مجله دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران (پیاورد سلامت) دوره ۹ شماره ۳ مرداد و شهریور ۱۳۹٤، ۲۸۷-۲۷۶

مقاله پژوهشی

مقایسه‌ی اثر لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و محیط کشت ام- آر- اس بر تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی

مصطفی صابریان[۱]، الهام شهیدی دلشاد[۲]، دکتر طاهره ناجی[۳]، دکتر علی صمدی کوچکسرائی[٤]

چکیده

زمینه و هدف: در مطالعات مختلف استفاده از پروبیوتیک‌ها مورد ارزیابی قرار گرفته است. به عنوان نمونه در ایمنی، سرطان و بررسی تکثیر سلول‌های رویانی تحقیقات زیادی صورت گرفته است. سلول‌های بنیادی مزانشیمی نسبتاً دارای رشد کمتر و تعداد پاساژ محدودتری هستند. در این مطالعه بررسی سوپرناتانت باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس(LS) به عنوان یکی از پرمصرف‌ترین پروبیوتیک‌ها بر تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی با هدف افزایش تکثیر آنها جهت درمان بیماران نیازمند به پیوند با استفاده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی صورت گرفته است.

روش بررسی: سلول‌های بنیادی مزانشیمی جدا شده از مغز استخوان رت را در پاساژ دوم به رده‌های استخوان و چربی سوق داده شدند و مزانشیمی بودن آنها تایید گردید. سپس سلول‌ها با LS و محیط کشت MRS broth که از قبل جدا شده بودند، مواجه شده و تعداد سلول‌ها با استفاده از آزمون MTT نسبت به استاندارد، بررسی گردیدند.

یافته‌ها: نمودار رشد سلول‌ها در مقادیر مختلف رسم شده و با نتایج آزمون MTT و نمودار، تعداد سلول‌ها به دست آمد. سپس با آنالیز آماری، معنی دار بودن تغییرات مشخص شد.

نتیجه‌گیری: یافته‌ها حاکی از تاثیر LS مضاعف بر تاثیر ضعیف محیط کشت MRS broth است. استفاده از سوپرناتانت باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس می‌تواند به عنوان یک روش کاربردی و کم هزینه برای افزایش تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی جدا شده از مغز استخوان باشد.

واژه‌های کلیدی: سلول بنیادی مزانشیمی، لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، تکثیر سلولی

* نویسنده مسئول :
دکتر علی صمدی کوچکسرائی ؛ دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی ایران
Email : ali.samadi@iums.ac.ir

- دریافت مقاله : خرداد ۱۳۹٤ پذیرش مقاله : شهریور ۱۳۹٤

مقدمه

میکرواورگانیسم‌های پروبیوتیک در انسان، همچون حیوانات، اثرات مفید بسیاری دارند(۱). اولین مزیت آنها در سیستم گوارش است که می‌توانند اسهال را کنترل کنند(۲)، حساسیت به لاکتوز را کاهش دهند(۳) و نیز جذب کلسترول را به حداقل برسانند(٤). مکانیسمی که با آن باکتری‌های پروبیوتیک اثر مفید می‌گذارند، هنوز در حال بررسی است. به عنوان مثال، باکتری‌های پروبیوتیک ممکن است با تولید موادی بر ضد میکرواورگانیسم‌های مضر جلوی رشد آنها را بگیرند. راه دیگر کاهش pH با تولید اسیدلاکتیک به وسیله‌ی پروبیوتیک‌ها است(۵). همچنین این باکتری‌ها از راه افزایش تولید

[۱] کارشناس ارشد بیولوژی سلولی و مولکولی، گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
[۲] کارشناس ارشد پرستاری مراقبت های ویژه، گروه پرستاری مراقبت‌های ویژه، مرکز آموزشی تحقیقاتی درمانی قلب و عروق شهید رجایی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران
[۳] استادیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم دارویی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
[٤] دانشیار گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

سایتوکاین‌ها، فعالیت دستگاه ایمنی را تقویت می‌کنند و یا با رقابت با دیگر باکتری‌های بیماریزا برای دستیابی به فاکتورهای رشد و دیگر مواد مغذی باعث کندی رشد آنها می‌شوند(٦).

یکی از مهم‌ترین باکتری‌های پروبیوتیک در دستگاه گوارش Lactobacillus acidophilus است. مطالعات مختلف نشان داده‌اند که این باکتری تاثیرات مختلفی بر روی افزایش سلامت و افزایش فاکتورهای فعال کننده‌ی سیستم ایمنی انسان و حیوان در شرایط in vitro و in vivo دارد(٧). تیمار با L.acidophilus می‌تواند جمعیت و غلظت میکروب‌ها را به طور مفیدی تغییر دهد که این امر رشد بیش از حد باکتری‌های مضر را کنترل می‌کند(٨). همچنین مدارک زیادی مبنی بر تاثیر L.acidophilus بر سلول‌های سیستم ایمنی در in vivo و in vitro به دست آمده است(٨). استفاده خوراکی L.acidophilus باعث القای میتوژن‌های تکثیر لنفوسیت‌ها، و افزایش مقدار سرمی IgG و IgM و IgA ترشحی از سلول‌های موکوسی موش می‌شود(٩). Amdekar و همکاران، و Reid با استفاده از خط سلولی ماکروفاژی RAW264.7 نشان دادند که L.acidophilus، تولید اینترلوکین 1α و TNF-α را تحریک می‌کند. همچنین در j774.1 موش، افزایش تولید IL-6 ، IL-10 ، IL-12 و TNF-α توسط L.acidophilus نشان داده شد(١١و١٠). مطالعه‌ی Halper و همکاران حاکی از تاثیر استفاده از سوپرناتانت باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس(LS) بر ویژگی‌های کموتاکتیک و آنژیوژنیک سلول‌ها و در نتیجه تحریک تکثیر ماکروفاژها و لنفوسیت‌ها در شرایط in vitro و خاصیت کموتاکسی و تکثیر فیبروبلاست‌ها، سلول‌های اندوتلیال و سلول‌های التهابی در محیط in vivo بود. با تزریق زیرجلدی در لوب‌های گوش رت‌های جوان، تکثیر رگ‌های خونی و افزایش نوتروفیل‌ها مشاهده شد(١٢). در مطالعه‌ای دیگر، Li و همکاران تاثیر سوپرناتانت L.acidophilus را بر روی سلول‌های جنینی بررسی کردند. آنها یک جنین جوجه و یک خط سلولی نوروبلاستوما از موش‌هایی که در مراحل اولیه تکثیر نورون‌ها بودند، و هم چنین از جنین گاو برای انجام تحقیقات خود استفاده کردند(١٣). بر اساس مشاهدات، LS می‌تواند تکثیر سلول‌های دیگر از جمله سلول‌های بنیادی مزانشیمی(MSC یا Mesenchymal Stem cells) را افزایش دهد. سلول بنیادی یک جمعیت سلول‌های اولیه با توانایی خودسازی(self-renew) و تمایز به چندین رده سلولی است(١٤). دو نوع از سلول‌های چند قوه زا که در مغز استخوان بالغان وجود دارد شامل: سلول‌های بنیادی خون ساز(HSC یا Hematopoietic Stem Cells) و سلول‌های بنیادی مزانشیمی(MSCs یا Mesenchymal Stem Cells) است(١٥). سلول‌های بنیادی ممکن است با اسامی دیگری نیز نامیده شوند، مانند Colony-Forming Fibroblastic Cells(١٦)، Mesenchymal Progenitor cells(١٧)، BM Stromal Cells (١٨). سلول‌های بنیادی مزانشیمی به عنوان یک منبع بالقوه برای هدف‌های ژن درمانی استفاده می‌شود(١٩). تاثیر MSCs بر احیای خون سازی، بازسازی استخوان و درمان بیماران با نقص‌های استخوان سازی(٢٠)، و مشکلات عضله قلب(٢١) به خوبی مشخص گشته است. محققان گزارش کردند که MSCs با سرعت بیشتری قدرت چندقوه زایی و پتانسیل کلونی زایی و تکثیر خود را در پاساژهای مکرر از دست می‌دهند (٢٢). به طوری که از پاساژ سوم یا چهارم به بعد شروع به تمایز به یک رده(بسته به شرایط محیطی) می‌کند و امکان پاساژ در حالت چندقوه زایی به مرور

کاهش چشمگیری می‌یابد. این مسئله باعث ایجاد محدودیت در کارکردن و آماده سازی سلول‌ها برای درمان بیماری‌ها می‌شود و باعث کاهش پاسخ به درمان خواهد شد(۲۳).

در این مطالعه، LS با سلول‌های بنیادی مزانشیمی مواجه شد تا با استفاده از این روش، ضعف تکثیری این سلول‌ها تا حدی مرتفع گردد. لذا سلول‌های بنیادی که محدودیت تکثیر و پاساژ دادن آنها کمتر شده باشد را با ظرفیت بیشتری می‌توان برای پیوند و درمان بیماری‌های مختلف به ویژه ترمیم استخوان استفاده نمود. در نهایت، میزان تاثیر محیط کشت MRS را با محیط کشتی که در آن مواد ترشح شده از باکتری لاکتوباسیلوس وجود دارد، مقایسه شد. هدف این تحقیق، تعیین افزایش تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی تحت تاثیر لاکتوباسیلوس بود تا با استفاده از آن راهی آسان و کم هزینه برای افزایش ضریب موفقیت در درمان با سلول‌های بنیادی ایجاد شود.

روش بررسی

تهیه سوپرناتانت از کشت باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس: از سویه‌ی ATCC به شماره‌ی ٤٣٥٦ استفاده شد. محیط کشت استفاده شده برای لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، MRS broth با ۰/۰۵ L-cysteine بود. محتویات محیط کشت MRS broth در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱: ترکیبات محیط کشت MRS broth

نام ماده	مقدار
پپتون پروتئاز	۱۰ گرم
عصاره‌ی گوشت	۱۰ گرم
عصاره‌ی مخمر	۵ گرم
دکستروز	۲۰ گرم
سوربیتن مونواولیت	۱۰ گرم
آمونیوم سیترات	۲ گرم
سدیم استات	۵ گرم
سولفات منگنز	۰/۰۵گرم
فسفات سدیم	۲ گرم
آب دیونیزه	۱۰۰۰ میلی لیتر

ابتدا باکتری‌ها در محیط کشت MRS broth در شرایط میکروائروفیلیک به مدت ٤٨ ساعت کشت داده شدند. در این شرایط تعداد باکتری‌ها حدوداً به $۲/۵ \times ۱۰^{۸}$ Colony Forming Unit (CFU) رسید. سپس کشت با دور g ۱۰۰۰۰ برای مدت ۱۵ دقیقه در دمای ٤°C سانتریفیوژ گردید. سوپرناتانت به دست آمده از فیلتر ۰/۲ µm نایلونی عبور داده شد. سپس در ۲۰°C- تا زمان انجام آزمایش‌های بعدی نگهداری شد(۱۲).

جدا کردن سلول‌های بنیادی مزانشیمی از مغز استخوان رت: یک رت نر ۸-٦ هفته‌ای با وزن تقریبی ۳۰۰g -۲۵۰ انتخاب شد. پس از کشتن آن با کلروفورم و جدا کردن استخوان‌های تیبیا و فمور و

هم چنین جدا کردن تمامی بافت‌های عضلانی از آن، دو طرف استخوان جدا شد و با سرنگ استریل به روش خروج سلول‌ها با فشار مایع(Flushing)، با استفاده از محیط کشت سلول‌های مغز استخوان خارج گردید. سپس سلول‌ها از فیلتر ۷۰ mm عبور داده شد. سپس درصد سلول‌های زنده با استفاده از تریپان بلو تعیین گردید(۲٤).

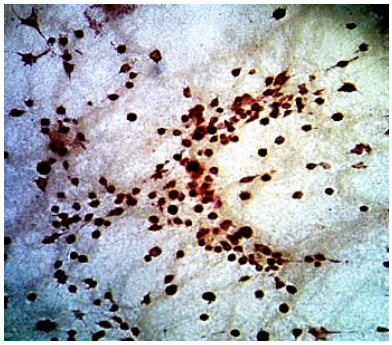
کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی جدا شده از مغز استخوان رت: تعداد ۲۵×۱۰^{٦} سلول در یک پلیت به همراه Dulbecco's Modified Eagle's Medium و ۱۵٪ Fetal Bovine Serum و ۱٪ آنتی بیوتیک ریخته شد و در انکوباتور ۳۷°C با شرایط استاندارد CO_2 ۵٪ به مدت ۳ ساعت قرار داده شد. بعد از طی این مدت سلول‌هایی که به کف پلیت نچسبیده بودند، با تعویض محیط خارج گردید. بعد از ۸ ساعت، محیط مجدداً تعویض گردید و این عمل به مدت ۷۲ ساعت، هر ۸ ساعت یک بار، تکرار شد. سلول‌هایی که چسبیده بودند با PBS شسته شده و هر ۳ روز یک بار محیط تعویض گردید. پس از دو هفته پر شدن سطح از سلول به ۸۰٪-۷۰ رسیدند. پس از ۲ هفته سلول‌ها با PBS شسته و سپس به مدت ۲ دقیقه به سلول‌ها تریپسین ۲۵٪ در ۱ mM EDTA اضافه گردید و پس از خنثی کردن تریپسین، سلول‌ها در فلاسک‌های $۲۵\ cm^2$ پاساژ داده شدند(۲۵).

فلوسایتومتری: سلول‌های استرومال مغز استخوان از فمور موش رت با فلاشینگ آزاد شده و در فلاسک‌های کشت سلولی قرار داده شدند. سلول‌هایی که به سطوح کشت چسبیدند سلول‌های استرومال بودند. با توجه به اینکه میزان بیان مارکرهای سطحی CD90 و CD105 نشانه‌ی درصد سلول‌های بنیادی مزانشیمی در این جمعیت سلولی است، میزان سلول‌هایی که برای بیان این مارکرها مثبت می‌باشند با استفاده از فلوسایتومتری اندازه گیری شدند(۲٦).

درصد سلول‌های مزانشیمال را می‌توان به واسطه اندازه گیری میزان بیان CD مارکرهای CD90 (FITC Santa Cruz Biotechnology) و CD105 (FITC Santa Cruz Biotechnology) تعیین کرد.

تمایز به رده‌های استخوان و چربی: تعداد ۵۰۰۰۰ cell/ml سلول در پاساژ دوم در پلیت‌های ٦ خانه به همراه DMEM با FBS ۱۵٪ انکوبه گردید. پس از حدود ۱ هفته، پلیت‌ها پر شدند. سپس محیط کشت با Osteogenic Medium تعویض شد. این محیط شامل DMEM و ۵۰ µg/ml Ascorbic Acid Phosphate، Ddexamethasone ۱۰ nM و ۱۰ mM β-Gelycerol Phosphate بود. کشت‌ها در انکوباتور مرطوب ۳۷°C با CO_2 ۵٪ به مدت ۲۱ روز گذاشته شد و هر ۳ روز یک بار، محیط تجدید گردید. پس از طی این مدت، سلول‌ها با فرمالین ۱۰٪ به مدت ۱۰ دقیقه فیکس شدند و سپس با رنگ آلیزارین قرمز(alizarin red) به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق رنگ آمیزی گردیدند(۲۷).

برای تمایز چربی، ۵۰۰۰۰ cell/ml در پاساژ دوم در پلیت ٦ خانه به همراه DMEM با FBS ۱۵٪ انکوبه شد. پس از پر شدن با محیط تمایزی چربی که شامل DMEM به همراه ایندومتاسین(indomethacin) به میزان ۵۰ µg/ml و دگزامتازون(dexamethasone) به میزان ۱۰۰ nM است، تعویض شد. کشت‌ها به مدت ۲۱ روز در ۳۷°C و CO_2 ۵٪ قرار گرفتند و هر سه روز یک بار محیط تجدید شد. در نهایت سلول‌ها با oil red O ۵٪ به مدت ۱۵ دقیقه برای تعیین تمایز چربی رنگ آمیزی شد(شکل ۱)(۲۸).



شکل۱: سلول‌های تمایز یافته به آدیپوسیت‌ها که ۲۱ روز پس از پاساژ دوم که در محیط تمایز به چربی قرار داشتند. سلول‌ها با Oil Red رنگ آمیزی شد. سلول‌های گرد بزرگ با هسته‌های خارج مرکز و واکوئل‌های بزرگ حاوی چربی قابل مشاهده است(بزرگنمایی 100X).

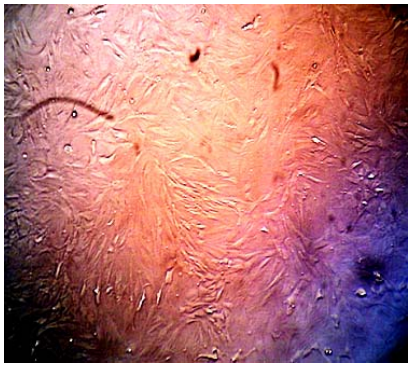
تکثیر سلولی: تکثیر سلول‌ها با استفاده از واکنش میتوکندریایی

[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-1,5-diphenyl tetrazulium bromide] (MTT)

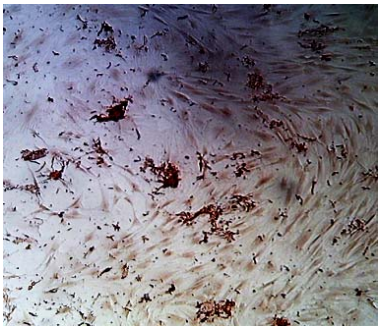
بررسی گردید. اساس این واکنش توانایی سلول‌های زنده برای تبدیل تترازولیوم به فومازان است. به طور خلاصه 5×10^4 سلول در میکروپلیت‌های ۹۶ خانه‌ای با رقت‌های معین محیط کشت و مواد مورد آزمایش ریخته شد. پس از ۳ روز از کشت محلول MTT که به نسبت ۵:۱ با محیط کشت آماده شده بود، جایگزین محیط قبلی گردید و ۲ ساعت در ۳۷°C انکوبه شد. پس از خارج کردن محلول داخل چاهک‌ها، به آنها DMSO اضافه شد. در نهایت، جذب نور با میکروپلیت ریدر در طول موج ۵۷۰ nm و طول موج رفرانس ٦٤٠ nm اندازه گیری شد. همچنین تعداد سلول‌ها به وسیله منحنی استاندارد محاسبه گردید(۲۸).

یافته‌ها

سلول‌ها در پاساژ دوم مورد بررسی قرار گرفتند. از محیط‌های تمایز به استخوان و چربی استفاده شد. پس از ۲۱ روز که هر ۳ روز یکبار محیط‌ها تجدید گردید، با رنگ آمیزی اختصاصی استخوان (Alizarin red)(۲۷) و چربی(Oil red)(۲۸)، رنگ آمیزی شدند و سپس از آنها زیر میکروسکوپ، عکس برداری شد. در محیط تمایز به استخوان، رسوب‌های استخوانی در بین سلول‌ها حاکی از تمایز سلول‌ها به سلول‌های استخوانی است که این از ویژگی‌های سلول‌های بنیادی مزانشیمی است. در رنگ آمیزی با oil red تمایز سلول‌ها به سلول‌های چربی که اکثراً ویژگی‌های سلول‌های چربی را داشتند، مشهود بود. سلول‌های بنیادی مزانشیمی توانایی تمایز به سه رده‌ی استخوان و چربی و غضروف را دارند(۳۰و۲۹) که در محیط‌های تمایزی که استفاده شدند، تمایز به هر سه رده جداگانه بررسی شد. این امر، بیانگر تایید این سلول‌ها به عنوان سلول‌های بنیادی مزانشیمی است. نتایج حاصل از فلوسایتومتری برای تعیین درصد سلول‌های مزانشیمال در سلول‌های استرومال استخراج شده از فمور rat با روش Flushing با استفاده از دو آنتی بادی CD90 و CD105 کونژوگه شده با FITC، ۷۷٪ سلول‌ها CD90 و ۷۲٪ سلول‌ها CD105 را بیان نموده‌اند(اشکال ۳و۲).



شکل۲: سلول‌های بنیادی مزانشیمی- در این تصویر MSCs در پاساژ دوم نشان داده شده است. فرم سوزنی و دوکی شکل سلول‌های بنیادی مزانشیمی قابل مشاهده است. پس از ۲۱ روز از کشت اولیه اولین پاساژ انجام می‌شود. در پاساژ دوم مقدار پر شدن سطح 70-80% است(بزرگنمایی 100X).



شکل۳ : استئوسیت‌ها- سلول‌های تمایز یافته به استئوسیت‌ها که ۲۱ روز پس از پاساژ دوم که در محیط تمایز به استخوان قرار داشتند. سلول‌ها با Alizarin Red رنگ آمیزی شد. در حاشیه‌ی سلول‌ها رسوبات کلسیمی سلول‌های استخوانی قابل مشاهده است(بزرگنمایی 100X).

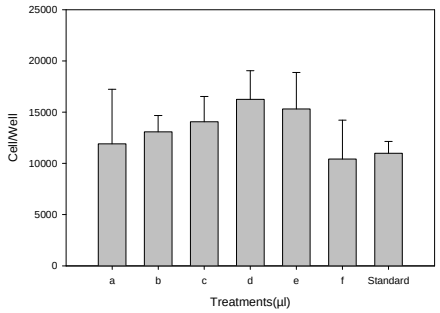
همچنین سلول‌ها در پاساژ دوم با رقت‌های مختلف در محیط کشت DMEM و ٪۱۵ FBS ، پنی سیلین و استرپتومایسین در ۳۷°C با ٪۵ CO_2 به مدت ۷۲ ساعت در میکروپلیت‌های ۹۶ خانه‌ای قرار گرفتند و سپس آزمون تترازولیوم میتوکندریایی (Mitochondria Tetrazolium Test) انجام شد(برای هر چاهک ۳ مرتبه و هر مرتبه ٦ بار تکرار). در ادامه در طول موج ۵۷۰ nm و رفرانس ٦٤٠ nm با دستگاه الایزا ریدر قرائت شد و سپس منحنی استاندارد رسم شد و معادله‌ی خط آن به صورت زیر رسم گردید.

در هر چاهک تعداد ۱۰۰۰۰ سلول ریخته شد و تیمار سلول‌ها در پاساژ دوم با LS و همچنین محیط کشت MRS broth انجام گردید. تیمار با LS، شامل ٦ رقت مختلف برای بررسی تاثیر لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، به صورت لگاریتمی انتخاب شد. مقادیر شامل ۰/۱ و ۰/۳ و ۰/۹ و ۳ و ۹ و ۳۰ میکرولیتر در حجم ۱۰۰۰ میکرولیتر که برای هر کدام ٦ سری و در

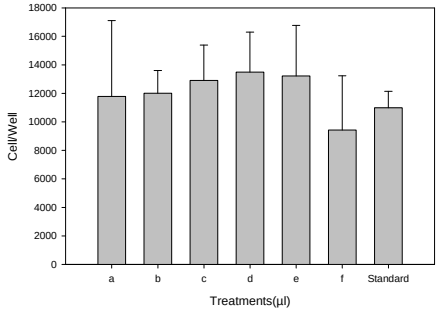
کل ۳ بار تکرار شد. همچنین، همین موارد با محیط کشت MRS broth نیز انجام شد و برای آنها آزمون MTT انجام گردید و نتایج به دست آمده برای هر چاهک را در فرمولی که از نمودار استاندارد به دست آمده بود قرار داده شد تا تعداد سلول در هر چاهک به دست آید. از محیط کشت DMEM با FBS ٪۱۵ به عنوان استاندارد استفاده شد. سپس داده‌ها با نرم افزار SPSS آنالیز شد و نتایج زیر حاصل گردید:

داده‌ها در دو گروه(سوپرناتانت لاکتوباسیلوس و محیط کشت MRS broth) که هر کدام رقت‌های مختلف تیمار داشت، بررسی شد. همچنین، هر کدام بر مبنای استانداردی که سلول‌ها با محیط کشت سلولی و در شرایط استاندارد شمارش شده‌اند، محاسبه گردید. در گام بعدی برای هر کدام از رقت‌ها میانگین ٦ تکرار و همراه با میانگین استاندارد و میانگین کل محاسبه گردید(نمودار ۱ تا ۳).

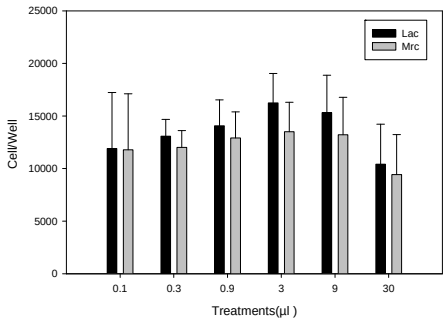
سپس با استفاده از SPSS، داده‌ها تحلیل شدند. از روش تحلیل ANOVA برای تحلیل داده‌ها استفاده شد و مشخص گردید که تغییرات برای LS معنی دار است و مقدار آن sig=۰/۰۲۸ است، اما در مورد محیط کشت MRS برابر sig=۰/۵۸ می‌باشد که نتیجه‌ی تغییرات، معنی دار نیست.



نمودار ۱: تاثیر LS بر MSCs- تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی در مقادیر مختلف مواجهه با LS در مقایسه با استاندارد a تا f، مقدار لگاریتمی تیمار سوپرناتانت باکتری است. محور عمودی نیز تعداد سلول‌های هر چاهک می‌باشد. مشاهده می‌شود که در غلظت d بیشترین افزایش تکثیر وجود دارد. از a تا d با افزایش غلظت LS تکثیر افزایش می‌یابد، در حالی که بعد از غلظت d کاهش محسوسی دیده می‌شود.



نمودار ۲: تاثیر MRS broth بر MSCs- تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی در مقادیر مختلف مواجهه با محیط کشت MRS broth در مقایسه با استاندارد a تا f، مقدار لگاریتمی تیمار با محیط کشت MRS broth است. محور عمودی نیز تعداد سلول‌های هر چاهک می‌باشد. در غلظت d بیشترین افزایش تکثیر مشاهده می‌شود. از a تا d با افزایش غلظت LS تکثیر افزایش می‌یابد، در حالی که بعد از غلظت d تعداد سلول‌ها کاهش دارد.



نمودار۳ : مقایسه تاثیر LS و MRS broth- مقایسه تاثیر LS و محیط کشت MRS broth بر تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی نشان داده شده است. ستون‌های تیره مربوط به LS و ستون‌های روشن محیط کشت MRS broth را نشان می‌دهد. بطور مشخص دیده می‌شود که افزایش تکثیر در تیمار با LS بیشتر از تیمار با محیط کشت MRS broth است. غلظت ۳ µl/۱۰۰۰ به عنوان غلظت اوپتیمم برای رشد سلول‌های بنیادی مزانشیمی است. پس از این غلظت، در هر دو تیمار، تعداد سلول‌ها کاهش یافته است. این کاهش برای LS با شدت بیشتری همراه است که به علت ایجاد شرایط اسیدی و سخت برای رشد سلول‌هاست. دیده می‌شود که همه مقادیر سلولی در تیمار با MRS broth کمتر از تیمار با LS است.

بحث

نتایج این مطالعه مشخص کرد که با افزایش غلظت و حجم LS، تعداد سلول‌ها نیز افزایش پیدا می‌کند. به طوری که میانگین تعداد سلول‌ها در چاهک استاندارد، ۱۰۹۸٦ سلول بود که نسبتاً با مقدار سلول‌های ریخته شده مطابقت دارد. در تیمارهای سلول‌ها با غلظت‌های ۰/۱، ۰/۳، ۰/۹ و ۳ میکرولیتر در ml از LS، تعداد سلول‌ها به ترتیب ۱۱۹۱۱، ۱۳۰۷۷، ۱٤۰٦٥ و ۱٦۲٤٤ سلول افزایش داشت. این مقادیر، معادل افزایش ۹٪، ۱۵/۹٪، ۲۱/۸٪ و ۳۲/۳٪ در ٤ چاهک اول بود. غلظت اپتیمم مربوط به مقدار تیمار ۳ میکرولیتر در ml از LS بود. در تیمار ۹ میکرولیتر در ml، تعداد سلول‌ها ۱۵۳۱٤ و معادل ۲۸/۲٪ افزایش را نشان داد؛ اگرچه نسبت به مقادیر قبل افزایش، سلول کمتری صورت گرفه بود. از طرفی در تیمار ۳۰ میکرولیتر در ml، تعداد ۱۰٤۲۰ سلول در هر چاهک وجود داشت که کاهشی معادل ۵/۱٪ داشت. در این مقدار تیمار، تعداد سلول‌ها از تعداد اولیه نیز کمتر بود که مشخص شد نه تنها افزایش تکثیر صورت نگرفته است، بلکه سلول‌ها رو به مرگ رفتند. علت این موضوع را می‌توان به اسیدیته‌ی محیط MRS broth نسبت داد(۱۲). زیرا با افزایش غلظت تیمار، pH اسیدی محیط کشت، غالب بر pH اپتیمم برای رشد سلول‌های بنیادی مزانشیمی بود و در نتیجه رشد آنها کند و تا حدی متوقف شد. تعداد سلول‌ها در چاهک چهارم نشان داد که بیشترین تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی برای تیمار با LS در مقدار ۳µl/۱۰۰۰ بود، اما در مقادیر کمتر از ۳ میکرولیتر در ml، تاثیر LS برای رشد سلول‌ها کمتر و در مقادیر بیشتر از ۳ میکرولیتر در ml، تعداد سلول‌ها کاهش یافت. در مطالعات گذشته که از LS برای تکثیر سلول‌های رویانی استفاده شده بود نیز افزایش تکثیر این سلول‌ها مشاهده شد(۱۳).

همچنین به طور موازی تعداد سلول‌های به دست آمده از مواجهه با محیط کشت MRS broth بررسی شد. مقادیر تیمار محیط کشت MRS broth مساوی با تیمار با LS انتخاب شد. با افزایش غلظت و حجم محیط کشت MRS broth، تعداد سلول‌ها تا حدی افزایش را نشان داد؛ به طوری که میانگین سلول‌ها در چاهک استاندارد ۱۰۹۸٦ سلول بود که نسبتاً با مقدار سلول‌های ریخته شده مطابقت داشت. در تیمار با محیط کشت در غلظت‌های ۰/۱، ۰/۳، ۰/۹ و ۳ میکرولیتر در ml، تعداد سلول‌ها به ۱۱۷۹۲، ۱۲۰۰۹، ۱۲۹۱۳ و ۱۳٤۹۷ سلول رسید که این تعداد سلول، به ترتیب افزایشی معادل ٪٦/۸، ٪۸/۵، ٪۱٤/۹ و ٪۱۸/٦ داشت. در تیمار ۹ میکرولیتر در ml، تعداد سلول‌ها ۱۳۲۱۸ و معادل ٪۱٦/۸ افزایش داشت، اما نسبت به مقادیر قبل افزایش سلول کمتری صورت گرفته بود. با وجود این، در تیمار ۳۰ میکرولیتر در ml، تعداد سلول‌ها ۹٤۲٤ سلول در هر چاهک بود که کاهشی معادل ٪۱٤/۲ نسبت به تعداد سلول ریخته شده در هر چاهک را نشان می‌داد. در این مقدار تیمار تعداد سلول‌ها از تعداد اولیه نیز کمتر بود که نه تنها افزایش تکثیر را نشان نمی‌داد، بلکه حاکی از آن بود که سلول‌ها رو به مرگ رفته است.

نتیجه گیری

مقدار افزایش سلول‌ها در تیمار با MRS broth در مقایسه با LS کمتر است که دلیل بر نقش مواد ترشح شده از باکتری لاکتوباسیلوس بر رشد و تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی است. ضمناً مقدار ممانعت از رشد در غلظت‌های زیاد تیمار، در مورد محیط کشت MRS broth محسوس‌تر است که یک علت آن می‌تواند اسیدیته‌ی بیشتر محیط کشت MRS broth بدون باکتری باشد، زیرا با افزایش غلظت تیمار، pH اسیدی محیط کشت باکتریایی غالب بر pH اپتیمم برای رشد سلول‌های بنیادی مزانشیمی است و در نتیجه رشد آنها کند می‌شود. نتایج به دست آمده و مقایسه‌ی تاثیر LS نسبت به محیط کشت MRS broth نشان می‌دهد که سوپرناتانت باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس می‌تواند تاثیر معنی داری بر تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی داشته باشد؛ در حالی که محیط کشت MRS broth تاثیر قابل توجهی ندارد، لذا می‌توان آن را حذف کرد و LS را به تنهایی برای افزایش تکثیر سلول‌های بنیادی استفاده کرد. با این روش می‌توان شرایطی مناسب برای کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی در جهت ترمیم بافت و پیوند ایجاد نمود.

تشکر و قدردانی

این مقاله نتیجه طرح تحقیقاتی مصوب دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران به شماره قرارداد ۱۷٤۷-۳۱-۰۱-۹۱ مورخ ۹۱/٤/۱۳ می‌باشد که در آزمایشگاه تحقیقات مرکزی دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران به انجام رسیده است. بدین وسیله از معاونت محترم تحقیقات و فناوری دانشگاه جهت تامین هزینه‌های این طرح تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

1. Mercenier A, Pavan S & Pot B. Probiotics as biotherapiutic agents: Present knowledge and future prospects. Current Pharmaceutical Design 2003; 9(2): 175-91.

2. Eamonn MQ. Probiotics in functional gastrointestinal disorders: What are the facts? Current Opinion in Pharmacology 2008; 8(6): 704-8.

3. De Verse M & Marteau PR. Probiotics and prebiotics: Effects on Diarrhea. Journal of Nutrition 2007; 137(3): 803-11.

4. Silva M, Jacobus NV, Deneke C & Gorbach SL. Antimicrobial substance from a human Lactobacillus strain. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 1987; 31(8): 1231-3.

5. Kopp-Hoolihan L. Prophylactic and therapeutic uses of probiotics: A review. Journal of the American Dietetic Association 2001; 101(2): 229-38.

6. Dongarra ML, Rizzello V, Muccio L, Cascio A, Bonaccorsi I, Ferlazzo G, et al. Mucosal immunogogy and probiotics. Current Allergy and Asthma Reports 2013; 13(1): 19-26.

7. Ganguli K & Walker WA. Probiotics in the prevention of Necrotizing Enterocolitis. Journal of Clinical Gastroenterology 2011; 45(1): 133-8.

8. Ray B. Probiotics of lactic acid bacteria: Science or myth? Lactic Acid Bacteria: Current advances in metabolism, Genetics and applications. Berlin Heidelberg: Spiringer-Verlag; 1996: 101-36.

9. Kopp MV & Salfeld P. Probiotics and prevention of allergic disease. Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care 2009; 12(3): 298-303.

10. Amdekar S, Dwivedi D, Roy P, Kushwah S & Singh V. Probiotics: Multifarious oral vaccine against infectious traumas. FEMS Immunology and Medical Microbiology 2010; 58(3): 299-306.

11. Reid G. Probiotics and prebiotics-progress and challenges. International Dairy Journal 2008; 18(10-11): 969-75.

12. Halper J, Leshin LS, Lewis SJ & Li WI. Wound healing and angiogenic properties of supernatants from Lactobacillus cultures. Experimental Biology and Medicine 2003; 228(11): 1329-37.

13. Li WI, Brackett BG & Halper J. Culture supernatant of Lactobacillus acidophilus stimulates proliferation of embryonic cells. Experimental Biology and Medicine 2005; 230(7): 494-500.

14. Fuchs E & Segre JA. Stem cells: A new lease on life. Cell 2000; 100(1): 143-55.

15. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Moorman MA, et al. Multilingeage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science 1999; 248(5411): 143-7.

16. Friedenstein AJ, Gorskaja JF & Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. Experimental Hematology 1976; 4(5): 267-74.

17. Bakhsh D, Song L & Tuan RS. Adult mesenchymal stem cells: Characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. Journal of Cellular and Molecular Medicine 2004; 8(3): 301-16.

18. Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues and as potential vectors for gene therapy. Journal of Cellular Biochemistry 1998; 276(30-31): 284-5.

19. Fernandez Vallon VB, Romaniuk MA, Choi H, Labovsky V, Otaegui J & Chasseing NA. Mesenchymal stem cells and their use in therapy: What has been achived? Differentiation 2013; 85(1-2): 1-10.

20. Barba M, Cicione C, Bernardin C, Michetti F & Lattanzi W. Adipose-derived Mesenchymal stem cells for bone regeneration: State of the art. Biomedical Research International 2013; 2013(1): 1-11.

21. Parekkadan B & Milwid JM. Mesenchymal stem cells as therapeutics. Annual Review of Biomedical Engineering 2010; 12(1): 87-117.

22. Nadri S & Soleimani M. Isolation murine mesenchymal stem cells by positive selection. In Vitro Cellular & Developmental Biology Animal 2007; 43(8-9): 276-82.

23. Nadri S, Soleimani M, Hosseni RH, Massumi M, Atashi A & Izadpanah R. An efficient method for isolation of murine bone marrow mesenchymal stem cells. International Journal of Developmental Biology 2007; 51(8): 723-9.

24. Sun S, Guo Z, Xiao X, Liu B, Tang PH & Mao N. Isolatin of mouse marrow mesenchymal progenitors by a novel and reliable method. Stem Cells 2003; 21(5): 527-35.

25. Soleimani M & Naderi S. A protocol for isolation and culture of mesenchymal stem cells from mouse bone marrow. Nature Protocols 2009; 4(1): 102-6.

26. Bianco P, Riminucci M, Gronthos S & Robey PG. Bone marrow stromal stem cells: Nature, biology, and potential applications. Stem Cells 2001; 19(3): 180-92.

27. Horwize EM, Gordon PL, Koo WK, Marx JC, Neel MD, McNall RY, et al. Isolated allogenic bone marrow-derived mesenchymal cell engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2002; 99(13): 8932-7.

28. Barry FP. Mesenchymal stem cell therapy in joint disease. Novartis Found Symposium 2003; 249(1): 86-241.

29. Petite H, Veronique V, Bensaide W, Meunier A, de Pollak C, Sedel L, et al. Tissue-engineered bone regeneration. Nature Biotechnology 2000; 18(9): 959-63.

30. Grinnemo KH, Mansson A, Dellgren G, Klinberg D, Wardell E, Drovota V, et al. Xenoreactivity and engraftment of human mesenchymal stem cells transplanted into infracted rat myocardium. The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery 2004; 127(5): 1293-300.

Comparing The Effect Of Lactobacillus Aacidophilus And MRS Medium On Mesenchymal Stem Cells Proliferation

Saberian Mostafa[1] (MSc.) - Shahidi Delshad Elham[2] (MSc.)
Naji Tahereh[3] (Ph.D) - Samadikuchaksaraei Ali[4] (M.D.)

1 Master of Science in Cellular and Molecular Biology, Medical Laboratory Sciences Department, School of Allied Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
2 Master of Science in Critical Care Nursing, Critical Care Nursing Department, Rajaei Cardiovascular Medical and Research Center, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
3 Assistant Professor, Biology Department, Pharmaceutical Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
4 Associate Professor, Department of Medical Biotechnology, Faculty of Allied Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Abstract

Received : May 2015
Accepted : Aug 2015

Background and Aim: The use of probiotics has been surveyed in different studies. For example, many researches have been conducted on immunity, cancer and embryonic cells proliferation. Mesenchymal stem cells (MSCs) have a rather slower growth and a more limited number of passages. In this research, the effect of supernatant of Lactobacillus acidophilus (LS) as one of the most commonly used probiotics on the proliferation of mesenchymal stem cells has been studied with the aim of increasing their proliferation for the treatment of patients in need of transplantation using mesenchymal stem cells.

Materials and Methods: The MSCs separated from rats' bone marrow were led to bone and fat levels in the second passage, and their mesenchymal state was confirmed. The cells were then treated by the supernatant of Lactobacillus acidophilus (LS) and MRS broth medium, which have been separated in advance. The number of cells was examined by MTT test equated with the standard.

Results: A curve was drawn for the cells' growth in different amounts and the number of cells was obtained by converting the results of MTT test to a standard curve. For statistical analyses, SPSS and ANOVA were employed.

Conclusion: The findings show the double effect of LS on the weak effect of MRS broth medium. The use of supernatant of Lactobacillus acidophilus (LS) can be a practical and economical method for increasing the proliferation of MSCs isolated from bone marrow.

Key words: Mesenchymal Stem Cells, Lactobacillus Acidophilus, Cell Proliferation

*** Corresponding Author:**
Samadikuchaksaraei A;
E -mail:
ali.samadi@iums.ac.ir