پژوهش درپزشکی (مجله پژوهشی دانشکده پزشکی)
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی
دوره ۳۵، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۰، صفحات ۲۰۰ تا ۲۰۸

مقاله اصلی
(Original Article)

بررسی امکان استفاده از آنزیم‌های مختلف جهت استخراج سلول‌های بنیادی مزانشیمی از بافت چربی انسانی

مهشید الهی [۱]، مریم کبیرسلمانی [۲و ۳*]، عبدالحسین شیروی [۴]

[۱] عضو باشگاه پژوهشگران جوان، دانشگاه آزاد آسلامی، واحد دامغان
[۲] گروه ژنتیک مولکولی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری
[۳] بخش تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
[۴] دانشگاه آزاد اسلامی، واحد دامغان

چکیده

سابقه و هدف: *با توجه به موانع کاربرد بالینی سلول‌های بنیادی جنینی در پزشکی ترمیمی و امکان استفاده از سلول‌های بنیادی بزرگسالان به ویژه سلول‌های بنیادی مزانشیمی بافت چربی، بافت چربی به عنوان منبع سلولی مناسبی جهت سلول درمانی مطرح شده است. نظر به هزینه بالای استخراج متداول این سلول‌ها از بافت چربی با استفاده از کلاژناز نوع ۱ و ۴، هدف از انجام این مطالعه بررسی امکان استفاده از آنزیم های مقرون به صرفه با بازدهی مناسب به عنوان جایگزینی برای این آنزیم بود.*

روش بررسی: *فاز اول مطالعه به صورت اکتشافی انجام گرفت و در مرحله دوم، برای افتراق سلول‌های بنیادی مزانشیمی از بافت چربی انسانی مطالعه تجربی صورت گرفت. بافت چربی گرفته شده از جراحی لیپوساکشن در شرایط استریل به آزمایشگاه انتقال و مقدار مشابهی از بافت در گروه های مختلف تحت تأثیر آنزیم های مختلف در شرایط یکسان از نظر دمایی و زمانی قرار داده شد. سلول های حاصل از نظر مورفولوژی، تراکم و سرعت رشد، بیان مارکرهای سطحی ویژه و توانایی تمایز پذیری بررسی شدند.*

یافته‌ها: *در کشت اولیه مقدار سلول استخراج شده در بین گروه ها تفاوت‌هایی را نشان داد، اما پس از اولین پاساژ، تفاوتی از نظر رشد و یا قابلیت سلول‌ها در بیان مارکرهای سطحی و تمایز پذیری مشاهده نشد. در آنالیز فلوسیتومتری، بیش از ۹۵ درصد سلول‌ها نسبت به بیان مارکرهای مزانشیمی CD73, CD90, CD105 مثبت بودند. در تمامی گروه‌ها سلول‌ها قابلیت تمایز به رده‌های سلولی چربی و استخوانی را داشتند.*

نتیجه‌گیری: *در این تحقیق برای اولین بار نشان دادیم که استخراج سلول‌های بنیادی مزانشیمی از بافت چربی انسان بدون نیاز به آنزیم کلاژناز خالص و با استفاده از آنزیم کلاژناز ترکیبی به اضافه تریپسین که به مراتب در دسترس تر و مقرون به صرفه تر است، امکان پذیر می‌باشد و توان تمایزی و کیفیت رشد سلول های حاصله مشابه با سلول های استخراج شده با استفاده از آنزیم‌های خالص است.*

واژگان کلیدی: *سلول‌های بنیادی مزانشیمی، بافت چربی، آنزیم کلاژناز، هضم آنزیم.*

مقدمه

سلول‌های بنیادی از لحاظ منشأ به دو دسته عمده سلول‌های بنیادی جنینی و سلول‌های بنیادی بالغین تقسیم می‌شوند. محدودیت‌های موجود در کاربرد سلول‌های تمایز یافته بالغ و سلول‌های بنیادی جنینی در پزشکی ترمیمی و مهندسی بافت، بررسی امکان استفاده از سلول‌های بنیادی بالغ و القای پرتوانی در آن و یا سلول های تمایز یافته بالغ را به عنوان جایگزین‌های مناسب در مباحث سلول درمانی مطرح ساخت (۱). از مهم‌ترین سلول‌های بنیادی بالغین که امروزه توجه اکثر محققین را به خود جلب کرده است می‌توان به سلول‌های بنیادی مزانشیم اشاره کرد.

آدرس نویسنده مسئول: تهران، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، مریم کبیرسلمانی
(**e-mail:** maryam@nigeb.ac.ir)
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۰/۶/۲۱
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۰/۱۰/۱۵

Archive of SID
www.SID.ir

سلول‌های بنیادی مزانشیمی (*MSCs*)، برای اولین در سال ۱۹۶۶ در تحقیقات *Petrakova* و *Friedenstein*، که موفق به جداسازی سلول‌های اجدادی تشکیل دهنده استخوان از مغز استخوان موش آزمایشگاهی شدند، مطرح شد (۲) . این سلول‌ها، جمعیتی از سلول‌های بنیادی سوماتیک چند توانه می‌باشند که تاکنون در بافت‌هایی نظیر مغز استخوان، ماهیچه اسکلتی، مغز، بافت چربی، خون بند ناف، خون محیطی و بافت‌های پیوندی پوستی شناسایی شده‌اند. سلول‌های مزانشیمی، برای مارکرهای سطحی از جمله *CD29*، *D44*، *CD73*، *CD90*، *CD105*، *CD106* و *CD166* مثبت بوده و برای مارکرهای سطحی هماتوپویتیک و *HLA-DR* منفی می‌باشند (۳). این سلول‌ها صرفه نظر از منبع بافتی مربوط به آن، در پاره ای از خصوصیات نظیر توانایی تکثیر و خود نوسازی طولانی مدت تحت شرایط کنترل شده کشت سلول، مرفولوژی دوکی شکل، فیبروبلاست مانند و پتانسیل تمایز به دودمان مزودرمی و حتی غیر مزودرمی، مشترک می‌باشد (۴). سلول‌های مزانشیمی، پتانسیل تمایز به سلول‌های مزودرم احشایی، استئوبلاست، آدیپوسیت، کندروسیت و مایوسیت را دارا می باشند. همچنین در مطالعات اخیر نشان داده‌اند که در ریز محیط مناسب، سلول‌های مزانشیمی می‌توانند به کاردیومیوسیت و یا حتی سلول هایی از مشتقات غیر مزودرمی نظیر هپاتوسیت‌ها و نورون‌ها، تمایز خصوصیات ذکر شده، سلول‌های بنیادی مزانشیمی را تبدیل به منبع سلولی مناسب جهت کاربرد در مهندسی بافت و سلول درمانی ساخته است (۵).

اگر چه مغز استخوان به عنوان منبع اصلی جداسازی این سلول‌ها تصور می‌شود، وجود چندین خصیصه نظیر کاهش بارز در پتانسیل تمایز سلول‌ها در طی فرآیند افزایش سن و آسیب‌های وارده به فرد در هنگام برداشت نمونه، منجر به محدود شدن استفاده از مغزاستخوان به عنوان منبعی برای این سلول‌ها می‌باشد. امروزه توجه شایانی به بافت چربی به عنوان منبع سلول‌های مزانشیمی شده است. بافت چربی به آسانی و با حداقل ایجاد جراحت در فرد، قابل دستیابی می‌باشد و بازدهی سلول‌های حاصل صد برابر بیشتر از آنچه که در مغزاستخوان یافت می‌شود، می‌باشد (۶، ۷). در سال‌های اخیر دانشمندان توانستند سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی را در شرایط آزمایشگاهی تفکیک کنند. چربی‌های مختلف و زیرپوستی انباری فراوان، در دسترس و قابل ذخیره کردن به عنوان منبعی از سلول‌های بنیادی بالغ هستند. تقریبا تمام بافت‌های بالغ دارای سلول‌های بنیادی مزانشیمی هستند که از جمله می‌توان به مغز استخوان (۸)، خون محیطی(۹)، رگ‌های خونی و عضلات اسکلتی (۱۰)، پوست و کبد (۶) و بافت چربی (۷) اشاره نمود. در ابتدا، مغز استخوان به عنوان بهترین منبع برای استخراج سلول‌های بنیادی مزانشیمی مورد توجه قرار گرفت. پس از سال‌ها، با توجه به روش تهاجمی دسترسی به این منبع و امکان آسیب دیدن فرد در هنگام برداشت نمونه، امکان دسترسی به حجم بسیار محدود نمونه و کاهش بارز در پتانسیل تمایز سلول‌ها در طی فرآیند افزایش سن، محققین در صدد یافتن منابع مناسب‌تر دیگری برآمدند. با این رویکرد، با توجه به امکان دستیابی آسان‌تر به بافت چربی با حداقل جراحت فردی و دسترسی به حجم بالاتر نمونه و با بازدهی بالاتر از آنچه که در مغز استخوان یافت می‌شد، استفاده از بافت چربی در مقایسه با مغز استخوان به عنوان جایگزین مناسب‌تری از منبع سلولی برای استخراج سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان مطرح شد.

مطالعات نشان داده است که سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان و چربی از لحاظ رشد، پیری و تمایز چند رده‌ای تفاوت‌های بسیار اندکی دارند. به علاوه، سلول‌های مزانشیمی جدا شده از بافت چربی از نظر ریخت‌شناسی و حتی بیان نشانگرهای سطحی شبیه همان سلول‌های جدا شده از مغز استخوان هستند. بنابراین می‌توان از سلول‌های بنیادی مزانشیمی به دست آمده از بافت‌های مختلف در سلول درمانی استفاده کرد. اینکه چه نوع نوعی مورد استفاده قرار گیرد بستگی به این دارد که کدام بافت در دسترس‌تر است. نشان داده شده که بافت چربی انسانی، منبع بافتی مناسبی برای جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی می‌باشد چرا که این بافت به راحتی و به طور روتین در مقادیر مناسب از جراحی لیپوساکشن در دسترس می‌باشد و بازده سلولی آن نسبت به منبع بافتی مغزاستخوان بسیار بالاتر می‌باشد (۱۱). سلول‌های بنیادی به دست آمده از بافت چربی انسانی، سلول‌هایی چند توانه بوده و قادر به بیان خصوصیات بیوشیمیایی و مورفولوژیک آدیپوسیت‌ها، استئوبلاست‌ها، کندروسیت‌ها و مایوسیت‌ها تحت شرایط کشت مناسب می‌باشند. همچنین نشان داده‌اند که توانایی تولید تعداد کافی سلول جهت کاربردهای مهندسی بافت و سلول درمانی را دارند (۱۲).

سوالی که در ارتباط با این تحقیق مطرح می‌شود این است که آیا استفاده از آنزیم ترکیبی کلاژناز به اضافه تریپسین برای تامین سلول‌ها مقدور است یا خیر؟

Archive of SID

www.SID.ir

مواد و روشها

در این مطالعه، پس از اخذ موافقت از کمیته اخلاق و مجوز کتبی از بیماران جهت استفاده از نمونه‌های بافت اهدایی در تحقیقات، نمونه‌های بافت چربی در طی جراحی لیپوساکشن در ظروف شیشه‌ای دردار استریل حاوی بافر HBSS (Hanks Buffer Salt Solution) و آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین و استرپتومایسین به آزمایشگاه انتقال داده شدند. سپس در شرایط استریل زیر هود، کشت سلولی نمونه‌ها با بافر PBS (Phosphate Buffer Saline) حاوی آنتی‌بیوتیک چندین بار شستشو داده شدند و پس از جدا کردن بافت‌های زائد، بافت چربی با استفاده از تیغ جراحی تا حد امکان ریز گردید. سپس در محلول حل کننده بافت چربی شامل محیط کشت DMEM (Dubleco's Modified Eagles Medium)(Gibco, Invitrogen Corporation USA) و یکی از آنزیم های مورد مطالعه شامل کلاژناز نوع یک (Gibco, Invitrogen) (با غلظت ۲۵۰U/ml، کلاژناز نوع چهار با غلظت ۲۵۰U/ml (Gibco, Invitrogen)، کلاژناز ترکیبی (Wako) و کلاژناز ترکیبی به اضافه تریپسین (Sigma) به مدت ۶۰ دقیقه در انکوباتور شیکر در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. در مرحله بعد، با دور ۱۰۰۰rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شدند تا پلت سلولی تشکیل گردد. سپس محیط رویی تخلیه شد و سلول‌ها با محیط DMEM/F12 (Gibco, Invitrogen Corporation, USA) حاوی ۲۰٪ سرم FBS (FetalBovine Serum)(Sigma) معلق شده و در هر خانه از ظروف ۶ خانه ای کشت داده شدند. قبل از کشت سلول‌ها در هر روش، سلول‌ها از نظر در صد بقا پس از هضم آنزیمی مورد بررسی قرار گرفتند و در تمامی گروه‌ها، بیش از ۹۵ درصد از سلول‌ها زنده بودند. ظروف کشت به انکوباتور CO_2 با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد منتقل گردیدند. بعد از ۲ روز، محیط رویی به آرامی خارج و پس از شستشو با PBS محیط DMED/F12 گرم و تازه به آرامی به آن اضافه گردید. در گروه‌های مختلف که تحت تاثیر آنزیم‌های متفاوتی قرار گرفته بودند، سلول‌ها از نظر مورفولوژی و روند رشد، مورد بررسی کیفی قرار گرفتند. محیط سلول‌ها هر ۳-۲ روز یک بار به مدت حدود دو هفته تعویض شد تا سلول‌ها در هر گروه به تراکم مناسب رسیدند. سپس پاساژ اول صورت گرفت، به این ترتیب که سلول‌ها با استفاده از Trypsin/EDTA ۰/۲٪ (Gibco, Germany) از کف ظروف کشت کنده شده و به نسبت ۱:۳ کشت داده شدند. در حدود ۱۰-۱۵ روز پس از هر پاساژ، پاساژ بعدی انجام شد. این سلول‌ها پس از پر کردن کف ظرف کشت، در پاساژ مورد نظر منجمد شدند تا در مرحله بعدی تحقیق جهت آنالیز مارکرهای سطحی و تمایز به بافت چربی و استخوان استفاده شوند. برای انجماد از DMSO (Dimethyil Sulfoxide: Sigma,USA) ۱۰ درصد، FBS ۱۰ درصد و DMEM ۸۰ درصد استفاده شد. هر فلاسک ۲۵ سانتی‌متری به ۵ ویال تقسیم شد.

بعد از خالص شدن این سلول‌ها، شناسایی مارکرهای اختصاصی آنها از طریق مجاور کردن آنها با آنتی‌بادی‌های مونوکلونال و انجام فلوسیتومتری صورت گرفت. روش کار بدین صورت بود که سلول‌های چسبنده به کف فلاسک توسط Trypsin/EDTA جدا شده و در یک فالکون ۱۵ میلی‌لیتری ریخته و با دور ۱۲۰۰ rpm و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ گردید. سپس محلول رویی را دور ریخته و رسوب سلولی شمارش گردید. پس از شمارش، سلول‌ها با بافر شستشو (wash buffer) حاوی PBS استریل و FBS دو درصد در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با دور ۲۱۰۰ rpm سانتریفوژ گردید. مرحله فوق مجددا تکرار گردید. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از رسوب را در یک میکروتیوپ ۱/۵ میلی‌لیتری ریخته و با ۵۰۰ میکرولیتر سرم استریل (Goat serum) به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار دادیم. سپس محلول شستشو تا حجم نهایی ۱ میلی‌لیتر اضافه شد و به مدت ۴ دقیقه با دور ۲۱۰۰rpm سانتریفوژ گردید. محلول رویی را دور ریخته و رسوب سلولی شمارش گردید. بعد از شمارش، غلظت مناسبی از آنتی‌بادی های مورد نظر شامل CD73، CD90، CD105، CD31، CD34 و CD45 در محیط تاریک به آن اضافه و به مدت نیم ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سپس به محلول فوق ۵۰۰ میکرولیتر پارافرمالدئید ۴ درصد اضافه نموده و توسط دستگاه فلوسیتومتر بررسی گردید (سلول‌ها تا زمان بررسی در محیط تاریک و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند). این آزمایش سه بار و با استفاده از نمونه‌های گرفته شده از سه بیمار و در هر گروه در پاساژ چهارم از کشت سلول‌ها انجام پذیرفت (۱۳).

برای القاء تمایز در سلول‌های استخراج شده در این مطالعه به سلول‌های چربی از محیط کشت آدیپوژنیک، حاوی مقدار ۰/۰۰۵ گرم آسکوربیک اسید، ۰/۰۰۵ گرم ایندومایسین، ۱/۳۴ گرم پودر DMEM و ۰/۳۷ گرم بی‌کربنات سدیم استفاده گردید. تعداد ۳۰۰۰۰۰ سلول در محیط کشت القاء کننده فوق در پلیت‌های ۶ خانه‌ای به مدت ۱۵ روز در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO_2 کشت داده شد.

Archive of SID
www.SID.ir

لازم به ذکرست که محیط کشت تمایزی هر ۳ روز یک بار با محیط کشت تمایزی تازه تعویض می‌شد. اثبات تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سلول‌های چربی توسط رنگ‌آمیزی Oil Red صورت گرفت. بدین ترتیب که سلول‌ها را با پارافرمالدئید ۴ درصد فیکس کرده و پلیت به مدت ۲۰ دقیقه در یخچال قرار داده شد. سپس به مدت ۵ دقیقه در محیط آزمایشگاه قرارگرفته و بعد از آن پارافرمالدئید از روی سلول‌ها بر داشته و با PBS شستشو داده شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر رنگ اضافه شد و به مدت ۴ الی ۵ دقیقه در محیط آزمایشگاه قرار گرفت. سپس رنگ را برداشته و با PBS شستشو داده و زیر میکروسکوپ حضور واکوئل‌های حاوی قطرات چربی در داخل سیتوپلاسم سلول‌ها مشاهده می‌گردید. این آزمایش سه بار و با استفاده از نمونه‌های گرفته شده از سه بیمار و در هر گروه در پاساژ چهارم از کشت سلول‌ها انجام پذیرفت (۱۱، ۱۶-۱۴).

به منظورالقاء تمایزدر سلول‌های استخراج شده در این مطالعه به سلول‌های استخوانی از محیط کشت استئوژنیک، حاوی ۱/۳۵ گرم پودر DMEM (High Glucose) و ۱/۳۷ گرم بی‌کربنات سدیم همراه با القاءگرهای اسید آسکوربیک (۰/۰۰۵ گرم)، دگزامتازون و بتا گلیسرول فسفات استفاده گردید. تعداد ۳۰۰۰۰۰ سلول در محیط کشت القاء کننده فوق در پلیت‌های ۶ خانه‌ای به مدت ۱۹ تا ۲۱ روز در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO_2 کشت داده شد. لازم به ذکر است که محیط کشت تمایزی هر ۳ روز یک بار تعویض می‌شد. اثبات تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سلول‌های استخوان توسط رنگ‌آمیزی Alizarin Red صورت گرفت. بدین ترتیب که سلول‌ها بعد از فیکس شدن توسط متانول، به مدت ۲ الی ۳ دقیقه در دمای محیط تحت تاثیر محلول ۲۵ درصد رنگ Alizarin Red قرار گرفتند. این آزمایش سه بار و با استفاده از نمونه‌های گرفته شده از سه بیمار و در هر گروه در پاساژ چهارم از کشت سلول ها انجام پذیرفت (۱۱، ۱۶-۱۴).

یافته‌ها

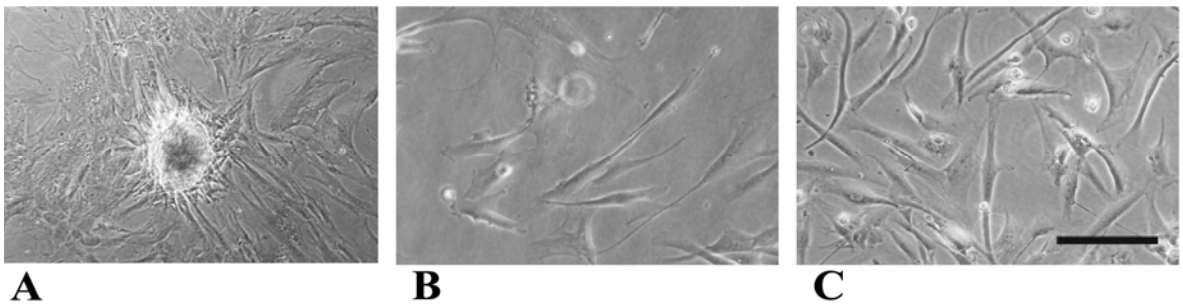
نتایج حاصل از هضم آنزیمی در تمامی گروه‌ها در کشت اولیه، سلول‌هایی با مورفولوژی چند ضلعی، پهن و دوکی شکل بود (شکل 1A). مقدار سلول استخراج شده از بافت چربی با توجه به آنزیم مورد استفاده درکشت اولیه تفاوت‌هایی را نشان داد. بدین صورت که آنزیم کلاژناز نوع چهار، کلاژناز نوع یک، ترکیبی با تریپسین، کلاژناز ترکیبی همراه با آنزیم تریپسین به ترتیب دارای اثر مثبت بر روی تعداد سلول‌های بنیادی اولیه بودند. در پاساژ یک، این سلول‌ها شروع به ازدیاد کردند و سرعت رشد بیشتری گرفتند (شکل 1B). سلول‌های دوکی شکل نسبت به سلول‌های پهن و مکعبی با سرعت بیشتری در حال تقسیم بودند، به طوری که پس از اولین پاساژ، سلول‌های دوکی شکل بیشترین درصد سلولی را تشکیل دادند و صرف نظر از نوع هضم آنزیمی، سلول‌ها در تمامی گروه‌ها همگن‌تر شده و آهنگ رشد سریع‌تری داشتند و در زمان کوتاه‌تری کف ظرف رشد را پر کردند. در پاساژهای بعدی، در نهایت تعداد سلول‌های دوکی افزایش یافت، به طوری که این سلول‌ها در پاساژ چهارم جمعیت هموژنی از سلول‌های دوکی شکل با هسته‌های مشخص و تیپیک سلول‌های بنیادی مزانشیمی را نشان دادند (شکل 1C). در پاساژهای سوم به بعد، علی‌رغم این که درکشت اولیه مقدار سلول استخراج شده از بافت چربی با توجه به آنزیم مورد استفاده تفاوت‌هایی را نشان می‌داد، تفاوت محسوسی در سرعت رشد سلول‌ها در گروه‌های مختلف قابل رویت نبود. اشکال A-C از شکل ۱ مربوط به گروه هضم آنزیمی با آنزیم ترکیبی کلاژناز و تریپسین است. الگوی رشد و مورفولوژی در گروه‌های دیگر نیز شباهت بالایی به این اشکال داشت.

نتایج حاصل از آنالیز مارکرهای سطحی مثبت سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسانی توسط روش فلوسیتومتری نشان داد که سلول‌های چسبنده به کف فلاسک در تمامی گروه‌ها صرف نظر از نوع هضم آنزیمی به کار رفته در هنگام استخراج، هنگامی که با غلظت‌های مناسبی از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال CD105، CD90 و CD73 مجاور شدند، نسبت به مارکرهای CD73 ۹۷ درصد، CD90 ۹۵ درصد و CD105 ۱۰۰ درصد مثبت بودند (شکل ۲).

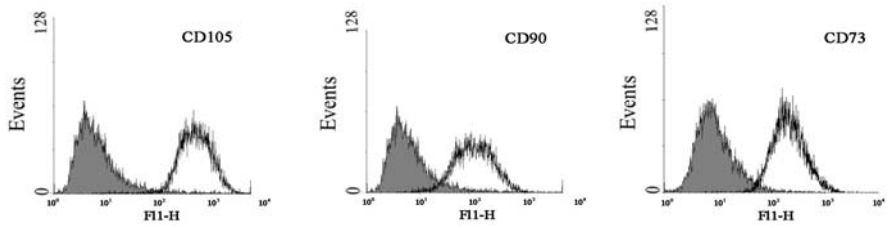
نتایج حاصل از این آنالیز در شکل ۳ آمده است. جهت بررسی عدم بیان مارکرهای سطحی منفی سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسانی در سلول‌های استخراج شده در این مطالعه، سلول‌های چسبیده به کف فلاسک با غلظت‌های مناسبی از آنتی‌بادی های مونوکلونال CD34, CD45 و CD31 مجاور شدند. نتایج حاصل از آنالیز فلوسیتومتری نشان داد که سلول‌های فوق نسبت به مارکرهای سطحی CD34، CD31 و CD45 منفی بودند (شکل ۳). نتایج حاصل از آنالیزهای فلوسیتومتری نشان داد که بیش از ۹۵ درصد از سلول‌های استخراج شده در این مطالعه از نظر بیان مارکرهای سطحی مشابه با الگوی بیانی این مارکرها در سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسانی مشابه هستند. اشکال آورده شده مربوط

Archive of SID

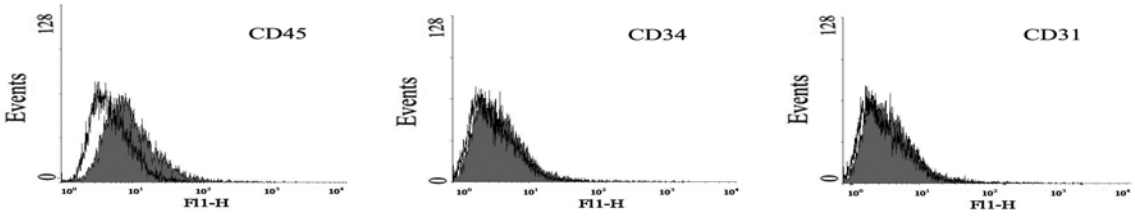
www.SID.ir



شکل ۱. نمای میکروسکوپی سلول‌های کشت داده شده. A: در گروهی که با آنزیم کلاژناز ترکیبی به همراه تریپسین استخراج صورت پذیرفت همانند دیگر گروه ها در کشت اولیه، سلول هائی با مورفولوژی چند ضلعی، پهن و دوکی شکل قابل مشاهده اند. B: در پاساژ یک از کشت های فوق سلول های دوکی شکل شروع به ازدیاد نموده و سرعت رشد آن ها افزایش می یافت. C: در پاساژ چهارم جمعیت یکنواختی از سلول های دوکی شکل با هسته های مشخص رویت شد.



شکل ۲ -نتایج حاصل از آنالیز فلوسیتومتری سلول های مزانشیمی جداسازی شده از بافت چربی انسان در مجاورت آنتی بادی های CD73 ، CD90 و CD105 قرار داده شد و بیان این مارکر های سطحی طبق اشکال فوق در این تحقیق به ترتیب از سمت راست ۹۵٪، ۹۷٪ و ۱۰۰٪ مشاهده شد.



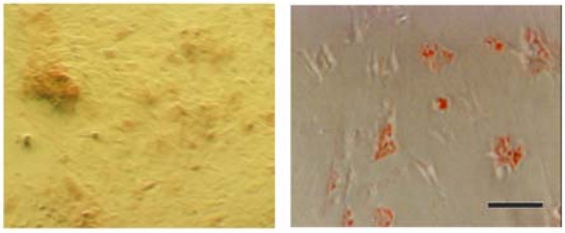
شکل ۳- نتایج حاصل از آنالیز فلوسیتومتری سلول های مزانشیمی جداسازی شده از بافت چربی انسان در مجاورت آنتی بادی های CD31و CD34, CD45 قرار داده شد و بیان این مارکر های سطحی طبق اشکال فوق منفی مشاهده شد.

به نتایج گروه هضم آنزیمی با آنزیم ترکیبی کلاژناز و تریپسین است. بیان مارکرهای سطحی در گروه های دیگر نیز شباهت بالایی به این گروه داشت.

نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی Alizarin Red پس از القای تمایز به سلول‌های استخوانی در سلول‌های استخراج شده در این مطالعه در تمامی گروه‌ها صرف نظر از نوع هضم آنزیمی به کار رفته در هنگام استخراج نشان دهنده رسوب ماتریکس مینرالیزه به رنگ نارنجی در پلیت‌های سلولی بود که حاکی از توانایی تمایز پذیری این سلول‌ها به سلول های استئوبلاست است (شکل۴A). نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی Oil Red نیز حاکی از توانایی تمایزپذیری سلول‌های استخراج شده در این مطالعه در تمامی گروه‌ها صرف نظر از نوع هضم آنزیمی به سلول‌های بافت چربی بود. در شکل ۴B قطرات چربی ذخیره شده در این سلول‌ها و مورفولوژی خاص سلول‌های چربی قابل مشاهده است. نتایج حاصل از آنالیزهای عملکردی سلول های استخراج شده در این مطالعه نشان دهنده توان تمایز پذیری چندگانه این سلول‌ها به سلول‌های بافت مزانشیمی است که از ویژگی‌های خاص سلول‌های بنیادی مزانشیمی است. اشکال آورده شده مربوط به گروه هضم آنزیمی با آنزیم ترکیبی کلاژناز و

www.SID.ir

تریپسین است. نتایج تمایز در گروه های دیگر نیز شباهت بالایی به این نتایج حاصل در این گروه داشت.



شکل ۴- نتایج رنگ‌آمیزی سلول‌ها. سلول‌های مزانشیمی تحت تاثیر محیط کشت استئوژنیک قرار گرفتند و به مدت ۱۵ روز و هر سه روز یک بار محیط کشت تعویض شد. سپس اثبات تمایز این سلول‌ها با رنگ آمیزی آلیزارین- رد مشاهده شد. به این صورت که سلول‌های بنیادی مزانشیمی رنگ آمیزی شده ایجاد رسوب ماتریکس مینرالیزه نارنجی رنگ نمودند که نشان دهنده تبدیل سلول‌های مزانشیمی به سلول های استئوبلاست است (A). سلول‌های مزانشیمی تحت تاثیر محیط کشت آدیپوژنیک قرار گرفتند و به مدت ۱۵ روز و هر سه روز یک بار محیط کشت تعویض شد. سپس اثبات تمایز این سلول‌ها با رنگ آمیزی اویل- رد مشاهده شد. به این صورت که در سلول‌های بنیادی مزانشیمی رنگ‌آمیزی شده قطرات چربی مشاهده شد که نشان دهنده تبدیل سلول‌های مزانشیمی به سلول‌های چربی است (B).

بحث

این تحقیق نشان داد با استفاده از آنزیم‌های کلاژناز نوع ۱، نوع ۴ و آنزیم کلاژناز ترکیبی به اضافه تریپسین امکان استخراج سلول‌های بنیادی مزانشیمی از بافت چربی انسانی وجود دارد. همان طور که در مقدمه ذکر گردید، تاکنون گزارشی در مورد استفاده از آنزیم کلاژناز ترکیبی به اضافه تریپسین نشده است و یا حداقل در دسترس قرار نگرفته است. سوالی که در ارتباط با آنزیم کلاژناز و بافت چربی مطرح می‌شود این است که آنزیم کلاژناز دارای چه مکانیزمی است که منجر به استخراج سلول‌های بنیادی از بافت چربی می‌گردد؟

بسیاری از موجودات پرسلولی دارای اجتماعات سازمان یافته‌ای از سلول‌های تخصصی شده، به نام بافت‌ها هستند. به طور معمول، سلول‌ها در بافت‌ها در تماس با شبکه‌ای پیچیده از ماکرومولکول‌های ترشح شده برون سلولی به نام ماتریکس برون‌سلولی هستند. این ماتریکس، سلول‌ها و بافت‌ها را در کنار یکدیگر نگاه می‌دارد و با ایجاد شبکه‌ای سازمان یافته در جانوران امکان مهاجرت سلول‌ها و برهم‌کنش آنها را با سایر سلول‌ها فراهم می کند. در بافت‌های پیوندی از جمله بافت چربی، ماتریکس برون سلولی به فراوانی وجود دارد و سلول‌ها در آن پراکنش یافته‌اند. این ماتریکس، غنی از پلیمرهای رشته‌ای به ویژه کلاژن است که تنش‌های مکانیکی وارد به بافت را تحمل می‌کند (۱۷). از آنجایی که سلول‌ها به ترکیبات ماتریکس متصل شده‌اند، لذا باید برای جداسازی این سلول‌ها از بافت چربی، آنزیمی را به کار برد که بتواند اتصال بین کلاژن موجود در ماتریکس و سلول را از بین ببرد. آنزیم کلاژناز این ویژگی را دارد و می‌تواند این اتصال را از بین ببرد و باعث تخریب ماتریکس سلولی گردد، در نتیجه سلول از ماتریکس خارج می‌شود و می‌توان آن را استخراج نمود.

بر اساس تحقیقات انجام شده، سلول‌های بنیادی مزانشیمی جدا شده از بافت چربی از نظر ریخت‌شناسی و بیان نشانگرهای سطحی شباهت بالایی به سلول‌های بنیادی مزانشیمی جدا شده از مغز استخوان دارند و در عین حال پتانسیل پاساژپذیری و تزاید بالاتری نسبت به این سلول‌ها دارند (۱۸). در مطالعه‌ای که از نظر عملکردی در خصوص رد پیوند در مقایسه با سلول‌های بنیادی مزانشیمی استخراج شده از مغز استخوان در میزبان غیرخودی صورت پذیرفت، توان بقا در نبود سرکوب کننده‌های سیستم ایمنی مشابه با عملکرد بنیادی مزانشیمی استخراج شده از مغز استخوان بود و این بدان معناست که این تحمل سیستم ایمنی بیمار به این سلول‌ها مشابه سلول‌های بنیادی مزانشیمی استخراج شده از مغز استخوان است (۱۹).

از نظر توان تمایز پذیری، هنگامی که این سلول‌ها در محیط‌های کشت القاگر مناسب قرار گیرند، توانایی تمایز پذیری بالایی به سلول‌های رده مزانشیمی شامل استخوان، غضروف و چربی را دارند که از این نظر نیز تفاوت چندانی در مقایسه با سلول‌های بنیادی مزانشیمی ندارند (۲۰). اگرچه، در مطالعاتی نیز نشان داده شده است که توان تمایز پذیری و بهبود شرایط بیمار با استفاده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی با منشا بافت چربی نسبت به مغزاستخوان بهتر است. برای مثال، در انفارکتوس قلبی و تمایز به سلول‌های شبه کبدی پتانسیل بالاتری دارند (۲۱). اخیرا Dmitrieva و همکاران ویژگی‌های عمومی عملکردی و تاثیرات درمانی سلول‌های مزانشیمی با منشاء مغز استخوان و چربی در ۴۳ بیمار اهدا کننده بررسی کردند و گزارش نمودند که در پاساژهای پایین هر دوی این سلول‌ها از نظر ایجاد تعداد

Archive of SID
www.SID.ir

کلونی‌ها، زمان دوبلینگ (سرعت تزاید) و ترشح مدیاتورهای سیستم ایمنی نظیر اینترلوکین ۶، فاکتور رشد ترانسفورمینک بتا و فاکتور رشد سلول های اپیدرمی عروقی توان مشابهی دارند، اما در پاساژهای بالاتر، سلول‌های بنیادی مزانشیمی با منشا مغز استخوان از پاساژ ۳-۴ به بعد علایم سالخوردگی و پیری را نشان می‌دهند و این در صورتی است که سلول‌های بنیادی مزانشیمی با منشا چربی تا پاساژ ۸ نیز علایمی از سالخوردگی نشان نمی دهند (۲۲).

این بدان معنی است که حتی بر فرض نمونه و بازدهی مساوی، با استفاده از سلول‌های مزانشیمی جدا شده از بافت چربی به منبع سلولی بالاتری دسترسی خواهیم داشت. لذا روی هم رفته، سلول‌های بنیادی مزانشیمی جدا شده از بافت چربی مزیت‌هایی نسبت به سلول‌های بنیادی مزانشیمی جدا شده از مغز استخوان دارند (۱۱).

جهت بهینه‌سازی روش‌های متداول استخراج سلول‌های بنیادی مزانشیمی از منابع مختلف به منظور فراهم‌سازی امکان استفاده عملی آن در بالین بیمار، توجه به سرعت ازدیاد منبع سلولی و پایین آوردن هزینه مواد مورد استفاده از جایگاه ویژه‌ای برخوردار است. با توجه به هزینه‌های بالای کشت سلولی باید با کمترین هزینه و با کارایی بالا شرایطی را برای کشت سلول فراهم نمود. یکی از مؤلفه‌هایی که می‌تواند در بهینه‌سازی شرایط جداسازی و پایین آوردن هزینه استخراج سلول‌های بنیادی مزانشیمی از بافت چربی مطرح باشد، انتخاب هضم آنزیمی آن است. در اغلب مطالعات پیشین، آنزیم کلاژناز نوع یک برای جداسازی سلول های بنیادی مزانشیمی از بافت چربی پیشنهاد شده است (۲۳). در یکی از گزارش‌ها نیز آنزیم کلاژناز نوع چهار مطرح شده است (۲۴). در این مطالعه، علاوه بر آنزیم‌های فوق، آنزیم کلاژناز ترکیبی به اضافه تریپسین و کلاژناز ترکیبی بدون تریپسین برای جداسازی سلول های بنیادی مزانشیمی از بافت چربی استفاده شد که تاکنون در این موارد گزارشی دیده نشد و یا شاید در دسترس قرار نگرفته است. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که در پاساژهای سوم به بعد، علی‌رغم این که درکشت اولیه مقدار سلول استخراج شده از بافت چربی با توجه به آنزیم مورد استفاده تفاوت هایی را نشان می‌داد، تفاوت محسوسی در رشد سلول‌ها در گروه‌های مختلف قابل رویت نبود. هم‌چنین نتایج حاصل از آنالیز مارکرهای سطحی مثبت سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسانی توسط روش فلوسیتومتری نشان داد که سلول‌های چسبنده به کف فلاسک در تمامی گروه‌ها صرف نظر از نوع هضم آنزیمی به کار رفته در هنگام استخراج بیش از ۹۵ درصد از سلول‌های استخراج شده در این مطالعه از نظر بیان مارکرهای سطحی مشابه با الگوی بیانی این مارکرها در سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسانی هستند. در گزارش‌های مختلف، از مارکرهای زیادی برای شناسایی سلول های بنیادی مزانشیمی با منشاء موشی و یا انسانی استفاده شده است (۲۱، ۲۷-۲۵). در این مطالعه، ما از CD مارکرهای مثبت و منفی مناسب و کافی برای شناسایی سلول‌های مورد مطالعه استفاده کردیم ونتایج حاصل نشان داد که بیش از ۹۵ درصد از این سلول‌ها، سلول‌های بنیادی مزانشیمی هستند. علاوه بر آن، نتایج حاصل از آنالیزهای عملکردی سلول‌های استخراج شده در این مطالعه نشان دهنده توان تمایزی چندگانه این سلول‌ها به سلول‌های بافت مزانشیمی بود که در تمامی گروه‌ها صرف نظر از نوع هضم آنزیمی به کار رفته در هنگام استخراج قابل رویت بود. لذا با توجه به نتایج فوق، تفاوتی که این کار تحقیقی با گزارش‌های پیشین دارد این است که با توجه به قیمت بالای آنزیم کلاژناز نوع ۱ و ۴ در مقایسه با قیمت پایین‌تر آنزیم کلاژناز ترکیبی با تریپسین نشان داد استخراج سلول‌های بنیادی مزانشیمی از بافت چربی انسان بدون نیاز به آنزیم کلاژناز خالص و با استفاده از آنزیم کلاژناز ترکیبی با تریپسین که به مراتب در دسترس‌تر و مقرون به صرفه‌تر از آنزیم های کلاژناز خالص نوع ۱ و یا ۴ است، امکان‌پذیر است و توان و کیفیت سلول‌های حاصل مشابه سلول‌های استخراج شده با استفاده از روش‌های پیشنهاد شده در گزارش‌های قبلی است. از آنجایی که سلول‌های بنیادی بالغ نسبت به سلول‌های بنیادی جنینی زودتر پیر می‌شوند و تا پاساژهای محدودی می‌توان از این سلول‌ها در سلول درمانی استفاده نمود، در نتیجه برای استخراج سلول‌های بنیادی مزانشیمی از بافت چربی انسانی نیاز به بافت‌های چربی انبوهی برای استخراج سلول مزانشیم است و همان طور که قبلا ذکر شد برای جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی از بافت چربی آنزیم کلاژناز مورد نیاز می‌باشد که تولید سلول‌های بنیادی مزانشیمی برای سلول درمانی با استفاده از آنزیم کلاژناز خالص (نوع ۱ و ۴) از نظر اقتصادی مقرون به صرفه نیست و دارای محدودیت‌هایی است که در این تحقیق به منظور کاهش محدودیت ذکر شده نشان داده شد که استخراج سلول‌های بنیادی مزانشیمی از بافت چربی انسانی با استفاده از آنزیم کلاژناز ترکیبی به اضافه تریپسین امری امکان‌پذیر و از نظر اقتصادی مقرون به صرفه خواهد بود.

Archive of SID
www.SID.ir

تشکر و قدردانی

نویسندگان بر خود لازم می‌دانند از جناب آقای دکتر مصطفی منظوری جراح بیمارستان تخصصی و فوق تخصصی قائم کرج برای همکاری نزدیک ایشان در تهیه نمونه‌های مورد استفاده در این مطالعه تشکر و قدردانی نمایند. تحقیق حاضر با استفاده از قسمتی از حمایت مالی بنیاد ملی نخبگان و ستاد راهبردی سلول‌های بنیادی متعلق به پروژه ۳۶۴ و ۳۸۷ پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک در سال ۱۳۸۹ انجام یافت.

REFERENCES

1. Romanov YA, Darevskaya AN, Merzlikina NV, Buravkova LB. Mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue: isolation, characterization, and differentiation potentialities. Bull Exp Biol Med. 2005; 140: 138-43.
2. Barry F, Murphy JM. Mesenchymal stem cells: clinical application and biological characterization. Cell Biol 2004; 36: 568-84.
3. Schwartz L, Maitournam H, Stolz JM, Ho Ba Tho MC, Halphen B. Growth and cellular differentiation: a physico-biochemical conundrum? The example of the hand. Medical Hypotheses 2003; 61: 45-51.
4. Armesilla-Diaz A, Elvira G, Silva A. Regulates the proliferation differentiation and spontaneous transformation of mesenchymal stem cells. Exp Cell Res 2009; 13: 4-7.
5. Sethe S, Scutt A, Stolzing A. Aging of mesenchymal stem cells. Ageing Res Rev 2006; 5: 91-116.
6. NO S, Yang Y, Appleford M, Bumgardner J, Haggard W, Ong JL. Bioceramics for tissue engineering applications– a review. Am J Biochem Biotech 2006; 2: 49-56.
7. Kim KM, Evans GRD. Tissue Engineering: The Future of Stem Cells. In: Ashammakhi N, Reis RL, editors. Topics in tissue engineering. 2005.
8. Ghung Y, Klimanaskaya I, Becker S, Marh J, Lu SJ, Johnson J. Embryonic and extraembryonic stem cell line derived from signal mouse blastomeres. Nature 2006; 439:216-19.
9. MR A. Stem cells in pathobiology and regenerative medicine. J Pathol 2009; 217:141-43.
10. Furth ME AA. Stem cells sources to treat diabetes. J Cell Bioche 2009; 106:507-11.
11. Pittenger MF, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science 1999; 284:143-47.
12. Gimble J GF. Adipose-derived adult stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential. Cytotherapy 2003; 5:362-69.
13. Talens-Visconti R, Bonora A, Jover R, Mirabet V, Carbonell F, Vicente Castell J, et al. Hepatogenic differentiation of human mesenchymal stem cells from adipose tissue in comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. World Journal Gastroenterol 2006;12: 5834-45
14. Phinney DG, Prockop DJ. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair--current views. Stem Cells 2007; 25:2896–902.
15. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy 2006; 8: 315–17.
16. Song L, TUAN R. Transdifferentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow. Faseb J 2004;18: 980-82

۱۷. عبادی م، واعظی غ. غشاء پلاسمایی سلول (ساختمان و عمل). چاپ اول، دامغان، نشر دانشگاه آزاد اسلامی، ۱۳۸۲.

18. Kim JW, Kim SY, Park SY, Kim YM, Kim JM, Lee MH, et al. Mesenchymal progenitor cells in the human umbilical cord. Ann Hematol 2004; 83:733–38.
19. Romanov YA, Darevskaya AN, Merzlikina NV, Buravkova LB. Mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue: isolation, characterization, and differentiation potentialities. Bull Exp Biol Med. 2005; 140: 138-43.
20. Paul A, Srivastava S, Chen G, Shum-Tim D, Prakash S. Functional assessment of adipose stem cells for xenotran splantation using myocardial infarction immunocompetent models: comparison with bone marrow stem cells. Cell Biochem Biophys 2011 Dec 29.
21. AI C. Adult mexenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. Cell physiol 2007; 213:341-47.

Archive of SID

www.SID.ir

22. Fukuchi Y, Nakajima H, Sugiyama D, Hirose I, Kitamura T, Tsuji K. Human PlacentaDerived Cells Have Mesenchymal Stem/Progenitor Cell. Stem Cells 2004; 22:649-58.

23. Dmitrieva RI, Minullina IR, Bilibina AA, Tarasova OV, Anisimov SV, Zaritskey AY. Bone marrow – and subcutaneous adipose tissue – derived mesenchymal stem cells: differences and similarities. Cell Cycle 2012; 11.

24. Raquel TV, Ramiro J, Vicente M, Francisco C, Jose VC, Maria JGL. Hepatogenic differentiation of human mesenchymal stem cells from adipose tissue in comparison with bone marrow mwsenchymal stem cells. Clin Res 2006; 12:5834-45.

25. Higuchia A, Chuanga CW, Lingc QD, Huange SC, Wange LM, Chena H, et al. Differentiation ability of adipose-derived stem cell separated from adipose tissue by a membrane filtration method. Journal of Membrane Science 2011; 366: 286-94.

26. Friedenstein AJ GU, Julagina NN. Fibroblast precurs Ors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. Exp Hematol 1979; 4:267-74.

27. Buhring H-J BV, Treml S et al. Novel markers for the prospective isolation of human MSC. Ann N Y Acad Sci 2007; 1106:262-71.

Archive of SID

www.SID.ir