

بررسی اثر Chir99021 بر تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی جدا شده از مغز استخوان جنین گوسفند

لیلا سلطانی^{۱*}، حمیدرضا رحمانی^۱، مرتضی دلیری جوپاری^۲، حوری قانعی الوار^۳، امیرحسین مهدوی^۴
^۱Ph.D.، مهدی شمس‌آرا^۲، ناصر امیری‌زاده^۳،
^۴Ph.D.

- ۱- دانشگاه صنعتی اصفهان، دانشکده کشاورزی، گروه علوم دامی، اصفهان، ایران
 - ۲- پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، پژوهشکده زیست‌فناوری کشاورزی، گروه دام و آبزیان
 - ۳- دانشگاه تربیت مدرس تهران دانشکده علوم پزشکی، تهران، ایران
 - ۴- موسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون، مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران
- * پست الکترونیک نویسنده مسئول: Leilasoltani7@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۱۲/۱۸

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۸/۱۶

چکیده

هدف: هدف از مطالعه‌ی حاضر بررسی اثر غلظت‌های متفاوت Chir99021 بر تکثیر آزمایشگاهی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان (Bone-Marrow Mesenchymal Stem Cells; BM-MSCs) جنین گوسفند است.

مواد و روش‌ها: MSCs از مغز استخوان جنین گوسفند جداسازی و کشت داده شد. پتانسیل تمایز این سلول‌ها به سلول‌های استخوان و چربی، در پاساژ سوم بررسی شد. در این مطالعه، BM-MSCs جنین گوسفند با غلظت‌های متفاوت ۰، ۰/۵، ۱، ۱/۵، ۳، ۵ میکرومولار Chir99021 کشت داده شدند. در طول دوره‌ی کشت، سلول‌ها از نظر تعداد کلونی، دوبرابر شدن جمعیت سلولی و زمان دو برابر شدن، زنده‌مانی سلولی مورد بررسی قرار گرفتند، علاوه بر این، بیان ژن بتا-کاتنین مورد ارزیابی قرار گرفت. کشت بدون Chir99021 به‌عنوان گروه شاهد در نظر گرفته شد.

نتایج: یافته‌های ما نشان داد که افزودن غلظت‌های ۰/۵ و ۱ میکرومولار Chir99021 به محیط کشت در مقایسه با دوزهای ۵ میکرومولار Chir99021 و گروه شاهد به‌صورت معنی‌داری تکثیر را افزایش داده بودند ($p < 0/05$). علاوه‌براین، پنج روز بعد از تیمار با این ریز مولکول، نتایج نشان داد که تیمارهای ۰/۵ و ۱ تعداد کلونی بیشتری در مقایسه با تیمارهای کنترل و ۵ میکرومولار Chir99021 تشکیل داده‌اند. بیان بتا-کاتنین در گروه مکمل شده با ۱ میکرومولار در مقایسه با گروه‌های دریافت‌کننده‌ی غلظت‌های ۰/۵ و ۱/۵ به‌صورت معنی‌داری بالاتر بود ($p < 0/05$).

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد، به‌کارگیری غلظت ۱ میکرومولار Chir99021 سبب افزایش تکثیر آزمایشگاهی BM-MSCهای جنین گوسفند شده است اما به‌کارگیری غلظت‌های بالای این ترکیب اثرات سمی بر تکثیر این سلول‌ها دارد.

واژگان کلیدی: سلول‌های بنیادی مزانشیمی، جنین گوسفند، تکثیر، Chir99021

مقدمه

در طب ترمیمی سلول‌های بنیادی مزانشیمی (Mesenchymal Stem Cells; MSCs) با استناد به توانایی تمایز چند دودمانی و خود تجدیدی، امید به زندگی را افزایش داده‌اند (۱). در دهه‌های گذشته، MSCs از بندناف، خون بند ناف، مغز استخوان، بافت چربی و سایر بافت‌ها استحصال شده‌اند (۲). استفاده از MSCs نسبت به سلول‌های بنیادی رویانی (Embryonic Stem Cells; ESCs) مزایایی دارد که این مزایا شامل: مشکلات اخلاقی در پی ندارند به این علت که استخراج ESCsها معمولا از اپی‌بلاست رویان پیش از لانه‌گزینی صورت می‌گیرد که در نهایت سبب مرگ رویان می‌شود. همچنین سبب تشکیل تراوما نمی‌شوند. MSCs برای نسل‌های متوالی در آزمایشگاه تکثیر می‌شوند مورفولوژی و محتوای کروموزومی آن‌ها بدون تغییر باقی می‌ماند. MSCها برخی از مارکرهای سطحی مانند: CD44, CD90, CD73, CD166, CD105, CD25 را بیان می‌نمایند و برخی از مارکرهای سطحی از جمله: CD45, CD34, CD11b, CD79a را بیان نمی‌کنند (۳ و ۴). از ویژگی‌های دیگر این سلول‌ها، قابلیت تمایز به سلول‌های استخوان، چربی، تاندون، غضروف و ماهیچه است (۵) این سلول‌ها زمانی که پیوند می‌یابند قادر به تحریک سیستم ایمنی میزبان نمی‌باشند زیرا که در سطح خود HLA-II را بیان نمی‌کنند. طب ترمیمی بر مبنای سلول‌های بنیادی نیاز به تعداد فراوان سلول زنده دارد. برای رسیدن به این هدف، استراتژی‌های متفاوتی دنبال می‌شود: سرم گوساله‌ی جنینی (Fetal Bovine Serum; FBS) در جهت افزایش تکثیر MSCs استفاده شده است (۶). سرم در صورتی می‌تواند منبع مفیدی برای تکثیر MSCs باشد که از خود فرد استحصال شود. از طرفی ترکیبات سرم از یک منبع به منبع دیگر متفاوت است و احتمال انتقال برخی آلودگی‌های پاتولوژیکی وجود دارد که ممکن است در مطالعات کلینیکی مشکل‌ساز شود (۷). راهکار دیگر، جهت افزایش تکثیر MSCs در شرایط آزمایشگاهی به‌کارگیری سیتوکین‌ها و فاکتورهای رشد است. برای مثال، افزودن فاکتور رشد مشتق از پلاکت (Platelet-derived growth factor; PDGF) محرک افزایش تکثیر MSCهای انسانی با فعال‌سازی مسیر هدایتی (c-Jun N-terminal kinases; JNK) است (۸). فاکتور رشد تغییر دهنده-بتا (Transforming growth factor beta 1; TGF-1) به‌سرعت سبب انتقال بتا-کاتنین به هسته، به‌روش وابسته به-Smad3؛ و تحریک تکثیر MSCهای انسانی می‌شود (۹). فاکتور رشد فیبروبلاستی (Fibroblast growth factor; FGF2) نیز، سبب افزایش تکثیر و گسترش MSCهای انسانی شده است (۱۰ و ۱۱) استفاده از سیتوکین‌ها و

فاکتورهای رشد، دارای مشکلاتی از قبیل نیمه عمر پایین و قیمت بالایی می‌باشند که افزودن آن‌ها به محیط کشت MSCs، اگرچه محرک افزایش تکثیر سلولی است ولی به‌دلایل ذکر شده سبب صرف هزینه کشت بالا می‌شود. ریز مولکول‌ها ترکیبات سینتتیک، با وزن مولکولی کمتر از ۹۰۰ دالتون هستند که به‌راحتی از غشای سلول عبور می‌کنند و به جایگاه عمل داخل سلولی خود می‌رسند. این ترکیبات در سلول اغلب آنزیم‌ها و گیرنده‌ها را فعال یا مهار می‌کنند. مزایای به‌کارگیری ریز مولکول‌ها عبارتند از: نخست، اثرات بیولوژیکی ریز مولکول‌ها معمولا سریع، قابل برگشت و وابسته به دوز است، با غلظت‌های مناسب ریز مولکول‌ها به تنظیم فعالیت‌های سلولی کمک می‌شود. دوم، تنوع ساختاری که با سنتز شیمیایی تامین می‌شود، عملکرد بهینه‌ی ریز مولکول‌ها را فراهم می‌آورد. سوم، در مقایسه با دستکاری‌های ژنتیکی، ریز مولکول‌ها به آسانی در شرایط آزمایشگاهی و درون تنی استفاده می‌شوند و پیشرفت درمانی را عملی‌تر می‌کنند (۱۲).

مدل‌های حیوانی بزرگ برای مطالعه‌ی آسیب‌شناسی انسانی نسبت به مدل‌های حیوانی کوچک مانند موش بهتر هستند زیرا که حیوانات اهلی مانند گوسفند از نظر ایمنولوژیکی و فیزیولوژیکی به انسان شبیه‌تر هستند (۱۳). ریزمولکول 3-[[4-(2,4-Dichlorophenyl)-5-(5-methyl-1H-imidazol-2-yl)-2-pyrimidinyl]amino] ethyl amino] pyridinecarbonitrile; Chir99021 قوی‌ترین مهارکننده گلیکوژن سینتاز کیناز ۳ بتا ۳ (Glycogen synthase kinase 3 beta; GSK3-3beta) است. استفاده از ریز مولکول Chir99021 در ESCs خودتجدیدی و تکثیر را به‌میزان بالایی افزایش داده است و سبب افزایش برنامه‌ریزی مجدد سلول‌های سوماتیک به‌سمت عقب یعنی سلول‌های پیش‌ساز شده است (۱۴). تاکنون مطالعات اندکی بر روی نقش این ریز مولکول بر تکثیر و زنده‌مانی MSCs، خصوصا در مدل‌های حیوانی بزرگ، مانند گوسفند صورت گرفته است. هدف از این مطالعه بررسی اثر افزودن غلظت‌های متفاوت Chir99021 به‌عنوان قوی‌ترین مهارکننده‌ی GSK-3beta بر تکثیر و زنده‌مانی MSCهای مستخرج از مغز استخوان جنین گوسفند است.

مواد و روش‌ها

تمام مواد شیمیایی به جز مواردی که اشاره شده است از شرکت سیگما خریداری شد. مطالعه‌ی حاضر حاصل کار پژوهشی است که در آزمایشگاه دام و آبزیان، پژوهشکده‌ی زیست فناوری کشاورزی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری انجام گرفت. جنین‌های گوسفند ۳۵ روزه از کشتارگاه راک کرج به آزمایشگاه، در محلول نمکی فسفات با خاصیت بافری

میلی لیتر ایندومتاسین تشکیل شده بود تعویض شد. کشت در محیط تمایز به چربی برای مدت ۲۱ روز ادامه یافت و محیط سلول‌ها، ۳ روز یکبار عوض شد بعد از اتمام دوره‌ی تمایز، سلول‌ها با پارافرم‌آلدئید ۴ درصد فیکس شدند و سپس با رنگ اوایل رد ۳ درصد برای مدت ۱۰ تا ۱۵ دقیقه انکوباسیون صورت گرفت و در نهایت بعد از شستشو با DPBS قطرات چربی در زیر میکروسکوپ مشاهده و عکس‌برداری انجام شد.

برای بررسی تمایز به استخوان، MSC‌های پاساژ سوم در دانسیته‌ی سلولی 10^4 سلول در پلیت‌های چهار چاهکی کشت شدند و پس از رسیدن به تراکم سلولی 70 تا 80 درصد محیط کشت، با محیط تمایز به استخوان تعویض شد این محیط شامل: DMEM مکمل شده با FBS، 50 میکروگرم در میلی‌لیتر آسکوربیک اسید- 2 فسفات، 10 نانو مولار دگزامتازون و 10 میلی‌مولار بتا-گلیسرول فسفات بود. سلول‌ها در محیط تمایزی استخوان برای مدت ۲۱ روز کشت شدند که این محیط هر ۳ روز یکبار تعویض شد. در انتهای دوره‌ی کشت سلول‌ها با پارافرم‌آلدئید ۴ درصد فیکس شدند و رنگ آلیزارین رد ۲ درصد برای مدت ۵ دقیقه به سلول‌ها اضافه شد بعد از دو مرتبه شستشو با DPBS ماتریکس مینراله شده در زیر میکروسکوپ مشاهده شد و عکس‌برداری انجام گرفت.

بررسی میزان زنده‌مانی MSC‌های جداسازی شده از مغز

استخوان جنین گوسفند تیمار شده با Chir99021 با روش (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide; MTT) جهت ارزیابی MTT در ابتدا لازم است که یک منحنی استاندارد رسم شود. برای رسم منحنی استاندارد (با رسم منحنی استاندارد، معادله‌ی به‌دست می‌آید که تعداد سلول‌های زنده را در گروه‌های تیماری می‌توان محاسبه کرد) در یک پلیت ۹۶ چاهکی سلول‌های پاساژ سوم شمارش و کشت شدند لازم است که MSCs در دانسیته‌ی سلولی 10000 ، 20000 ، 30000 ، 40000 و 50000 هر کدام در سه تکرار کشت شوند و در همان روز در پلیت ۹۶ چاهکی، برای ارزیابی تاثیر دوزهای متفاوت Chir99021 بر تکثیر و زنده‌مانی MSCs، (برای هر دوز سه تکرار)، در هر چاهک 10000 MSC برای مدت ۲۴ ساعت کشت شدند و در روز بعد محیط رویی سلول‌های کشت شده در پلیت مربوط به منحنی استاندارد و گروه‌های تیماری دور ریخته شد و با DPBS شسته شدند و سپس به هر چاهک 100 میکرولیتر محلول MTT زرد (5 میلی‌گرم MTT حل شده در

(Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline; DPBS) حاوی آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین و استرپتومایسین روی یخ انتقال داده شد.

کشت MSC‌های جداسازی شده از مغز استخوان جنین

گوسفند: مغز استخوان، از استخوان‌های ران و درشت‌نی پس از اطمینان، از سوراخ بودن دو سر استخوان، با استفاده از محیط (Dulbecco's Modified Eagle Medium/ F-12 Ham; DMEM:F12) به نسبت $3:1$ که با 10 درصد FBS همراه با 100 واحد بین‌المللی در میلی‌لیتر پنی‌سیلین و 100 میکروگرم در میلی‌لیتر استرپتومایسین مکمل شده بود استحصال شد پس از عبور مایع آسپیره شده از فیلتر 70 میکرومتری، سلول‌های تک هسته‌ای با گرادیانته فایکول (در 4000 rpm، به مدت 30 دقیقه و درجه حرارت 4 درجه سانتی‌گراد) جداسازی شدند. بعد از جداسازی لایه‌ی ابری، دو مرتبه شستشو در DPBS (3000 rpm برای مدت 10 دقیقه و درجه حرارت 4 درجه سانتی‌گراد) انجام گرفت و سپس این سلول‌ها در محیط DMEM:F12 با نسبت $3:1$ مکمل شده با FBS، ال-گلوتامین، آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین و استرپتومایسین، در فلاسک‌های T25 کشت داده شدند. سپس فلاسک‌ها در انکوباتور 37 درجه سانتی‌گراد، با شرایط 5 درصد دی‌اکسیدکربن و هوای اتمسفری مرطوب قرار گرفتند. MSCs که به کف فلاسک چسبیده بودند مورفولوژی شبیه به سلول‌های فیبروبلاستی از خود نشان می‌دهند. بعد از گذشت 48 ساعت محیط رویی این سلول‌ها تعویض شد و پس از رسیدن به تراکم سلولی 80 درصد ($4-5$ روز بعد از کشت اولیه) با تریپسین $0/25$ درصد همراه با یک میلی‌مولار EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid; از کف فلاسک جداسازی شدند و در فلاسک T75 کشت شدند به این مرحله از کشت، پاساژ اول گفته می‌شود. تیمارها در پاساژ سوم اعمال شد. **تمایز MSCs به چربی و استخوان:** یکی از راه‌های تایید بنیادی بودن سلول‌های جداسازی شده از مغز استخوان، بررسی پتانسیل تمایزی آن‌ها به رده‌های مزودرمی، مانند: استخوان و چربی است. برای بررسی تمایز به چربی، MSC‌های پاساژ سوم در دانسیته‌ی سلولی 10^4 سلول در پلیت‌های چهار چاهکی کشت شدند و زمانی که به تراکم سلولی 70 تا 80 درصد رسیدند محیط کشت با محیط تمایز به چربی که از محیط DMEM مکمل شده با FBS، 50 میکروگرم در میلی‌لیتر آسکوربیک اسید- 2 فسفات، 100 نانومولار دگزامتازون و 50 میکروگرم در

شدند. بعد از اتمام دوره‌ی کشت سلول‌ها تریپسینه شدند و با استفاده از لام نفوبار شمارش سلولی انجام گرفت.
 $DT \text{ (Doubling Time)} = \text{Culture Duration} / \text{Population Doubling Number}$
 به منظور محاسبه‌ی PDN، رابطه‌ی PDN (Population Doubling Number) = $\log N/N_0 * 3.31$ به کار گرفته شد. در این رابطه N و N₀ به ترتیب تعداد سلول‌های آنها و آغاز دوره‌ی کشت بودند.

استخراج RNA و Real-time qRT-PCR استخراج RNA با معرف AccuZol (Bioneer) از MSC‌های مغز استخوان جنین گوسفند القا شده و القا نشده انجام گرفت. سپس RNA استخراج شده با DNAase (به منظور حذف آلودگی با DNA ژنومی) تیمار شد. سنتز cDNA با کیت سنتز cDNA (Fermentas) بر طبق دستورالعمل کارخانه انجام گرفت. بیان ژن بتا-کاتنین در مسیر فعال (wingless-type; Wnt) با تکنیک Real-time qRT-PCR و با استفاده از کیت Real-time qRT-PCR (Fermentas) مورد ارزیابی قرار گرفت. سطح نسخه‌برداری بر طبق سطح بیان ژن خانه‌دار GAPDH استاندارد شد. پرایمرهای forward و reverse برای Real-time qRT-PCR با نرم‌افزار Oligo6 طراحی شدند (جدول ۱). پروفیل‌های دمایی برای Real-time qRT-PCR عبارت بود از: دناتوراسیون اولیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه، ۴۰ سیکل شامل ۲۰ ثانیه دناتوراسیون در ۹۵ درجه سانتی‌گراد، سپس ۳۰ ثانیه دمای گداخت ۵۸/۲ درجه سانتی‌گراد و به دنبال آن ۲۰ ثانیه طولی سازی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد، بود. همه‌ی واکنش‌ها در سه تکرار انجام گرفت و نتایج با روش 2^{-CT} آنالیز شد.

یک میلی‌لیتر (DPBS) اضافه گردید و برای دوره‌ی ۴ ساعته در انکوباتور، انکوبه شدند. بعد از اتمام دوره‌ی انکوباسیون و مشاهده‌ی کریستال‌های فورمازان بنفش رنگ با میکروسکوپ، محلول MTT به آرامی خارج شد و سپس به چاهک ۱۰۰ میکرولیتر محلول DMSO اضافه شد و خوب پیتاژ گشت. از محلول DMSO به عنوان Blank استفاده شد و در نهایت در دستگاه الیزا ریدر با نسبت طول موجی ۵۴۰ تا ۶۳۰ خوانش انجام گرفت.

سنجش واحد کلونی فیبروبلاستی (Colony Forming Unit-Fibroblast; CFU-F)

جهت بررسی تحریک تشکیل CFU-F مغز استخوان، MSC‌های پاساژ سوم با دوزهای متفاوت Chir99021 تیمار شدند. بعد از اتمام دوره‌ی ۵ روزه، محیط رویی سلول‌ها برداشته شد. سلول‌ها دو مرتبه با DPBS شسته شدند و سپس با فرمالین ۱۰ درصد به مدت ۵ دقیقه سلول‌ها فیکس شدند بعد از اتمام دوره‌ی فیکساسیون، فرمالین حذف شد و سلول‌ها با DPBS شستشو شدند و سپس سلول‌ها با رنگ کریستال ویولت ۰/۰۵ درصد برای مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شدند در اتمام دوره انکوباسیون با رنگ، سلول‌ها چندین مرتبه با آب مقطر استریل شسته شدند و مایع رویی حذف شد. پس از خشک شدن پلیت‌ها، عکس برداری و شمارش کلونی‌ها با استفاده از میکروسکوپ فاز معکوس انجام گرفت.

زمان دو برابر شدن MSC‌های تیمار شده با دوزهای مناسب Chir99021: برای بررسی اثر Chir99021 بر توان تکثیر MSCs، سلول‌های پاساژ سوم با دانسیته‌ی ۵۰۰۰ سلول در پلیت‌های ۶ سانتی‌متری مکمل شده با دوزهای صفر، ۰/۵، ۱ و ۱/۵ میکرومولار Chir99021 برای مدت ۵ روز کشت داده

جدول ۱: پرایمرهای Forward و Reverse طراحی شده همراه با طول محصول PCR و دمای گداخت.

نام پرایمر	توالی‌ها	دمای گداخت C°	طول محصول PCR
بتا-کاتنین	For: CAAGGCTACTGTTGGGTTGATTCCG Rev: GACGCTGGGTATCCTGATGTGC	۵۸/۲	۱۲۸
GAPDH یا ژن خانه دار	For: ATCGTGGAGGGACTTATGACC Rev: CGCCAGTAGAAGCAGGGATG	۵۸/۲	۱۳۰

انجام گرفت. داده‌ها بر مبنای میانگین \pm انحراف استاندارد نشان داده شدند. سطح معنی‌داری در $p < 0/05$ بررسی گشت.

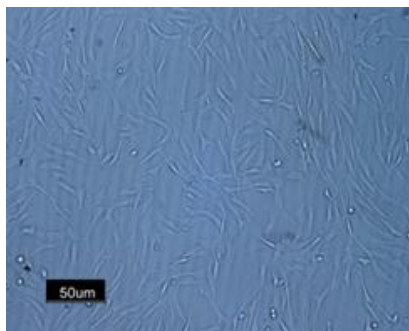
آنالیز آماری

داده‌های به دست آمده به وسیله‌ی نرم افزار SPSS با به کارگیری تست ANOVA آنالیز شدند و مقایسه میانگین به روش دانکن

نتایج

نچسبیده بودند در پایان ۴۸ ساعت انکوباسیون با تعویض محیط حذف شدند. اکثر سلول‌ها کلونی‌های شبه فیبروبلاستی در زیر میکروسکوپ از خود نشان می‌دهند (شکل ۱).

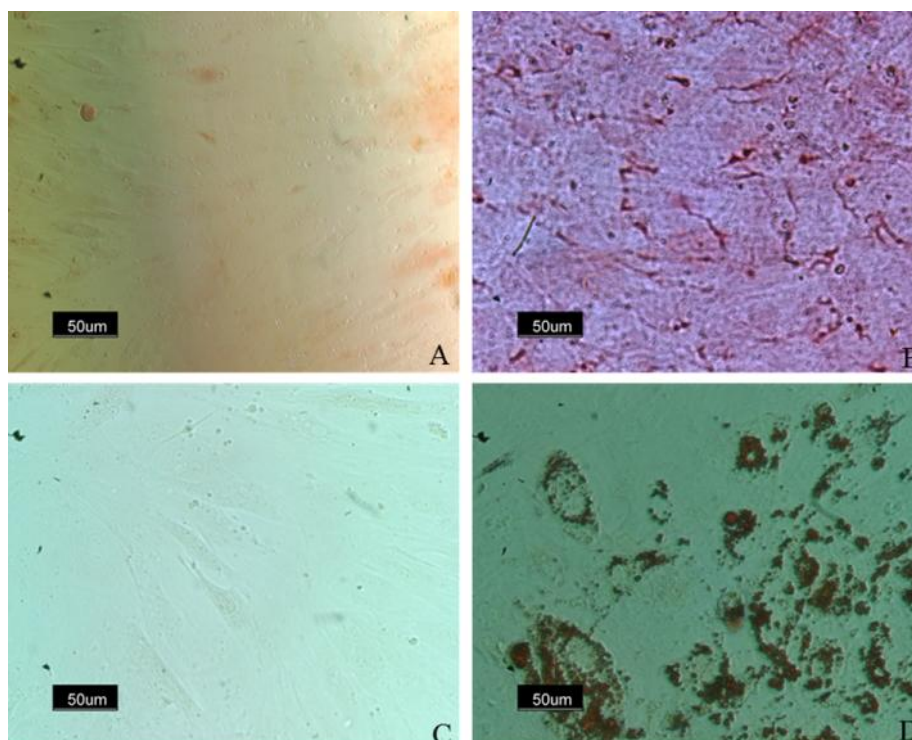
بعد از ۲۴ ساعت از کشت اولیه، MSC‌های جداسازی شده از مغز استخوان جنین گوسفند، به صورت جمعیت‌های کوچک تک سلولی به کف فلاسک می‌چسبند. سلول‌هایی که به کف فلاسک



شکل ۱: MSC‌های مغز استخوان جنین گوسفند پاساژ دوم (بزرگ‌نمایی $\times 200$).

رنگ آمیزی اوایل رد، MSC‌هایی که در معرض محیط تمایز به چربی برای دوره‌ی ۲۱ روزه قرار گرفته بودند و اکوتل‌های چربی قابل رویت بود (شکل ۲: C و D).

رنگ آمیزی آلیزارین رد برای MSC‌هایی که در معرض محیط تمایز استخوان برای مدت ۲۱ روز قرار گرفته بودند وجود رسوبات کلسیم را نشان داد (شکل ۲: A و B)، همچنان‌که



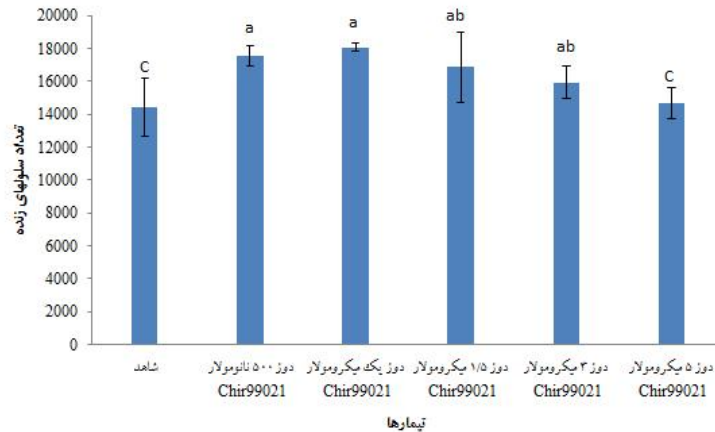
شکل ۲: A: سلول‌های نرمال رنگ آمیزی شده با آلیزارین رد، B: تمایز به استخوان MSCs بعد از ۲۱ روز، C: سلول‌های نرمال رنگ آمیزی شدن با اوایل رد، D: تمایز به چربی MSCs بعد از ۲۱ روز (بزرگ‌نمایی $\times 200$).

Chir99021 به روش MTT، میزان تکثیر MSC‌های گروه‌های

بررسی میزان تکثیر MSC‌های مواجه شده با دوزهای متفاوت

میکرومولار Chir99021 بر میزان تکثیر، با دوزهای ۰/۵ و ۱ میکرومولار اختلاف معنی‌داری نشان ندادند. هر چند که، از نظر عددی میزان تکثیر کمتری ارائه دادند (نمودار ۱).

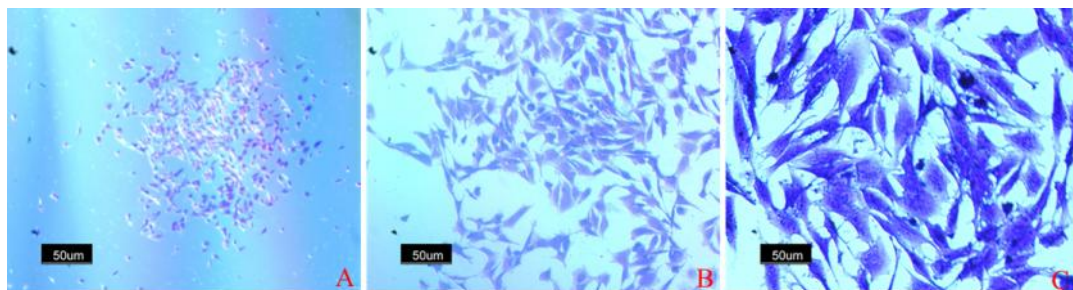
تیمار شده با ۰/۵، ۱ میکرومولار Chir99021، در مقایسه با گروه‌های ۵ میکرومولار Chir99021 و شاهد افزایش معنی‌داری داشتند ($p < 0/05$). از طرفی، حضور دوزهای ۱/۵ و ۳



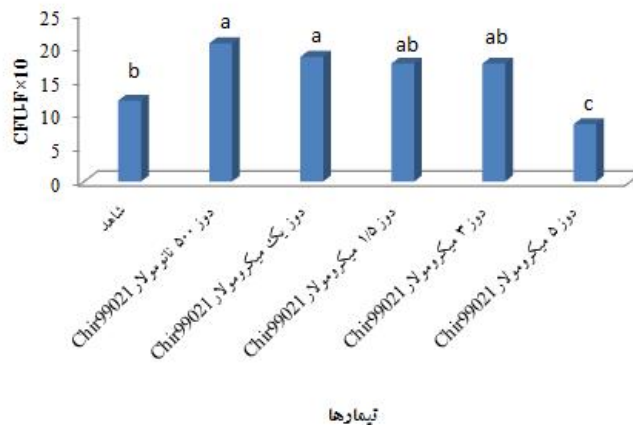
نمودار ۱: مقایسه تعداد MSCs زنده در کشت تداخلي، تیمار شده با دوزهای متفاوت Chir99021

میکرومولار شده بود ($p < 0/05$). این در حالی است که دوزهای ۱/۵ و ۳ از نظر عددی پایین‌تر بودند اما از نظر آماری معنی‌دار نبودند (شکل ۳، نمودار ۲) دوز ۵ میکرومولار از نظر آماری کمتر از شاهد بود ($p < 0/05$).

ارزیابی تاثیر دوزهای متفاوت Chir99021 بر میزان تشکیل MSC، CFU-F، پاساژ سوم مشخص کرد که افزودن دوزهای ۰/۵ و ۱ به محیط کشت سبب افزایش معنی‌داری در میزان تشکیل CFU-F در مقایسه با گروه‌های شاهد و دوز ۵



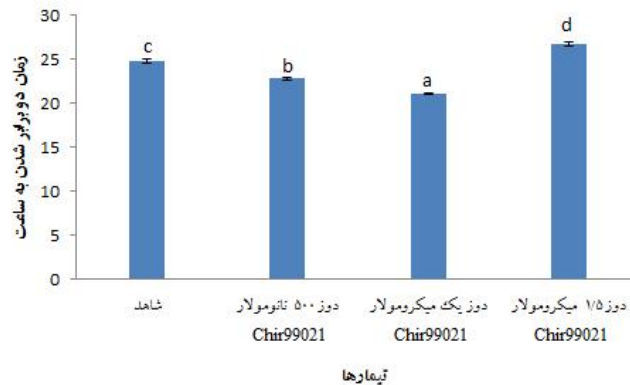
شکل ۳: اثر دوزهای متفاوت Chir99021 بر میزان تشکیل CFU-F (A) بزرگ‌نمایی ۱۰۰×، B: بزرگ‌نمایی ۲۰۰×، C: بزرگ‌نمایی ۴۰۰×.



نمودار ۲: اثر دوزهای متفاوت Chir99021 بر میزان تشکیل CFU-F، MSCs

شدند. در اتمام دوره سلول‌ها تریپسینه شدند و شمارش سلولی انجام گرفت همانطور که مشاهده می‌شود زمان دو برابر شدن در گروه تیماری ۱ میکرومولار به صورت معنی‌داری نسبت به گروه‌های شاهد، ۰/۵ و ۱،۵ کمتر بود (نمودار ۳، $p < 0/05$).

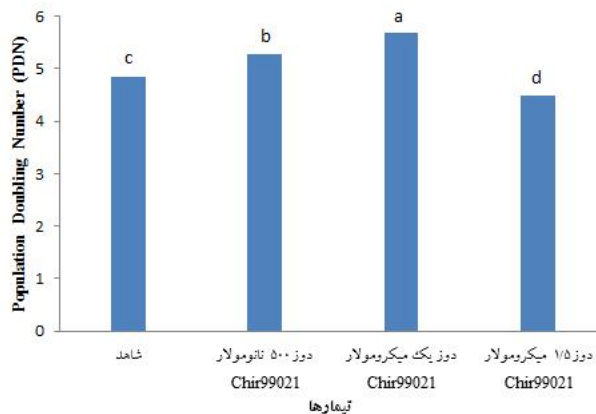
در این مطالعه، اثر افزودن Chir99021 بر زمان دو برابر شدن جمعیت MSCs مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور MSC های پاساژ سوم به میزان ۵۰۰۰ سلول در پلیت‌های کشت حاوی دوزهای متفاوت Chir99021 برای مدت ۱۲۰ ساعت کشت داده



نمودار ۳: اثر دوزهای متفاوت Chir99021 بر زمان دو برابر شدن MSCs.

(نمودار ۴).

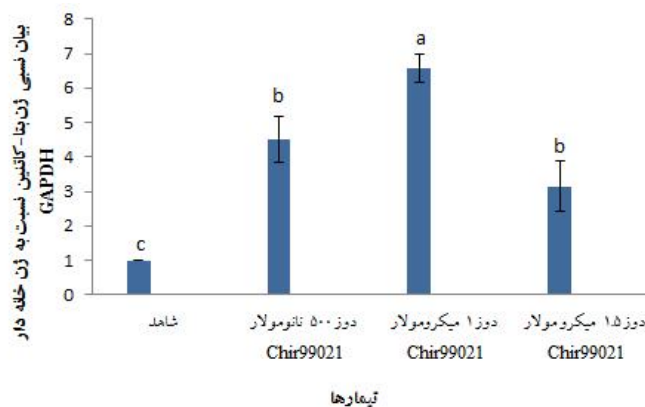
همچنین بیشترین PDN مربوط به دوز ۱ میکرومولار بود و نسبت به بقیه گروه‌های تیماری اختلاف معنی‌دار نشان داد



نمودار ۴: اثر دوزهای متفاوت Chir99021 بر PDN، MSCs.

Chir99021 دریافت کرده بود افزایش یافته بود که در مقایسه با گروه‌های شاهد، ۰/۵ و ۱/۵ میکرومولار اختلاف معنی‌داری نشان می‌دهد ($p < 0/05$).

بررسی بیان ژن بتا-کاتنین با استفاده از تکنیک Real-time qRT-PCR، (ژنی که در مسیر هدایتی Wnt فعال، فعال است و با مهار GSK-3 beta در پی افزودن Chir99021، این ژن و مسیر هدایتی Wnt فعال می‌شوند) نشان داد (نمودار ۵) که سطح بیان ژن بتا-کاتنین در تیماری که دوز ۱ میکرومولار



نمودار ۵: آنالیز Real-time بیان ژن بتا-کاتنین در مسیر تیمار شده با دوزهای متفاوت

بیان نسبی ژن بتا-کاتنین نسبت به ژن خانه دار GAPDH

بحث

تشکیل CFU-F نشان داد که دوزهای ۰/۵ و ۱ میکرومولار سبب تشکیل بیشترین میزان CFU-F در مقایسه با سایر گروه‌ها شده‌اند. افزودن دوز ۱ میکرومولار Chir99021 سبب کاهش زمان دو برابر شدن و افزایش تکثیر در مقایسه با سایر دوزها شده است. مقایسه بیان کمی ژن بتا-کاتنین در سه دوز Chir99021 یعنی ۰/۵، ۱ و ۱/۵ میکرومولار با گروه شاهد نشان داد که میزان بیان ژن بتا-کاتنین در تیمار ۱ میکرومولار با سایر گروه‌ها اختلاف معنی‌دار دارد. دوزهای ۳ و ۵ میکرومولار Chir99021 به دلیل سمیتی که در تمایز چربی و استخوان نشان دادند، نقش آن‌ها بر بیان ژن بتا-کاتنین، PDN و DT مورد بررسی قرار نگرفت (اطلاعات ارائه نشده است). پروتئین فعال GSK-3 beta، از فعالیت چرخه‌ی Wnt جلوگیری می‌کند، تصور می‌شود که این چرخه، در حالت فعال، در حفظ پلوری پوتنتی دخالت دارد. آنزیم GSK-3 beta سطح و فعالیت تعدادی از پروتئین‌ها را تنظیم می‌کند و یکی از اهداف این آنزیم، مولکول بتا-کاتنین است، در واقع بتا-کاتنین کوفاکتور نسخه‌برداری برای ژن‌های هدف چرخه‌ی هدایتی Wnt است (۱۹). ژن‌های وابسته به Wnt در تنظیم تکثیر شامل: c-*e2f1*, *myc*, *cyclinD1* (مارکرهای مزودرمی T/Brachury, *Pitx2*) و انتقال از اپی-تلیال به مزودرم (Epithelial-mesenchymal transition) شامل: (*Slug*, *Snail*, *vimentin*) هستند و در طول نمو و در بافت‌های بالغ عمل می‌کنند (۲۰، ۲۱، ۲۲، ۲۳). مهار GSK-3 beta سبب پلوری پوتنتی و برنامه‌ریزی مجدد سلول‌های سوماتیک در جهت ایجاد سلول‌های شبه ESCs یا سلول‌های بنیادی القایی (Induced Pluripotent Stem Cells; iPSCs)

از بافت مغز استخوان جنین گوسفند استحصال شدند و در شرایط آزمایشگاهی در راستای اثبات بنیادی بودن این سلول‌ها، به سلول‌های چربی و استخوان تمایز داده شدند. این سلول‌ها در سلول درمانی و برای آزمایش‌های پیش‌کلینیکی و کلینیکی مورد استفاده قرار می‌گیرند. میزان این سلول‌ها در مغز استخوان بسیار اندک است و تنها حدود ۰/۰۰۱ و ۰/۰۱ درصد سلول‌های هسته‌دار جداسازی شده با فایکول را شامل می‌شوند. میزان تکثیر MSCs با افزایش پاساژ کاهش پیدا می‌کند. از پاساژ ششم، به تدریج میزان تکثیر MSCs کاهش می‌یابد (۱۵). خود MSCs تحت تاثیر اثرات پیری و بیماری قرار می‌گیرند و ممکن است که تکثیر، تمایز، توانایی پیوند و اثرات سرکوب‌کنندگی ایمنی در آن‌ها کاهش پیدا کند (۱۶ و ۱۷). در سلول درمانی ممکن است به تعداد بالایی سلول نیاز باشد با توجه به نرخ خیلی پایین بقا و زنده‌مانی سلول‌ها، ممکن است برای حصول حداکثر نتایج مثبت پیش‌کلینیکی و کلینیکی به تعداد بالای سلول نیاز باشد (۱۸).

در این مطالعه، اثر افزودن دوزهای متفاوت Chir99021 به عنوان قوی‌ترین مهارکننده‌ی GSK-3 beta، بر روی میزان تکثیر و زنده‌مانی MSCs، قابلیت تشکیل CFU-F، PDN و میزان بیان ژن بتا-کاتنین در مسیر فعال Wnt مورد بررسی قرار گرفت. در ارزیابی MTT، دوزهای ۰/۵ و ۱ میکرومولار Chir99021 بیشترین میزان تکثیر و زنده‌مانی را از خود نشان دادند. افزودن دوزهای متفاوت ریزمولکول Chir99021 بر میزان

کردند، BIO در دوزهای ۰/۱ تا ۱ و بقیه ترکیبات در دوزهای ۱ تا ۱۰ میکرومولار اضافه شدند. اثرات سمی مهارکننده‌های GSK-3beta برای همه‌ی ترکیبات مشاهده شده بود. در رده‌ی سلولی ES-D3 زنده مانی با افزودن دوزهای بالاتر از ۰/۱ BIO کاهش یافته بود. در گروه‌های که با SB-216763 و Chir99021 تیمار شده بودند نیز دوزهای بالاتر از ۱ میکرومولار سبب کاهش تعداد سلول‌های زنده شده بود. در همین سویه تمامی دوزهای Chir-98014 سبب کاهش تکثیر و زنده‌مانی شده بودند. همه‌ی دوزهای مهارکننده‌های مختلف استفاده شده در مورد سویه‌ی ES-CCE سمیت نشان دادند. در آن مطالعه افزودن SB-216763 و Chir99021 کمترین سمیت را بر زنده‌مانی هر دو لاین نشان داده بودند (۲۹). در مطالعه‌ی حاضر نیز برخلاف مطالعه‌ی ناجاک و همکاران، زمانی که دوزهای ۰/۵ و ۱ میکرومولار استفاده شده بود بیشترین میزان زنده‌مانی مشاهده شد. این درحالی که است که تنها زمانی که دوز ۵ میکرومولار استفاده شد روند کاهشی تکثیر مشابه با شاهد بود به نظر می‌رسد که دوزهای بالاتر از ۵ میکرومولار ممکن است سبب کاهش میزان زنده‌مانی و تکثیر MSC‌های مستخرج از مغز استخوان جنین گوسفند شوند. همان‌طور که در بالا ذکر شد در مطالعه‌ی ناجاک و همکاران در سویه‌ی ES-D3 دوزهای بالاتر از ۱ میکرومولار Chir99021 سمیت نشان داده بود و در سویه‌ی ES-CCE تمامی دوزهای استفاده شده حتی دوز ۱ میکرومولار سبب کاهش تکثیر و زنده‌مانی شده بودند. البته باید به این نکته اشاره شود که در مقایسه با مطالعه‌ی ناجاک و همکاران، گذشته از گونه حیوانی متفاوت، آنها از ESCs و ما از MSCs استفاده نمودیم ممکن است پاسخ سلول‌های بنیادی متفاوت به ریز مولکول‌های یکسان در شرایط آزمایشگاهی متفاوت باشد. در مطالعه‌ی چن و همکاران (۳۰)، افزودن ریز مولکول BIO، به محیط کشت فیبروبلاست‌های رویانی موش، سبب افزایش تکثیر شده بود. در آن مطالعه ارتباط چرخه‌ی بتا-کاتنین و چرخه‌ی سیگنال دهنده Notch و تاثیر این دو بر تکثیر آن سلول‌ها به اثبات رسیده است. همان‌طور که اشاره شد استفاده از BIO به‌عنوان مهارکننده‌ی GSK-3 beta در نهایت منجر به افزایش سیتوپلاسمی و ورود بتا-کاتنین به‌داخل هسته سلول می‌شود و بتا-کاتنین سبب بیان شدن یک سری از ژن‌های پلوری پوتنتی از قبیل Nanog، Oct4، Sox2 و Jag1 می‌شود. ترکیب اخیر یعنی Jag1 به‌عنوان لیگاندی برای نواحی خارج سلولی Notch عمل می‌کند و اتصال این لیگاند سبب شکسته شدن نواحی

می‌شود. مهارکننده‌های GSK-3 beta سبب ارتقای اشتقاق رده‌های ESCs موشی شده‌اند (۲۴). در مطالعه‌ی اسلامی نژاد و همکاران (۲۵) زمانی که غلظت‌های متفاوت BIO (به‌عنوان مهارکننده‌ی دیگری از GSK-3 beta) به محیط کشت MSC‌های مغز استخوان موش صحرایی اضافه شدند بیشترین میزان تشکیل کلونی‌ها زمانی که غلظت‌های ۰/۱ و ۱ میکرومولار BIO اضافه شده بود به‌دست آمد همچنین کمترین زمان لازم برای دو برابر شدن نیز در همین دو دوز دیده شده بود. علاوه بر این، در آن مطالعه BIO میزان گسترش و زنده‌مانی MSCs را در شرایط آزمایشگاهی بهبود بخشیده بود. در مطالعه‌ی دیگر، اسلامی نژاد و همکاران (۲۶)، حضور دوزهای متفاوت BIO بر زنده‌مانی MSC‌های مغز استخوان موش، نشان داد که دوزهای ۰/۰۵ و ۰/۱ بیشترین تاثیر معنی‌دار را بر تکثیر و زنده‌مانی MSCs دارند. افزودن دوز ۰/۱ میکرومولار BIO به محیط کشت MSC‌های مستخرج از مغز استخوان موش به‌صورت معنی‌داری نرخ رشد بالاتری بر مبنای PDN در مقایسه با سایر غلظت‌ها و شاهد ایجاد کرده بود. این محققین این‌گونه نتیجه‌گیری کرده‌اند که با توجه به مطالعه‌ی قبلی‌شان بر روی موش صحرایی با دوزهای مشابه BIO این احتمال وجود دارد که پاسخ متفاوت MSC‌های موش و موش صحرایی، بدلیل تفاوت گونه‌ای باشد. تفاوت در رفتار تکثیری در MSC‌های گونه‌های متفاوت گزارش شده است. برای مثال، MSC‌های موش در مقایسه با MSC‌های انسان و موش صحرایی دیرتر تکثیر و گسترش پیدا می‌کنند (۲۷). حتی MSC‌های سویه‌های متفاوت موش inbred نرخ‌های متفاوتی از تکثیر و تمایز را نشان می‌دهند (۲۸). در مطالعه‌ی ما که از MSC‌های مغز استخوان جنین گوسفند استفاده شد. علاوه بر، نوع سلول، نوع ریز مولکول استفاده شده‌ی ما با مطالعات اسلامی نژاد و همکاران (۲۵) که بر روی MSC‌های مغز استخوان گونه‌های موش و موش صحرایی کار نمودند تفاوت داشت ما از Chir99021 به‌عنوان قوی‌ترین مهارکننده‌ی GSK-3 beta استفاده نمودیم. علاوه بر پاسخ‌های گونه‌ی، ممکن است ریز مولکول‌های متفاوت نیز پاسخ‌های متفاوتی در دوزهای مختلف ایجاد کنند. زنده‌مانی دو رده‌ی ESCs، یعنی ES-D3 و ES-CCE، با افزودن مهارکننده‌های متفاوت GSK-3beta، یعنی: BIO، SB-216763، Chir99021 و Chir-98014 به محیط کشت، در دوزهای متفاوت و غلظت پایین سرم توسط ناجاک و همکاران (۲۹) بررسی شد، آن‌ها سمیت و زنده‌مانی را با تست MTT بررسی

استفاده از دوزهای ۱ و ۵/۵ میکرومولار Chir99021 بیشترین تاثیر را بر تکثیر و زنده‌مانی و تشکیل CFU-F، MSC‌های مستخرج از جنین گوسفند دارند. از طرفی دوز ۱ میکرومولار Chir99021 بیشترین تاثیر را بر دو برابر شدن جمعیت سلولی، کاهش زمان دو برابر شدن و بیان ژن بتا-کاتنین، در MSC‌های مستخرج از جنین گوسفند دارد. پیشنهاد می‌شود که تاثیر این ریز مولکول بر بیان ژن‌ها و پروتئین‌های مرتبط با تکثیر سلول‌های بنیادی استخراج شده از منابع مختلف مورد بررسی قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

از مهندس جدی رئیس کشتارگاه راک کرج به‌خاطر همکاری در جهت تامین و ارسال نمونه‌های جنین گوسفند تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

1. Zou JP, Huang S, Peng Y, Liu HW, et al. Mesenchymal stem cells/multipotent mesenchymal stromal cells (MSCs): potential role in healing cutaneous chronic wounds. *The international journal of lower extremity wounds*. 2012; 11(4): 244-53.
2. da Silva ML, Chagastelles PC, Nardi NB. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *Journal of Cell Science*. 2006; 119: 2204-13.
3. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999; 284: 143-147.
4. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006; 8(4): 315-317.
5. Minguell JJ, Erices A. Mesenchymal stem cells and the treatment of cardiac disease. *Experimental Biology and Medicine*. 2006; 231(1): 39-49.
6. Phinny DG, Kopen G, Righter W, Webster S, et al. Donor variation in the growth properties and osteogenic potential of human marrow stromal cells. *Journal of Cellular Biochemistry*. 1999; 75(3): 424-436.
7. Karamishabankareh H, Kafilzadeh F, Soltani L. Treatment of ovine oocytes with certain water-soluble vitamins during in vitro maturation (IVM). *Small Ruminant Research*. 2012; 104: 139-145.
8. Kang YJ, Jeon ES, Song HY, Woo JS, et al. Role of c-Jun N-terminal kinase in the PDGF-induced proliferation and migration of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Journal of Cellular*

داخل سلولی NICD به‌وسیله‌ی آنزیم گاماسکرتاز می‌شود. حال اگر مهارکننده‌ی گاما سکرتاز به محیط اضافه شود. نواحی داخل سلولی شکسته نشده و حضور این نواحی سبب تجزیه‌ی بیشتر بتاکاتنین می‌شود. پس عدم فعالیت NICD و فعالیت GSK-3 beta سبب کاهش میزان بتا-کاتنین در سلول می‌شود در آن مطالعه زمانی که سلول‌های فیبروبلاستی موشی با ۵ میکرومولار BIO تیمار شدند سبب افزایش ۹۸ برابری میزان بتا-کاتنین شد در حالی که حضور مهارکننده‌ی گاما سکرتاز و BIO سبب کاهش میزان ورود بتا-کاتنین به هسته سلول شده بود و افزایش تکثیر در نتیجه‌ی اثر متقابل این دو چرخه است. در مطالعه‌ی دیگر بر روی ESC‌های مشتق از موش‌های سویه‌ی سرسخت مهار GSK-3 beta به‌وسیله‌ی Chir99021 خودتجدیدی را ارتقا داده است (۳۱). مهارکننده‌ی Chir99021 الگوی بیان ژن‌های کدکننده‌ی پروتئین به‌ویژه فاکتورهای نسخه‌برداری، ژن‌های تنظیمی اپی‌ژنتیکی و RNA‌های غیر کدکننده در ESC‌های موشی در جهت ایجاد شبکه پلوری پوتنتی نسبتاً ثابت، تغییر می‌دهد (۱۴). مهارکننده‌ی BIO در مقایسه با مهارکننده‌ی Chir99021 برای GSK-3 beta کمتر انتخابی است و احتمالاً کینازهای متفاوت دیگری شامل کینازهای وابسته به سیکلین (Cyclin-dependent kinases; Cdk)، گیرنده‌ی FGF و کینازهای تنظیم‌کننده‌ی سیگنال خارج سلولی (extracellular signal-regulated kinases; Erk) را نیز مهار می‌کند (۳۲).

در سلول درمانی به‌میزان بالایی سلول زنده نیاز است استفاده از محیط‌های تعریف شده عاری از سرم می‌تواند خطر انتقال مواد بیولوژیک را در مقایسه با محیط‌های تعریف نشده، حاوی سرم، کاهش دهد یکی از راه‌کارهای افزایش تکثیر استفاده از ریز مولکول‌های تاثیرگذار بر مسیرهای تکثیر سلولی است Chir99021 به‌عنوان قوی‌ترین مهارکننده‌ی GSK-3 beta می‌تواند علاوه بر مهار GSK-3beta در داخل سلول، سبب فعال شدن مسیر هدایتی Wnt شود و سپس ورود بتا-کاتنین به داخل هسته‌ی سلول و فعال شدن کمپلکس نسخه‌برداری TCF-LEF شود با فعال سازی این کمپلکس نسخه‌برداری، از ژن‌های مرتبط با تکثیر از جمله c-Myc و cyclin D1 نسخه‌برداری صورت می‌گیرد.

نتیجه گیری

با توجه به نتایج به‌دست آمده در این مطالعه، به نظر می‌رسد که

- Biochemistry. 2005; 95(6): 1135–1145.
9. Jian H, Shen X, Liu I, Semenov M, et al. Smad3-dependent nuclear translocation of β -catenin is required for TGF- β 1-induced proliferation of bone marrow-derived adult human mesenchymal stem cells. *Genes & Development*. 2006; 20(16): 666–674.
 10. Solchaga LA, Penick K, Porter JD, Goldberg VM, et al. FGF-2 enhances the mitotic and chondrogenic potentials of human adult bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Journal of Cellular Physiology*. 2005; 203(2): 398–409.
 11. Tsutsumi S, Shimazu A, Miyazaki K, Pan H, et al. Retention of multilineage differentiation potential of mesenchymal cells during proliferation in response to FGF. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2001; 288(2): 413–419.
 12. Zhang Y, Li W, Laurent T, Ding S. Small molecules, big roles – the chemical manipulation of stem cell fate and somatic cell reprogramming. *Journal of Cell Science*. 2012; 125: 5609–562.
 13. De KA, Malakar D, Akshey YS, Jena MK, et al. Isolation and Characterization of Embryonic Stem Cell-Like Cells From in vitro Produced Goat (*Capra hircus*) Embryos. *Animal Biotechnology*. 2011; 22(4): 181–196.
 14. Wu Y, Ai Z, Yao K, Cao L, et al. Chir99021 promotes self-renewal of mouse embryonic stem cells by modulation of protein-encoding gene and long intergenic non-coding RNA expression. *Experimental Cell Research*. 2013; 319(17): 2684–99.
 15. Xu W, Zhang X, Qian H, Zhu W, et al. Mesenchymal stem cells from adult human bone marrow differentiate into a cardiomyocyte phenotype in vitro. *Experimental Biology and Medicine*. 2004; 229(7): 623–31.
 16. O'Donoghue K, Fisk NM. Fetal stem cells. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2004; 18(6): 853–875.
 17. Roobrouck VD, Ulloa-Montoya F, Verfaillie CM. Self-renewal and differentiation capacity of young and aged stem cells. *Experimental Cell Research*. 2008; 314(9): 1937–1944.
 18. Herberts CA, Kwa MSG, Hermesen HPH. Risk factors in the development of stem cell therapy. *Journal of Translational Medicine*. 2011; 9(1): 29.
 19. Jope RS, Johnson GV. The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3. *Trends in Biochemical Sciences*. 2004; 29(2): 95–102.
 20. Arnold SJ, Stappert J, Bauer A, Kispert A, et al. Brachyury is a target gene of the Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Mechanisms of Development*. 2000; 91(1-2): 249–258.
 21. Wang J, Wynshaw-Boris A. The canonical Wnt pathway in early mammalian embryogenesis and stem cell maintenance/differentiation. *Current Opinion in Genetics & Development*. 2004; 14(5): 533–539.
 22. Willert K, Jones KA. Wnt signaling: is the party in the nucleus? *Genes & Development*. 2006; 20(11): 1394–1404.
 23. Abramova MV, Pospelova TV, Nikulenkov FP, Hollander CM, et al. G1/S arrest induced by histone deacetylase inhibitor sodium butyrate in E1A + Ras-transformed cells is mediated through down-regulation of E2F activity and stabilization of β -catenin. *The Journal of Biological Chemistry*. 2006; 281: 21040–21051.
 24. Umehara H, Kimura T, Ohtsuka S, Nakamura T, et al. Efficient derivation of embryonic stem cells by inhibition of glycogen synthase kinase-3. *Stem Cells*. 2007; 25: 2705–2711.
 25. Eslaminejad MB, Salami F, Soleimani Mehranjani M, Abnoosi MH, et al. BIO treatment enhances rat marrow-derived mesenchymal stem cell in vitro proliferation and viability. *Physiology and Pharmacology*. 2009; 13: 57–67.
 26. Eslaminejad MB, Salami F, Soleimani Mehranjani M, Abnoosi MH, et al. BIO treatment protects rat marrow-derived mesenchymal stem cell culture against the TNF- induced apoptosis. *Cell Journal (Yakhteh)*. 2009; 11(1): 35–42.
 27. Martin I, Muraglia A, Campanile G, Cancedda R, et al. Fibroblast growth factor-2 supports ex vivo expansion and maintenance of osteogenic precursors from human bone marrow. *Endocrinology*. 1997; 138(10): 4456–4462.
 28. Peister A, Mellad JA, Larson BL, Hall BM, et al. Adult stem cells from bone marrow (MSCs) isolated from different strains of inbred mice vary in surface epitopes, rates of proliferation, and differentiation potential. *Blood*. 2004; 103(5): 1662–1668.
 29. Naujok O, Lentjes J, Diekmann U, Davenport C, et al. Cytotoxicity and activation of the Wnt/ β -catenin pathway in mouse embryonic stem cells treated with four GSK3 inhibitors. *BMC Research Notes*. 2014; 7:273.
 30. Chen C, Hoffman DM, Reynolds D, Benoit SWS. Inhibition of Notch signaling reduces Wnt/ β -catenin-mediated mesenchymal stem cell proliferation.
 31. Yao, Y, Li W, Wu J, Germann UA, et al. Extracellular signal-regulated kinase 2 is necessary for mesoderm differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2003; 100(22): 12759–12764.
 32. Zhen Y, Sorensen V, Jin Y, Suo Z, et al. Indirubin-3-monoxime inhibits autophosphorylation of FGFR1 and stimulates ERK1/2 activity via p38 MAPK. *Oncogene*. 2007; 26: 6372–6385.

Evaluation of the effect of Chir99021 on proliferation of ovine fetal mesenchymal stem cells isolated from bone-marrow

Soltani L, Ph.D.^{1*}, Rahmani HR, Ph.D.², Daliri Joupari M, Ph.D.³, Ghaneialvar H, Ph.D.⁴,
Mahdavi AH, Ph.D.², Shamsara M, Ph.D.³, Amirizadeh N, Ph.D.⁵

1. Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran
2. Department of Animal and Marine Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran
3. Department of Clinical Biochemistry, Faculty of Medical Science, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
4. High Institute for Education and Research in Transfusion Medicine. Iranian Blood Transfusion Organization (IBTO), Tehran, Iran

* Email corresponding author: Leilasoltani7@yahoo.com

Received: 7 Nov. 2015

Accepted: 8 Mar. 2016

Abstract

Aim: The aim of the present study was to evaluate the effects of different concentrations of Chir99021 on ovine fetal marrow-derived mesenchymal stem cells (BM-MSCs) expansion in culture.

Material and Methods: BM-MSCs were isolated from ovine fetal and cultured. Passaged-3 cells were examined for their differentiation potential into osteocytes and adipocytes. In the present study, BM-MSCs from ovine fetal were plated in the presence of 0, 0.5, 1, 1.5, 3 and 5 μM of Chir9902. During the cultivation period, the cultures were statistically compared in terms of inducers of cell growth including the number of colonies, population doubling number (PDN), doubling time (DT) and the number of viable cells. Furthermore, expression of the beta-catenin was evaluated. The culture without Chir99021 was taken as the control group.

Results: Our findings indicated that, addition of 0.5 and 1 μM of Chir99021 to medium significantly improved overall proliferation compared to that of control group as well as 5 μM of Chir99021 ($p < 0.05$). Furthermore, Five days after treatment with small molecule showed that the treatments with 0.5 and 1 μM Chir99021 formed higher Colony Forming Unit-Fibroblast (CFU-F) compared to control and 5 μM of Chir99021. The expression of beta-catenin was significantly higher in culture supplemented with 1 μM of Chir99021 compared to that in groups containing 0.5 and 1.5 μM ($p < 0.05$).

Conclusion: In conclusion, using Chir99021 at concentration of 1 μM could enhance in vitro proliferation of ovine fetal BM-MSC; however administration of high concentration of this small molecule had toxic effects on these cells proliferation.

Key words: Mesenchymal stem cells, Ovine fetal, Proliferation, Chir99021