ابتدای میتوز که رنگ آمیزی یکنواختی را نشان می‌دهد. E و F: کروموزم‌های هسته سلول را در میتوز نشان می‌دهد (بزرگنمایی با عدسی 40X).

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-10-22]



تصویر شماره ۲- مشاهده BMSCs رنگ شده با FITC برای نشانگر Ki-67 توسط میکروسکوپ فلورسنت. تصاویر A، B و C مربوط به گروه‌های سلولی کنترل، گروه تیمار ۱ (۴۸ ساعت تیمار با ALA) و گروه تیمار ۲ (در تمام طول مدت آزمایش تیمار با ALA) که با نشانگر Ki-67 رنگ گرفته‌اند. تصاویر پایین همان تصاویر بالا که با رنگ DAPI مشاهده می‌شوند. نمودار مقایسه درصد سلول‌های Ki-67 مثبت یا تکثیر شده مربوط به گروه‌های کنترل و تیمار ۱ و گروه تیمار ۲ به‌ترتیب ستون‌های A، B و C که با یکدیگر اختلاف معنی دار دارند ($P<۰/۰۵$).



تصویر شماره ۳- نمای میکروسکپ ایمنوفلورسانس BMSCs رنگ شده با DAPI. A. گروه کنترل BMSCs، B. گروه تیمار اول، C: گروه تیمار دوم که افزایش در تراکم سلول‌ها در گروه‌های تیمار شده با ALA دیده می‌شود. نمودار مقایسه BMSCs رنگ شده با DAPI. در گروه‌های تیمار به‌مدت ۴۸ ساعت و گروه دوم که در تمام طول آزمایش تیمار شده بودند. افزایش تعداد سلول‌ها دیده می‌شود که این افزایش در تمامی گروه‌ها با یکدیگر اختلاف معنی‌دار را نشان می‌دهند ($P<۰/۰۵$).

بحث

کشت طولانی‌مدت سلول‌های بنیادی برای مقاصد درمانی با مشکلاتی همراه است که یکی از آن‌ها پیری سلولی است. کاهش سرعت تکثیر و طولانی شدن مراحل رشد سلولی از نشانه‌های پیری سلولی است. به‌دلیل گزارش‌های متعدد خاصیت آنتی‌اکسیدانی ALA این مطالعه به بررسی بقا و تکثیر BMSCs موش صحرایی پس از هم‌زمان سازی چرخه سلولی با تیمار ALA پرداخته است. کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی نیازمند مطالعه برای بهبود شرایط کشت می‌باشد. این شرایط باید مانع از پیری و غیرفعال شدن این سلول‌ها در پاساژهای بالاترشود. برای حمایت از سلول‌ها و بالا بردن رشد و فعالیت آن‌ها در شرایط برون‌تنی می‌توان از پروتئین‌ها و فاکتورها مکمل استفاده کرد. این امر موجب به‌دست آمدن محیط فیزیولوژیکی می‌شود که در آن سلول‌ها بالاترین تکثیر و تمایز را به‌دست آورند [۲۳]؛ چراکه سلول درمانی نیازمند تهیه تعداد زیادی سلول بنیادی در محیط آزمایشگاه است [۲۴]. در محیط داخلی بدن موجود زنده سوخت‌وساز یک سلول توسط برهم‌کنش با متابولیت‌ها و انواع مختلف سلول‌ها کنترل می‌شود. وقتی سلول از محیط و بافت اصلی خود جدا شده و کشت داده می‌شود نیازهای غذایی آن تغییر می‌کند [۲۳]. یکی از عواملی که موجب تغییر در فعالیت‌های تکثیری و مورفولوژی سلول‌ها در پاساژهای مختلف می‌شود، عدم تعادل بین آنزیم‌های آنتی اکسیدانی آن است [۲۵]. به‌همین‌منظور در این پژوهش

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-10-22]

ویژگی‌های بقا و تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی در حضور آنتی اکسیدان آلفا لیپوییک اسید مورد بررسی قرار گرفت. MSCs در شرایط کشت طولانی‌مدت با تغییرات مورفولوژی، بیان آنتی ژن-های سطحی و نیز توان تمایزی روبه‌رو می‌شود [۲۶]. بهبود شرایط کشت و کنترل سلول‌های بنیادی یکی از اهداف پژوهش‌های سلول های بنیادی است که در این مطالعه به آن پرداخته شده است. در گام نخست باید مورفولوژی و ماهیت سلول‌ها بنیادی مزانشیمی مورد بررسی و تایید قرار گیرد که در مقالات پیشین گزارش شده است [۲۲،۲۱]. براساس نتایج به‌دست آمده تفاوت در میزان تکثیر سلول‌های BMSCs تیمار شده با ALA نسبت به گروه کنترل مشاهده شد. کاهش در زمان رسیدن به پاساژ در سلول‌های تیمار شده با ALA به‌وضوح مشاهده شد. علاوه بر مشاهدات روزانه با میکروسکوپ اینورت، شمارش سلولی با روش هموسایتومتر نیز این افزایش در تعداد سلولی را در گروه تیمار با ALA نشان داد. در این پژوهش BMSCs به‌مدت ۲۴ ساعت در شرایط فقر سرم و ۱۸ ساعت در معرض HU بودند. فقر سرم سلول‌ها را به فاز G_0 برده و HU آن‌ها را در فاز S متوقف می‌کند. فقر سرم موجب ایجاد ۹۵ درصد هماهنگی در چرخه سلول‌ها می‌شود [۲۷]. بررسی نتایج به‌دست آمده از روش MTT نشان داد که تیمار با ALA در محیط کشت BMSCs باعث افزایش میزان بقا و تکثیر سلول‌ها نسبت به گروه کنترل می‌شود. بنابراین، ماده ALA موجب افزایش نرخ تکثیر سلول‌ها می‌شود. هم‌سو با نتایج به‌دست آمده نشان داده شده است ALA تکثیر سلول‌های مزانشیمی خوک را به‌میزان۴۰ درصد نسبت به گروه کنترل افزایش می‌دهد [۲۸]. Ki-67 پروتئینی است که در تمام مراحل چرخه سلولی بیان می‌شود. پاسخ مثبت سلول‌ها به نشان گر Ki-67 نشان دهنده تکثیر سلولی است و برای مقایسه سلول‌ها در فاز خاموشی و در حال تکثیر استفاده می‌شود [۲۹]. استفاده از شاخص‌های اندازه‌گیری کمی تکثیر سلولی نظیر Brdu و Ki-67 در محیط‌های برون‌تنی و درون‌تنی متداول است. در مطالعات اخیر از این نشان‌گر به‌صورت گسترده (با روش ایمنوسیتوشیمی) برای ارزیابی کمی تکثیر سلولی استفاده شده است [۳۳-۳۰]. هم‌چنین، Stein و همکاران از این نشان‌گر برای تعیین مراحل چرخه سلولی و مراحل تقسیم میتوز نیز استفاده نموده‌اند [۳۰]. مطالعه حاضر نیز با الگو قرار دادن گزارش مذکور مراحل چرخه سلولی را در تصویر شماره ۱ نشان داد. نتایج حاصل نشان می‌دهد که در گروه BMSCs تیمار با ماده ALA سلول‌ها تکثیر بیشتری را نسبت به گروه فاقد تیمار نشان دادند. هم‌پوشانی نتایج MTT و ایمنوسیتوشیمی برای نشان‌گر Ki-67 و شمارش کل سلول‌ها با DAPI مهم بوده و بر نقش ALA بر بقا و تکثیر این سلول‌ها تاکید می‌نماید. بررسی‌ها نشان می‌دهد ALA موجب جلوگیری از آپوپتوز می‌شود [۲۸]. در سلول‌های شبه‌استئوبلاست که با ALA تیمار شده-اند، بیان ژن‌های آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی افزایش یافته و بیان ژن‌های دخیل در مسیر آپوپتوز مثل P53 و کاسپاز ۳ کاهش می‌یابد [۱۵]. ALAبا خاصیت آنتی‌اکسیدانی قوی سلول را در برابر استرس محافظت می‌کند [۳۴]. این مطالعه نیز نشان داد که ALA موجب افزایش بقا و تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی می‌شود.

نتیجه‌گیری

بقا و تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان موش صحرایی در محیط کشت حاوی آلفا لیپوئیک اسید با غلظت ۱ میکرومولار افزایش می‌یابد. بنابراین، می‌توان این آنتی-اکسیدان را برای بهبود شرایط کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی پیشنهاد کرد.

تشکر و قدردانی

این مطالعه برگرفته از پایان‌نامه خانم طاهره بشیری دانش-آموخته کارشناسی ارشد دانشگاه دامغان می‌باشد. از دانشکده و پژوهشکده علوم زیستی دانشگاه دامغان بابت پرداخت همه هزینه-ها و از آقای ابوطالب کوشا کارشناس آزمایشگاه و خانم مریم رمضانی سپاسگزاری می‌گردد.

References:

[1] Rossi DJ, Jamieson CH, Weissman IL. Stems cells and the pathways to aging and cancer. ***Cell*** 2008; 132(4): 681-96.
[2] Nadig RR. Stem cell therapy. Hype or hope? A review. ***J Conserv Dent*** 2009; 12(4): 131-8.
[3] Rao MS, Mattson MP. Stem cells and aging: expanding the possibilities. ***Mech Ageing Dev*** 2001; 122(7): 713-34.
[4] Kitada M, Dezawa M. Parkinson's disease and mesenchymal stem cells: potential for cell-based therapy. ***Parkinsons Dis*** 2012; 2012: 873706.
[5] Sethe S, Scutt A, Stolzing A. Aging of mesenchymal stem cells. ***Ageing Res Rev*** 2006; 5(1): 91-116.
[6] Vishnubalaji R, Al-Nbaheen M, Kadalmani B, Aldahmash A, Ramesh T. Comparative investigation of the differentiation capability of bone-marrow- and adipose-derived mesenchymal stem cells by qualitative and quantitative analysis. ***Cell Tissue Res*** 2012 ; 347(2): 419-27.
[7] Bellantuono I, Aldahmash A, Kassem M. Aging of marrow stromal (skeletal) stem cells and their

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-10-22]

contribution to age-related bone loss. ***Biochim Biophys Acta*** 2009; 1792(4): 364-70.
[8] Dvorakova J, Hruba A, Velebny V, Kubala L. Isolation and characterization of mesenchymal stem cell population entrapped in bone marrow collection sets. ***Cell Biol Int*** 2008; 32(9): 1116-25.
[9] Shay JW, Wright WE. Hayflick, his limit, and cellular ageing. ***Nat Rev Mol Cell Biol*** 2000; 1(1): 72-6.
[10] Maslov AY, Vijg J. Genome instability, cancer and aging. ***Biochem Biophys Acta*** 2009; 1790(10): 963-9.
[11] Campisi J. Cellular senescence as a tumor-suppressor mechanism. ***Trends Cell Biol*** 2001; 11(11): S27-31.
[12] Packer L, Witt EH, Tritschler HJ. alpha-Lipoic acid as a biological antioxidant. ***Free Radic Biol Med*** 1995 ; 19(2): 227-50.
[13] Lee WJ, Kim SH, Kim GH, Han SM, Won JC, Jung CH, et al. Alpha-lipoic acid activates dimethylarginine dimethylaminohydrolase in cultured endothelial cells. ***Biochem Biophys Res Commun*** 2010; 398(4): 653-58.
[14] Smith JR, Thiagaraj HV, Seaver B, Parker KK. Differential activity of lipoic acid enantiomers in cell culture. ***J Herb Pharmacothe*** 2005; 5(3):43-54.
[15] Xiao Y, Cui J, Shi Y, Le G. Alpha-lipoic acid protects against hydrogen peroxide-induced oxidative stress in MC3T3-E1 osteoblast-like cells. ***J Funct Foods*** 2012; 4(3): 642-49.
[16] Petersen Shay K, Moreau RF, Smith EJ, Hagen TM. Is alpha-lipoic acid a scavenger of reactive oxygen species in vivo? Evidence for its initiation of stress signaling pathways that promote endogenous antioxidant capacity. ***IUBMB Life*** 2008; 60(6): 362-7.
[17] Packer L. alpha-Lipoic acid: a metabolic antioxidant which regulates NF-κB signal transduction and protects against oxidative injury. ***Drug Metab Rev*** 1998; 30(2): 245-75.
[18] Goraca A, Huk-Kolega H, Piechota A, Kleniewska P, Ciejka E, Skibska B. Lipoic acid - biological activity and therapeutic potential. ***Pharmacol Rep*** 2011; 63(4): 849-58.
[19] Azizi SA, Stokes D, Augelli BJ, DiGirolamo C, Prockop DJ. Engraftment and migration of human bone marrow stromal cells implanted in the brains of albino rats--similarities to astrocyte grafts. ***Proc Natl Acad Sci USA*** 1998; 95(7): 3908-13.
[20] Ferreira A. Abnormal synaps formation in agrin-depleted hippocampal neurons. ***J Cell Sci*** 1999; 112 (Pt 24): 4729-38.
[21] Nikoozad Z, Ghorbanian MT, Rezaei A. Comparison of the liver function and hepatic specific genes expression in cultured mesenchymal stem cells and hepatocytes. ***Iran J Basic Med Sci*** 2014; 17(1): 27-33.
[22] Ghorbanian MT, Haji Ghasem Kashani M, Lashkarbolouki T, Hosseinpour L, Mirzaeiyan L. Characterization ofin vitro cultured bone marrow and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells and their ability to express neurotrophic factors. ***Cell Biol Int*** 2012: 36(12): 1239–49.
[23] Choi KM, Seo YK, Yoon HH, Song KY, Kwon SY, Lee HS, et al. Effect of ascorbic acid on bone marrow-derived mesenchymal stem cell proliferation and differentiation. ***J Biosci Bioeng*** 2008; 105(6): 586-94.
[24] Choi JS, Kim BS, Kim JD, Choi YC, Lee EK, Park K, et al. In vitro expansion of human adipose-derived stem cells in a spinner culture system using human extracellular matrix powders. ***Cell Tissue Res*** 2011; 345(3): 415-23.
[25] Lindenau A, Fischer B. Effect of oxygen concentration in the incubator's gas phase on the development of cultured preimplantation rabbit embryos. ***Theriogenology*** 1994; 41(4): 889-98.
[26] Baker N, Boyette LB, Tuan RS. Characterization of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in aging. ***Bone*** 2015; 70: 37-47.
[27] Chen M, Huang J, Yang X, Liu B, Zhang W, Huang L, et al. Serum starvation induced cell cycle synchronization facilitates human somatic cells reprogramming. ***PloS one*** 2012; 7(4): e28203.
[28] Ferrari C, Olmos E, Balandras F, Tran N, Chevalot I, Guedon E, et al. Investigation of growth conditions for the expansion of porcine mesenchymal stem cells on microcarriers in stirred cultures. ***Appl Biochem Biotechnol*** 2014; 172(2): 1004-17.
[29] Davis PK, Ho A, Dowdy SF. Biological methods for cell-cycle synchronization of mammalian cells. ***Biotechniques*** 2001; 30(6): 1322-31.
[30] Becker KA, Ghule PN, Therrien JA, Lian JB, Stein JL, van Wijnen AJ, et al. Self-renewal of human embryonic stem cells is supporte d by a shortened G1 cell cycle phase. ***J Cell Physiol*** 2006; 209(3): 883-93.
[31] Bullwinkel J, Baron-Lühr B, Lüdemann A, Wohlenberg C, Gerdes J, Scholzen T. Ki67 protein is associated with ribosomal RNA tran scription in quiescent and proliferating cells. ***J Cell Physiol*** 2006; 206(3): 624-35.
[32] Urruticoechea A, Smith IE, Dowsett M. Proliferation marker Ki-67 in early breast cancer. ***J Clin Oncol*** 2005; 23(28): 7212-20.
[33] Krawczyk A, Jaworska-Adamu J, Rycerz K. Immunohistochemical evaluation of hippocampal CA1 region astrocytes in 10-day-old rats after monosodium glutamate treatment. ***Pol J Vet Sci*** 2015; 18(4): 767-74.
[34] Hiller S, DeKroon R, Hamlett ED, Xu L, Osorio C, Robinette J, et al. Alpha-lipoic acid supplementation protects enzymes from damage by nitrosative and oxidative stress. ***Biochim Biophys Acta*** 2016; 1860(1 Pt A): 36-45.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-10-22]