DOI: 10.22100/jkh.v9i4.320

مقاله پژوهشی

مجله دانش و تندرستی، دوره ۹، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۳
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شاهرود

مقایسه استحصال و موفقیت در تخلیص سلول‌های بنیادی مزانشیمی از دو منبع مغز استخوان و بافت چربی انسان

حجت نادری‌مشکین[۱،۲]، مریم مقدم‌متین[۱]، نغمه احمدیان‌کیا[۳]، آسیه حیرانی‌طبسی[۲]، مهدی میراحمدی[۲]، مینا شهریاری[۲]، ملیحه حسن‌زاده[۲]، محمود محمودی[۴]، ناصر سنجر موسوی[۵]، آرمین عطاران‌زاده[۶]، احمدرضا بهرامی[۱*]

۱- دانشگاه فردوسی مشهد- دانشکده علوم پایه- گروه زیست‌شناسی سلولی و ملکولی- عضو هیئت علمی.
۲- جهاد دانشگاهی مشهد- پژوهشکده بیولوژی ملکولی و پزشکی ترمیمی- گروه سلول‌های بنیادی و پزشکی ترمیمی- عضو هیئت علمی.
۳- دانشگاه علوم پزشکی شاهرود- دانشکده پزشکی- عضو هیئت علمی.
۴- دانشگاه علوم پزشکی مشهد- پژوهشگاه بوعلی سینا- مرکز تحقیقات ایمنولوژی- عضو هیئت علمی.
۵- دانشگاه آزاد اسلامی- واحد مشهد- دانشکده پزشکی- گروه جراحی پلاستیک- عضو هیئت علمی.
۶- دانشگاه علوم پزشکی مشهد- دانشکده پزشکی- گروه پاتولوژی- عضو هیئت علمی.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۷/۲۲، **تاریخ پذیرش:** ۱۳۹۲/۹/۵

چکیده

مقدمه: *سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSCs: Mesenchymal stem cells) با داشتن مزیت‌هایی نظیر قابلیت توان تمایزی و اعمال آثار پاراکرین در درمان بیماری‌های مختلف نقش دارند. لذا استفاده از MSCs به‌عنوان ابزاری در سلول درمانی، نیازمند استحصال موفق این سلول‌ها در کمترین زمان ممکن است.*

مواد و روش‌ها: *به همین منظور در این مطالعه MSCs از منابع مغز استخوان و چربی انسان استخراج شده و از نظر درصد موفقیت کشت و سرعت تخلیص مورد ارزیابی قرار گرفتند. برای اطمینان از اینکه سلول‌های استحصال شده MSCs هستند، مطالعه تمایز به سلول‌های چربی و سلول‌های استخوانی به‌وسیله رنگ‌آمیزی Oil Red O و Alizarin Red S و سنجش فعالیت آلکالین فسفاتازی انجام گرفت. همچنین سلول‌های جدا شده، از نظر نشانگرهای اختصاصی به‌وسیله فلوسایتومتری مورد بررسی قرار گرفتند.*

نتایج: *نتایج حاکی از آن بود که درصد موفقیت در جداسازی MSCs از بافت چربی بیشتر از بافت مغز استخوان بود و همچنین روند تخلیص در MSCs جدا شده از بافت چربی در مقایسه با MSCs جدا شده از مغز استخوان به‌مدت زمان کمتری نیاز دارد. همچنین نتایج ما موید این واقعیت بود که استحصال MSCs از بافت چربی از دهنده‌های مختلف کاملاً تکرارپذیر بوده و وابسته به دهنده نیست لیکن این مسأله در مورد MSCs مشتق از بافت مغز استخوان صادق نبود.*

نتیجه‌گیری: *در مجموع نتایج این تحقیق بیانگر این بود که بافت چربی در مقایسه با بافت مغز استخوان، به لحاظ درصد موفقیت در جداسازی اولیه سلول‌ها و همچنین سرعت تخلیص بعدی سلول‌ها، منبع مناسب‌تری برای استخراج MSCs می‌باشد.*

واژه‌های کلیدی: سلول‌های بنیادی مزانشیمی، بافت چربی، مغز استخوان، استحصال و تخلیص.

***نویسنده مسئول:** مشهد- ابتدای بلوار وکیل آباد- دانشگاه فردوسی مشهد- دانشکده علوم پایه- گروه زیست‌شناسی، **تلفن:** ۰۵۱۱-۸۷۶۲۲۲۷، **Email:** Ar-Bahrami@um.ac.ir

ارجاع: نادری‌مشکین حجت، مقدم‌متین مریم، احمدیان‌کیا نغمه، حیرانی‌طبسی آسیه، میراحمدی مهدی، شهریاری مینا، حسن‌زاده ملیحه، محمودی محمود، سنجر موسوی ناصر، عطاران‌زاده آرمین، بهرامی احمدرضا. مقایسه استحصال و موفقیت در تخلیص سلول‌های بنیادی مزانشیمی از دو منبع مغز استخوان و بافت چربی انسان. مجله دانش و تندرستی ۱۳۹۳؛۹(۴):۳۸-۴۵.

مقدمه

نگاهی به آمار و ارقام جدید، نشان می‌دهد که استفاده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSCs: mesenchymal stem cells) به‌عنوان یکی از روش‌های درمانی برای بیماری‌های مختلف نظیر سکته قلبی، آسیب‌های نخاعی، دیابت، آسیب‌های مغزی و... به صورت روز افزونی در حال افزایش است (۱). MSCs، سلول‌های دوکی شکل شبه فیبروبلاست و چندتوان هستند که اولین بار توسط فریدن اشتاین و همکاران در اوایل دهه ۱۹۷۰ جداسازی و شناسایی شدند (۲). بعد از اولین جداسازی، در دهه‌های گذشته MSCs از بافت‌های مختلفی استحصال گردیدند. اگرچه اغلب مطالعات برروی MSCs مشتق از مغز استخوان صورت گرفته است، اما علاوه‌بر مغز استخوان، MSCs مشتق از بافت چربی و بند ناف نیز دارای فنوتیپ مشابه این سلول‌ها می‌باشند و توانایی تکثیر و تمایز به چند رده سلولی در شرایط آزمایشگاهی را دارا می‌باشند. MSCs مسئول بازسازی و هموستاز سلولی هستند و در اغلب بافت‌ها حضور دارند (۳–۵). به‌طورکلی، منظور از MSCs، سلول‌هایی هستند که در استرومای بافت‌هایی با منشاء مزانشیمی نظیر استخوان، بافت چربی، عضله و کبد استقرار یافته و در ترمیم این بافت‌ها مشارکت دارند. طبق گزارش انجمن بین‌المللی سلول درمانی (International society for cellular therapy) این سلول‌ها باید ویژگی‌های زیر را دارا باشند.

در شرایط کشت معمولی در ظروف کشت پلاستیکی به کف ظرف بچسبند.

مورفولوژی دوکی شکل شبه فیبروبلاستی داشته باشند.

توانایی تمایز به سلول‌های چربی، غضروف و استخوان را در شرایط آزمایشگاهی داشته باشند.

نشانگرهای سطحی CD105، CD73 و CD90 را بیان کنند و نیز نشانگرهای ویژه سلول‌های هماتوپوئتیک (CD45 و CD34) و نشانگرهای ماکروفاژها (CD14، CD11b) را بیان نکنند (۴، ۶ و ۷).

مغز استخوان و بافت چربی هر دو توانایی تولید سلول‌هایی با ویژگی‌های فوق را دارند ولی مسلماً منبع بافتی که بتواند سلول‌هایی با این ویژگی‌ها را با بیشترین درصد موفقیت و در زمان کوتاه‌تری در اختیار ما قرار دهد از ارزش بالاتری برخوردار خواهد بود. لذا هدف اصلی ما در این مطالعه، در مرحله اول مقایسه درصد موفقیت استحصال، کشت و در مرحله بعد مقایسه سرعت تخلیص MSCs استحصال شده از دو منبع مغز استخوان و بافت چربی بود.

مواد و روش‌ها

نمونه‌های مغز استخوان انسان (۷ نمونه) از استخوان ایلیاک بیماران مشکوک به سرطان یا سالم، تهیه شدند. نمونه‌های به‌دست آمده از هر بیمار حدود ۱۰ میلی‌لیتر بود که در کمترین زمان و تحت شرایط استریل به آزمایشگاه انتقال داده می‌شدند. به‌منظور جداسازی سلول‌های تک هسته‌ای مغز استخوان انسان از فایکول استفاده شد. به این ترتیب که ابتدا مغز استخوان جدا شده با نسبت یک به یک با PBS رقیق و سپس به آرامی برروی فایکول (هم حجم آن) ریخته شد. برای جداسازی فازهای سلولی، با شتاب نسبی g ۱۲۰۰۰ و به‌مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ انجام شد. بعد از این مرحله سلول‌های تک هسته‌ای جدا شده، چندین بار با PBS حاوی آنتی‌بیوتیک شستشو داده شده و بعد از سانتریفیوژ (با شتاب نسبی g ۴۰۰ و به‌مدت ۶ دقیقه) رسوب سلولی حاصله کشت گردید.

به‌منظور تهیه منبع بافتی، از نمونه‌های چربی (۱۰ مورد) جدا شده طی جراحی لیپوساکشن استفاده شد. از هر فرد به‌طور متوسط ml ۲۰ چربی گرفته و در کمترین زمان و تحت شرایط استریل به آزمایشگاه انتقال داده شدند. نمونه‌های بافت چربی موجود در سرنگ پس از انتقال به آزمایشگاه به ظرف استریل دیگری منتقل شدند و چندین بار با PBS محتوی آنتی‌بیوتیک شستشو داده شد.

در مرحله بعد بافت چربی با آنزیم کلاژناز تیمار شد. به این منظور، نخست به ازای هر ml ۳ چربی mg ۱ از کلاژناز و به ازای هر میلی‌گرم کلاژناز mg ۱۰ آلبومین سرم گاوی در PBS حل شدند. سپس کلسیم کلراید با غلظت نهایی mM ۲ به این مجموعه اضافه گردید و با استفاده از فیلترهای ۰/۲ میکرون، استریل شد. محلول کلاژناز به بافت چربی حاصل از شستشوی مرحله قبل اضافه گردیده و به‌مدت ۱۰ ثانیه محکم تکان داده شد. مخلوط چربی و کلاژناز در دمای ۳۷°C در حمام آب گرم شیکردار به‌مدت یک ساعت انکوبه گردید.

بعد از مرحله هضم آنزیمی، بافت چربی را به نسبت ۱ به ۳ با PBS رقیق کرده و به فالکون ml ۵۰ منتقل گردید. پس از سانتریفیوژ فالکون‌ها با شتاب g۸۰۰ به‌مدت ۱۰ دقیقه، چهار فاز در لوله‌های آزمایش قابل مشاهده می‌شدند. سپس با استفاده از یک پیپت ml ۲۵، چربی‌های معلق، بافت چربی و PBS موجود در سه فاز رویی از لوله آزمایش خارج شدند. در نهایت بعد از چندین بار شستشوی رسوب سلولی ایجاد شده، این سلول‌های تک هسته‌ای در محیط کشت معلق شده و به فلاسک T75 منتقل شدند. به ازای هر ml۱۰ نمونه چربی اولیه یک فلاسک T75 استفاده گردید.

سلول‌های تک‌هسته‌ای مغز استخوان بعد از شمارش سلولی و تعیین تعداد سلول‌های زنده، با تراکم 3 × 105 cells/cm2 در فلاسک‌های T75 کشت داده شدند. ۲۴ الی ۴۸ ساعت بعد از کشت اولیه، محیط کشت فلاسک را خارج کرده و محیط کشت جدید به جمعیت سلولی چسبیده به ته فلاسک اضافه شد. پس از آن محیط کشت فلاسک هر ۳ یا ۴ روز یک‌بار تعویض گردید. طی این مدت سلول‌ها به تدریج رشد کرده و ته فلاسک را می‌پوشانند.

طی پاساژهای متوالی این سلول‌ها تخلیص شدند. زمانی که سطح کف فلاسک در حدود ۹۰٪ توسط سلول‌ها پوشیده شد، اولین پاساژ به‌ترتیب زیر انجام گرفت. ابتدا از PBS برای شستشوی سلول‌ها و خارج کردن سرم محیط کشت استفاده شد. بعد از شستشو با PBS، ۱/۵ ml تریپسین–EDTA (1X) به فلاسک کشت اضافه کرده و فلاسک‌ها حدود ۵ دقیقه در انکوباتور ۳۷°C قرار داده شدند. محتویات هر فلاسک با تراکم سلولی ۵۰۰۰ –۱۰۰۰۰cells/cm2 به دو یا چند فلاسک جدید منتقل و محیط کشت لازم به هریک از فلاسک‌ها افزوده شد (۸).

به‌منظور اطمینان از خالص بودن و بررسی ویژگی‌های بنیادی این سلول‌ها از روش‌های تمایز به چربی و استخوان استفاده گردید. همچنین به‌روش فلوسایتومتری، بیان برخی از نشانگرهای اختصاصی MSCs در این سلول‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

سلول‌های حاصل از پاساژهای ۴–۳ به‌مدت ۲۱ روز در محیط تمایزی چربی کشت داده شدند. محیط تمایزی چربی شامل DMEM به همراه ۱۰٪ سرم و عوامل القاءکننده بتا گلیسرول فسفات (10 mM)، دگزامتازون (1 µM) و ایندومتاسین (100 µM) بود. این محیط هر دو روز یک بار تعویض شده و سلول‌ها در پایان این دوره تمایزی، با Oil red O رنگ‌آمیزی شدند. برای رنگ‌آمیزی هسته سلول‌ها از هماتوکسیلین استفاده شد.

سلول‌های حاصل از پاساژهای ۴–۳ در محیط تمایزی استخوان به‌مدت ۱۴ تا ۱۷ روز کشت شدند. محیط تمایزی استخوان از DMEM به همراه ۱۰٪ سرم و عوامل القاءکننده بتا گلیسرول فسفات (10 mM)، دگزامتازون (0.1 µM) و آسکوربات ۲–فسفات (10 mM) تشکیل شده بود. این محیط کشت دو روز در میان تعویض گردید.

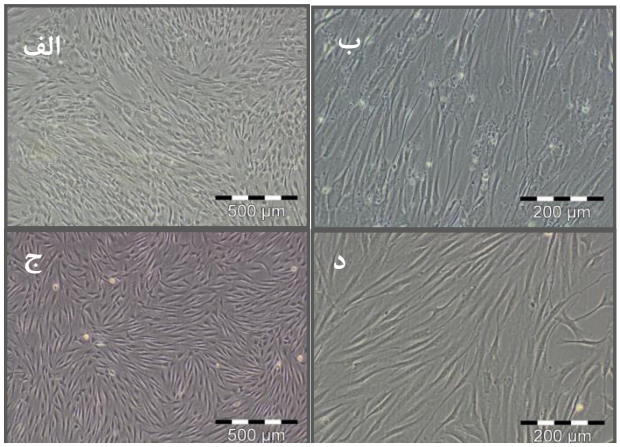
در پایان دوره تمایز، به‌منظور آشکارسازی رسوبات غنی از کلسیم تشکیل شده احتمالی در ماتریکس خارجی سلول‌های القاء شده، رنگ‌آمیزی Alizarin red S انجام گرفت. همچنین میزان فعالیت آلکالین فسفاتاز در درون سلول‌های تمایز یافته به استئوسیت‌ها با معرف BCIP/NBT مورد ارزیابی قرار گرفت.

بیان برخی نشانگرهای MSCs (CD90، CD44 و CD105) و سلول‌های هماتوپوئیتیک (CD45، CD11b و CD34) با روش فلوسایتومتری مورد بررسی قرار گرفتند. سلول‌های کشت شده با استفاده از تریپسین از ظرف کشت جدا شده و با استفاده از PBS دو بار شستشو داده شدند. سپس سلول‌ها با آنتی‌بادی‌های موردنظر انکوبه شدند. سپس درصد سلول‌هایی که نشانگرهای سطحی فوق را نشان می‌دهند با دستگاه فلوسایتومتری (FACSCalibur, BD) و نرم‌افزار مخصوص آن به نام FlowingSoftware 2.5. تعیین گردید.

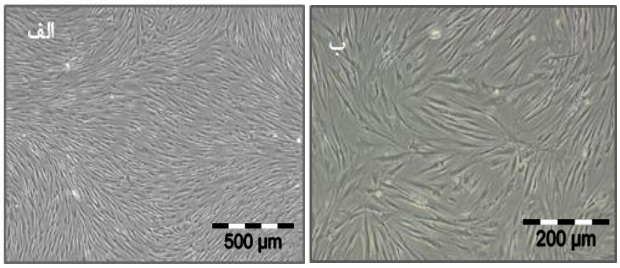
نتایج

استحصال MSCs از بعضی نمونه‌های مغز استخوان (۳ مورد از ۷ نمونه) موفقیت آمیز نبود لیکن در مورد تمامی نمونه‌های بافت چربی (۱۰ مورد) استحصال با موفقیت انجام گرفت، که این مسأله بیانگر نتایج بهتر جداسازی اولیه MSCs از بافت چربی در مقایسه با بافت مغز استخوان است. همچنین از مقایسه درصد موفقیت در جداسازی اولیه MSCs از بافت چربی در مقایسه با بافت مغز استخوان، می‌توان دریافت که نتایج استحصال MSCs از بافت چربی از دهنده‌های مختلف کاملاً تکرارپذیر بوده و وابسته به دهنده نیست لیکن چنین تکرارپذیری در مورد نمونه‌های بافت مغز استخوان صادق نبود.

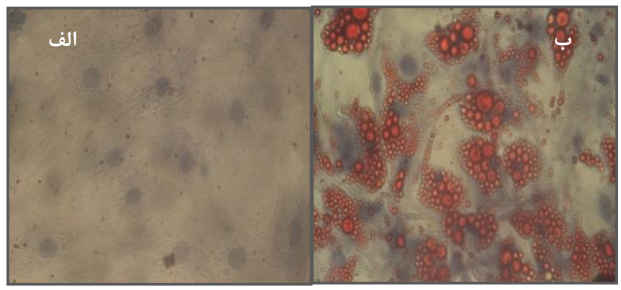
در مواردی که موفق به جداسازی اولیه سلول‌ها از نمونه‌های مغز استخوان شدیم، سلول‌های استخراج شده، ۷ روز پس از کشت اولیه (پاساژ صفر، P0) کلونی‌هایی را تشکیل دادند که معمولاً بعد از ۱۴ روز نیاز به پاساژ داخلی (P1) داشتند. بعد از پاساژ یک، دیگر کلونی‌ها به‌طور جداگانه قابل مشاهده نبودند و سلول‌ها ظاهری شبیه



شکل ۱- ریخت‌شناسی MSCs (جداسازی شده از مغز استخوان رت و انسان) در پاساژ ۳. MSCs استحصال شده از مغز استخوان رت (الف) با درشت‌نمایی ۴۰X و (ب) درشت‌نمایی ۱۰۰X و همچنین از مغز استخوان انسان (ج) با درشت‌نمایی ۴۰X و (د) درشت‌نمایی ۱۰۰ X



شکل ۲- ریخت‌شناسی MSCs جداسازی شده از بافت چربی انسان در پاساژ ۳. MSCs استحصال شده از بافت چربی(الف) با درشت‌نمایی ۴۰X و (ب) درشت‌نمایی ۱۰۰X



شکل ۳- بررسی تمایز AD-MSCs به سلول‌های چربی به کمک رنگ‌آمیزی Oil red پس از ۲۱ روز (درشت‌نمایی ۲۰۰X). (الف) گروه شاهد ، (ب) گروه آزمون

فیبروبلاست داشتند که یکی از ویژگی‌های MSCs می‌باشد (شکل ۱). نتایج بیانگر این بودند که سلول‌های استخراج شده از مغز استخوان انسان الگوی رشد بسیار متغیر و غیرتکرارپذیری دارند به این معنا که دهنده‌های سلولی مختلف بازده سلولی متفاوتی داشتند.

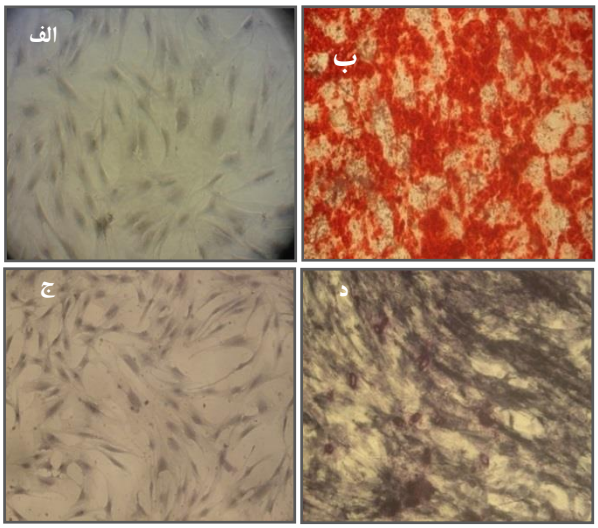
در بررسی MSCs مشتق از بافت چربی انسان، دو روز پس از کشت اولیه تعداد فراوانی کلونی در کف فلاسک دیده شدند، به‌طوری‌که تشخیص کلونی‌ها به تفکیک بسیار سخت بود و پاساژ داخلی (P1) در روز سوم کشت، ضروری بود. پس از آن معمولاً به فاصله ۳ تا ۴ روز سلول‌ها به Confluency حدود ۹۰٪ می‌رسیدند و پاساژ مجدد انجام می‌گرفت. در طی دوره کشت، سلول‌ها ظاهر فیبروبلاست شکل خود را از دست ندادند (شکل ۲). این روند برای تمام نمونه‌های بافت چربی که از دهنده‌های مختلف گرفته شده بودند، مشابه بود.

تکرار آزمایشات حاکی از آن بود که معمولاً از ۲۰ میلی‌لیتر نمونه چربی، ۹ روز پس از کشت، سلول‌های استحصال شده به پاساژ ۳ می‌رسند و نتایج تعیین هویت سلولی مؤید آن بود که این سلول‌ها MSCs بودند. در مقابل، از ۱۰ میلی‌لیتر مغز استخوان، ۹ روز پس از کشت، سلول‌های مشتق شده از مغز استخوان حتی به پاساژ ۱ هم نمی‌رسیدند و تنها تعداد کمی کلونی سلولی مشاهده می‌شد.

قرار گرفتن سلول‌های تخلیص شده در محیط تمایزی چربی سبب ظهور واکوئل‌های چربی در این سلول‌ها شد که پس از رنگ‌آمیزی با Oil Red این واکوئل‌ها به رنگ قرمز مشخص شدند (شکل ۳).

نتایج رنگ‌آمیزی با Alizarin Red و همچنین بررسی فعالیت آلکالین‌فسفاتازی، معرف تمایز این سلول‌ها به سمت سلول‌های استخوانی بود که این نتیجه تأیید دیگری بر هویت بنیادی سلول‌های تخلیص شده بود (شکل ۴).

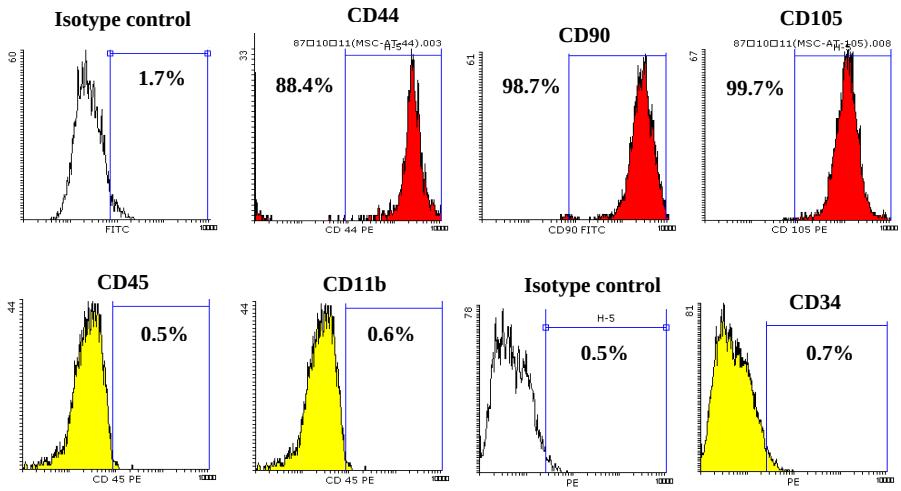
بررسی نشانگرهای سطحی CD44، CD90، CD105، CD45، CD34 و CD11b برروی سلول‌های استخراج شده در پاساژ ۳، نیز مؤید این بودند که سلول‌های استخراج شده، MSCs می‌باشند (شکل ۵).



شکل ٤- بررسی تمایز AD-MSCs به سلول‌های استخوان به کمک Alizarin red (الف) گروه شاهد، (ب) گروه آزمون و سنجش فعالیت آلکالین‌فسفاتازی، (ج) گروه شاهد و (د) گروه آزمون برای فعالیت آلکالین فسفاتاز. پس از ۲۱ روز (درشت‌نمایی ۱۰۰X).

بحث

نگاهی به آمار و ارقام جدید، نشان می‌دهد که استفاده از MSCs به‌عنوان یکی از روش‌های درمانی برای بیماری‌های مختلف نظیر سکته قلبی (MI: Myocardial infarction)، آسیب‌های نخاعی، دیابت، آسیب‌های مغزی، انواع روماتیسم، بیماری پارکینسون و کرون، سیروز کبدی، کم خونی آپلاستیک، graft versus host disease (GVHD)، multiple sclerosis (MS) و لوپوس، به‌صورت روز افزونی در حال افزایش است؛ این تعداد در سال ۲۰۱۲ به بیش از ۱۲۰ کارآزمایی بالینی رسیده است که از این تعداد تقریباً نیمی (۴۹/۶٪) در فاز ۲ کارآزمایی هستند (۱). بیماری‌های مختلف سهم متفاوتی از سلول درمانی با استفاده از MSCs را به خود اختصاص داده‌اند. به‌عنوان مثال، سکته قلبی با ۲۲/۹٪ بیشترین سهم را به خود اختصاص داده است. این آمار نشان‌دهنده اهمیت و توجه روزافزون به سلول درمانی با استفاده از MSCs می‌باشد (۱). موفقیت در سلول درمانی به عوامل زیادی بستگی دارد. یکی از این عوامل، انتخاب منبع سلولی مناسب است. تاکنون منابع سلولی مختلفی معرفی شده‌اند که هریک دارای مزایا و معایبی می‌باشند. یکی از این منابع، MSCs می‌باشند (۹ و ۱۰) که از بافت‌های مختلفی مانند چربی، مغز استخوان و خون بند ناف و از گونه‌های مختلف گرفته شده و مشخص شده است که MSCs جدا شده از منابع و گونه‌های مختلف با همدیگر متفاوت هستند (۱۱-۱۳).



شکل ۵- تعیین هویت MSCs با فلوسایتومتری

روش‌های مختلف امروزی برای جداسازی MSCs مبتنی بر خصوصیات فیزیکی و ایمنولوژیک آنها می‌باشد. به‌دلیل سهولت جداسازی و پتانسیل تمایزی گسترده آنها، MSCs در میان نخستین انواع سلول‌های بنیادی قرار گرفته که در کلینیک کاربرد دارند. توانایی کشت‌های طولانی مدت MSCs اجازه دسترسی به سلول‌های کافی جهت درمان را می‌دهد. از طرف دیگر، از آنجایی‌که این سلول‌ها HLA-II را بیان نمی‌کنند، ایمنوژنیسیتی کمی داشته و خطر GVHD کمتر است و بنابراین پیوند آلوژنیک این سلول‌ها امکان‌پذیر است. لذا، می‌توان انتظار داشت که MSCs بتوانند در پیوند سیستمیک و یا موضعی برای رفع اختلالات موضعی بافتی و نیز به‌عنوان ناقل برای ژن درمانی یا تولید بافت‌ها و اندام‌های قابل پیوند در روش‌های مهندسی بافت به‌کار روند (۵، ۱۴ و ۱۵).

در این مطالعه، MSCs از مغز استخوان و بافت چربی انسان استحصال شده و از نظر درصد موفقیت کشت اولیه و سرعت تخلیص مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که سلول‌های استخراج شده از مغز استخوان انسان الگوی رشد بسیار متغیر و غیر تکرارپذیری از خود نشان دادند. به‌طوری‌که، دهنده‌های سلولی مختلف بازده سلول متفاوتی داشتند و از بسیاری از نمونه‌های مغز استخوان انسان از دهنده‌های مختلف، پس از دو هفته MSCs استحصال نشد. در صورتی‌که، کلونی‌های MSCs بافت چربی انسان، دو روز پس از کشت اولیه به فراوانی در کف فلاسک دیده شدند تا جایی‌که تشخیص کلونی‌ها به تفکیک بسیار سخت بود. هر چند وجود دانه‌های روغن و چربی هم مانع از مشاهده واضح آنها می‌شد. به هر حال این سلول‌ها در روز سوم کشت، پاساژ داخلی (P1) داده شدند و پس از آن معمولاً هر ۳ تا ۴ روز یکبار پاساژ داده شدند و در طی کشت ظاهر فیبروبلاست مانند خود را از دست ندادند. این روند برای همه نمونه‌ها از دهنده‌های مختلف تکرارپذیر بود. موافق با این نتایج، مطالعات نشان داده‌اند که بازده استحصال MSCs از بافت چربی بسیار بالاتر از مغز استخوان است، به‌طوری‌که از هر گرم بافت چربی بیش از ۵۰۰ برابر MSCs در مقایسه با هر گرم از مغز استخوان استحصال می‌گردد (۱۶-۱۸).

به‌منظور اثبات توان تمایزی سلول‌های تخلیص شده به سمت دودمان‌های مزانشیمی مانند سلول‌های چربی، استخوان و غضروف و تعیین هویت آنها، این سلول‌ها در پاساژ سوم تحت تأثیر محیط‌های تمایزی القاءکننده آدیپوژنز و استئوژنز، قرار گرفتند. موافق با نتایج سایر مطالعات (۱۳ و ۱۹)، پس از سه هفته کشت سلول‌ها در این شرایط، تمایز موفق آنها به سمت سلول‌های چربی و استخوان به‌روش رنگ‌آمیزی اُویل رد و استخوان به‌روش آلیزارین رد اثبات گردید. بررسی نشانگرهای سطحی نیز مؤیّد این بودند که سلول‌های تخلیص شده، MSCs بوده‌اند. اگرچه فیبروبلاست‌ها از نظر ظاهری و قابلیت چسبیدن به کف فلاسک مانند MSCs هستند و قابل تشخیص از هم نمی‌باشند، اما MSCs با داشتن قابلیت تمایز به رده‌های سلولی دیگر مانند آدیپوسیت‌ها و اُستئوسیت‌ها و همچنین نشانگرهای سطحی از آنها متفاوت می‌باشند (۲۰).

مغز استخوان جایگاه اصلی MSCs می‌باشد. نشانگرهای سطحی MSCs مشتق از مغزاستخوان به‌طور گسترده‌ای مورد مطالعه قرار

گرفته‌اند (۲۱). به‌طور معمول این سلول‌ها، نشانگرهای CD44،CD90، CD105 و CD166 را بیان کرده و از طرف دیگر، نشانگرهای CD14 (آنتی‌ژن سطحی مونوسیت‌ها و ماکروفاژها)، CD45 (آنتی ژن سطحی لوکوسیت) و CD34 (آنتی ژن سطحی سلول‌های بنیادی هماتوپوئیتیک) را بیان نمی‌کنند (۲۲).

مغز استخوان نه تنها شامل سلول‌های بنیادی خون‌ساز است بلکه سلول‌های بنیادی بافت‌هایی را که به‌طورکلی بافت‌های مزانشیمی نامیده می‌شوند را هم شامل می‌شود. پتانسیل تمایزی گسترده MSCs، سهولت جداسازی و کشت آنها و پتانسیل گسترش آنها در شرایط ex vivo این سلول‌ها را به‌عنوان ابزار درمانی جالبی که قادر به ارائه نقش‌های کاربردی وسیعی در راهکارهای سلول درمانی و ژن درمانی هستند، معرفی کرده است (۲۳ و ۲۴)؛ اما به هر حال، مشابه با مطالعه ما، تحقیقات زیادی نشان داده‌اند که بازده سلولی بافت چربی بیشتر از مغز استخوان است. به‌عنوان مثال استریم و همکاران نشان دادند که AD-MSCs حدود ۲٪ سلول‌های تک‌هسته‌ای بافت چربی را تشکیل می‌دهند (۲۵)، که تراکم آنها تقریباً ۱۰۰ تا ۳۰۰ برابر بیشتر از تراکم سلول‌های بنیادی مغز استخوان است (۲۶). همچنین مقداری زیادتری از بافت چربی نسبت‌به مغز استخوان در دسترس می‌باشد و تهیه بافت چربی در مقایسه با مغز استخوان با درد کمتری همراه است. در ضمن می‌توان سلول‌های بنیادی بافت چربی را با تعداد بیشتری نسبت‌به سلول‌های مغز استخوان جداسازی کرد. این سلول‌های بنیادی تخلیص شده از بافت چربی انسان دارای شباهت‌های فراوانی با MSCs مغز استخوان هستند. این سلول‌های بنیادی انسانی مانند MSCs مغز استخوان، در شرایط in vitro به استخوان، غضروف، چربی، عضله و نورون تمایز یافته‌اند و حتی خصوصیات تعدیل سیستم ایمنی مشابهی دارند (۱۳، ۲۷ و ۲۸). علاوه‌براین، در دسترس بودن و توانایی استخراج نسبتاً آسان آنها (مطابق با نتایج ما) و به‌علاوه عدم‌تحریک سیستم ایمنی میزبان پس از پیوند و توانایی پیوند آلوگرافت و زنوگرافت، این سلول‌ها را به‌عنوان کاندید مناسبی برای سلول درمانی معرفی کرده است (۲۲). به‌طورکلی، ازآنجاکه روند تخلیص MSCs به واسطه پاساژهای متوالی کشت‌های سلولی انجام می‌گیرد لذا می‌توان چنین استنباط کرد که روند تخلیص برای سلول‌های جدا شده از بافت چربی در مقایسه با بافت مغز استخوان سریع‌تر و بازده آن بیشتر است.

تشکر و قدردانی

این پژوهش توسط گرنت ستاد سلول‌های بنیادی، دانشگاه فردوسی مشهد و جهاد دانشگاهی مشهد حمایت شده است.

References

1. Wei X, Yang X, Han ZP, Qu FF, Shao L, Shi YF. Mesenchymal stem cells: a new trend for cell therapy. Acta Pharmacologica Sinica 2013;34(6):747-54.
2. Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Latsinik NV, Panasyuk AF, Keiliss-Borok IV. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo. Transplantation 1974;17(4):331-40.
3. Bieback K, Brinkmann I. Mesenchymal stromal cells from human perinatal tissues: From biology to cell therapy. World Journal of Stem Cells 2010;2(4):81-92.
4. Ankrum J, Karp JM. Mesenchymal stem cell therapy: Two steps forward, one step back. Trends in Molecular Medicine 2010;16(5):203-9.
5. Lavoie JR, Rosu-Myles M. Uncovering the secrets of mesenchymal stem cells. Biochimie 2013;95(12):2212-21.
6. Tarnok A, Ulrich H, Bocsi J. Phenotypes of stem cells from diverse origin. Cytometry Part A: the Journal of the International Society for Analytical Cytology 2010;77(1):6-10.
7. Falavigna A, Costa da Costa J. Mesenchymal autologous stem cells. World neurosurgery 2013 Feb 9. doi: 10.1016/j.wneu.2013.02.026.
8. Ringe J, Strassburg S, Neumann K, Endres M, Notter M, Burmester GR, et al. Towards in situ tissue repair: human mesenchymal stem cells express chemokine receptors CXCR1, CXCR2 and CCR2, and migrate upon stimulation with CXCL8 but not CCL2. Journal of Cellular Biochemistry 2007;101(1):135-46.
9. Mimeault M, Batra SK. Concise review: recent advances on the significance of stem cells in tissue regeneration and cancer therapies. Stem Cells (Dayton, Ohio) 2006;24(11):2319-45.
10. Van Poll D, Parekkadan B, Rinkes I, Tilles AW, Yarmush ML. Mesenchymal stem cell therapy for protection and repair of injured vital organs. Cellular and Molecular Bioengineering 2008;1(1):42-50.
11. Wagner W, Wein F, Seckinger A, Frankhauser M, Wirkner U, Krause U, et al. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. Exp Hematol 2005;33(11):1402-16.
12. Peng L, Jia Z, Yin X, Zhang X, Liu Y, Chen P, et al. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, cartilage, and adipose tissue. Stem Cells and Development 2008;17(4):761-73.
13. Kern S, Eichler H, Stoeve J, Kluter H, Bieback K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. Stem Cells (Dayton, Ohio) 2006;24(5):1294-301.
14. Paul D, Samuel SM, Maulik N. Mesenchymal stem cell: present challenges and prospective cellular cardiomyoplasty approaches for myocardial regeneration. Antioxid Redox Signal 2009;11(8):1841-55.
15. Huang NF, Li S. Mesenchymal stem cells for vascular regeneration. Regen Med 2008;3(6):877-92.
16. Blaber SP, Webster RA, Hill CJ, Breen EJ, Kuah D, Vesey G, et al. Analysis of in vitro secretion profiles from adipose-derived cell populations. Journal of Translational Medicine 2012;10:172.
17. Varma MJ, Breuls RG, Schouten TE, Jurgens WJ, Bontkes HJ, Schuurhuis GJ, et al. Phenotypical and functional characterization of freshly isolated adipose tissue-derived stem cells. Stem Cells and Development 2007;16(1):91-104.
18. Astori G, Vignati F, Bardelli S, Tubio M, Gola M, Albertini V, et al. "In vitro" and multicolor phenotypic characterization of cell subpopulations identified in fresh human adipose tissue stromal vascular fraction and in the derived mesenchymal stem cells. Journal of Translational Medicine 2007;5:55.
24. Kassem M, Kristiansen M, Abdallah BM. Mesenchymal stem cells: cell biology and potential use in therapy. Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology 2004;95(5):209-14.

19. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. Tissue engineering 2001;7(2):211-28.
20. Singh M, Thomas P, Shukla D, Tulsawani R, Saxena S, Bansal A. Effect of subchronic hypobaric hypoxia on oxidative stress in rat heart. Applied Biochemistry and Biotechnology 2013;169(8):2405-19.
21. Niehage C, Steenblock C, Pursche T, Bornhauser M, Corbeil D, Hoflack B. The cell surface proteome of human mesenchymal stromal cells. PloS One 2011;6(5):e20399.
22. Wagner J, Kean T, Young R, Dennis JE, Caplan AI. Optimizing mesenchymal stem cell-based therapeutics. Current Opinion in Biotechnology 2009;20(5):531-6.
23. Kassem M. Stem cells: potential therapy for age-related diseases. Annals of the New York Academy of Sciences 2006;1067:436-42.
25. Strem BM, Hicok KC, Zhu M, Wulur I, Alfonso Z, Schreiber RE, et al. Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. The Keio Journal of Medicine 2005;54(3):132-41.
26. Helder MN, Knippenberg M, Klein-Nulend J, Wuisman PI. Stem cells from adipose tissue allow challenging new concepts for regenerative medicine. Tissue Engineering 2007;13(8):1799-808.
27. Puissant B, Barreau C, Bourin P, Clavel C, Corre J, Bousquet C, et al. Immunomodulatory effect of human adipose tissue-derived adult stem cells: comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. British Journal of Haematology 2005;129(1):118-29.
28. Konno M, Hamabe A, Hasegawa S, Ogawa H, Fukusumi T, Nishikawa S, et al. Adipose-derived mesenchymal stem cells and regenerative medicine. Development, Growth & Differentiation 2013;55(3):309-18.

Journal of Knowledge & Health 2015; Vol 9, No 4
Shahroud University of Medical Sciences

DOI: 10.2210/jkh.v9i4.320

Original Article

Comparison of Derivation and Successful Purification of Human Adipose and Bone Marrow-Mesenchymal Stem Cells

Hojjat Naderi-Meshkin (Ph.D.)[1], Maryam Moghaddam Matin (Ph.D.)[1], Naghmeh Ahmadiankia (Ph.D.)[3], Asieh Heirani Tabasi (M.Sc.)[2], Mahdi Mirahmadi (M.Sc.)[2], Mina Shahryari (M.Sc.)[2], Malihe Hasanzadeh (M.Sc.)[2], Mahmoud Mahmoudi (M.D., Ph.D.)[3], Nasser Sanjar Moussavi (M.D.)[4], Armin Attaranzadeh (Ph.D.)[5], Ahmad Reza Bahrami (Ph.D.)[1*]

1- Dept. of Biology, School of Basic Sciences, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.
2- Dept. of Stem Cells and Regenerative Medicine, Iranian Academic Center for Education, Culture and Research (ACECR), Mashhad Branch, Mashhad, Iran.
3- Dept. of Medicine, School of Medicine, Shahroud University of Medical Sciences, Shahroud, Iran.
4- Immunology Research Centre, Bu-Ali Research Institute, Mashhad University of Medical Science, Mashhad, Iran.
5- Dept. of Surgery, School of Medicine, Islamic Azad University-Mashhad Branch, Iran.
6- Dept. of Pathology, Mashhad University of Medical Science, Mashhad, Iran.

Received: 14 October 2013**, Accepted:** 26 November 2013

Abstract:

Introduction: *Mesenchymal stem cells (MSCs) exhibit multiple beneficial properties in treatment of various diseases through their differentiation capacity and secretion of paracrine signals. Therefore, using MSCs as a tool for cell therapy rely on the ability of harvesting a sufficient number of cells in a short time.*
Methods: *In this study, MSCs derived from bone marrow (BM) and adipose tissue (AD) were investigated in terms of success rate of culture and cell yields. To ensure that the isolated cells are MSCs, adipogenic and osteogenic differentiation study were performed by Oil Red O, Alizarin Red S and Alkaline Phosphatase assay, and specific surface markers expression examined by flow cytometry.*
Results: *The results showed that successful culture's rate of AD-MSCs were superior to BM-MSCs. AD-MSCs reached to confluency and passage in a shorter time (faster) and produced further amount of cells at a defined time. It was also demonstrated that the derivation of MSCs from adipose tissue were completely reproducible and not donor dependent rather than BM-MSCs.*
Conclusion: *In conclusion, with our protocol, adipose tissues are proposed the more appropriate source for derivation of MSCs in terms of percentage of cells successfully isolated and subsequent purification as compared to bone marrow.*

Keywords: Mesenchymal stem cells, Adipose tissue, Bone marrow, Derivation and expansion.

Conflict of Interest: No
***Corresponding author:** A. R. Bahrami**, Email:** AR-Bahrami@um.ac.ir*

Citation: Naderi-Meshkin H, Moghaddam Matin M, Ahmadiankia N, Heirani Tabasi A, Mirahmadi M, Shahryari M, Hasanzadeh M, Mahmoudi M, Sanjar Moussavi N, Attaranzadeh A, Bahrami AR. Comparison of derivation and successful purification of human adipose and bone marrow-mesenchymal stem cells. Journal of Knowledge & Health 2015;9(4):38-45.