

## Simulated microgravity effects on cell cycle in adipose derived stem cells

Ebnerasuly F., PhD Student<sup>1,2</sup>, Hajebrahimi Z., PhD<sup>3</sup>, Tabaie SM., MD<sup>4</sup>, Darbouy M., PhD.<sup>5,6</sup>

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

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

فرید ابن رسولی<sup>۱،۲</sup>، زهرا حاج‌ابراهیمی<sup>۳</sup>، سید مهدی طبایی<sup>۴</sup>، مجتبی دابویی<sup>۵،۶</sup>

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 مسول)، تلفن ثابت: ۰۲۱-۸۸۳۶۲۰۱۱، 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 شبیه‌سازی شده توسط دستگاه کِلینواست 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 کِلینواست 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 کِلینواست تک محوره، از نظر آماری تاثیر معنی‌داری بر چرخه سلولی و میزان آپوپتوز ندارد ( $P > 0/05$ ).

**نتیجه‌گیری:** مطالعات قبلی نشان داده است که بی‌وزنی شبیه‌سازی شده توسط کِلینواست سه محوره یا RPM، چرخه سلولی را تغییر می‌دهد و میزان آپوپتوز را افزایش می‌دهد. براساس داده‌های ما، به نظر می‌رسد که استرس تنشی ایجاد شده توسط کِلینواست تک محوره بسیار کمتر از کِلینواست سه محوره می‌باشد. بنابراین ما کِلینواست 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، کِلینواست تک محوره

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

## 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 جاذبه ۱ جی (۱g) 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 (۲-۴). بسیاری از این مشکلات به علت تغییرات در سطح سلولی به وجود می‌آید، به طوری که مطالعات نشان داده است که بی‌وزنی منجر به تغییر در تکثیر، رشد سلولی و مسیرهای انتقال پیام می‌شود (۵-۸). از طرف دیگر، بی‌وزنی شرایط جدیدی را برای سلول‌ها ایجاد می‌کند که می‌تواند منجر به شناخت بهتر مکانیسم‌های اصلی سلول شود (۱۰) و (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 (۱۵ و ۸-۵). به عنوان نمونه، مطالعات قبلی نشان داده است که بی‌وزنی که توسط دستگاه کلینواست تک محوره ایجاد شده است؛ تاثیر مثبت بر تمایز نورونی سلول‌های بنیادی مزانشیمی دارد به گونه‌ای که بی‌وزنی منجر به افزایش تمایز سلول‌های مزانشیمی به سلول‌های شبه عصبی و افزایش بیان نوروتروفین‌ها در این سلول‌ها می‌گردد (۱۷ و ۱۶).

شرایط بی‌وزنی را می‌توان با پروازهای فضایی و یا سقوط آزاد ایجاد کرد. طول بی‌وزنی ایجاد شده توسط سقوط آزاد معمولاً 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 کلینواست تک محوره وسیله مفیدی برای شبیه‌سازی بی‌وزنی بر روی سلول‌ها می‌باشد (۱). دستگاه کلینواست، با چرخاندن سلول‌ها باعث می‌شود تا سلول‌ها نتوانند جهت جاذبه را تشخیص دهند. این مسئله موجب می‌شود که شرایطی شبیه به بی‌وزنی در فضای خارج جو برای سلول‌ها ایجاد شود. سرعت چرخش کلینواست 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 (۲۰ و 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

روغنی بالایی دور ریخته شد و بخش ته نشین شده در فالکون به همراه محیط کشت DMEM حاوی ۱۰ درصد 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 CO<sub>2</sub> قرار داده شد. بعد از ۴۸ ساعت با تعویض محیط کشت، سلول‌های نجسپیده 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 تأیید سلول‌های بنیادی مزانشیمی استفاده شدند.

تأیید سلول‌های استخراج شده

تأیید ماهیت مزانشیمی سلول‌های بنیادی کشت یافته، با دو روش فلوسایتومتری و تمایز به رده‌های چربی و استخوان به گونه‌ای که قبلاً 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 جدا شده در پاساژ سوم استفاده شد. ابتدا سلول‌ها در یک 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 ۱۰<sup>۴</sup>×۲/۱ در پلیت ۶ خانه و در محیط کشت MEM- حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گوساله کشت شدند. بعد از رسیدن سلول‌ها به تراکم ۹۰ تا

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

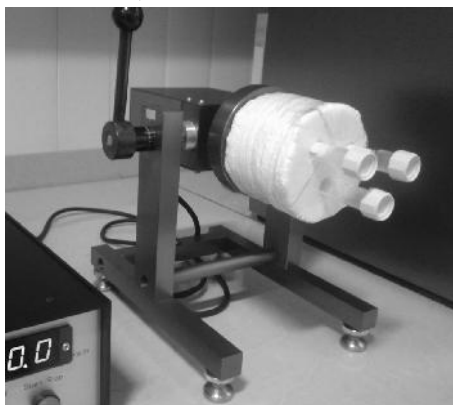
آماده سازی بافت چربی

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 ۱۰ درصد سرم جنین گوساله (FBS)، نمونه‌ها با سرعت ۴۰۰ جی و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. بعد از سانتریفیوژ، لایه

## شبیه سازی بی وزنی

برای شبیه سازی بی وزنی از دستگاه کلینواستت یک محوره که از سازمان ملل گرفته شده بود؛ استفاده شد (شکل ۱). این دستگاه با چرخاندن سلول ها باعث می شود که سلول ها 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 سلول های ADSC به تعداد  $2 \times 10^6$  در لوله های کشت سلول (tissue culture tube=TPP) کشت داده شدند. پس از چسپیدن سلول ها، برای جلوگیری از حضور حباب و ایجاد نیروهای برشی، لوله های کشت کاملاً با محیط کشت پر شدند. برای ثابت ماندن pH محیط کشت، از غلظت ۱۵ میلی مولار HEPES در محیط کشت استفاده شد. نمونه ها در مرکز کلینواستت تثبیت شده و سرعت دستگاه بر روی ۲۰ rpm تنظیم شد (۲۶).



شکل ۱: دستگاه کلینواستت یک محوره

درجه سانتیگراد کشت شدند. اساس این روش به این ترتیب است که DNA موجود در سلول ها با رنگ PI (propidium iodide) رنگ آمیزی شده و مقدار آن در سلول ها با دستگاه فلو سایتومتری تعیین می شود. همچنین مولکول های DNA سلول هایی که دچار مرگ سلولی برنامه ریزی شده (آپتوز) شده اند؛ معمولاً به صورت شکسته شده در می آیند. این امر موجب می شود که طی مراحل رنگ آمیزی سلول ها، مقداری از این مولکول های DNA، از سلول های مورد نظر خارج شوند.

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، واکوئل های چربی مشاهده شدند. سپس از رنگ آمیزی Oil Red O (Sigma, USA) جهت تأیید تمایز به چربی استفاده شد (۲۴). برای تمایز به استخوان، سلول ها با تراکم  $2/1 \times 10^4$  در پلیت ۶ خانه و در محیط کشت MEM- حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گوساله کشت شدند. بعد از رسیدن سلول ها 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 سلول ها شروع به کنده شدن کردند، سلول های استخوانی مشاهده شدند. تأیید تمایز با رنگ آمیزی Alizarin Red S (Sigma, USA) انجام شد (۲۵).

## آنالیز چرخه سلولی

پس از ۳ روز از قرار دادن سلول ها در شرایط شبیه سازی بی وزنی، بررسی چرخه سلولی بر روی سلول های قرار گرفته در شرایط بی وزنی (سلول ها در داخل لوله های کشت سلول کشت شدند و لوله های کشت در مرکز دستگاه کلینواستت یک محوره تثبیت شدند) و نمونه کنترل انجام گرفت. نمونه های کنترل سلول های ADSC بودند که به مدت ۳ روز در شرایط جاذبه نرمال (جاذبه ۱ جی؛ محیط طبیعی داخل انکوباتور) در داخل انکوباتور  $CO_2$  و در دمای ۳۷

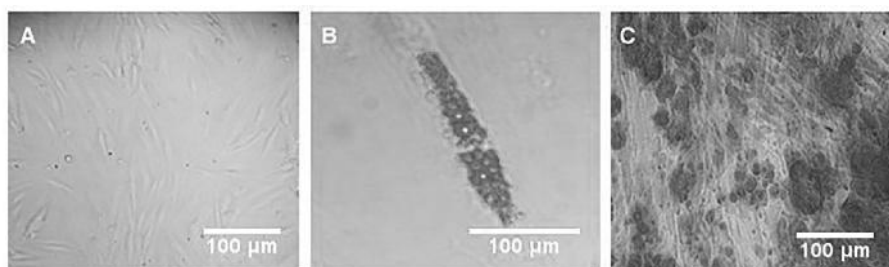
### یافته ها

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 تقریباً پس از گذشت دو پاساژ از کشت اولیه، جمعیتی از سلول‌های دوکی شکل با مورفولوژی سلول‌های فیروبللاست 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).

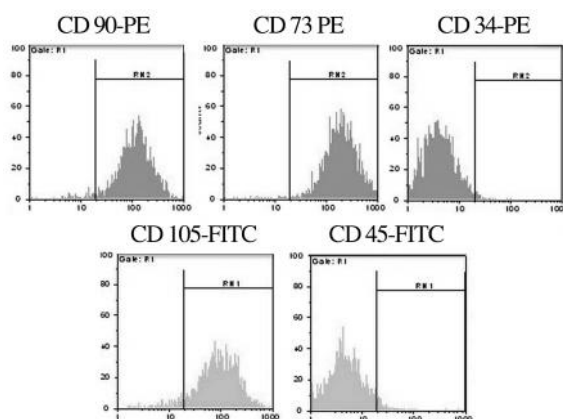
همچنین مشخص شده است که بعضی از سلول‌ها با تبدیل شدن به اجسام آپپتوتیک (apoptotic bodies)، DNAی خود را از دست می‌دهند. بنابراین سلول‌هایی که دچار آپپتوز شده‌اند؛ تنها مقداری از DNA خود را دارند. همین مقدار کم DNA موجب می‌شود تا سلول‌هایی که دچار فرایند آپپتوز شده‌اند؛ در نمودار در بخش کمتر از  $2N$  ( $<2N$ ) 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 سانتی‌گراد 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 داشته شدند. آنالیز فلوسایتمتری 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  $P < 0/05$  در نظر گرفته شد.



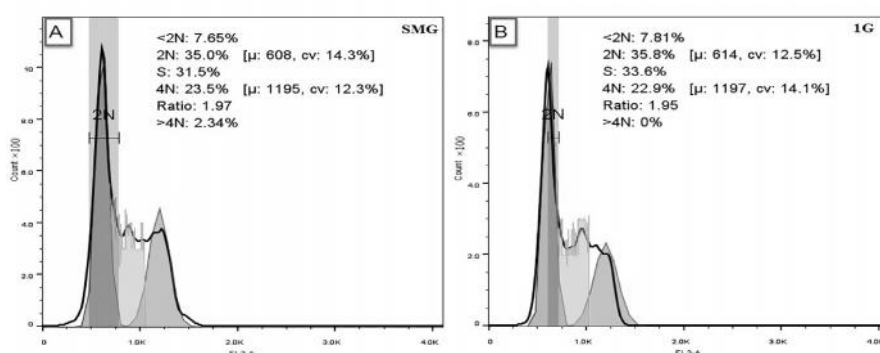
شکل ۲: کشت و تایید سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی (A) سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی در پاساژ دوم (B) تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی به سلول‌های چربی و مشاهده واکنش‌های چربی بعد از رنگ‌آمیزی با Oil Red O (C) تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی به سلول‌های استخوانی و مشاهده رسوب کلسیم با رنگ‌آمیزی Alizarin Red S



شکل ۳: آنالیز مارکرهای سطحی سلول‌های استخراج شده از بافت چربی با روش فلوسایتومتری. بیش از ۹۵ درصد سلول‌ها برای CDهای ۹۰، ۷۳، ۳۴، ۱۰۵ مثبت و برای مارکرهای خونی چون CDهای ۴۵ و ۳۴ منفی بودند.

درصد سلول‌هایی که در فاز G2/M بودند و مقدار DNA آنها در این مرحله 4N می‌باشد به میزان ۲۳/۵ درصد بود. در ارتباط 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 (شکل ۴). این نتایج حاکی از این بود که نتایج چرخه سلولی در شرایط شبیه‌سازی بی‌وزنی نسبت به نمونه کنترل تفاوت معنی‌داری ندارد ( $P > 0.05$ ).

اثر بی‌وزنی شبیه‌سازی شده بر چرخه سلولی بعد از سه روز قرار گرفتن در شرایط شبیه‌سازی بی‌وزنی، آنالیز چرخه سلولی بر اساس مقدار DNA سلول‌ها انجام شد. نتایج فلوسایتومتری نشان داد که بعد از ۳ روز قرار گرفتن در شرایط شبیه‌سازی بی‌وزنی، هیچ کدام از مراحل اصلی چرخه سلولی (G1، S، G2) تغییر معنی‌داری نسبت به نمونه کنترل نداشتند ( $P > 0.05$ ). 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



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. IG: شرایط جاذبه نرمال.

زمین ساخته شده است که از بین آنها می‌توان به قفس بی‌وزنی برای شبیه‌سازی بی‌وزنی در جوندگان و کلینواست تک محوره و سه محوره برای شبیه‌سازی بی‌وزنی در سلول‌های گیاهی و جانوری اشاره کرد (۸ و ۶). در این مطالعه دستگاه کلینواست یک محوره برای شبیه‌سازی بی‌وزنی استفاده شد. نتایج ما نشان داد که ۳ روز قرار گرفتن در معرض شبیه‌سازی بی‌وزنی ایجاد شده توسط کلینواست، 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 (کلینواست 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 دپلمریزه 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 معمولاً ناشی از تفاوت در نوع دستگاه‌های شبیه‌ساز بی‌وزنی، رده‌های متفاوت سلولی

نتایج ما نشان داد که درصد سلول‌هایی که میزان مولکول‌های DNA آنها کمتر از 2N می‌باشد در شرایط شبیه‌سازی بی‌وزنی ۷/۶۵ درصد می‌باشد که نشان دهنده سلول‌های وارد شده به مرحله آپوتوز است. میزان آپوتوز در نمونه‌های کنترل نیز مشابه با نمونه‌های بی‌وزنی بود به طوری که در نمونه کنترل، میزان ۷/۸۱ درصد از سلول‌ها، مقدار DNA کمتر از 2N را نشان دادند (شکل ۴). بنابراین میزان سلول‌هایی که دچار آپوتوز شده بودند در شرایط شبیه‌سازی بی‌وزنی اختلاف معنی‌داری را نسبت به نمونه‌هایی که در جاذبه نرمال (۱ جی) کشت شده بودند نشان ندادند ( $P > 0.05$ ).

## 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 خصوصیات چربی است. 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 (۳۰ و 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

استفاده شده و مدت زمان قرارگیری در شرایط شبیه سازی بی وزنی بوده است. به این ترتیب که نتایج بعضی از مطالعات نشان داده اند که بی وزنی باعث انباشتگی سلولها در فاز خاصی از چرخه سلولی می شود در حالی که سایر مطالعات تغییر معنی داری را نشان نداده اند (۳۲ و ۳۱). برخی از مطالعات حاکی از این است که در شرایط بی وزنی سلولها در فاز G0/G1 تجمع می یابند در حالی که برخی دیگر تجمع سلولها را در فاز G2/M گزارش کرده اند. به عنوان مثال Lewis در سال ۲۰۰۲ در آزمایشی که بر روی رده سلولی MCF-7 انجام داد مشاهده کرد که شبیه سازی بی وزنی موجب تجمع این سلولها در فاز G2/M می شود (۲۰). بنابراین با توجه به اختلافات مشاهده شده، زمانی می توان نتایج را مقایسه کرد که دستگاه استفاده شده، رده سلولی و زمان مطالعه برابر باشد.

نتایج مطالعات قبلی در مورد میزان آپوپتوز در شرایط بی وزنی هم یکسان نبوده است. نتایج ما در مورد آپوپتوز نشان داد که ۳ روز بی وزنی شبیه سازی شده توسط کلینواست تک محوره، تاثیر معنی داری 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 فیروبلاست بعد از ۲۴ ساعت قرار گرفتن در معرض بی وزنی شبیه سازی شده توسط دستگاه کلینواست سه محوره، کاهش می یابد (۳۳). در مقابل آزمایش دیگری که توسط Lin و همکاران در سال ۲۰۱۶ و بر روی سلولهای بنیادی نوروئی موش صحرائی (Rat) انجام شد؛ نشان داد که شبیه سازی بی وزنی توسط دستگاه RCCS (rotatory cell culture system) موجب افزایش آپوپتوز می شود (۳۴). همچنین مطالعات Zhao و همکاران در سال ۲۰۱۶ نشان داد که شبیه سازی بی وزنی توسط کلینواست سه محوره موجب افزایش آپوپتوز در سلولهای رده میلوامای BL6-10 می شود (۳۵). بنابراین اختلاف مشاهده شده در هر دو مرحله (چرخه

سلولی و میزان آپوپتوز) می تواند ناشی از نوع رده سلولی و نوع دستگاه شبیه سازی بی وزنی باشد. بر اساس نتایج به دست آمده در مطالعه ما، اینطور به نظر می رسد که احتمالاً دستگاه کلینواست تک محوره در مقایسه با دستگاه کلینواست سه محوره، محیط ملایمتری را برای سلولها فراهم می کند. در کلینواست سه محوره به علت چرخش همزمان سلولها در سه محور، نیروهای تنشی و استرس وارد شده به سلولها بیشتر می باشد. این امر می تواند بر رشد سلولی و همچنین میزان مرگ و میر سلولی تاثیر گذارد. بنابراین میزان مرگ و میر و آپوپتوز در شرایط بی وزنی که توسط دستگاه کلینواست تک محوره ایجاد می شود بسیار کمتر و یا ناچیز می باشد. بنابراین ما پیشنهاد می کنیم که برای مطالعات سلولی و تمایز سلولی در شرایط بی وزنی کلینواست تک محوره مناسب تر می باشد به ویژه برای تمایز به رده های سلولی در مواردی که خود فرایند تمایز نیز منجر به مرگ و میر سلولها می شود. 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 در نتیجه کم بودن سلولهای شبه عصبی حاصل جهت انجام پیوند و سلول درمانی می باشد (۳۶). بنابراین جهت تمایز سلولها به سلولهای شبه عصبی در شرایط بی وزنی، کلینواست تک محوره توصیه می شود.

### نتیجه گیری

نتایج ما نشان دادند که سلولهای بنیادی مزانشیمی بعد از ۳ روز قرار گرفتن در معرض شبیه سازی بی وزنی از لحاظ چرخه سلولی و میزان آپوپتوز تغییر معنی داری در مقایسه با نمونه های کشت شده در شرایط جاذبه نرمال (۱ جی) نداشتند. بر اساس نتایج این مطالعه، به نظر می رسد که دستگاه کلینواست تک محوره در مقایسه با دستگاه کلینواست سه محوره، محیط ملایمتری را برای سلولها فراهم کرده و میزان مرگ و میر و آپوپتوز در این شرایط،

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.

بسیار کمتر از کلینواستت سه محوره می باشد. بنابراین پیشنهاد می شود که برای مطالعات سلولی و تمایز سلولی در شرایط بی وزنی، کلینواستت تک محوره مناسب تر می باشد.

### تشکر و قدردانی

این مقاله براساس بخشی از نتایج حاصل از پایان نامه دانشجوی دکتری ژنتیک با عنوان مطالعه اثر بی وزنی بر

### 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

- 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, Debusse 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.

32. Coinu R, Chiaviello A, Galleri G, Franconi F, Crescenzi E, Palumbo G. Exposure to model microgravity induces metabolic idleness in malignanthuman MCF-7 and 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- B-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.