Simulated microgravity effects on cell cycle in adipose derived stem cells

Ebnerasuly F., PhD Student[1,2], Hajebrahimi Z., PhD[3], Tabaie SM., MD[4], Darbouy M., PhD.[5,6]

1. PhD Student of Molecular Genetics, Department of Biology, Fars Science and Research Branch , Islamic Azad University, Marvdasht, Iran.
2. PhD Student of Molecular Genetics, Department of Biology, Marvdasht Branch, Islamic Azad University, Marvdasht, Iran.
3. Assistant Professor, Aerospace Research Institute, Ministry of Science Research and Technology, Tehran, Iran (Corresponding Author), Tel:+98-21-88366030, hajebrahimi@ari.ac.ir
4. MD, Medical Laser Research Center, Iranian Academic Center for Education, Culture and Research (ACECR), Tehran, Iran.
5. Professor, Department of Biology, Fars Science and Research Branch, Islamic Azad University, Marvdasht, Iran.
6. Professor, Department of Biology, Marvdasht Branch, Islamic Azad University, Marvdasht, Iran.

ABSTRACT

Background and Aim: In recent years, biophysical forces especially microgravity increasingly has been used for cell manipulation, in particular cell differentiation and tissue engineering. Microgravity, as a mechanical factor, has been demonstrated to stimulate cell proliferation and differentiation. In this study, we investigated the impact of simulated microgravity condition generated by one-axis clinostat, on cell cycle and apoptosis rate of adipose derived stem cells (ADSCs).

Material and Methods: After isolation and characterization of human ADSCs, they were exposed to simulated microgravity condition generated by one-axis clinostat, for 3 days. After 3 days of clinorotation, control and microgravity samples were stained with PI, then, we evaluated cell cycle and apoptosis rate.

Results: Isolated cells expressed mesenchymal markers and were able to differentiate into adipocytes and osteocytes. Our results showed that 3 days of simulated microgravity induced by one-axis clinostat had no statistically significant effects on the cell cycle and apoptosis rate.

Conclusion: Previous studies have shown that simulated microgravity induced by 3-axis clinostat or RPM altered cell cycle and increased apoptosis rate. Based on our data, it seems that shear stress generated by one-axis clinostat is much less than that generated by three-axis clinostat. Therefore, we recommend use of one-axis clinostat for evaluation of cell differentiation and cell therapy under microgravity conditions for the future studies.

Keywords: Adipose derived stem cells, Simulated microgravity, One-axis clinostat.

Received: Feb 4, 2017 **Accepted:** Jul 8, 2017

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-05]

[DOI: 10.22102/22.5.55]

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی کردستان / دوره بیست و دوم / آذر و دی ۱۳۹۶/ ۶۵-۵۵

اثر بی‌وزنی شبیه‌سازی شده بر چرخه سلولی در سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی

فرید ابن رسولی[۱،۲]، زهرا حاج‌ابراهیمی[۳]، سید مهدی طبایی[۴]، مجتبی داربویی[۵،۶]

۱. دانشجوی دکتری ژنتیک مولکولی، گروه زیست‌شناسی، واحد علوم و تحقیقات فارس، دانشگاه آزاد اسلامی، مرودشت، ایران.

۲. دانشجوی دکتری ژنتیک مولکولی، گروه زیست‌شناسی، واحد مرودشت، دانشگاه آزاد اسلامی مرودشت، مرودشت، ایران.

۳. استادیار، دکتری تخصصی ژنتیک مولکولی، پژوهشگاه هوافضا، وزارت علوم، تحقیقات و فناوری، تهران، ایران (مولف مسوول)، تلفن ثابت:۸۸۳۶۲۰۱۱-۰۲۱، zahrahagebrahimi@yahoo.com

۴. استادیار، مرکز تحقیقات لیزر در پزشکی جهاد دانشگاهی، واحد علوم پزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران.

۵. استاد، دکتری تخصصی ژنتیک مولکولی، گروه زیست‌شناسی، واحد علوم و تحقیقات فارس، دانشگاه آزاد اسلامی، مرودشت، ایران.

۶. استاد، دکتری تخصصی ژنتیک مولکولی، گروه زیست‌شناسی، واحد مرودشت، دانشگاه آزاد اسلامی مرودشت، مرودشت، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: در سال‌های اخیر، از نیروهای بیوفیزیکی به‌ویژه بی‌وزنی به‌طور فزاینده‌ای برای دستکاری سلول‌ها به خصوص برای تمایز سلولی و مهندسی بافت استفاده شده است. مشخص شده است که بی‌وزنی به‌عنوان یک فاکتور مکانیکی، رشد و تمایز سلولی را تحریک می‌کند. در مطالعه حاضر، تاثیر بی‌وزنی شبیه سازی شده توسط دستگاه کلینواستت تک محوره بر چرخه سلولی و میزان آپوپتوز در سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی بررسی شد.

روش بررسی: بعد از جداسازی و تایید سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی انسان، سلول‌ها برای مدت سه روز در شرایط بی‌وزنی شبیه‌سازی شده که توسط دستگاه کلینواستت تک محوره ایجاد شده بود؛ قرار گرفتند. بعد از سه روز چرخش، نمونه‌های کنترل و بی‌وزنی توسط رنگ PI رنگ شدند و چرخه سلولی و میزان آپوپتوز در آن‌ها بررسی شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که سلول‌های جدا شده مارکرهای مزانشیمی را بیان می‌کنند و توانایی تمایز به سلول‌های چربی و استخوان را دارند. نتایج ما نشان داد که ۳ روز بی‌وزنی شبیه‌سازی شده توسط کلینواستت تک محوره، ازنظر آماری تاثیر معنی‌داری بر چرخه سلولی و میزان آپوپتوز ندارد($P>۰/۰۵$).

نتیجه‌گیری: مطالعات قبلی نشان داده است که بی‌وزنی شبیه‌سازی شده توسط کلینواستت سه محوره یا RPM، چرخه سلولی را تغییر می‌دهد و میزان آپوپتوز را افزایش می‌دهد. براساس داده‌های ما، به‌نظر می‌رسد که استرس تنشی ایجاد شده توسط کلینواستت تک محوره بسیار کمتر از کلینواستت سه محوره می‌باشد. بنابراین ما کلینواستت تک محوره را برای مطالعات تمایز سلولی و سلول درمانی در شرایط بی‌وزنی برای مطالعات آینده پیشنهاد می‌کنیم.

واژه‌های کلیدی: سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی، بی‌وزنی شبیه‌سازی شده، کلینواستت تک محوره

وصول مقاله:۹۶/۲/۱۳ اصلاحیه نهایی:۹۶/۳/۲۰ پذیرش:۹۶/۴/۲۴

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-05]

[DOI: 10.22102/22.5.55]

مقدمه

از روش‌های جدیدی که به تازگی برای مطالعات سلولی و مولکولی به آن توجه زیادی شده است، استفاده از نیروهای بیوفیزیکی مانند جریان تنش برشی و جاذبه است. در سال‌های اخیر، استفاده از این نیروها به تنهایی و یا همراه با سایر تکنیک‌های بیوشیمیایی، برای کشت، تمایز و دستکاری سلول‌ها رواج یافته است. در طول تکامل، حیات بر روی کره زمین در شرایط جاذبهٔ ۱ جی (1g) گسترش یافته است. جاذبه، یکی از مهمترین نیروهای محیطی است که در تکامل موجودات زنده موثر بوده است. حذف این نیرو و مطالعه سلول‌ها در شرایط بی‌وزنی می‌تواند منجر به روشن شدن بسیاری از سوالات علم زیست‌شناسی و حتی بهبود کیفیت زندگی بشر بر روی کره زمین گردد (۱). مطالعات در شرایط بی‌وزنی نشان داده است که پروازهای فضایی تاثیر زیادی بر فیزیولوژی بدن می‌گذارد. از جمله این موارد می‌توان به تغییر در متابولیسم مواد معدنی، تغییر در سیستم ایمنی، آتروفی عضلانی و کاهش توده استخوانی اشاره کرد (۴-۲). بسیاری از این مشکلات به علت تغییرات در سطح سلولی به وجود می‌آید، به‌طوری‌که مطالعات نشان داده است که بی‌وزنی منجر به تغییر در تکثیر، رشد سلولی و مسیرهای انتقال پیام می‌شود (۸-۵). ازطرف دیگر، بی‌وزنی شرایط جدیدی را برای سلول‌ها ایجاد می‌کند که می‌تواند منجر به شناخت بهتر مکانیسم‌های اصلی سلول شود (۱۰و ۹).

سلول‌های بنیادی مزانشیمی، سلول‌های چند توانی هستند که توانایی تمایز به رده‌های مختلف سلولی را دارا می‌باشند (۱۱). این سلول‌ها اولین بار از مغز استخوان استخراج شدند (۱۲)؛ اما پس از آن مشخص شد که این سلول‌ها در بیشتر بافت‌های بدن و از جمله بافت چربی وجود دارند (۱۳). سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی (Adipose derived stem cells=ADSCs) منبع ساده و قابل دسترسی از سلول‌های بنیادی هستند که به طور گسترده‌ای در مهندسی بافت و پزشکی ترمیمی مورد استفاده قرار می‌گیرند (۱۴). مطالعات نشان داده است که بی‌وزنی می‌تواند تمایز سلولی را تسریع و تحریک کرده و منجر به رشد سه‌بعدی سلول‌ها بدون نیاز به داربست شود. بنابراین بی‌وزنی یک محیط ایده‌آل برای رشد سلول، تکثیر سلول و تشکیل بافت است (۱۵و ۸-۵). به عنوان نمونه، مطالعات قبلی نشان داده است که بی‌وزنی که توسط دستگاه کلینواستت تک محوره ایجاد شده است؛ تاثیر مثبت بر تمایز نورونی سلول‌های بنیادی مزانشیمی دارد به‌گونه‌ای که بی‌وزنی منجر به افزایش تمایز سلول‌های مزانشیمی به سلول‌های شبه عصبی و افزایش بیان نوروتروفین‌ها در این سلول‌ها می‌گردد (۱۷و ۱۶).

شرایط بی‌وزنی را می‌توان با پروازهای فضایی و یا سقوط آزاد ایجاد کرد. طول بی‌وزنی ایجاد شده توسط سقوط آزاد معمولا کوتاه‌تر از آن است که منجر به تغییر در رشد و تمایز سلول شود. به دلیل محدودیت در سفرهای فضایی و همچنین هزینه بالای این سفرها، روش‌هایی برای شبیه‌سازی شرایط بی‌وزنی بر روی کره زمین توسعه یافته است که از بین آنها دستگاه کلینواستت تک محوره وسیله مفیدی برای شبیه‌سازی بی‌وزنی بر روی سلول‌ها می‌باشد(۱). دستگاه کلینواستت، با چرخاندن سلول‌ها باعث می‌شود تا سلول‌ها نتوانند جهت جاذبه را تشخیص دهند. این مسئله موجب می شود که شرایطی شبیه به بی‌وزنی در فضای خارج جو برای سلول‌ها ایجاد شود. سرعت چرخش کلینواستت قابل تنظیم است و می‌توان از سرعت‌های ۱۰ تا ۷۰ دور بر دقیقه برای ایجاد شرایط شبیه سازی بی‌وزنی استفاده کرد (۱۸).

در سال‌های اخیر بررسی اثر بی‌وزنی بر انواع مختلف سلول‌ها مورد توجه قرار گرفته است، که در این راستا سلول‌های استخوان و غضروف بیشتر مطالعه شده‌اند (۲۰و ۱۹). در این سلول‌ها بسیاری از مکانیسم‌های سلولی مانند مسیرهای پیام رسان، آپوپتوز و تمایز سلولی مورد بررسی قرار گرفته‌اند (۲۱). از آنجا که مطالعه مکانیسم‌های سلولی

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-05]

[DOI: 10.22102/22.5.55]

مانند تکثیر و چرخه سلولی در شرایط شبیه سازی بی‌وزنی باعث درک بهتر ما از تاثیر بی‌وزنی بر سلول‌ها می‌شود، و به منظور استفاده از شرایط بی‌وزنی برای تمایز سلولی در آینده، در این مطالعه به بررسی تاثیر بی‌وزنی شبیه سازی شده بر تکثیر و چرخه سلولی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی پرداختیم. برای شبیه سازی بی‌وزنی از کلینواستت یک محوره استفاده شد.

روش بررسی

آماده سازی بافت چربی

مطالعه حاضر از نوع مداخله‌ای آینده‌نگر بود و در آزمایشگاه زیست پزشکی پژوهشگاه هوافضا (Aerospace Research Institute) در سال ۱۳۹۵ انجام شد. بافت چربی از دو فرد ۳۴ و ۴۸ سال که برای انجام جراحی زیبایی به مرکز پزشکی لیزر دانشگاه تهران (ACECR) مراجعه کرده بودند، با کسب رضایت شخصی مراجعان و طی جراحی لیپوساکشن تهیه شد. نمونه چربی داخل فالکون استریل جمع‌آوری شد و در حداقل زمان به آزمایشگاه زیست پزشکی پژوهشگاه هوافضا منتقل گردید.

جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی

جداسازی سلول‌ها با روش هضم آنزیمی انجام شد (۲۲). به طور خلاصه ابتدا فاز خونی نمونه، جداسازی شده و باقیمانده چربی چند بار با محلول HBSS (Hank's Balanced Salt Solution;Biowest, France) شستشو داده شد. سپس نمونه چربی در دمای ۳۷ درجه و به مدت ۶۰ دقیقه در کلاژناز نوع ۱ (۱٪) انکوبه شد. در طول این مدت با تکان دادن لوله حاوی نمونه، به هضم بهتر بافت چربی کمک شد. بعد از مرحله هضم آنزیمی و پس از اضافه کردن محیط کشت DMEM حاوی ۱۰درصد سرم جنین گوساله (FBS)، نمونه‌ها با سرعت ۴۰۰ جی و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. بعد از سانتریفیوژ، لایه روغنی بالایی دور ریخته شد و بخش ته نشین شده در فالکون به همراه محیط کشت DMEM حاوی ۱۰درصد سرم جنین گوساله و ۱ درصد آنتی بیوتیک به فلاسک کشت سلولی منتقل شد. در نهایت فلاسک کشت سلولی در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد و ۵ درصد گاز CO2 قرار داده شد. بعد از ۴۸ ساعت با تعویض محیط کشت، سلول‌های نچسپیده و باقی مانده‌های سلولی دور ریخته شد. پس از رسیدن سلول‌ها به تراکم حدود ۸۰٪، پاساژ سلولی با روش استاندارد trypsinization انجام گرفت. سلول‌ها در پاساژ سوم برای مراحل تائید سلول‌های بنیادی مزانشیمی استفاده شدند.

تائید سلول‌های استخراج شده

تایید ماهیت مزانشیمی سلول‌های بنیادی کشت یافته، با دو روش فلوسایتومتری و تمایز به رده‌های چربی و استخوان به‌گونه‌ای که قبلا توضیح داده شد؛ انجام شد (۲۳). به طور خلاصه، جهت انجام فلوسایتومتری، آنتی‌بادی‌های CD90-PE، CD105-FITC و CD73-PE به عنوان مارکرهای مثبت و آنتی‌بادی‌های CD34-PE و CD45-FITC به عنوان مارکر منفی مورد استفاده قرار گرفت. بدین منظور از سلول‌های جداشده در پاساژ سوم استفاده شد. ابتدا سلول‌ها دریک محیط تاریک با غلظت مناسبی از آنتی‌بادی‌های نشاندار (نسبت ۱:۱۰) به مدت ۳۰ دقیقه و در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شد. بعد از شستشو، آنالیز فلوسایتومتری توسط دستگاه Cyflow Space (Partec) انجام گرفت. سپس نتایج توسط نرم افزار FloMax آنالیز شد.

تمایز به چربی و استخوان، توسط کیت Human Mesenchymal Stem Cell Functional Identification (R&D systems, USA) و مطابق با دستورالعمل تولید کننده انجام شد. به طور خلاصه برای تمایز به چربی، سلول‌ها با تراکم $۲/۱\times۱۰^{۴}$ در پلیت ۶ خانه و در محیط کشت α-MEM حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گوساله کشت شدند. بعد از رسیدن سلول‌ها به تراکم ۹۰ تا

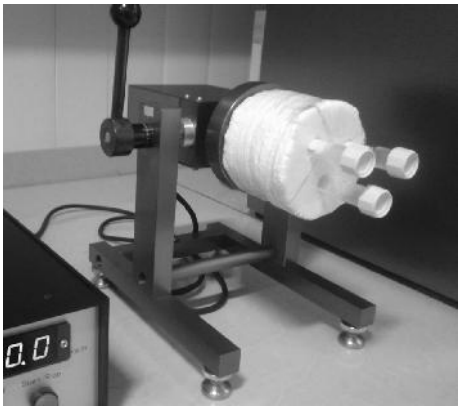
[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-05]

[DOI: 10.22102/22.5.55]

۱۰۰٪، محیط کشت قبلی تخلیه شد و محیط کشت آماده تمایز به چربی اضافه شد. محیط تمایزی هر سه روز یک بار تعویض شد. بعد از گذشت ۹ روز از تمایز، واکوئل‌های چربی مشاهده شدند. سپس از رنگ‌آمیزی Oil Red O (Sigma, USA) جهت تائید تمایز به چربی استفاده شد (۲۴). برای تمایز به استخوان، سلول‌ها با تراکم $۲/۱\times۱۰^{۴}$ در پلیت ۶ خانه و در محیط کشت α-MEM حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گوساله کشت شدند. بعد از رسیدن سلول‌ها به تراکم ۵۰ تا ۷۰٪، محیط کشت قبلی تخلیه شد و محیط کشت آماده تمایز به استخوان اضافه شد. محیط تمایزی هر سه روز یک بار تعویض شد. بعد از گذشت ۱۵ روز از تمایز که سلول‌ها شروع به کنده شدن کردند، سلول‌های استخوانی مشاهده شدند. تایید تمایز با رنگ آمیزی Alizarin Red S (Sigma, USA) انجام شد (۲۵).

شبیه سازی بی‌وزنی

برای شبیه‌سازی بی‌وزنی از دستگاه کلینواستت یک محوره که از سازمان ملل گرفته شده بود؛ استفاده شد (شکل ۱). این دستگاه با چرخاندن سلول‌ها باعث می‌شود که سلول‌ها نتوانند جاذبه را تشخیص دهند. بدین منظور ابتدا کلینواستت توسط اتانول ۷۰ درصد و UV استریل شد و داخل انکوباتور کشت سلولی قرار گرفت. سپس سلول‌های ADSC به تعداد ۲×۱۰^{۶} در لوله‌های کشت سلول (tissue culture tube=TPP) کشت داده شدند. پس از چسپیدن سلول‌ها، برای جلوگیری از حضور حباب و ایجاد نیروهای برشی، لوله‌های کشت کاملا با محیط کشت پر شدند. برای ثابت ماندن pH محیط کشت، از غلظت ۱۵ میلی مولار HEPES در محیط کشت استفاده شد. نمونه‌ها در مرکز کلینواستت تثبیت شده و سرعت دستگاه بر روی ۲۰ rpm تنظیم شد(۲۶).



شکل ۱: دستگاه کلینواستت یک محوره

آنالیز چرخه سلولی

پس از ۳ روز از قرار دادن سلول‌ها در شرایط شبیه‌سازی بی‌وزنی، بررسی چرخه سلولی بر روی سلول‌های قرار گرفته در شرایط بی‌وزنی (سلول‌ها در داخل لوله‌های کشت سلول کشت شدند و لوله‌های کشت در مرکز دستگاه کلینواستت یک محوره تثبیت شدند) و نمونه کنترل انجام گرفت. نمونه‌های کنترل سلول‌های ADSC بودند که به مدت ۳ روز در شرایط جاذبه نرمال (جاذبه ۱ جی؛ محیط طبیعی داخل انکوباتور) در داخل انکوبلاتور CO_2 و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد کشت شدند. اساس این روش به این ترتیب است که DNA موجود در سلول‌ها با رنگ PI (propidiumiodide) رنگ آمیزی شده و مقدار آن در سلول‌ها با دستگاه فلوسایتومتری تعیین می‌شود. همچنین مولکول‌های DNAی سلول‌هایی که دچار مرگ سلولی برنامه ریزی شده (آپوپتوز) شده‌اند؛ معمولا به صورت شکسته شده در می‌آیند. این امر موجب می‌شود که طی مراحل رنگ آمیزی سلول‌ها، مقداری از این مولکول‌هایDNA، از سلول‌های مورد نظر خارج شوند.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-05]

[DOI: 10.22102/22.5.55]

همچنین مشخص شده است که بعضی از سلول‌ها با تبدیل شدن به اجسام آپوپتوتیک (apoptotic bodies)، DNAی خود را از دست می‌دهند. بنابراین سلول‌هایی که دچار آپوپتوز شده اند؛ تنها مقداری از DNA خود را دارند. همین مقدار کم DNA موجب می‌شود تا سلول‌هایی که دچار فرایند آپوپتوز شده‌اند؛ در نمودار در بخش کمتر از 2N (<2N) مشاهده شوند(۲۷). بدین منظور، بعد از جدا کردن سلول‌ها با تریپسین و شستشو با PBS ، سلول‌ها با اتانول سرد ۷۰ درصد و در دمای ۴ درجه سانتی گراد و به مدت یک ساعت تثبیت شدند. سپس سلول‌ها ۲ بار با PBS شسته شدند و سلول‌ها در رنگ PI و آنزیم RNase معلق شدند. نمونه‌ها برای ۴۵ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی نگه داشته‌شدند. آنالیز فلوسایتومتری توسط دستگاه Cyflow Space (Partec) انجام گرفت و داده‌ها با نرم افزار FlowJo آنالیز شدند (۲۸).

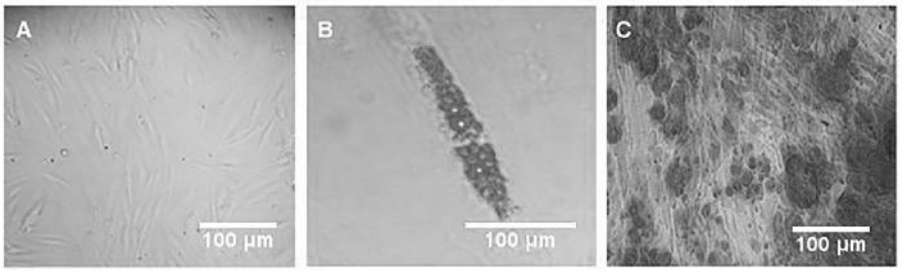
آنالیز آماری

جهت جلوگیری از خطای ایجاد شده بر اثر تفاوت در منبع سلول‌ها، برای هر آزمایش سه سری کشت سلول و با استفاده از سلول‌های استخراج شده از یک دهنده تهیه شد. تفاوت بین گروه‌ها با استفاده از آزمون Student's t-test بررسی شده و سطح معنی‌داری $P<۰/۰۵$ در نظر گرفته شد.

یافته ها

استخراج و کشت سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی

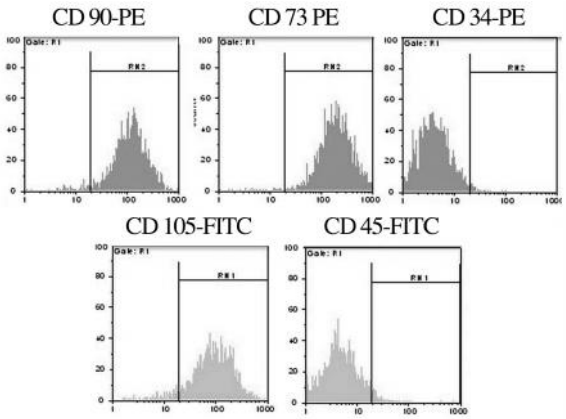
پس از استخراج و انتقال سلول‌ها به فلاسک و انکوبه شدن در انکوباتور، محیط کشت در روز بعد تعویض شد و بدین ترتیب سلول‌های چربی که در محیط قرار داشتند حذف شدند و تنها سلول‌هایی که به کف ظرف چسبیده بودند باقی ماندند. از ویژگی‌های سلول‌های بنیادی مزانشیمی همین چسبیدن آنها به کف ظروف پلاستیکی کشت می‌باشد که روشی برای جداسازی آنها از سایر سلول‌ها می‌باشد. بعد از پاساژ اول سلول‌های دوکی شکل مشاهده شدند (شکل ۲A) و تقریبا پس از گذشت دو پاساژ از کشت اولیه، جمعیتی از سلول‌های دوکی شکل با مورفولوژی سلول‌های فیبروبلاست مشاهده شدند. همچنین تمایز به دو رده چربی و استخوان نیز تایید کرد که سلول‌های استخراج شده، سلول‌هایی پرتوان هستند و توانایی تمایز به سایر رده‌های سلولی را دارا می‌باشند (شکل ۲B و ۲C). آنالیز مارکرهای سطحی نشان داد که بیش از ۹۵ درصد سلول‌ها ماهیت مزانشیمی داشته و برای CDهای ۹۰، ۷۳ و ۱۰۵ مثبت بوده و برای مارکرهای خونی چون CDهای ۳۴ و ۴۵ منفی بودند (شکل ۳).



شکل۲: کشت و تایید سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی A) سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی در پاساژ دوم B) تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی به سلول‌های چربی و مشاهده واکوئول‌های چربی بعد از رنگ‌آمیزی با C Oil Red O) تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی به سلول‌های استخوانی و مشاهده رسوب کلسیم با رنگ‌آمیزی Alizarin Red S

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-05]

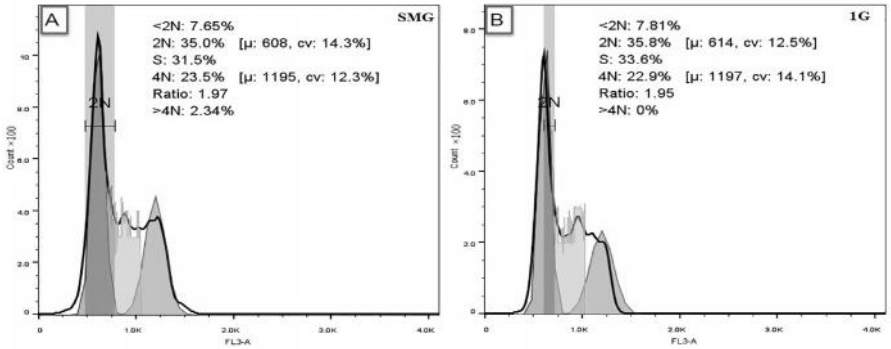
[DOI: 10.22102/22.5.55]



شکل۳: آنالیز مارکرهای سطحی سلول‌های استخراج شده از بافت چربی با روش فلوسایتومتری. بیش از ۹۵ درصد سلول‌ها برای CDهای ۹۰، ۷۳ و ۱۰۵ مثبت و برای مارکرهای خونی چون CDهای ۳۴ و ۴۵ منفی بودند.

اثر بی‌وزنی شبیه سازی شده بر چرخه سلولی

بعد از سه روز قرار گرفتن در شرایط شبیه سازی بی‌وزنی، آنالیز چرخه سلولی بر اساس مقدار DNA سلول‌ها انجام شد. نتایج فلوسایتومتری نشان داد که بعد از ۳ روز قرار گرفتن در شرایط شبیه سازی بی‌وزنی، هیچ کدام از مراحل اصلی چرخه سلولی (G1، S و G2) تغییر معنی‌داری نسبت به نمونه کنترل نداشتند (P>۰/۰۵). به این ترتیب که در شرایط شبیه‌سازی بی‌وزنی، درصد سلول‌هایی که در فاز G0/G1 بودند و مقدار DNA آنها در این مرحله 2N می‌باشد به میزان ۳۵ درصد بود؛ درصد سلول‌هایی که در فاز S یا همانندسازی DNA بودند به میزان ۳۱/۵ درصد بود و درصد سلول‌هایی که در فاز G2/M بودند و مقدار DNA آنها در این مرحله 4N می‌باشد به میزان ۲۳/۵ درصد بود. درارتباط با نمونه‌های کنترل، نتایج آنالیز چرخه سلولی نشان داد که درصد سلول‌هایی که در فاز G0/G1 بودند به میزان ۳۵/۸ درصد بود؛ درصد سلول‌هایی که در فاز S بودند به میزان ۳۳/۶ درصد بود و درصد سلول‌هایی که در فاز G2/M بودند به میزان ۲۲/۹ درصد بود (شکل۴). این نتایج حاکی از این بود که نتایج چرخه سلولی در شرایط شبیه‌سازی بی‌وزنی نسبت به نمونه کنترل تفاوت معنی‌داری ندارد (P>۰/۰۵).



شکل ۴: نتایج بررسی چرخه سلولی در سلول‌های ADSC کشت شده در شرایط شبیه‌سازی بی‌وزنی (A) و در نمونه‌های کنترل کشت شده در شرایط جاذبه نرمال (B). SMG: شرایط شبیه‌سازی بی‌وزنی. 1G: شرایط جاذبه نرمال.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-05]

[DOI: 10.22102/22.5.55]

نتایج ما نشان داد که درصد سلول‌هایی که میزان مولکول‌های DNAی آنها کمتر از 2N می‌باشد در شرایط شبیه‌سازی بی‌وزنی ۷/۶۵ درصد می‌باشد که نشان دهنده سلول‌های وارد شده به مرحله آپوپتوز است. میزان آپوپتوز در نمونه‌های کنترل نیز مشابه با نمونه‌های بی‌وزنی بود به طوری که در نمونه کنترل، میزان ۷/۸۱ درصد از سلول‌ها، مقدار DNAی کمتر از 2N را نشان دادند (شکل ۴). بنابراین میزان سلول‌هایی که دچار آپوپتوز شده بودند در شرایط شبیه سازی بی‌وزنی اختلاف معنی‌داری را نسبت به نمونه‌هایی که در جاذبه نرمال (۱ جی) کشت شده بودند نشان ندادند (P>۰/۰۵).

بحث

در مطالعه حاضر به بررسی اثر بی‌وزنی شبیه‌سازی شده بر روی چرخه سلولی در سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی پرداختیم. علت انتخاب سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی، استفاده روز افزون از این سلول‌ها در مطالعات سلولی و تمایز به رده‌های مختلف سلولی در بحث‌های سلول درمانی و پیوند بافت به موجب خصوصیاتی چون در دسترس بودن، سهولت کشت و ایمنی‌زایی پایین می‌باشد (۱۴ و ۱۳). از طرف دیگر در سال‌های اخیر کشت و تمایز سلولی در شرایط بی‌وزنی به علت تمایل سلول‌ها به رشد سه بعدی بدون نیاز به داربست رواج یافته است (۱۶ و ۱۵). در واقع جاذبه یکی از مهمترین نیروهای مکانیکی روی زمین است که تاثیر زیادی روی تمام موجودات زنده دارد و تغییر در میزان جاذبه بر روی فیزیولوژی موجودات زنده و فعالیت سلول‌ها تاثیر می‌گذارد (۳۰و ۲۹). در نتیجه در این مطالعه تاثیر بی‌وزنی شبیه‌سازی شده بر روی چرخه سلولی در سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی بررسی شد. از آنجا که انجام مطالعات در شرایط واقعی بی‌وزنی (پروازهای فضایی) بسیار پرهزینه و دشوار است، به همین علت دستگاه‌های مختلفی برای ایجاد شرایط بی‌وزنی بر روی زمین ساخته شده است که از بین آنها می‌توان به قفس بی‌وزنی برای شبیه‌سازی بی‌وزنی در جوندگان و کلینواستت تک محوره و سه محوره برای شبیه‌سازی بی‌وزنی در سلول‌های گیاهی و جانوری اشاره کرد (۸ و ۶). در این مطالعه دستگاه کلینواستت یک محوره برای شبیه‌سازی بی‌وزنی استفاده شد. نتایج ما نشان داد که ۳ روز قرار گرفتن در معرض شبیه‌سازی بی‌وزنی ایجاد شده توسط کلینواستت، تاثیری بر مراحل چرخه سلولی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی ندارد. این نتایج مغایر با نتایجی بود که Sokolovskaya و همکاران در سال ۲۰۱۴ مشاهده کردند. مطالعه آنها بر روی رده سلول‌های اندوتلیال انسان EA.hy926 بود و برای شبیه‌سازی بی‌وزنی از دستگاه شبیه‌ساز بی‌وزنی RPM (کلینواستت سه محوره و یا random positioning machine) استفاده کردند. آنها نشان دادند که درصد سلول‌هایی که در فاز G0/G1 هستند بعد از ۲۴ و ۹۶ ساعت کشت در شرایط بی‌وزنی شبیه سازی شده، به صورت معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل افزایش می‌یابد. این در حالی بود که شبیه‌سازی بی‌وزنی برای ۱۲۰ ساعت، تاثیر معنی‌داری بر چرخه سلولی نداشت. همچنین آنها نشان دادند که ۲۴ و ۹۶ ساعت بی‌وزنی موجب کاهش معنی‌دار درصد سلول‌هایی می‌شود که در فاز S می‌باشند. مشابه با فاز G0/G1، بعد از ۱۲۰ ساعت کشت در بی‌وزنی، درصد سلول‌هایی که در فاز S بودند؛ مشابه با نمونه‌های کنترل بود (۳۱). به نظر می‌رسد که در ساعت‌های اولیه قرار گرفتن در شرایط شبیه‌سازی بی‌وزنی تغییرات بیشتری در چرخه سلولی مشاهده می‌شود. این امر می‌تواند ناشی از دپلیمریزه شدن میکروتوبول‌ها در این شرایط و در ساعت‌های اولیه باشد (۳۱).

در بسیاری از موارد، مطالعات سلولی انجام شده با استفاده از دستگاه‌های شبیه‌ساز بی‌وزنی، نتایج یکسانی را بیان نکرده‌اند. این اختلافات معمولا ناشی از تفاوت در نوع دستگاه‌های شبیه‌ساز بی‌وزنی، رده‌های متفاوت سلولی

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-05]

[DOI: 10.22102/22.5.55]

استفاده شده و مدت زمان قرارگیری در شرایط شبیه‌سازی بی‌وزنی بوده است. به این ترتیب که نتایج بعضی از مطالعات نشان داده‌اند که بی‌وزنی باعث انباشتگی سلول‌ها در فاز خاصی از چرخه سلولی می‌شود در حالی که سایر مطالعات تغییر معنی‌داری را نشان نداده‌اند (۳۲و۳۱). برخی از مطالعات حاکی از این است که در شرایط بی‌وزنی سلول‌ها در فاز G0/G1 تجمع می‌یابند در حالی که برخی دیگر تجمع سلول‌ها را در فاز G2/M گزارش کرده‌اند. به عنوان مثال Lewis در سال ۲۰۰۲ در آزمایشی که بر روی رده سلولی MCF-7 انجام داد مشاهده کرد که شبیه‌سازی بی‌وزنی موجب تجمع این سلول‌ها در فاز G2/M می‌شود (۲۰). بنابراین با توجه به اختلافات مشاهده شده، زمانی می‌توان نتایج را مقایسه کرد که دستگاه استفاده شده، رده سلولی و زمان مطالعه برابر باشد.

نتایج مطالعات قبلی در مورد میزان آپوپتوز در شرایط بی‌وزنی هم یکسان نبوده است. نتایج ما در مورد آپوپتوز نشان داد که ۳ روز بی‌وزنی شبیه‌سازی شده توسط کلینواستت تک محوره، تاثیر معنی‌داری بر میزان آپوپتوز سلولی در سلول‌های ADSC ندارد. این در حالی است که Beck و همکاران در سال ۲۰۱۲ نشان دادند که میزان آپوپتوز در سلول‌های جنینی فیبروبلاست بعد از ۲۴ ساعت قرار گرفتن در معرض بی‌وزنی شبیه‌سازی شده توسط دستگاه کلینواستت سه محوره، کاهش می‌یابد (۳۳). در مقابل آزمایش دیگری که توسط Lin و همکاران در سال ۲۰۱۶ و بر روی سلول‌های بنیادی نورونی موش صحرایی (Rat) انجام شد؛ نشان داد که شبیه‌سازی بی‌وزنی توسط دستگاه RCCS (rotatory cell culture system) موجب افزایش آپوپتوز می‌شود (۳۴). همچنین مطالعات Zhao و همکاران در سال ۲۰۱۶ نشان داد که شبیه‌سازی بی‌وزنی توسط کلینواستت سه محوره موجب افزایش آپوپتوز در سلول‌های رده میلومای BL6-10 می‌شود (۳۵). بنابراین اختلاف مشاهده شده در هر دو مرحله (چرخه سلولی و میزان آپوپتوز) می‌تواند ناشی از نوع رده سلولی و نوع دستگاه شبیه‌ساز بی‌وزنی باشد. بر اساس نتایج به دست آمده در مطالعه ما، اینطور به نظر می‌رسد که احتمالا دستگاه کلینواستت تک محوره در مقایسه با دستگاه کلینواستت سه محوره، محیط ملایمتری را برای سلول‌ها فراهم می‌کند. در کلینواستت سه محوره به علت چرخش همزمان سلول‌ها در سه محور، نیروهای تنشی و استرس وارد شده به سلول‌ها بیشتر می‌باشد. این امر می‌تواند بر رشد سلولی و همچنین میزان مرگ و میر سلولی تاثیر گذارد. بنابراین میزان مرگ و میر و آپوپتوز در شرایط بی‌وزنی که توسط دستگاه کلینواستت تک محوره ایجاد می‌شود بسیار کمتر و یا ناچیز می‌باشد. بنابراین ما پیشنهاد می کنیم که برای مطالعات سلولی و تمایز سلولی در شرایط بی‌وزنی کلینواستت تک محوره مناسب‌تر می‌باشد به ویژه برای تمایز به رده‌های سلولی در مواردی که خود فرایند تمایز نیز منجر به مرگ و میر سلول‌ها می‌شود. به عنوان مثال، یکی از مشکلاتی که در تمایز سلول‌های بنیادی به سلول‌های شبه عصبی در شرایط نرمال ۱ جی وجود دارد؛ مرگ و میر این سلول‌ها بعد از تمایز و درنتیجه کم بودن سلول‌های شبه عصبی حاصل جهت انجام پیوند و سلول درمانی می‌باشد (۳۶). بنابراین جهت تمایز سلول‌ها به سلول‌های شبه عصبی در شرایط بی‌وزنی، کلینواستت تک محوره توصیه می‌شود.

نتیجه گیری

نتایج ما نشان دادند که سلول‌های بنیادی مزانشیمی بعد از ۳ روز قرار گرفتن در معرض شبیه‌سازی بی‌وزنی از لحاظ چرخه سلولی و میزان آپوپتوز تغییر معنی‌داری در مقایسه با نمونه‌های کشت شده در شرایط جاذبه نرمال (۱ جی) نداشتند. بر اساس نتایج این مطالعه، به نظر می‌رسد که دستگاه کلینواستت تک محوره در مقایسه با دستگاه کلینواستت سه محوره، محیط ملایمتری را برای سلول‌ها فراهم کرده و میزان مرگ و میر و آپوپتوز در این شرایط،

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-05]

[DOI: 10.22102/22.5.55]

بسیارکمتر از کلینواستت سه محوره می‌باشد. بنابراین پیشنهاد می‌شود که برای مطالعات سلولی و تمایز سلولی در شرایط بی‌وزنی، کلینواستت تک محوره مناسب‌تر می‌باشد.

تشکر و قدردانی

این مقاله براساس بخشی از نتایج حاصل از پایان نامه دانشجوی دکتری ژنتیک با عنوان مطالعه اثر بی وزنی بر تمایز سلوهای بنیادی چربی (Adipose derived stem cells) به سلول های فیبروبلاست نگارش شده است که در سال ۱۳۹۴ در آزمایشگاه زیست فضایی پژوهشگاه هوافضا انجام شده است. نویسندگان مقاله مراتب قدردانی خود را از مسئولین محترم پژوهشی آن مرکز ابراز می دارند.

References

1.Rea G, Cristofaro F, Pani G, Pascucci B, Ghuge SA, Corsetto PA, et al. Microgravity-driven remodeling of the proteome reveals insights into molecular mechanisms and signal networks involved in response to the space flight environment. J Proteomics 2016; 137: 3-18.
2.Basso N, Bellows C, Heersche J. Effect of simulated weightlessness on osteoprogenitor cell number proliferation young and adult rats. Bone 2005; 17: 173–83.
3.Grimm D, Grosse J, Wehland M, Mann V, Reseland J, Sundaresan A, et al. The impact of microgravity on bone in humans. Bone 2016; 87: 44-56.
4.Sonnenfeld G, Butel J, Shearer W. Effects of the space flight environment on the immune system. Rev Environ Health 2003; 18: 1–17
5.Grimm D, Bauer J, Kossmehl P, Shakibaei M, Schönberger J, Pickenhahn H, et al. Simulated microgravity alters differentiation ad increases apoptosis in human follicular thyroid carcinoma cells. FASEB J 2002; 16: 604-14.
6.Claassen DE, Spooner BS. Impact of altered gravity on aspects of cell biology. Int Rev Cytol 1994; 156: 301–73.
7.Hammond TG, Lewis FC, Goodwin TJ, Linnehan RM, Wolf DA, Hire KP, et al. Gene expression in space. Nat Med 1999; 5: 359.
8.Aleshcheva G, Bauer J, Hemmersbach R, Egli M, Wehland M, Grimm D. Tissue engineering of cartilage on ground-based facilities. Microgravity Sci Technol 2015; 28: 237-45.
9.Carlsson S, Bertilaccio M, Ballabio E, Maier J. Endothelial stress by gravitational unloading: effects on cell growth and cytoskeletal organization. Biochim Biophys Acta 2003; 1642: 173–9.
10. Xu H, Wu F, Zhang H, Yang C, Li K, Wang H, et al. Actin cytoskeleton mediates BMP2-Smad signaling via calponin 1 in preosteoblast under simulated microgravity. Biochimie 2017; 138: 184-93.
11.Ullah I, Subbarao R, Rho G. Human mesenchymal stem cells - current trends and future prospective. Biosci Rep 2015; 35:1-18.
12.Friedenstein A, Petrakova K, Kurolesova A, Frolova G. Heterotopic of bone marrow. analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. Transplantation 1968; 6: 230-47.
13.Meirelles DS. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. J Cell Sci 2006; 119: 2204-13.
14.Yamamoto T, Gotoh M, Hattori R, Toriyama K, Kamei Y, Iwaguro H, et al. Periurethral injection of autologous adipose-derived stem cells for the treatment of stress urinary

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-05]

[DOI: 10.22102/22.5.55]

incontinence in patients undergoing radical prostatectomy: Report of two initial cases. Int J Urol 2009; 17: 75–82.
15.Unsworth B, Lelkes P. Growing tissues in microgravity. Nat Med 1998; 4: 901-7.
16.Chen J, Liu R, Yang Y, Li J, Zhang X, Li J, et al. The simulated microgravity enhances the differentiation of mesenchymal stem cells into neurons. Neurosci Lett 2011; 505:171-5.
17.Yuge A, Sasaki Y, Kawahara SL, Wu M, Matsumoto T, Manabe T, et al. Simulated microgravity maintains the undifferentiated state and enhances the neural repair potential of bone marrow stromal cells. Stem Cells Dev 2010; 20: 893–900.
18.Herranz R, Anken R, Boonstra J, Braun M, Christianen P C, deGeest J, et al. Ground-based facilities for simulation of microgravity: organism-specific recommendations for their use, and recommended terminology. Astrobiology 2013; 13: 1–17.
19.Rucci N, Migliaccio S, Zani B M, Taranta A, Teti A. Characterization of the osteoblast-like cell phenotype under microgravity conditions in the NASA-approved rotating wall vessel bioreactor (RWV). J Cell Biochem 2002; 85: 167–79.
20.Lewis M L. The cytoskeleton, apoptosis, and gene expression in T lymphocytes and other mammalian cells exposed to altered gravity. Adv Space Biol Med 2002; 8: 128–77.
21.Schatten M L, Lewis A, Chakrabarti H. Space flight and clinorotation cause cytoskeleton and mitochondria changes and increase in apoptosis in cultured cells. Acta Astronaut 2001; 49: 399–418.
22.Zuk P. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. Mol Biol Cell 2002; 13: 4279-95.
23.Zarrinpour V, Hajebrahimi Z, Jafarinia M. Expression pattern of neurotrophins and their receptors during neuronal differentiation of adipose-derived stem cells in simulated microgravity condition. Iran J Basic Med Sci 2017; 20: 178-86.
24.Aldridge A, Kouroupis D, Churchman S, English A, Ingham E, Jones E. Assay validation for the assessment of adipogenesis of multipotential stromal cells—a direct comparison of four different methods. Cytotherapy 2013; 15: 89–101.
25.Fan J, Park H, Tan S, Lee, M. Enhanced osteogenesis of adipose derived stem cells with Noggin suppression and delivery of BMP-2. PLOS ONE 2013; 8: e72474.
26.Matsuoka R, Ohkubo S, Yoshida M, Nakahata N. Alteration of adenylyl cyclase type 6 expression in human astrocytoma cells after exposure to simulated microgravity. J Health Sci 2007; 53: 534-42.
27.Pozarowski P, Darzynkiewicz Z. Analysis of cell cycle by flow cytometry. Methods Mol Biol 2004; 281: 301–11.
28. Jafarnejad SM, Mowla SJ, Matin MM. Knocking-down the expression of nucleostemin significantly decreases rate of proliferation of rat bone marrow stromal stem cells in an apparently p53-independent manner. Cell Prolif 2008; 41: 28–35.
29.Winnard A, Nasser M, Debuse D, Stokes M, Evetts S, Wilkinson M et al. Systematic review of countermeasures to minimise physiological changes and risk of injury to the lumbopelvic area following long-term microgravity. Musculoskeletal Sci Practice 2017; 27: S5-S14.
30.Blaber E, Finkelstein H, Dvorochkin N, Sato K, Yousuf R, Burns B, et al. Microgravity reduces the differentiation and regenerative potential of embryonic stem cells. Stem Cells Dev 2015; 24: 2605-21.
31. Sokolovskaya A, Ignashkova T, Bochenkova A, Moskovtsev A, Baranov V, Kubatiev A. Effects of simulated microgravity on cell cycle in human endothelial cells. Acta Astronautica 2014; 99: 16-23.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-05]

[DOI: 10.22102/22.5.55]

32.Coinu R, Chiaviello A, Galleri G, Franconi F, Crescenzi E, Palumbo G. Exposure to model microgravity induces metabolic idleness in malignanthuman MCF-7and normal murine VSMC cells. FEBS Lett 2006; 580: 2465–70.
33.Beck M, Tabury K, Moreels M, Jacquet P, VanOostveldt P, DeVos W H, et al. Simulated microgravity decreases apoptosis in fetal fibroblasts. Int J Mol Med 2012; 30: 309–13.
34.Lin S, Gou G, Hsia C, Ho C, Huang K, Wu Y, et al. Simulated microgravity disrupts cytoskeleton organization and increases apoptosis of rat neural crest stem Cells via upregulating CXCR4 expression and RhoA-ROCK1-p38 MAPK-p53 signaling. Stem Cells Dev 2016; 25:1172-93.
35.Zhao T, Tang X, Umeshappa C, Ma H, Gao H, Deng Y, et al. Simulated microgravity promotes cell apoptosis through suppressing Uev1A/TICAM/TRAF/NF-κB-regulated anti-apoptosis and p53/PCNA- and ATM/ATR-Chk1/2-controlled DNA-damage response pathways. J Cell Bioche 2016; 117: 2138-48.
36.Edalat H, Hajebrahimi Z, Movahedin M, Tavallaei M, Amiri S, Mowla SJ. p75NTR suppression in rat bone marrow stromal stem cells significantly reduced their rate of apoptosis during neural differentiation. Neurosci Lett 2011; 498: 15-9.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-05]

[DOI: 10.22102/22.5.55]