



دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی ایران
دانشکده پزشکی

عنوان:

تأثیر امواج فراصوت بر تمایز سلولهای مزانشیمی جدا شده از مغز
استخوان رت به استخوان در محیط آزمایشگاهی

نگارش:

داریوش همراهی

اساتید راهنما:

جناب آقای دکتر محمد باقر شیران

جناب آقای دکتر حمید گورابی

استاد مشاور:

جناب آقای دکتر محمد رضا باغبان اسلامی نژاد

پایان نامه:

کارشناسی ارشد رشته فیزیک پزشکی

سال تحصیلی ۸۶-۱۳۸۵

تأثیر امواج فراصوت با شدت پائین بر تکثیر، توان زیستی و تمایز سلول های مزانشیمی جدا شده از مغز استخوان رت به استخوان در محیط آزمایشگاهی

چکیده:

نوسانات مکانیکی برای افزایش سیگنال های سلولی در بسیاری از انواع سلول ها بکار می رود. فراصوت با شدت پائین عملکردهای چندگانه ای را که مستقیماً با تشکیل و بازسازی استخوان در ارتباط است، بوجود می آورد.

تحریک با فراصوت تسریع در ترمیم آسیب های استخوان و بافت نرم آن را از خود نشان داده است، و نیز بر روی توان زیستی و تکثیر و تمایز بسیاری از انواع مختلف سلول ها مؤثر بوده است. در این مطالعه، از مدل کشت *in vitro* سلول های بنیادی مزانشیمی برای بررسی تأثیر امواج فراصوت بر توان زیستی، تکثیر و تمایز آنها استفاده شد.

دستگاه فراصوت با فرکانس ۳MHz روش فشار تابشی کالیبره شد. نسبت شدت (mW.cm^{-2}) $(I_{pk}/I_{av} = 3/561)$ محاسبه شده و ضریب تصحیح شدت با مقدار $R^2=0/9987$ با شدت بیشینه 355 mW.cm^{-2} انتخاب شد (به ازای تابش ۵ دقیقه و د رمد پیوسته). دلیل انتخاب این شدت افزایش کمتر از ۱ درجه سانتیگراد دمای محیط کشت سلول ها در خلال تابش فراصوت بود.

سلول های مزانشیمی از کانال مرکزی استخوان های فمور و تیبیا جدا شده و در محیط DMEM کامل شده با FBS کشت داده شدند. قبل از تابش فراصوت، سلول ها به مدت یک روز کشت داده شدند تا چسبندگی آنها بیشتر شود. سپس تابش فراصوت (فرکانس ۳MHz و شدت mW.cm^{-2} $I_p=355$ ، د رمد پیوسته) به مدت ۷ روز و برای سه پاساژ (اول، دوم و سوم) تا پایان آزمایش اعمال شد.

برای بررسی تمایز از سلول های پاساژ سوم استفاده شد و در روزهای اول تا چهاردهم بصورت یک روز در میان بررسی ها در سه محیط مختلف انجام شد. در خلال سه پاساژ توان زیستی، تکثیر، دو برابر شدگی جمعیتی سلول ها و تمایز آنها بوسیله تست های MTT، منحنی رشد بررسی شد. برای بررسی تمایز در سلول های پاساژ سوم سنجش فعالیت آلکالین فسفاتاز و RT-PCR نیمه کمی برای ژن های آلکالین فسفاتاز، استیوکلسین و استنوپونتین انجام شد. هر آزمایش ده بار تکرار شد و میانگین نتایج از لحاظ آماری مقایسه شدند. در این مطالعه، از سلول های پاساژ سوم برای ارزیابی پتانسیل تمایزی به دو رده استخوان و چربی استفاده شد.

بر اساس منحنی رشد، سلول هایی که تحت تأثیر امواج فراصوت قرار گرفته بودند، بجز در پاساژ اول، فاز lag کوتاهتری داشتند و نیز مرحله رشد آنها از شیب تندتری نسبت به گروه کنترل برخوردار بود. تست MTT نشان داد که سلول های گروه US بطور معنی داری از جذب بالاتری برخوردار بودند. این شاخص نشان می دهد که این گروه از سلول ها از توان زیستی بالاتری برخوردارند. بعلاوه، در گروه US، در پاساژهای دوم و سوم، تعداد دو برابر شدگی جمعیتی بیشتری اتفاق افتاد ($p < 0.004$)؛ این در حالی بود که این اختلاف در پاساژ اول معنی دار نبود ($p < 0.11$). تعداد دو برابر شدگی جمعیتی کل در گروه US $5/79 \pm 17/3924$ در مقابل در گروه کنترل برابر $4/69 \pm 14/07819$ بود ($p < 0.005$). سلول های پاساژ سوم در دو گروه مورد مطالعه براحتی به استخوان و چربی تمایز یافتند که حاکی از ماهیت بنیادی - مزانشیمی آنها بود.

نتایج حاصل از تأثیر فراصوت بر تمایز سلول های مزانشیمی نشان داد که فراصوت می تواند تأثیر برانگیزی معنی داری را در تمایز به استخوان این رده سلولی (در سطح mRNA) و نیز بیان آلکالین فسفاتاز در محیط های مختلف داشته باشد.

روپهم رفته می توان گفت که استفاده از فراصوت می تواند بطور مشخصی قابلیت حیات، تکثیر و تمایز سلول های مزانشیمی را در محیط آزمایشگاهی افزایش دهد.

لغات کلیدی : فراصوت(US)، سلول های مزانشیمی رت، تکثیر، تمایز

In vitro effects of low-intensity ultrasound on the growth, proliferation and differentiation of rat bone-marrow derived mesenchymal stem cell into osteoblast

Abstract:

Mechanical perturbation serves as extra cellular signals to a variety of cells. Low-intensity ultrasound produces significant multifunctional affects that are directly relevant to bone formation and resorption. Ultrasound stimulation has been shown to accelerate bone-defect healing and bone and much type of cells viability and proliferation. In this study, we use an in vitro mesenchymal stem cell culture model to investigate the effect of low-intensity ultrasound (US) on their proliferation and differentiation.

Ultrasound instrument with 3MHz frequency was calibrated by Radiation Force Method. The intensity ratio ($I_{pk}/I_{av} = 3.651 \text{ W.cm}^{-2}$) was calculated and corrected nominal intensity of $R^2=0.9987$ with peak intensity of 355mW.cm^{-2} was chosen (5 min. exposure and continues mode). This intensity/time was selected because the temperature did not exceed 1°C above cultured cell environment during sonication.

The rat mesenchymal stem cell prepared from rat's Tibia and Femur central canal were cultured in medium complemented with FBS. The mesenchymal stem cells were cultured for 1 day prior to sonication to facilitate their attachment. Ultrasound exposure (frequency=3MHz, Peak intensity= 355mW.cm^{-2} , continues mode) for 7 days was applied until the end of experiment for three subculture (passage 1, 2, 3). For Differentiation assay, passaged-3 cells were treatment by US and in 1st, 3rd, 5th, 7th, 9th, 11th, 14th days evaluated for differentiation in three different media.

For three successive passages during which viability, growth, proliferation and differentiation of cells were evaluated by MTT, calculation of Population Doubling Number (PDN), daily examination of the cell growth for drawing growth curve.

Alkaline phosphatase activity assay and Semi quantitative RT-PCR for Alkaline phosphatase, Osteocalcin and Osteopontin was performed. Each experiment was performed ten times and the mean values were statistically compared. In this study, passaged-3 cells were evaluated in terms of their bone and adipocyte differentiation potential. According to growth curve, the cells affected with ultrasound ($f = 3\text{MHz}$ and $I_p=355\text{mW.cm}^{-2}$), except 1st passage, have short lag phase and their log phase was sharper and shorter than control group (without ultrasound treatment). MTT test indicated that cells in US group significantly more absorption value than or control group, that referred to they would be more viable US than control groups.

Furthermore, in US group, in 2nd and 3rd passages more population doubling number occurred ($p<0.004$); but in 1st passage it was lower than Control group but non significant differences ($p<0.11$). Total PD in US group was 17.3924 ± 5.79 versus control group 14.087 ± 4.69 ($p<0.005$).

Passaged-3 cells were readily differentiated among bone and adipocyte lineages confirming their mesenchymal stem cell nature.

The result of US on rMSCs differentiation Shown that US could stimulate significantly osteoblast differentiation (in mRNA level) in various medium and can increase ALpase activity.

Taken together, the US could significantly improve the proliferation, viability and differentiation potential of rat MSCs in vitro.

Key words: Ultrasound (US), rat mesenchymal stem cell (rMSC), proliferation, Osteogenic Differentiation