

عواقب ژنتیکی پاساژ های متوالی در سلول های بنیادی مزانشیمال انسانی

دکتر حمید پورجعفری*، دکتر بهاره پورجعفری**، فهمیه طالب زاده***، دکتر علیرضا زمانی****
دکتر سیدمحمد حسینی پناه*****، حسین فضلی*****

دریافت: ۹۱/۵/۲ ، پذیرش: ۹۱/۱۰/۱۲

چکیده:

مقدمه و هدف: سلول های بنیادی بوسيله دو ویژگی منحصر بفرد خود مشخص می شوند. یکی از آن ها قدرت تکثیر بالا و دیگری توانایی تمایز به بافت های مختلف است. هر روز در سراسر دنیا از جمله در ایران نتایج کار های جدید منتشر می شود که نشان دهنده رشد فزاینده کار روی موضوع درمان بکمک سلول های بنیادی است. کار با سلول های بنیادی با منشا های گوناگون، از جمله سلول هایی با منشا جنینی و بالغ (مانند مغز استخوان، ریشه دندان، بند ناف و غیره) در حال انجام و پیشرفت است. هدف از انجام این مطالعه روشن نمودن ایقا و پایداری مواد ژنتیکی سلول های بنیادی مزانشیمال انسانی در طی کشت های متوالی در شرایط آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی همدان بود.

روش کار: در یک مطالعه تجربی، بند ناف به عنوان یک منبع غنی از سلول های بنیادی انسانی به کار گرفته شد. سلول های بنیادی استخراج شده پس از رشد و تکثیر، تعدادشان زیاد شده و کف ظرف های کشت را در کشت های متوالی پر نمودند. در نتیجه انجام کشت های متوالی موفقیت آمیز، سلول ها پیر شدند و این موضوع که احتمالا موجب آسیب های ژنتیکی می شود بوسيله تکنیک کامت قابل شناسایی است. با استفاده از این تکنیک، کشت های اولیه یا جوان (کشت های شماره ۱ تا ۵)، کشت های با عمر متوسط (کشت های شماره ۸ تا ۱۲) و کشت های پیر (کشت های شماره ۱۵ تا ۱۸) با یکدیگر مقایسه شدند، همچنین کاریوتیپ سه گروه فوق الذکر، به کمک تکنیک های رنگ آمیزی ساده و نواری تهیه و با هم مقایسه گردیدند. اسلاید های میکروسکوپی متعددی از هر پاساژ تهیه گردید و سپس ۲۰ سلول به طور اتفاقی از اسلاید های مربوط به هر گروه انتخاب شدند. در همه سلول های انتخاب شده، آسیب های ژنتیکی بررسی شدند و شدت آسیب ها به کمک روش استاندارد از صفر تا چهار شماره گذاری گردیدند. میانگین شماره های داده شده در سه گروه با استفاده از روش غیر پارامتریک کروسکال-والیس مقایسه و مورد بحث قرار گرفتند.

نتایج: میانگین سه گروه جوان، میانی و پیر به ترتیب ۰/۴، ۲/۸ و ۳/۶ بود. کاریوتیپ های آماده شده مربوط به کشت های اولیه از نظر ساختمانی و تعداد نرمال و کشت های مسن تر غیر طبیعی بودند. نتایج نشان دادند که پدیده پیری و عواقب آن از جمله آسیب مواد ژنتیکی باید در کار با سلول های بنیادی در کشت های متوالی در نظر گرفته شوند. نتیجه نهایی: از سلول های بنیادی مزانشیمال گرفته شده از خون بند ناف انسان در شرایط آزمایشگاهی همدان، تنها آن هایی قابل استفاده برای کارهای پژوهشی هستند که مربوط به کشت های جوان (زیر کشت شماره پنج) بودند. توصیه می شود کشت های بالاتر از شماره پنج تنها برای اهداف آموزشی بکار روند و بهتر است کاری مشابه با این طرح در این گونه آزمایشگاه های تحقیقاتی انجام شود.

کلید واژه ها: آسیب ژنتیکی / بند ناف / پیری / سلول های بنیادی

* استاد گروه پزشکی مولکولی و ژنتیک دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی همدان (h_pourjafari@yahoo.com)

** دکتری حرفه ای پزشکی دانشگاه علوم پزشکی همدان

*** کارشناس آزمایشگاه پزشکی مولکولی دانشگاه علوم پزشکی همدان

**** دانشیار گروه ایمونولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی همدان

***** استادیار گروه آناتومی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی همدان

***** کارشناس آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه علوم پزشکی همدان

مقدمه :

سلول های بنیادی بوسیله ویژگی های منحصر به فردشان مشخص می گردند (۱). یکی از ویژگی های آنها توانایی تکثیر بالا و دیگری قدرت تمایز منحصر بفردشان به بافت های گوناگون است (۲). امروزه سعی بر آن است تا از سلول های بنیادی گرفته شده از انسان که توانایی تمایز بالایی داشته و در آزمایشگاه قابلیت نگهداری و پاساژ دارند برای اهداف درمانی استفاده شوند. در زمان شروع طرح حاضر تکنولوژی تهیه، نگهداری، تمایز و استفاده از سلول های بنیادی از خون بند ناف در همدان وجود نداشت. محققین بر آن بودند تا با انجام این طرح قدمی در راه شروع چنین پروژه هایی بردارند.

اصولا کار با سلول های بنیادی با منشا های گوناگون در حال انجام است، از جمله سلول هایی با منشای جنینی و بالغ، مغز استخوان، خون، ریشه دندان، بند ناف و غیره که به عنوان مخازن سلول های بنیادی بالغ مورد استفاده قرار می گیرد (۳-۶).

سلول های تهیه شده بایستی مورد آزمون های راستی سنجی قرار گیرند. به عبارت دیگر گروه باید اثبات می نمود که سلول های نهایی سلول های بنیادی است و در نتیجه قابل تمایز می باشند. در کار حاضر برای این منظور از ویژگی های مورفولوژیکی (۷) سیتوژنتیکی (۸) و ایمونوهیستوشیمی (۹) استفاده گردید. از سوی دیگر از آنجایی که در نتیجه کشت های متوالی سلول های بنیادی دچار پدیده پیری می شوند (۱۰، ۱۱)، این امر موجب آسیب ماده ژنتیکی آن می شود (۱۰). یکی از روش های بررسی آسیب های ژنتیکی comet assay است که برای اولین بار بوسیله سینگ و همکارانش (۱۲) بکار گرفته شد. البته روش مذکور تاکنون بارها مورد اصلاح قرار گرفته است و ما از یکی از این روش های اصلاح شده استفاده نمودیم (۱۳).

هدف از این مطالعه عبارت است از تعیین پاساژی که بهترین شرایط ژنتیکی سلولهای بنیادی استخراج شده از خون بند ناف در شرایط آزمایشگاهی همدان در آن حاصل می شود.

روش کار:

الف. جدا سازی سلول های مزانشیمی از خون بند ناف: در این مطالعه تجربی که در سال ۱۳۸۹ انجام شده است ،

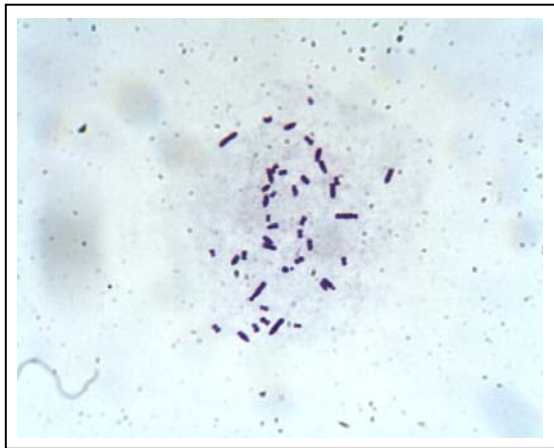
جداسازی و اثبات ماهیت سلول های مزانشیمی، با استفاده از روشهای معمول و تغییرات جزئی قابل اجرا در آزمایشگاه مرکز تحقیقات پزشکی مولکولی همدان، انجام شد (۱۴). جهت جلوگیری از چسبیدن مونوسیتها ابتدا بلافاصله بعد از خروج جفت آنرا به محل دیگری انتقال داده و سپس با قرار دادن سوزن در ورید ناف خونگیری از جفت صورت گرفت که این عمل قبل از لخته شدن و جدا شدن بند ناف بود. گرفتن خون ورید ناف در کیسه های مخصوص گرفتن خون سازمان انتقال خون انجام شد که از قبل نیز در کیسه ها ماده ضد انعقاد اضافه شده بود. کیسه ها بلافاصله در فلاسکهای مخصوص به آزمایشگاه انتقال داده شدند. ۳۰ میلی لیتر از خون همراه با ۱۰ میلی لیتر محلول فایکول در لوله های ۵۰ میلی لیتری پلی پروپیلن ریخته و بمدت ۳۰ دقیقه در حرارت اتاق با سرعت ۲۵۰۰ دور سانتیفریوژ گردید بعد از برداشتن سرم رویی، سلولهای روی بخش فایکول جمع آوری شد. بعد با فسفات بافر سالین سلول ها شسته شد و بمدت پنج دقیقه در حرارت اتاق با دور ۱۵۰۰ بار سانتیفریوژ گردید سپس مایع رویی بر داشته شده و مجددا شسته شدند. در نهایت محلول رویی را دور ریخته و رسوب حاوی سلولهای مورد نظر به ظرفهای شش خانه ای انتقال داده شدند. این بخش با ۲۰ میلی لیتر بافر مخلوط شده و بمدت نیم تا یک ساعت در سرم جنین گاو (FBS) قرار گرفتند. سپس در محیط کشت مخصوص قرار داده شدند.

محیط کشت بعد از ۱۲ تا ۱۸ ساعت جهت جدا کردن سلولهای نجسیده به ظرف جدا شده و سپس هر سه روز یکبار تعویض گردیدند تا مجموعه سلولهای مزانشیمی شکل گرفتند. آنگاه جهت اثبات سلولهای مزانشیمی مارکرهای CD73 و CD105 که بطور اختصاصی در سلولهای بنیادی مزانشیمی بیان می شوند، با روش ایمینو هسیتوشیمی (۹) مورد بررسی قرار گرفتند.

ب. بررسی کاربوتایپ سلول های بنیادی: از آن جایی که تا این زمان کاربوتایپ سلول های مزانشیمی در آزمایشگاه تحقیقاتی دانشکده پزشکی همدان راه اندازی نشده بود، پروتکل مشخصی که با شرایط این آزمایشگاه جواب دهد، در دست نبود. لذا پروتکل های مختلف بررسی و در نهایت یکی (۱۵) پس از انجام تغییرات جزئی انتخاب شد و مطابق آن کاربوتایپ سلول های مزانشیمی تهیه و وضعیت کروموزومی آن ها گزارش گردید.

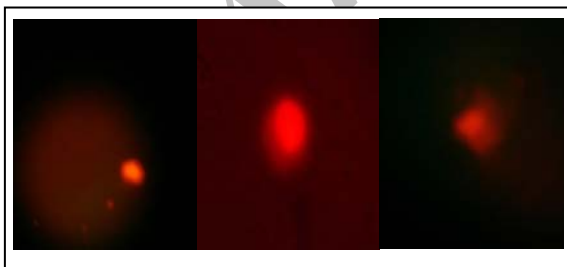


شکل ۱: گستره کروموزومی از سلول های مزانشیمال پاساژ ۵.



شکل ۲: گستره کروموزومی از سلول های مزانشیمال پاساژ ۱۰.

بررسی آسیب ژنتیکی در کشت های متوالی: شکل ۳ نمونه هایی از هریک از گروه ها را نشان می دهد.



شکل ۳: سمت راست، نمونه ای مربوط به کشت های اولیه، وسط، نمونه ای مربوط به کشت های میانی و بالاخره شکل سمت چپ مربوط به کشت های پیر می باشد.

جدول ۱ میانگین ها را در سه گروه پاساژ نشان می دهد. تفاوت بین نتایج گروه ها معنی دار بود ($P < 0.001$).

ج. بررسی آسیب های DNA در سلول های بنیادی مربوط به پاساژ های اول، پنجم و دهم: برای بررسی آسیب های DNA در سلول های بنیادی طی پاساژهای مختلف از روش استاندارد comet استفاده گردید (۱۷-۱۶). این روش بر اساس یک مرحله لیز سلولی با هدف جدا سازی پروتئین های وابسته به DNA استوار بوده و سپس با انجام الکتروفورز امکان رنگ آمیزی و مشاهده رشته های شکسته شده DNA فراهم می شود. اندازه دنباله هسته بیانگر میزان آسیبی است که به رشته DNA وارد شده است، زیرا DNA سالم به صورت دو رشته ای و متصل به پروتئین ها بوده و به سادگی بر اثر شرایط الکترولیز، برخلاف DNA شکسته شده، به طرف قطب آند حرکت نمی کند. اندازه دنباله بر اساس گلد استاندارد رایج مورد ارزیابی قرار می گیرد. این استاندارد اندازه نسبی دنباله را از صفر (سلول سالم و بدون دنباله) تا عدد چهار (سلول کاملا درهم ریخته و دنباله بلند) شماره گذاری کرده و امکان مقایسه عددی آسیب وارد آمده به DNA را فراهم می آورد (۱۴). دنباله در حقیقت قطعات شکسته شده DNA می باشند که طی حرکت از سلول لیز شده در طی الکتروفورز به دنبال سلول کشیده می شوند. هر چه آسیب شدیدتر باشد، مقدار DNA شکسته شده بیشتر و در نتیجه طول دنباله سلول بلندتر می شود.

از لام های مربوط به هر گروه پاساژ، تعداد ۲۰ سلول را به طور اتفاقی انتخاب و وضعیت دنباله را در آن ها زیر میکروسکپ فلوروسانت بررسی نموده و بر طبق الگوی استاندارد موجود به آن ها شماره داده شد. سپس از آن شماره ها میانگین گرفته و به عنوان اندازه دنباله ثبت و با سایر پاساژ ها مقایسه گردید. برای مقایسه سه میانگین بدست آمده از روش غیر پارامتریک کروسکال-والیس استفاده شد.

نتایج:

کاربوتایپ سلول های بنیادی: گسترش های کروموزومی (chromosome spread) تهیه شده مورد مطالعه قرار گرفت. تعداد، ساختمان و نیز الگوی باندینگ کروموزوم های مربوط به پاساژ های اولیه (اول تا پنجم) کاملا نرمال و در وضعیت خوب رنگ پذیری بودند (شکل ۱). اما کیفیت گستره های کروموزومی مربوط به پاساژ های ده به بالا قابل قبول و آنالیز نبود (شکل ۲).

روش کامت (Single Cell Gel Electrophoresis assay comet) روش نسبتاً ساده و حساسی برای تشخیص آسیب‌های DNA در سطح سلول‌های یوکاریوتیک است. به عنوان مثال کورتس و همکارانش (۱۸) در سال ۲۰۱۰ میزان آسیب DNA در زنان مکزیکی مبتلا به سرطان دهانه رحم را با کمک روش کامت مورد سنجش قرار دادند. همچنین ایبارا کاستیلا و همکاران (۱۹) نیز از همین متد برای سنجش میزان آسیب‌های DNA در بیماران دیابتی استفاده نمودند. آن‌ها در یک کار مورد-شاهدی نشان دادند که از نظر میزان آسیب DNA در بین دو گروه بیمار مبتلا به تحلیل ماهیچه‌ای نوع دوم (DM2) و گروه سالم (کنترل) تفاوت معنی‌داری وجود نداشت. مولر در سال ۲۰۰۵ نیز از روش کامت قلیایی (alkaline comet) برای تعیین سمیت برخی ترکیبات شیمیایی در محیط زندگی انسان استفاده نمود و در پایان اعلام کرد که روش کامت وسیله ارزشمندی برای تعیین تاثیر ژنوتوکسیک مواد مختلف بر انسان است (۲۰). در مطالعه حاضر از این روش برای ارزیابی و مقایسه میزان آسیب DNA در سلول‌های مزانشیمی در پاساژهای مختلف استفاده گردید و همان‌طور که در بخش نتایج اعلام گردید در پاساژهای بالا آسیب‌های ایجاد شده بیشتر بودند. بنابراین سلول‌های بنیادی حاصل از پاساژهای بالا (اصطلاحاً سلول‌های پیر)، همان‌طور که نشان داده شد دچار آسیب‌های ژنتیکی هستند و نباید در کارهای پژوهشی به کار روند و تنها می‌توان از آن‌ها در امور آموزشی و یا در کارهای که به این مهم (آسیب DNA) توجه دارند استفاده شوند. این نکته نیز باید تاکید شود که شماره پاساژهای ذکر شده و مشخصات آن‌ها مربوط به نتایج این پروژه در زمان و مکان خاص است که می‌تواند در آزمایشگاه‌های دیگر متفاوت باشد، اما نکته اصلی که مد نظر این مطالعه است توجه به آسیب ژنتیکی سلول‌های بنیادی طی پاساژهای متوالی است که این امر می‌تواند روی نتایج گرفته شده در کارهای تحقیقاتی که در آن‌ها از این سلول‌ها استفاده می‌شود تاثیر معنی‌داری بگذارد.

نتیجه نهایی:

نتایج به‌طور مشخص نشان دادند که در شرایط فعلی آزمایشگاه دانشگاه علوم پزشکی همدان، می‌بایست تنها از سلول‌های مزانشیمی استخراج شده از خون بند ناف انسان

جدول ۱: درجات مربوط به ۲۰ سلول انتخاب و بررسی شده در

شماره سلول	سه گروه پاساژ و میانگین مربوطه		
	درجات آسیب در پاساژهای اولیه (۱-۵)	درجات آسیب در پاساژهای میانی (۸-۱۲)	درجات آسیب در پاساژهای پیر (۱۵-۱۸)
۱	۰	۳	۴
۲	۱	۳	۴
۳	۱	۲	۴
۴	۰	۳	۳
۵	۰	۳	۴
۶	۰	۳	۴
۷	۰	۲	۲
۸	۱	۴	۴
۹	۱	۳	۴
۱۰	۰	۳	۴
۱۱	۱	۳	۳
۱۲	۱	۳	۴
۱۳	۰	۲	۴
۱۴	۰	۲	۴
۱۵	۱	۲	۴
۱۶	۰	۳	۳
۱۷	۰	۳	۴
۱۸	۱	۳	۲
۱۹	۰	۳	۳
۲۰	۰	۳	۴
جمع	۸	۵۶	۷۲
میانگین	۰/۴	۲/۸	۳/۶

بحث:

براساس گزارشات متعدد، همه کشت‌های سلولی پس از مدتی دچار مشکلات کروموزومی می‌شوند، از جمله کشت سلول‌های بنیادی جنینی. رایج‌ترین تغییرات کروموزومی در این گونه کشت‌ها تریزومی ۱۲ و تریزومی ۱۷ می‌باشند (۱۵) به خصوص هنگامی که کشت‌ها طولانی‌تر شوند (۱۶). وجود کاربوتایپ نرمال نشانه سلامت سلول‌های بنیادی و داشتن توانایی لازم در آزمایشات مربوطه است (۱۷). کاربوتایپ‌های تهیه شده از سلول‌های پاساژهای اولیه (تا پاساژ ۵) دارای وضعیت نرمال بیشتری بودند. به عبارت دیگر در شرایط آزمایشگاه ما سلول‌های مزانشیمال استخراج شده از خون بند ناف انسان برای استفاده‌های تحقیقاتی، که لازمه آن وجود سلول‌های سالم و دارای کلیه ویژگی‌های سلول‌های بنیادی می‌باشد، تنها طی پاساژهای اولیه بدست می‌آید. البته این نتیجه با گزارشات دیگر از این نظر که پاساژهای پایین‌دری پتانسیل‌های بالاتری هستند انطباق دارد (۱۶).

skin fibroblasts and keratinocytes. *Ann N Y Acad Sci* 2007;1100:424-30.

11. Nijnik A, Woodbine L, Marchetti C, Dawson S, Lambe T, Liu C, et al. DNA repair is limiting for haematopoietic stem cells during ageing. *Nature* 2007;447(7145):686-90.
12. Singh NP, McCopy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low level of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 1988; 175: 184-191.
13. Ivanov SD, Yashmanov VA, Kovanko EG, Vorobtsova IE, Poroshina TE, Bershtein LM. Comparative study of postradiation genotoxic changes in Mammalian cells by biochemical and cytogenetic methods. *Bull Exp Biol Med* 2006;142(6):679-82.
14. Pour-Jafari H. [Isolation of the mesenchymal stem cells from human umbilical cord blood and study of their DNA damage after different passages]. Final report of research work. Hamadan University of Medical Sciences, 2010. (Persian)
15. Meisner LF, Johnson JA. Protocols for cytogenetic studies of human embryonic stem cells. *Methods* 2008;45(2):133-41.
16. Buzzard JJ, Gough NM, Crook JM, Colman A. Karyotype of human ES cells during extended culture. *Nat Biotechnol* 2004;22(4):381-2.
17. Catalina P, Montes R, Ligerio G, Sanchez L, de la Cueva T, Bueno C, et al. Human ESCs predisposition to karyotypic instability: Is a matter of culture adaptation or differential vulnerability among hESC lines due to inherent properties? *Mol Cancer* 2008;7:76.
18. Cortés-Gutiérrez EI, Dávila-Rodríguez MI, Zamudio-González EA, Aguado-Barrera ME, Vargas-Villarreal J, Cerda-Flores RM. DNA damage in Mexican women with cervical dysplasia evaluated by comet assay. *Anal Quant Cytol Histol* 2010;32(4):207-13.
19. Ibarra-Costilla E, Cerda-Flores RM, Dávila-Rodríguez MI, Samayo-Reyes A, Calzado-Flores C, Cortés-Gutiérrez EI. DNA damage evaluated by comet assay in Mexican patients with type 2 diabetes mellitus. *Acta Diabetol* 2010 ;47(Suppl 1):111-6.
20. Møller P. Genotoxicity of environmental agents assessed by the alkaline comet assay. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2005;96 (Suppl 1):1-42.

در پاساژهای اولیه (اول تا پنجم) برای کارهای تحقیقاتی استفاده نمود. همچنین توصیه می شود کاری مشابه با این طرح در اینگونه آزمایشگاه های تحقیقاتی انجام شود تا از هدر رفتن مواد و نیز اتلاف وقت پرسنل جلوگیری شود.

منابع:

1. Hwang WS, Ryu YJ, Park JH. Evidence of a pluripotent embryonic stem cell line derived from a cloned blastocyst. *Science* 2004: 303: 1669-1674.
2. Rusnak AJ, Chudley AE. Stem cell research: cloning, therapy and scientific fraud. *Clin Genet* 2006; 70: 302-305.
3. Broxmeyer HE, Douglas GW, Hangoc G. Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:3828-3832.
4. Mareschi K, Biasin E, Piacibello W. Isolation of human mesenchymal stem cells: bone marrow versus umbilical cord blood. *Haematologica* 2001;86:1099-1100.
5. Wexler SA, Donaldson C, Denning-Kendall P et al. Adult bone marrow is a rich source of human mesenchymal "stem" cells but umbilical cord and mobilized adult blood are not. *Br J Haematol* 2003;121:368-374.
6. Jaiswal N, Haynesworth SE, Caplan AI. Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *J Cell Biochem* 1997;64:295-312.
7. Skoric D, Balint B, Petakov M, Sindjic M, Rodic P. Collection strategies and cryopreservation of umbilical cord blood. *Transfus Med* 2007; 17(2): 107-13.
8. Plaia TW, Josephson R, Liu Y, Zeng X, Ording C, Toumadje A, et al. Characterization of a new NIH-registered variant human embryonic stem cell line, BG01V: a tool for human embryonic stem cell research. *Stem Cells* 2006;24(3):531-46.
9. Koch TG, Heerkens T, Thomsen PD, Betts DH. Isolation of mesenchymal stem cells from equine umbilical cord blood. *BMC Biotechnol* 2007; 7:26.
10. Rattan SI, Ali RE. Hormetic prevention of molecular damage during cellular aging of human

Original Article

The Genetic Effects of Aging on Human Mesenchymal Stem Cells through Consecutive Subcultures

H. Pourjafari, Ph.D.^{*}; B. Pourjafari, G.P.^{**}; F. Talebzadeh, B.Sc.^{***}; A.R. Zamani, Ph.D.^{****}
S.M. Hoseinipannah, Ph.D.^{*****}; H. Fazli, B.Sc.^{*****}

Received: 23.7.2012 Accepted: 1.1.2013

Abstract

Introduction & Objective: Stem cells are determined by their unique features. One of them is high proliferation ability and the other is potency of differentiation to various tissues. The results of new works in various countries around the world including Iran show the growing momentum of works on stem cell therapy. Working with stem cells from different origins including the cells originated from fetal and adult origin (such as bone marrow, dental root, cord , etc) is in progress. The goal of this work was to clear the maintenance and stability of genetic materials of human mesenchymal stem cells through consecutive subcultures in our lab conditions in Hamadan University of Medical Sciences.

Materials & Methods: In an experimental work, human umbilical cord was used as a rich source of stem cells. Isolated stem cells, after proliferation phase, increased and filled the bottom of the flasks in consecutive passages. After some successive consecutive subcultures, stem cells aged and this may cause damages to genetic material that is evaluated in primary passages (passages number 1-5), middle passages (passages number 8-12) and late passages (passages number 15-18) by the single cell gel electrophoresis assay (comet assay). Also their karyotypes were examined; Solid technique and G-banding staining for chromosome analysis in the stem cells were employed. Several microscopic slides from each passage were prepared. Then 20 cells were randomly selected from the slides related to each group. In all selected cells, damages were examined and their degree of damages were scored based on the standard patterns, from 0 to 4. The averages were compared by Kruskal–Wallis test in different groups.

Results: Average scores related to three studied cell groups, primary, middle and late passages, were 0.4, 2.8 and 3.6, respectively. Prepared karyotypes from the cells belonging to passages 1-5 were normal but in the aged passages they were abnormal numerically and structurally. Our results showed that the aging phenomenon and its consequences such as DNA damages should be considered in the work with consecutive passages of stem cells.

Conclusion : We concluded that in our laboratory conditions, the stem cells taken from human umbilical cord blood are only usable for research purposes in early passages (below passage five). We recommend using passages more than five only for educational purposes in our laboratory; and it is better to do the same work in such research centers.

(*Sci J Hamadan Univ Med Sci 2013; 20 (1):32-37*)

Keywords: Aging / Genetic Damage / Stem Cells / Umbilical Cord

^{*} Professor, Department of Molecular Medicine & Genetics, School of Medicine
Hamadan University of Medical Sciences & Health Services, Hamadan, Iran. (h_pourjafari@yahoo.com)

^{**} General Practitioner

^{***} Molecular Medicine Lab, Hamadan University of Medical Sciences & Health Services, Hamadan, Iran

^{****} Associate Professor, Department of Immunology, School of Medicine

Hamadan University of Medical Sciences & Health Services, Hamadan, Iran.

^{*****} Assistant Professor, Department of Anatomy, School of Medicine

Hamadan University of Medical Sciences & Health Services, Hamadan, Iran.

^{*****} Microbiology Lab, Hamadan University of Medical Sciences & Health Services, Hamadan, Iran