دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی رفسنجان
دانشکده پزشکی
گروه بیوشیمی بالینی

بررسی اثر ویتامین E، سلنیوم بوتیل هیدروکسی تولوئن بر بهینه سازی محیط کشت، تکثیر و تمایز سلول های بنیادی مزانشیمی به سلول های استخوان و چربی

اساتید راهنما:
دکتر علیرضا خوشدل
دکتر محمدعلی فهمیده‌کار

اساتید مشاور:
دکتر مهدی محمودی
دکتر محمدرضا حاجی زاده
دکتر محمدرضا میرزایی

نگارش:
زینب سادات جوادی

زمستن ۱۳۹۷

چکیده

مقدمه: سلول های بنیادی مزانشیمی چندتوان (MSCs) با توانایی ترشح سیتوکین ها به تعمیر بافت آسیب دیده کمک می کند، که می تواند به عنوان یک منبع آزمایشگاهی برای کاربردهای درمانی در آینده مورد استفاده قرار گیرد. سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از چربی (AD-MSCs) می‌توانند تحت شرایط مناسب رشد به انواع مختلفی از سلول‌های مزودرمی تمایز یابند. Selenium (Se)، ویتامین E و بوتیل هیدروکسی تولوئن (BHT) به عنوان آنتی اکسیدان باعث تمایز و تکثیر MSCs می شوند. در این مطالعه اثر سلنیوم، ویتامین E و بوتیل هیدروکسی تولوئن را بر تمایز و تکثیر AD-MSCs مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه، نمونه بافت چربی زیر جلدی شکمی جمع آوری شد و به آزمایشگاه منتقل گردید. پس از شستشو با محلول فسفات بافر(PBS)، خرد شد و با استفاده از کلاژناز نوعI هضم گردید سپس در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد در انکوباتور به مدت ۳۰ دقیقه نگهداری شد. سلول‌های بنیادی مزانشیمی با موفقیت استخراج شدند، رسوب سلولی بعد از سانتریفوژ، در محیط کشت حاوی٪ DMEM+ ۲۰ FBS قرار گرفتند و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد رطوبت هوا ۵٪ CO2 قرار گرفتند. برای تعیین ظرفیت زنده بودن سلول، آن‌ها را داخل پلیت‌های ۹۶ خانه ای به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شدند. سلول ها توسطSe ، ویتامین E و BHT مورد آزمایش قرار گرفتند. پس از ۲۴ ساعت، برای اندازه گیری جذب IC50 در ۵۷۰ نانومتر، ۰,۵ میلی گرم بر میلی لیتر MTTاضافه شد. برای تمایز استئوژنیک، ۵۰۰۰۰ سلول cm2 / با DMEM+ ۲۰٪ FBS کشت داده شد. هنگامی که سلول‌ها به ۸۰٪ ظرفیت پلیت رسیدند، محیط پایه توسط محیط استئوژنیک یا آدیپوژنیک تعویض شد که هر ۳ روز به مدت ۱۴-۱۲ روز تعویض گردید. در نهایت رنگ آمیزی قرمز آلیزارین یا Oil Red برای تشخیص معدنی شدن ماتریکس سلولی انجام شد.

نتایج: در این مطالعه، با موفقیت سلول‌های بنیادی مزانشیمی با مورفولوژی فیبروبلاست مانند از چربی استخراج شدند (AD-MSCs) و تکثیر داده شدند. ظرفیت زنده بودن سلول‌های جدا شده از چربی (AD-MSCs) با استفاده از آزمونMTT ، نشان داده شد که غلظت بهینه برای Se را بین ۵ تا ۷۰۰ میکرومولار، ویتامین E بین ۵۰ تا ۷۰۰ میکرومولار و BHT بین دوز ۱۰۰ تا ۵۰۰۰ میکرومولار نشان داده شد. برای تمایز استئوژنیک و آدیپوژنیک، برای Se ۱۲۱ میکرومولار، ویتامین E ۱۲۵میکرومولار وBHT ۹۹۶ میکرومولار به عنوان دوز بهینه نشان داده شده است. رنگ آمیزی قرمز آلیزارین و همچنین رنگ آمیزی Oil Red حداکثر تمایز را با افزایش غلظت نشان می دهند.

نتیجه‌گیری: این نتایج نشان می دهد که بافت چربی، می تواند برای سلول درمانی و مهندسی بافت در آینده به عنوان منبع غنی از سلول‌های بنیادی مزانشیمی استفاده شود. ما احتمال می‌دهیم که سلنیوم، ویتامین E و BHT می‌توانند تمایز و تکثیر بهتر سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از چربی (AD-MSCs) را در محیط آزمایشگاهی القا کند.

کلمات کلیدی: سلول های بنیادی، سلنیوم، ویتامینE ،سلول های بنیادی مزانشیمی، تمایز

Selenium, vitamin E and Butylated Hydroxytoluene Induced Differentiation and Proliferation of Human Adipose Derived Mesenchymal Stem Cells

Abstract

Introduction: Multipotent mesenchymal stem cells (MSCs) with cytokines secretion capability which contribute to repair damaged tissues could be used as an in vitro source for future therapeutic applications. adipose-derived mesenchymal stem cells (AD-MSCs) can be differentiated into various types of mesodermal cells under appropriate growth conditions. Selenium (Se), vitamin E and butylated hydroxytoluene (BHT) as antioxidant give rise differentiation and proliferation of MSCs. In this study, effect of Selenium, vitamin E and butylated hydroxytoluene were evaluated on the differentiation and proliferation of AD-MSCs.

Methods: In the present study, abdominal subcutaneous fat sample were collected and transferred to the laboratory. After washing by phosphate buffered saline (PBS), minced and digested using collagenase type I and stored at 37°C in incubator for 30 min. human AD-MSCs successfully isolated and cultured. Following, pellet of the cells after centrifugation, seeded in tissue culture flask containing DMEM+10%FBS and transferred at 37°C humidified 5% CO2 atmosphere. For cell viability assays, cells cultured into per well of 96-well plate and incubated at 37°C humidified 5% CO2 for 24 hr. cells were treated by Se, vitamin E and BHT. After 24 hr, 0.5 mg/mL MTT was added for IC50 absorbance Measurement at 570 nm. For osteogenic differentiation, 50000 cells/cm2 were cultured by DMEM+20%FBS. At 80% confluency, the base medium was replaced by osteogenic medium which changed every 3 days for 12 days. Finally, Alizarin red staining was performed to detect matrix mineralization.

Results: In this study, successful isolation and proliferation of human AD-MSCs with fibroblast-like morphology, was confirmed. The viability of the isolated AD-MSCs using MTT test showed preferred concentration for Se between 50 µM to 700 µM, vitamin E between 50 µM to 700 µM and BHT between 100 µM to 5000 µM doses. for osteogenic and adipogenic differentiation, for Se 121 µM, vitamin E 125 µM and BHT 996 µM demonstrated as ideal dose. Alizarin red and oil red staining showed maximum differentiation with give rise in concentration.

Conclusions: These results suggest that adipose tissue, which is discarded in standard operations procedure, can be used for future cell therapy and tissue engineering as an enrichment source of potent mesenchymal stem cells. we speculated that Se, vitamin E and BHT could induce in vitro differentiation and proliferation isolated human AD-MSCs.

Key word: Stem cell, Selenium, vitamin E, Butylated Hydroxytoluene, mesenchymal stem cell, differentiation

Rafsanjan University of Medical Sciences
Medical School
Clinical Biochemistry Department

Selenium, vitamin E and Butylated Hydroxytoluene Induced Differentiation and Proliferation of Human Adipose Derived Mesenchymal Stem Cells

Supervisors:
Dr. Alireza Khoshdel
Dr. Mohammad Ali Fahmidehkar

Advisors:
Dr. Mehdi Mahmoudi
Dr. Mohammad Reza Hajizadeh
Dr. Mohammad Reza Mirzaei

By:
Zeinab Sadat Javadi

Winter 2019