جداسازی، تعیین هویت و ذخیره استاندارد سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی و پالپ دندان انسان

میثم گنجی بخش: جهاد دانشگاهی، مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران، بانک سلول‌های انسانی و جانوری، تهران، ایران، و دانشجوی دکتری تخصصی بیولوژی تولید مثل، گروه آناتومی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران. meysam_ganjy@yahoo.com

ابوالحسن شاهزاده فاضلی: دانشیار و متخصص ژنتیک پزشکی مولکولی، جهاد دانشگاهی، مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران، بانک سلول‌های انسانی و جانوری، تهران، ایران، وگروه بیولوژی سلولی و مولکولی، دانشگاه علم و فرهنگ، تهران، ایران.fazeli@ibrc.ir

ندا سادات گوهری: کارشناس ارشد ژنتیک، جهاد دانشگاهی، مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران، بانک سلول‌های انسانی و جانوری، تهران، ایران. N.gohari@yahoo.com

هدیه رحمتی: کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، جهاد دانشگاهی، مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران، بانک سلول‌های انسانی و جانوری، تهران، ایران. rahmati@ibrc.ir

زهرا الیاسی گرجی: دانشجو دکتری تخصصی بیوفیزیک، جهاد دانشگاهی، مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران، بانک سلول‌های انسانی و جانوری، تهران، ایران. elyasi@ibrc.ir

مهرناز ایزدپناه: دانشجو دکتری سلولی کاربردی، دانشگاه تهران، جهاد دانشگاهی، مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران، بانک سلول‌های انسانی و جانوری، تهران، ایران. izadpanah@ibrc.ir

شیوا محمدی: کارشناسی ارشد ژنتیک. جهاد دانشگاهی، مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران، بانک سلول‌های انسانی و جانوری، تهران، ایران. mohammadi@ibrc.ir

معصومه اسدی: کارشناس ارشد بافت شناسی و جنین شناسی. جهاد دانشگاهی، مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران، بانک سلول‌های انسانی و جانوری، تهران، ایران . masome.asadi@gmail.com

سپیده آشوری: دانشجوی دکتری تخصصی بیولوژی تولید مثل، دانشگاه تهران. جهاد دانشگاهی، مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران، بانک سلول‌های انسانی و جانوری، تهران، ایران. ashouri@ibrc.ir

***پروانه فرزانه**: دکتری تخصصی ایمنولوژی. استادیار، جهاد دانشگاهی، مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران، بانک سلول‌های انسانی و جانوری، تهران، ایران (*نویسنده مسئول). farzaneh@ibrc.ir

تاریخ دریافت: ۹۶/۱/۲۸ تاریخ پذیرش: ۹۶/۳/۲۳

چکیده

زمینه و هدف: با توجه به گسترش استفاده از کشت‌های سلولی در روند مطالعات و تحقیقات، لازم است کنترل کیفی و تایید هویت رده‌های استاندارد تحقیقاتی بیشتر مورد توجه قرار گیرد. سلول‌های بنیادی دارای دو ویژگی اصلی، پتانسیل تولید و تکثیر سلول‌هایی با خواص یکسان (خود نوزایی) و ایجاد انواع سلول‌های تمایز یافته هستند. سلول‌های بنیادی مزانشیمی در بافت‌های مختلفی حضور دارند. امروزه این سلول‌ها به صورت وسیعی در فرآیند درمان، پزشکی بازساختی و حوزه های مرتبط با آن استفاده می‌شوند. لذا هدف از انجام این تحقیق فراهم ساختن زیرساخت مطمئن و دسترسی آسان به این سلول‌ها برای پژوهشگران است.

روش کار: در این تحقیق بنیادی-کاربردی پس از جداسازی سلول‌ها از بافت چربی و پالپ دندان انسان و تایید عدم آلودگی آن ها به میکروارگانیسم‌های مهم نظیر مایکوپلاسما، تعیین هویت سلول‌های مزانشیمی با استفاده از روش‌های مختلف مانند بررسی و اندازه گیری خواص رشد آن ها، بررسی بیان مولکول‌های اختصاصی و قابلیت تمایز آن ها به سلول‌های چربی و استخوانی انجام شده است.

یافته‌ها: در این طرح تعداد شش رده سلول‌های بنیادی مزانشیمی از بافت چربی و پالپ دندان، جداسازی، تعیین هویت و ذخیره شد که این سلول‌ها از لحاظ بیانCD90، CD105 و CD29 مثبت بوده و از لحاظ بیان CD34 و CD45 منفی هستند. همچنین این سلول‌ها فاقد آلودگی باکتریایی، ویروسی و مایکوپلاسما هستند و قادرند در شرایط آزمایشگاهی به سلول‌های استخوانی و چربی تمایز یابند.

نتیجه‌گیری: معرفی رده‌های سلولی مزانشیمی با هویت و شناسنامه مشخص، منجر به تسهیل و تسریع تحقیقات زیست پزشکی در زمینه سلول‌های مزانشیمی انسانی همراه با کاهش قابل توجه هزینه‌ها در کشور خواهد شد.

کلیدواژه‌ها: سلول مزانشیمی انسانی، تعیین هویت، بافت چربی، پالپ دندان

مقدمه

سلول‌های بنیادی دارای دو ویژگی اصلی، پتانسیل تولید و تکثیر سلول‌هایی با خواص یکسان (خود نوزایی-Self-renewal) و ایجاد انواع

سلول‌های تمایز یافته هستند (۳-۱). این سلول‌ها بر اساس پتانسیل و توان تمایز به چندین گروه شامل، سلول‌های بنیادی همه توان (Totipotent Stem Cells)، پرتوان (Pluripotent Stem Cells)، چند توان (Multipotent Stem Cells)، و تک توان (Unipotent Stem Cells) طبقه بندی می‌شوند (۶-۴). در یک تقسیم‌بندی، سلول‌های بنیادی دارای دو منشا جنینی و بزرگسالان هستند. سلول‌های بنیادی جنینی از توده سلولی جنین در مرحله بلاستوسیست به دست می‌آیند و دسته دیگر سلول‌های بنیادی بزرگسالان هستند که در بسیاری از بافت‌های تخصص یافته بدن از جمله: بافت چربی، مغز استخوان، کبد، قرنیه و شبکیه چشم، پالپ عاج دندان و قسمت های مختلف بدن یافت می‌شوند (۹-۷).

سلول‌های بنیادی مزانشیمی جزء سلول‌های بنیادی بزرگسالان محسوب می‌شوند که در بافت‌های مختلفی یافت می‌شوند. این سلول‌ها می‌توانند در هنگام ایجاد عارضه و تخریب بافت، به روند بهبود و سلامت بافت کمک کنند و در بازساختی و ترمیم آن شرکت کنند. امروزه مطالعات زیادی در ارتباط با این سلول‌ها و روند استفاده از آن ها در فرآیند درمان بیماری‌ها به وسیله روش‌های سلول درمانی در دست انجام است. بنابراین سلول‌های بنیادی مزانشیمی یکی از موضوعات به روز علوم زیستی و پزشکی محسوب می‌شوند و این امر باعث گردیده است سرمایه گذاری‌های کلانی در حوزه تحقیقات و درمان بوسیله این سلول‌ها در کشورهای مختلف انجام گیرد (۱۰-۸).

با گسترش استفاده از کشت‌های سلولی در روند مطالعات و تحقیقات، تعداد گزارش‌ها مبنی بر عملکرد ضعیف و ناقص در این حوزه افزایش یافته است (۱۸-۱۰). در تعداد زیادی از این مطالعات، خطاها و آلودگی‌ها به علت عدم رعایت استانداردها، با نتایجی اشتباه گزارش شده‌اند (۲۷-۱۹). تأکید جامعه علمی جهانی مبنی بر اهمیت افزایش استانداردهای رده‌های سلولی مورد استفاده در تحقیقات، ضرورت این موضوع را نشان می‌دهد. به گونه‌ای که امروزه شرط پذیرفته شدن طرح‌های تحقیقاتی و اختصاص بودجه در بسیاری از مراکز نظیر موسسه ملی سلامت آمریکا (National Institutes of Health-NIH)، اثبات کیفیت و شناسنامه دار بودن رده‌های سلولی است. در نتیجه این امر برای چاپ نتایج تحقیقات حاصل از رده‌های سلولی نیز به یک امر متداول تبدیل گشته است (۳۱-۲۸). آزمایش‌های لازم برای اثبات استاندارد بودن رده‌های سلولی مستلزم صرف وقت و هزینه هستند و در بیشتر موارد نیاز به نیروی متخصص و با تجربه دارند که معمولاً فراهم کردن این امکانات برای مراکز و محققین امکان پذیر نیست. به همین دلیل دانشمندان سعی می‌کنند تا از مراکز ارائه دهنده این گونه خدمات کمک بگیرند و یا رده‌های سلولی مورد نیاز خود را از مراکز شناخته شده‌ای تهیه کنند که سلول‌ها را همراه با شناسنامه‌ی استاندارد و مطمئن به آن ها ارائه نمایند؛ به طوری که این موضوع به یکی از فعالیت‌های متداول بانک‌های سلولی تبدیل شده است (۳۱).

با توجه به تقاضای فراوان جامعه علمی کشور به سلول‌های مزانشیمی برای تحقیقات مختلف، در این طرح سلول‌های مزانشیمی انسانی از بافت چربی و پالپ دندان جداسازی، تعیین هویت و ارائه شده‌اند که نتیجه آن منجر به تسهیل و تسریع تحقیقات زیست پزشکی در زمینه سلول‌های مزانشیمی انسانی همراه با کاهش قابل توجه هزینه‌ها در کشور خواهد شد.

روش کار

جمع آوری بافت و انتقال به آزمایشگاه:

برای تهیه بافت های مورد نظر از اهدا کنندگان، ابتدا آن ها نسبت به این فرآیند توجیه شدند و پس از اخذ رضایت نامه کتبی از آن ها، بافت مورد نظر (دندان‌های کشیده شده (۵ نمونه) و بافت چربی (۳ نمونه) تهیه شده از Lipoaspirate) توسط کادر پزشکی جداسازی و آماده انتقال به آزمایشگاه کشت سلولی گردید و مطابق با الگوریتم شکل شماره ۱ مورد بررسی و آنالیز قرار گرفت. برای انتقال بافت چربی و پالپ دندان به آزمایشگاه از محلول استریل بافر فسفات (PBS- phosphate

شکل ۱- الگوریتم مراحل انجام کار از تهیه نمونه‌ها، کنترل کیفی و تعیین هویت سلول‌ها

buffered saline) همراه با دو درصد FBS، 1000 واحد بر میلی لیتر پنی سیلین و 1000 میکروگرم بر میلی لیتر استرپتومایسین استفاده گردید. پس از انتقال نمونه به آزمایشگاه، بافت های مورد نظر چندین مرتبه با محلول PBS شستشو داده شد. برای شستشو نمونه‌های بافت چربی تهیه شده از Lipoaspirate، ابتدا این نمونه‌ها به لوله فالکون استریل انتقال داده شدند و به آن ها محلول شستشو اضافه گردید. پس از مدت کوتاهی، قطعات بافت چربی روی سطح قرار گرفتند و سپس مایع زیرین که حاوی سلول‌های خونی بود، حذف شدند.

جداسازی سلول‌ها به روش هضم آنزیمی: در ابتدا محلول کلاژناز تیپ یک با غلظت ۰/۱ درصد در محلول بافر فسفات تهیه و با استفاده از فیلتر سرسرنگی۰/۲۲ میکرومتری استریل شد. سپس نمونه بافت چربی و پالپ دندان در لوله فالکون استریل حاوی محلول کلاژناز قرار گرفته و در بن ماری با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۴۰ دقیقه انکوبه شد. نمونه‌ها هر پنج دقیقه به مدت چند ثانیه با ضربات محکم تکان داده شد. پس از گذشت زمان انکوباسیون به نمونه‌ها محیط کشت DMEM (Glucose-Dulbecco's modified Eagle's medium) همراه با ۱۰ درصد FBS اضافه شد.

سپس نمونه‌ها از فیلترهای ۱۰۰، ۷۰ و ۴۰ میکرومتری عبور داده شدند و پس از سانتریفیوژ (با سرعت ۳۰۰×g به مدت ۷ دقیقه)، به رسوب حاصل از نمونه به میزان ۱۰ میلی لیتر محلول لیز کننده گلبول‌های قرمز اضافه شد و نمونه سانتریفیوژ گردید. در ادامه، به رسوب سلول‌ها محیط کشت DMEM همراه با ۱۰ درصد FBS اضافه گردید.

محلول لیز کننده گلبول های قرمز با مواد و شرایط ذیل تهیه شد: 155 mM NH4Cl; 5.7 mM K2HPO4; 0.1 mM EDTA, pH 7.3

حذف کردن سلول‌های مونوسیت و ماکروفاژ: برای حذف سلول های مونوسیت و ماکروفاژ از نمونه بدست آمده از مراحل قبل، سلول‌ها با غلظت یک میلیون سلول در هر میلی

لیتر محیط کشت به پلیت‌های شیشه ای استریل منتقل شده و به مدت یک ساعت در انکوباتور، انکوبه شدند. بعد از گذشت مدت انکوباسیون، مایع موجود در پلیت‌ها جمع آوری و به لوله فالکون استریل انتقال داده شد و با سرعت ۳۰۰g به مدت ۷ دقیقه سانتریفیوژ گردید. سلول‌های مونوسیت و ماکروفاژ به علت قابلیت بالای چسبندگی به ظروف پلاستیکی و شیشه‌ای در طی مدت یک ساعت به کف پلیت چسبیدند اما سلول‌های مزانشیمی به مدت زمان بیشتری برای اتصال به کف پلیت احتیاج داشتند، در نتیجه با استفاده از این خصوصیت مونوسیت‌ها و ماکروفاژها از سلول های مزانشیمی براحتی از یکدیگر جدا شدند (۳۴-۳۲).

بعد از اتمام سانتریفیوژ، سلول‌ها در ظرف‌های کشت سلولی با غلظت نیم میلیون سلول در هر میلی لیتر با محیط کشت DMEM همراه با ۱۵ درصد FBS، ۱۰۰ واحد بر میلی لیتر پنی سیلین و ۱۰۰ میکروگرمبر میلی لیتر استرپتومایسین به انکوباتور CO_2 دار منتقل شدند. بعد از گذشت ۲۴ ساعت محیط کشت فلاسک‌ها تعویض شد و بعد از آن هر سه روز یک مرتبه محیط کشت سلول ها تعویض شده و هنگامی که تراکم سلول ها به ۸۰ درصد رسید، پاساژ سلولی انجام گرفت.

کنترل کیفی و تعیین هویت سلول‌های بنیادی مزانشیمی: در این طرح برای هر نمونه سلولی، کنترل کیفی ویروسی همزمان با فرآیند کشت و کنترل کیفی میکربی شامل باکتری، قارچ، مخمر در هنگام کشت و همچنین در هنگام فریز سلول ها انجام گردید و پس از اطمینان از عدم آلودگی، اثبات بنیادی بودن، با بررسی قابلیت تمایز به سلول‌های استخوان‌ساز و چربی‌ساز و بررسی شاخص‌های سطحی خاص سلول‌های بنیادی مزانشیمی (CD45، CD29، CD90، CD34 وCD105) با روش فلوسایتومتری انجام شد. علاوه بر این، برای اثبات عدم اختلاط سلول ها با دیگر رده‌های سلولی و تعیین هویت رده‌های سلولی آزمون درون گونه‌ای (Short Tandem -STR Repeat) انجام شد. در بررسی‌های ویروسی از کیت‌های STRP-HIV-Detection kit (Sinaclon)، Hepatit B Detection kit (Sinaclon) و STRP-HCV-Detection Kit (Sinaclon) استفاده شد. برای انجام آزمون کنترل کیفی مایکوپلاسما با روش PCR، از تکنیک Multiplex PCR با کیت Mycoplasma (IBRC) Detection kit استفاده شد، که شامل هفت جفت پرایمر رفت و سه جفت پرایمر برگشت است.

تشخیص آلودگی مایکوپلاسما به روش رنگ آمیزی DNA (Hoechst): برای انجام آزمایش ابتدا یک لامل شیشه‌ای استریل در ظرف‌های کشت ۳۵ میلی متری قرار داده شد و مقدار ۲ میلی لیتر محیط کشت کامل به هریک از ظرف‌های آماده شده در مرحله قبل، اضافه گردید. سپس نیم میلی لیتر از سوسپانسیون یکنواخت سلولی (تعداد ۲×۱۰^{۵}) آماده شده به پتری دیش مربوطه اضافه شد و پتری دیش از نظر تراکم و پراکندگی سلول‌ها مورد بررسی میکروسکوپی قرار گرفتند (بهتر است در هنگام رنگ آمیزی سلول ها، تراکم سلولی در حدود۵۰ درصد باشد زیرا تراکم اندک و بسیار زیاد ممکن است تفسیر نتایج را با مشکل روبرو سازد). سپس ظرف‌های کشت به مدت یک روز در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد و مجهز به CO_2 انکوبه شدند. پس از اتمام زمان انکوباسیون و بررسی وضعیت سلول‌ها از لحاظ میکروسکوپی، محیط کشت موجود درظرف‌ها تخلیه شد و دو میلی لیتر از محلول فیکساتیو با رقت ۱:۲۳ (متانول: اسید اسیتیک) به ظرف ها اضافه شده و به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه گردید. سپس محلول فیکساتیو تخلیه شده و لامل ها در مجاورت هوا خشک گردیدند. پس از آن ۲ میلی لیتر از محلول هوخست تازه با رقت ۱:۱۰۰ به ظرف ها اضافه شده و به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی و دمای اتاق انکوبه شد. سپس محلول رنگی تخلیه شده و به منظور حذف بقایای رنگ هوخست، ظرف‌ها سه بار با آب مقطر شستشو داده شدند. پس از آخرین شستشو، آب مقطر موجود در ظرف ها تخلیه شد و لامل در مجاورت هوا کاملاً خشک گردید. برای هر لامل، لام برداشته و مشخصات هر نمونه جداگانه بر روی آن نوشته شد. سپس یک قطره از چسپ لامل بر روی هر لام قرار داده شد و لامل از سطحی که

سلول‌ها بر روی آن فیکس شده اند، بر روی لام ثابت شدند و لامل ها با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت با بزرگنمایی ۴۰۰ تا ۶۰۰ و فیلتر آبی بررسی شدند. لازم است به این نکته دقت شود که سلول هایی که برای انجام این تست استفاده می‌شوند، بایستی حداقل ۲ پاساژ در محیط فاقد آنتی بیوتیک کشت داده شوند.

آزمایش تشخیص آلودگی باکتریایی، قارچ و مخمر درکشت سلول‌ها: محیط‌های استفاده شده برای کشت باکتریایی شامل محیط تیوگلیکولات براث برای تشخیص انواع باکتری‌های هوازی و بی هوازی است. برای کشت ابتدا حدود ۰/۲ سی سی از نمونه مورد آزمایش به ۴ لوله حاوی محیط تیوگلیکولات و ۴ لوله حاوی محیط تریپتون سوی براث تزریق می‌گردد. نیمی از لوله‌های حاوی محیط تیوگلیکولات و تریپتون سوی براث در انکوباتور ۳۲ درجه قرار می‌گیرد و نیمی دیگر در دمای اتاق ۲۵-۲۰ نگهداری می‌شود. بمنظور تشخیص آلودگی لوله‌های آزمایش در روزهای ۳، ۷ و۱۴ از لحاظ آلودگی‌های باکتریایی و قارچی مورد بررسی و آنالیز قرار می‌گیرند.

برای بررسی سلول‌ها از نظر آلودگی مایکوپلاسمایی، از سلول‌های به دست آمده، استخراج DNA با استفاده از کیت IBRC انجام شد و DNA استخراج شده، برای بررسی آلودگی مایکوپلاسما با روش Multiplex PCR مورد ارزیابی قرار گرفت. در مرحله بعد محصولات PCR بر روی ژل الکتروفورز بررسی شد. در ادامه برای اطمینان از صحت نتایج از روش کشت میکروبی استفاده شد. بدین منظور نمونه هایی از کشت سلول‌های مزانشیمی در محیط کشت مایع اختصاصی مایکوپلاسما (PPLO Broth) کشت داده شده و نمونه‌های کشت یافته به مدت ۴ هفته در انکوباتور نگهداری و طی ۳ مرحله در محیط کشت جامد PPLO Agar کشت داده شدند. سپس هر یک از کشت‌ها از نظر میکروسکوپی و ماکروسکوپی مورد ارزیابی قرار گرفتند. درچند مورد برای اطمینان بیشتر از روش رنگ آمیزی DNA کمک گرفته شد.

تمایز به سلول‌های استخوانی (بررسی قابلیت Osteigenic): برای بررسی قابلیت تمایز سلول‌های بنیادی پالپ دندان به سلول‌های استخوانی، سلول‌های مورد نظر در پاساژ سوم در پلیت شش خانه و در محیط القا کننده تمایز به استخوان کشت داده شدند. بدین منظور سلول‌ها در محیط پایه DMEM حاوی ۱۰ درصد سرم گاوی، دگزامتازون، ۰/۲ میلی مولار آسکوربیک اسید و ۱۰ میلی مولار بتا گلیسروفسفات قرار گرفتند. به عنوان گروه کنترل، محیط تعدادی از خانه‌ها ، محیط پایه یعنی DMEM حاوی ۱۰ درصد سرم گاوی بدون مواد محرک تمایز انتخاب شدند. سپس سلول‌ها به مدت ۲۱ روز در شرایط دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و ۵ درصد CO_2 انکوبه شده و هر دو روز یکبار محیط آن ها تعویض شد. در پایان دوره تمایز وقوع تمایز سلول‌ها با روش رنگ آمیزی آلیزارین قرمز بررسی شد.

رنگ آمیزی آلیزارین قرمز: تک لایه سلولی با PBS شسته شده و به مدت ۱۰ دقیقه با متانول خالص فیکس شد، سپس با محلول رنگی ۱ درصد آلیزارین قرمز در آب آمونیاکی ۲۵ درصد به مدت دو دقیقه رنگ آمیزی شد. در پایان، سلول‌ها با آب مقطر شسته و خشک شدند و با میکروسکوپ بررسی گردیدند.

تمایز به سلول های چربی (بررسی قابلیت Adipogenic): برای بررسی قابلیت تمایز سلول‌ها به سلول‌های استخوانی سلول‌های مورد نظر در پاساژ سوم در محیط افتراقی ویژه کشت داده شدند. بدین منظور سلول‌ها در محیط پایه DMEMحاوی۱۰ درصد سرم گاوی، ۱ میکرو مولار دگزامتازون، ۰/۵ میلی مولار methylisobutylxanthine و ۱۰۰ میکرو مولار ایندومتاسین و انسولین ۱۰میکروگرم بر میلی لیتر قرار گرفت. به عنوان گروه کنترل، محیط تعدادی از خانه‌ها ، محیط معمولی یعنی DMEM حاوی ۱۰ درصد سرم گاوی انتخاب شد. سلول‌ها به مدت ۲۱ روز در شرایط دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و ۵ درصد CO_2 انکوبه شد. هر دو روز یکبار محیط آن‌ها تعویض شد و در پایان وقوع تمایز سلول‌ها با روش رنگ آمیزی Oil Red بررسی شدند.

رنگ آمیزی Oil Red: سلول‌ها بـه مـدت یـک ساعت در دمای اتاق با فرمالین چهار درصد فیکس شده و سپس بـا الکـل ۷۰ درصـد شسـته شـدند. سپس به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه با محلول Oil Red 0.5%در ایزوپروپانل ۹۹ درصد رنگ آمیزی شدند. در پایان، محلول رنگی خارج و سلول‌ها پس از سه بار شستشو بـا الکـل ۷۰ درصـد بـا میکروسـکوپ بررسی شدند.

بررسی مارکرهای سطحی سـلول بوسـیله فلوسـایتومتری: بـرای بررسـی مارکرهـای سلول‌های بنیـادی مزانشـیمی و تاییـد آن هـا بـه وسیله فلوسایتومتری از سلول‌های کشت داده شده در پاساژ سوم استفاده شد. برای انجام این کار پس از سومین پاساژ سلولی، سلول‌ها توسط تریپسین از کـف فلاسـک جـدا شـدند، سـپس سوسپانسـیون سلولی شمارش شـده و بـه هـر ویـال تعـداد 10^5 سلول اضافه شد. ویال‌ها به مدت ۳۰ دقیقه با یک میلی لیتر محلول PBS-BSA ۱ % بلاک شـدند و سوسپانسیون سلولی بـا دورg × ۳۰۰ بـه مـدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ می‌شد و غلظت مناسبی از آنتـی بـادی‌هـای isotype control، CD45، CD29 ، CD90، CD34 و CD105 طبـق دسـتورالعمل همراه، اضافه می‌شد. بعد از انکوباسیون سـلول هـا در شرایط تاریکی و دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت یک ساعت، دوباره سلول‌ها با PBS شستشـو و سانتریفیوژ شد. در مرحله‌ی آخر، رسوب سـلولی با ۲۰۰ میکرولیتر بافر FACS سوسپانسیون شد و تا هنگام بررسی و خوانش با دسـتگاه فلوسـایتومتر در دمای ۸-۲ درجه‌ی سانتی گراد نگهداری شد.

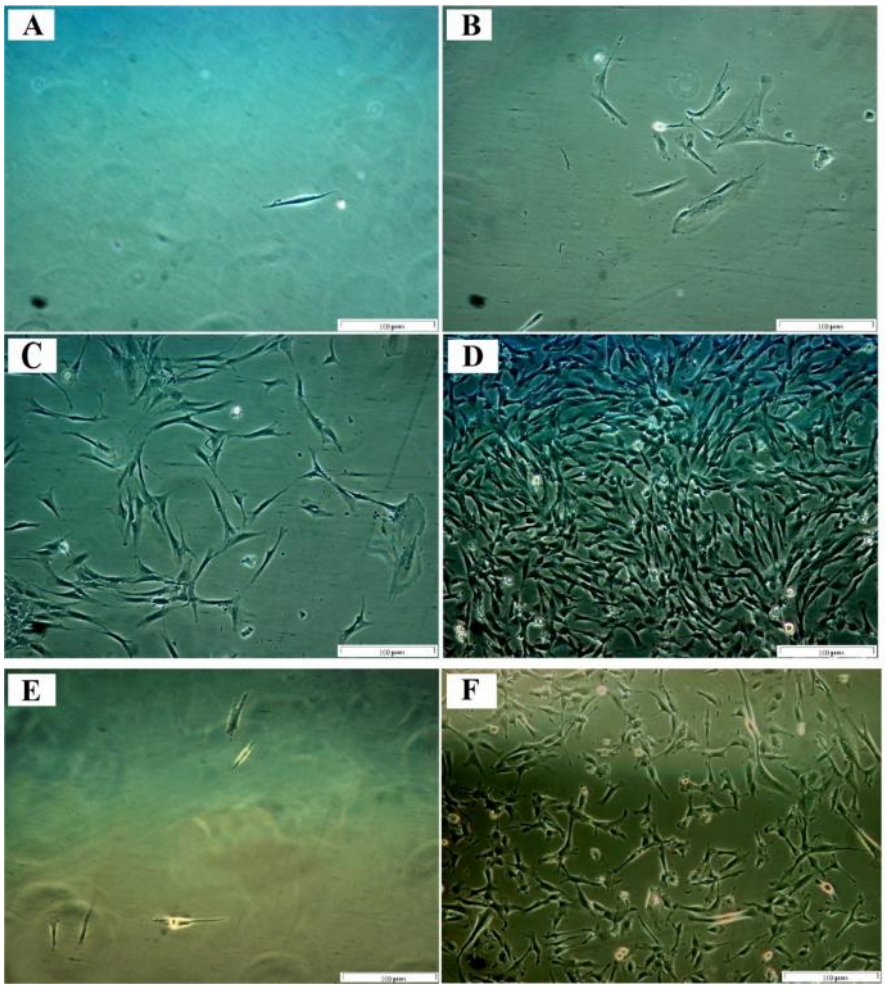
آنـالیز داده‌هـا: بررسـی و تفسـیر نتـایج فلوسایتومتری با اسـتفاده از نـرم افـزار *FlowJo (Version 10)*انجام شـد. همچنـین نتـایج آزمـون STR به وسیله نرم افزار *GeneMapper (version 4.1)*مورد آنالیز قرار گرفته است.

یافته‌ها

بررسی سلول‌ها از لحاظ ویژگی‌های رشد و مورفولوژی: پس از تهیه بافت‌هـای مـورد نظـر از بیمارستان و انتقال آن هـا بـه آزمایشـگاه مطـابق الگوریتم (شکل ۱) پروسه جداسـازی سـلول هـا از بافت انجام می‌گرفت. در طول فرآیند کشت، روزانه سلول‌ها با استفاده از میکروسکوپ اینورت بمنظور ارزیابی ویژگی‌های رشد و مورفولـوژی سـلول‌هـا و همچنـین بررسـی آلـودگی بـاکتری و قـارچی، مشاهده می‌شدند و تصاویر سلول‌ها ثبت می‌گردید. در ارتباط با سلول‌های مزانشیمی بافت چربـی، در این تحقیق مشاهده شـد کـه پـس از گذشـت ۲۴ ساعت از شروع کشت، سـلول‌هـا بـه بسـتر کشـت اتصال یافته و از لحاظ مورفولوژی سلول‌های شـبه فیبروبلاستی را ایجاد کردند. همچنین سـلول‌هـای مزانشیمی پالـپ دنـدان نیـز از لحـاظ مورفولـوژی همانند سلول‌های مزانشـیمی بافـت چربـی، شـبه فیبروبلاستی هستند (شکل ۲).

نتایج مرحله کنترل کیفی و بررسی آلودگی میکروارگانیسم‌ها: قبل از انجام هرگونه آزمایشی بر روی سلول‌ها، کنترل کیفی میکربی برای تاییـد عدم آلودگی به میکروارگانیسم ها ضروری است به دلیـل شـرایط اختصاصـی کشـت برخـی میکروارگانیسم‌ها و لزوم بررسی دقیق‌تر و کامل‌تـر سلول‌ها از لحاظ آلودگی میکروارگانیسـم‌هـا و بـه خصوص مایکوپلاسما، به دلیل ویژگی منحصـر بـه فرد آن در مخفی شدن، مراحل کنتـرل کیفـی بـر روی نمونه سلول‌ها و مایع رویی کشت آن ها انجام گرفت تا اطمینان لازم از عدم آلودگی و یـا احـراز آلودگی حصـول گـردد. بـه عنـوان مثـال آلـودگی مایکوپلاسما یکی از دغدغه‌های اصلی پژوهشگرانی است که در عرصه کشت سلول فعالیت دارند، زیـرا آلودگی سلول‌ها به این باکتری سبب کاهش تکثیر سلول‌ها و اختلال در روند آزمایش و عدم به دست آوردن داده‌های صحیح مـی‌شـود. عـلاوه بـر ایـن، باکتری‌ها، قارچ‌ها، کپک‌ها و ویروس‌هـا بـه عنـوان دیگـر منـابع آلـودگی خطرنـاک در کشـت سـلول محسوب می‌شوند. در این مطالعه بـرای تشـخیص آلودگی مایکوپلاسمایی از سه روش رنـگ آمیـزی DNA با رنگ هوخست، تشخیص مولکولی بوسیله واکنش زنجیـره‌ای پلیمـراز (Polymerase Chain Reaction-PCR) و روش کشـت اختصاصـی مستقیم مایکوپلاسما استفاده شده است (اشکال ۳ و ۴).

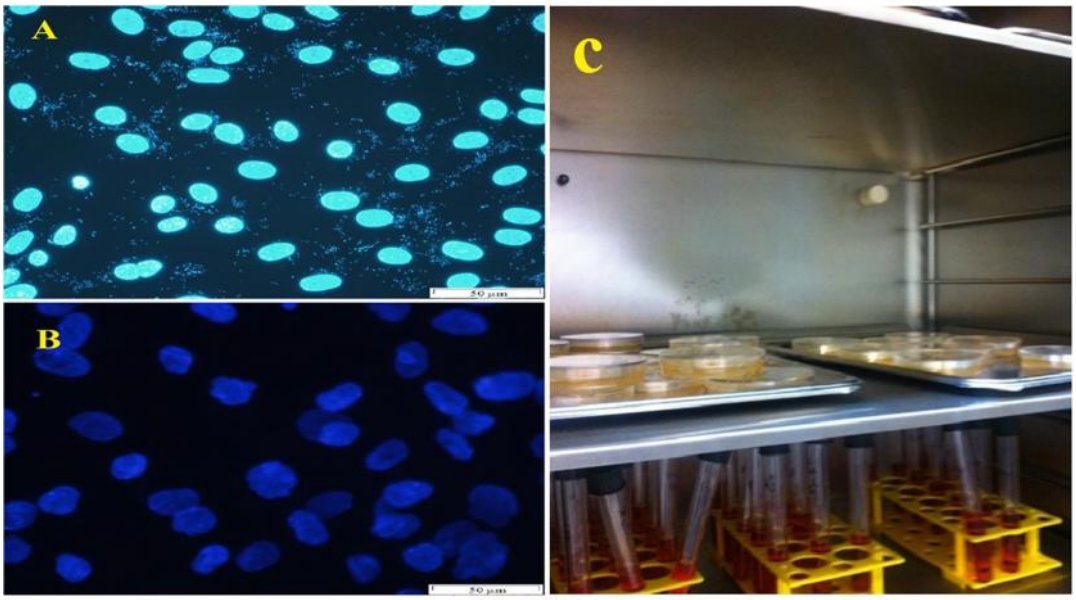
اگر سلول‌ها در محیط بدون آنتی بیوتیک کشت



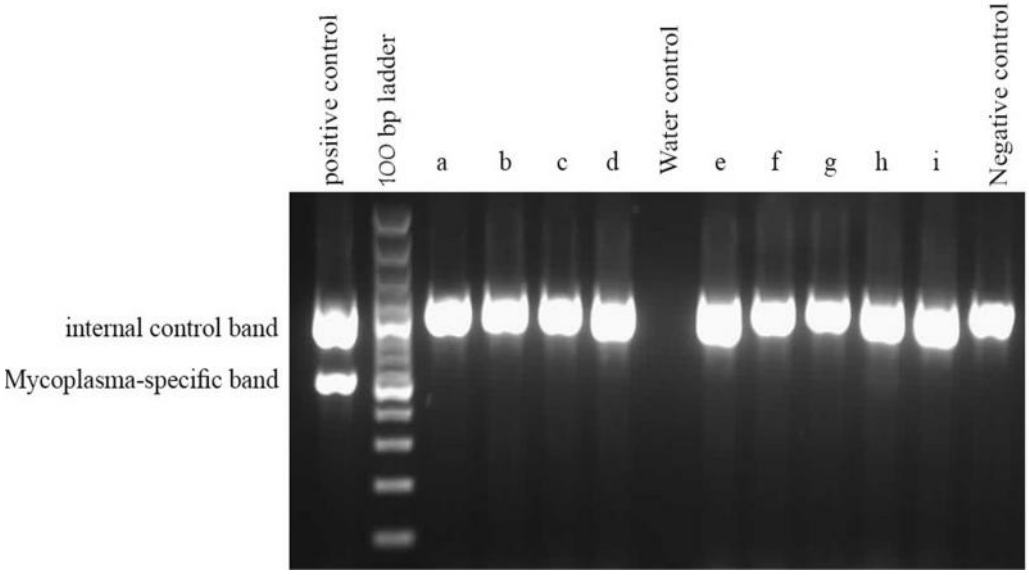
شکل ۲- سلول جدا شده از بافت چربی پس از گذشت یک روز از شروع کشت (A)، افزایش تعداد سلول‌ها پس از گذشت سه روز (B)، تراکم سلولی یک هفته پس از گذشت شروع کشت (C)، سلول‌های مزانشیمی جدا شده از بافت چربی پس از اولین پاساژ (D)، سلول های جداشده از پالپ دندان در روز سوم (E)، سلول‌های مزانشیمی پالپ دندان پس از اولین پاساژ (F)

داده شوند آلودگی با باکتری، مخمر و قارچ، معمولاً و نه همیشه، با کدورت محیط یا پایین آمدن PH مشخص می‌گردد. با علم به این موضوع، در طول روند کشت، روزانه ظرف‌های کشت سلول‌ها از نظر رنگ، کدورت محیط کشت و نیز میکروسکوپی برای یافتن آلودگی‌های احتمالی باکتری و قارچ بررسی شدند که به هیچ مورد آلودگی برخورد نشد. با این حال در نمونه های پالپ دندان آلودگی مایکوپلاسما در ۲ نمونه به وسیله آزمون های استفاده شده در این تحقیق تشخیص داده شد که از ادامه کار با آن ها اجتناب شد و این نمونه ها از روند آزمایش حذف گردیدند. با توجه به اینکه محیط دهان میزبان بسیاری از میکروارگانیسم‌ها از جمله مایکوپلاسما است لذا بدیهی است که در نمونه های تهیه شده از ناحیه دهان این آلودگی همراه با بافت وجود داشته باشد. لذا، لازم است به منظور کاهش احتمال آلودگی سلول ها در مرحله شستشوی اولیه در این بافت‌ها دقت بیشتری صرف گردد تا خطر آلودگی کاهش یابد. در ادامه کار، سلول‌هایی که عاری از آلودگی به میکرو ارگانیسم‌های مختلف و ویروس‌ها تشخیص داده می‌شدند، ابتدا از نظر بنیادی بودن، سپس از لحاظ منشا فردی آن ها با روش‌های افتراق گونه و STR تعیین هویت می‌شدند.

تمایز به سلول های چربی: برای بررسی قابلیت تمایز سلول‌های مزانشیمی جدا شده به سلول‌های چربی، رده‌های سلولی تولید شده در محیط کشت القا کننده تمایز سلول‌های چربی، به



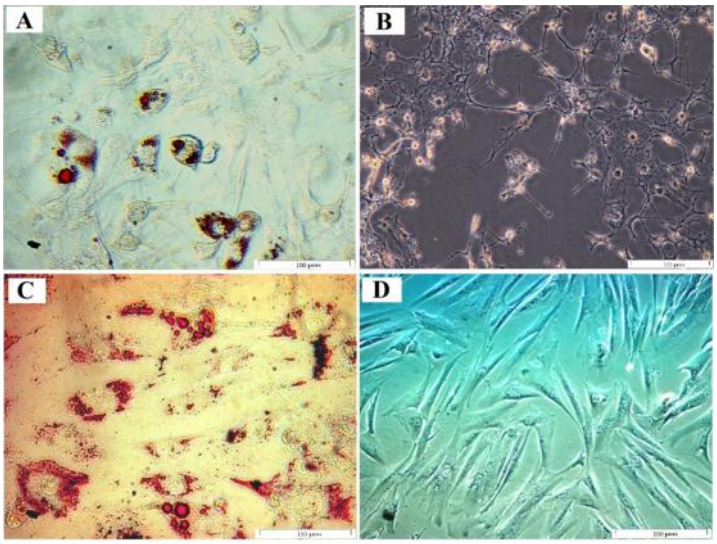
شکل ۳- تصویر بررسی آلودگی مایکوپلاسما به روش رنگ آمیزی DNA با رنگ فلورسنت هوخست (A و B) و کشت اختصاصی (C) . در تصویر A (نمونه کنترل مثبت) در بین هسته‌های سلول‌ها نقاط رنگ پذیر کوچکی، مشاهده می شود که بدلیل آلودگی مایکوپلاسما است، در صورتی که در تصویر B در پروسه رنگ آمیزی، فقط هسته سلول‌ها مشاهده می‌شود که این امر نشان دهنده عدم آلودگی این سلول‌ها است.



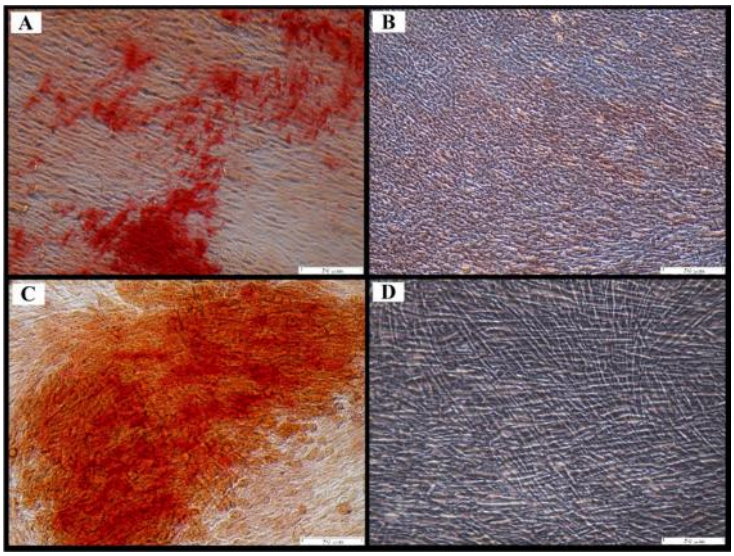
شکل ۴- نتایج بررسی آلودگی مایکوپلاسما در رده‌های سلولی تولید شده به روش تشخیص مولکولی با استفاده از PCR. در ستون‌های a تا i (سلول‌های مورد ارزیابی) باند اختصاصی مایکوپلاسما مشاهده نمی‌شود که این امر نشان دهنده منفی بودن این سلول ها از لحاظ آلودگی مایکوپلاسما است، در صورتی که باند اختصاصی مایکوپلاسما در گروه کنترل مثبت مشاهده می‌گردد.

مدت دو هفته قرار گرفتند و در طول این مدت سلول‌های مورد نظر روزانه به وسیله میکروسکوپ اینورت مورد بررسی قرار گرفتند. پس از گذشت هفت روز از زمان شروع تمایز، قطرات چربی در سلول‌ها ظاهر شدند و با گذشت زمان، تعداد سلول‌های حاوی قطرات چربی افزایش یافت. پس از پایان این دوره، سلول‌های مورد نظر فیکس شدند. با تمایز سلول‌های مزانشیمی به سلول‌های چربی، قطرات چربی درون سلول‌ها با رنگ آمیزی اختصاصی Oil Red به رنگ قرمز مشاهده شد (شکل ۵).

تمایز به سلول های استخوانی: سلول‌های مورد نظر به مدت چهار هفته در محیط کشت تمایزی قرار گرفتند و در طول این مدت روزانه با استفاده از میکروسکوپ اینورت مورد ارزیابی قرار گرفتند. اولین نشانه‌های تغییرات ریخت شناسی و



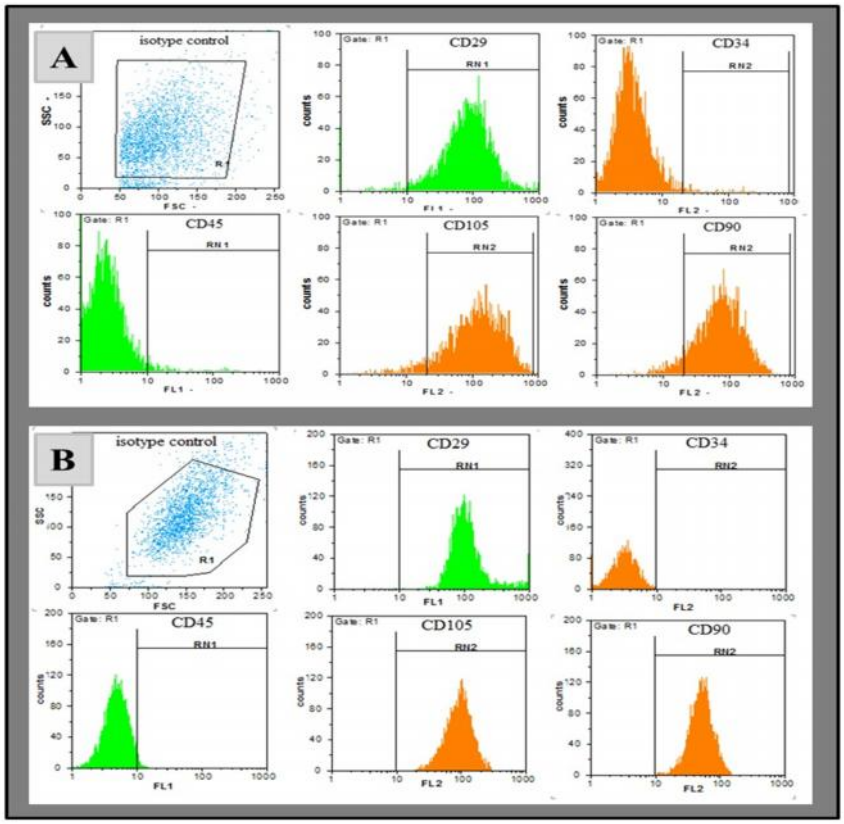
شکل ۵- تمایز سلول‌های مزانشیمی به سلول‌های چربی. سلول‌های پالپ دندان تحت تاثیر محیط القا کننده تمایز به چربی(A). سلول‌های پالپ دندان بدون فاکتورهای القا کننده تمایز (B). سلول‌های مزانشیمی بافت چربی تحت تاثیر محیط القا کننده تمایز(C). سلول‌های مزانشیمی بافت چربی بدون فاکتورهای القاکننده تمایز(D). وجود واکوئل‌های قرمز رنگ نشانگر تمایز به چربی است.



شکل ۶- تمایز سلول های مزانشیمی به سلول‌های استخوانی. سلول‌های پالپ دندان تحت تاثیر محیط القا کننده تمایز به استخوان (A). سلول‌های پالپ دندان بدون فاکتورهای القا کننده تمایز (B). سلول‌های مزانشیمی بافت چربی تحت تاثیر محیط القا کننده تمایز (C). سلول‌های مزانشیمی بافت چربی بدون فاکتورهای القاکننده تمایز (D). رنگ قرمز نشانگر تمایز به استخوان و ماتریکس خارج سلولی غنی از کلسیم اس

تمایز به استخوان یک هفته پس از القای تمایز مشاهده گردید. بدین صورت که در مناطقی از تک لایه سلولی، توده های سلولی تشکیل شده و به تدریج بزرگ‌تر شدند. پس از گذشت چهار هفته از زمان شروع تمایز، افزایش فراوانی توده‌ها در ظرف قابل ملاحظه بود. در این زمان تمایز سلول‌ها پایان یافته و سلول‌ها از نظر ترشح ماتریکس معدنی با روش آلیزارین قرمز ارزیابی شدند، که نتیجه آن با ظهور رنگ قرمز در اطراف سلول‌های تمایز یافته به سلول‌های استخوانی که به دلیل وجود ماتریکس خارج سلولی غنی از کلسیم هستند، مشاهده شد. در گروه کنترل که سلول‌های آن در معرض محیط فاقد فاکتورهای القا کننده تمایز قرار داشتند، توده‌های سلولی تشکیل نشده و در فرآیند رنگ آمیزی این سلول‌ها با رنگ آلیزارین قرمز، رنگ قرمز مشاهده نشد (شکل ۶).

بررسی نشانگرهای سطحی با روش فلوسایتومتری: برای بررسی مارکرهای سلول‌های بنیادی مزانشیمی و تایید آن‌ها با فلوسایتومتری، از سلول‌های کشت داده شده در



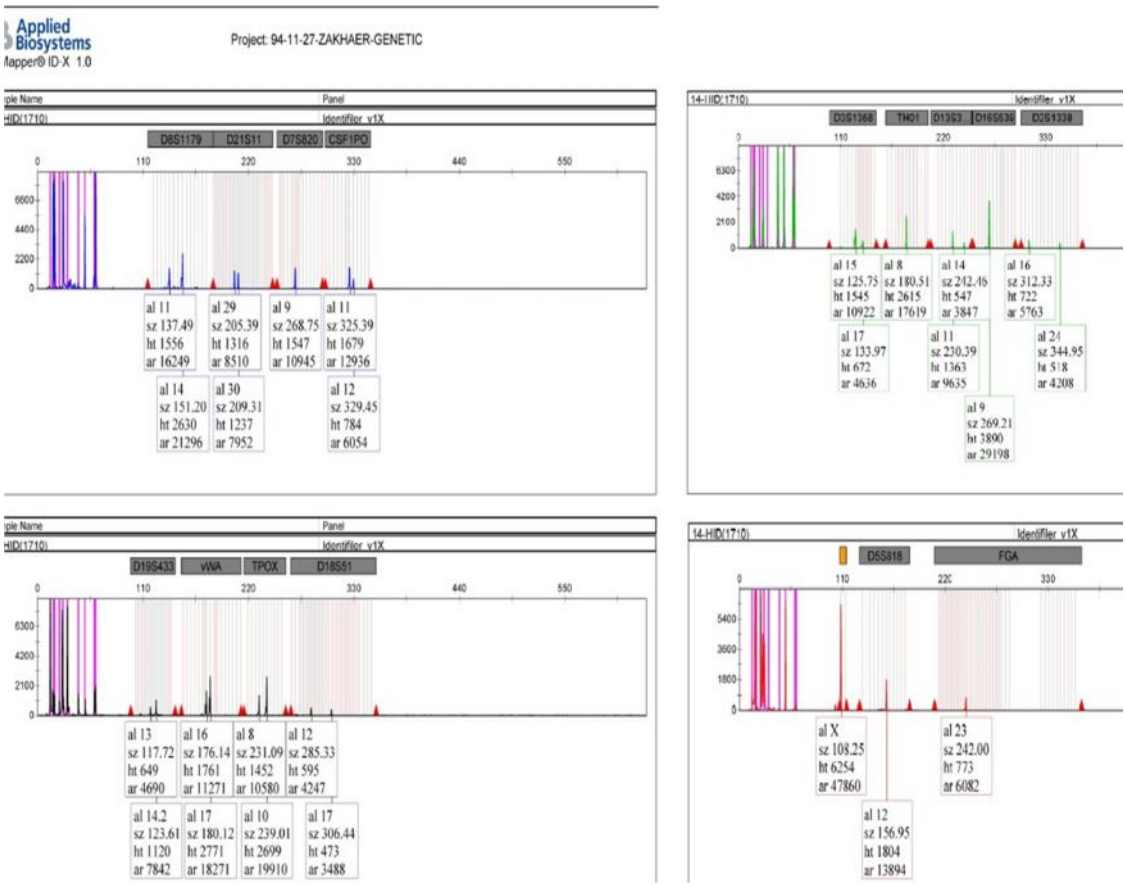
شکل ۷- نمودار هیستوگرام بررسی مارکرهای سطحی سلول های بنیادی مزانشیمی بوسیله دستگاه فلوسایتومتری، بافت چربی (A) (IBRC C10856) و بافت پالپ دندان (B) (IBRC C10894).

جدول ۱ – میانگین درصد بیان مارکرهای سطحی ارزیابی شده در سلول‌های تولید

ردیف	Cell line	Code number	منشا بافت	CD34	CD29	CD105	CD45	CD90
۱	DPS-1	IBRC C10265	پالپ دندان	0.27 ± 0.13	86.10 ± 2.68	97.87 ± 2.35	1.67 ± 0.36	2.39 ± 99.83
۲	DPS-12	IBRC C10894	پالپ دندان	0.98 ± 0.12	98.24 ± 1.93	98.69 ± 1.58	3.18 ± 0.96	99.36 ± 1.93
۳	DPS-13	IBRC C10896	پالپ دندان	3.21 ± 0.35	99.87 ± 1.73	99.36 ± 2.61	2.06 ± 0.54	98.69 ± 2.85
۴	AD-MSC-01	IBRC C10856	بافت چربی	2.97 ± 0.56	96.23 ± 2.63	95.21 ± 3.02	1.97 ± 0.47	94.89 ± 2.12
۵	AD-MSC-02	IBRC C10889	بافت چربی	1.28 ± 0.36	98.24 ± 2.03	97.85 ± 2.41	2.06 ± 0.34	96.81 ± 3.28
۶	AD-MSC-03	IBRC C10891	بافت چربی	3.95 ± 0.45	99.62 ± 1.81	94.31 ± 1.98	4.28 ± 0.51	93.67 ± 1.83

پاساژ سوم استفاده شد. نتایج فلوسایتومتری نشان دهنده بیان مارکرهای اختصاصی سلول های بنیادی مزانشیمی در سلول های جدا شده از بافت های پالپ دندان و بافت چربی بود. سلول‌های جداشده پس از رنگ آمیزی با آنتی بادی‌های اختصاصی علیه مارکرهای سلول‌های بنیادی مزانشیمی، شامل CD90، CD105 و CD29، و همچنین CD34 و CD45 با استفاده از دستگاه فلوسایتومتری بررسی گردیدند (شکل ۷). نتایج نشان داد، که این سلول‌ها از لحاظ بیان CD90، CD105 و CD29 مثبت بوده و از لحاظ بیان CD34 و CD45 منفی هستند که این امر تایید کننده، بنیادی بودن سلول های مزانشیمی جدا شده است (جدول ۱).

نتایج بررسی STR: برای اطمینان از عدم آلودگی بین سلولی در رده‌های تولید شده، تمام



شکل ۸- نتیجه پروفایل مارکرهای ۱۶ گانه Identifiler در آزمایش STR

سلول‌های به دست آمده از این طرح با استفاده از آزمایش STR مورد آنالیز قرار گرفته و مقایسه تمام آن ها با هم انجام شد. این سلول‌ها کاملاً هویت مستقل داشته و پروفایل مربوط به STRهای ۱۶ گانه آن ها موجود است. پروفایل مارکرهای رده سلولی IBRC C10856 که مربوط به AD-MSC-01 است به صورت نمونه، در شکل ۸ نشان داده شده است. مارکرهای متنوع از نظر هتروزیگوتی یا هوموزیگوتی و همچنین تعداد تکرارها به تفکیک مارکر از طریق این آزمون کاملاً آشکار است.

بحث و نتیجه‌گیری

سلول‌های بنیادی مزانشیمی، دارای قابلیت رشد بالایی بوده و پتانسیل‌های تمایزی بالقوه و بالفعل فراوانی دارند. یکی از موضوعات به روز علوم زیستی و پزشکی استفاده از این سلول‌های بنیادی مزانشیمی در مباحث درمانی است. همچنین به دلیل کاربرد وسیع سلول‌های بنیادی در مطالعات زیست شناسی تکوینی، طب پیوند، تحقیق و توسعه داروسازی، مطالعات ژنتیکی و تولید موجودات با خصوصیات تغییر یافته ژنتیکی، لازم است تحقیقات در ارتباط با این سلول‌ها افزایش یافته تا جداسازی، تخلیص و تعیین هویت این سلول‌ها با دقت بیشتری انجام گیرد. از آنجایی که مارکر مولکولی واحدی برای شناسایی سلول‌های بنیادی مزانشیمی معرفی نشده است، لازم است برای شناسایی سلول‌های بنیادی مزانشیمی از چندین مارکر مولکولی استفاده کرد. بر اساس پیشنهاد کمیته بافت و سلول‌های بنیادی مزانشیمی، انجمن بین المللی سلول درمانی (Mesenchymal and tissue stem cell committee of the international society for cellular therapy)، سلول‌های مزانشیمی انسانی باید در شرایط استاندارد کشت سلول، خاصیت چسبندگی به ظرف کشت پلاستیکی و قابلیت تمایز به

سلول‌های استخوانی و چربی را داشته باشند. همچنین این سلول‌ها باید مارکرهای سطحی CD105 و CD90 را بیان کنند و فاقد مارکرهای هماتوپویتیک همچون CD45 و CD34 باشند (۳۵).

با توجه به حساست بالای کشت سلولی به آلودگی مایکوپلاسما، در این طرح از تکنیک کشت مستقیم مایکوپلاسما، PCR و رنگ آمیزی DNA با رنگ Hoechst به منظور شناسایی این میکروارگانیسم استفاده شد. روش رنگ آمیزی با Hoechst بر اساس شناسایی گونه‌های مایکوپلاسما بر پایه جذب سریع این رنگ توسط DNA سلولی، طراحی شده است. این رنگ قابلیت نفوذپذیری به سلول دارد. رنگ به صورت انتخابی به شیار فرعی DNA متصل می‌گردد و در نتیجه سبب رنگ آمیزی هسته می‌شود. رنگ Hoechst با استفاده از لامپ جیوه‌ای زنون یا UV برانگیخته شده و از طریق فیلتر آبی شناسایی می‌شود. مایکوپلاسماهای رنگ آمیزی شده با رنگ Hoechst در سرتاسر سیتوپلاسم با بزرگ نمایی ۴۰x، قابل مشاهده هستند. علاوه بر آن هسته سلول‌ها نیز به طور واضح با این روش رنگ آمیزی می‌شوند (۱۳-۱۱).

تعیین هویت سلول‌ها از جمله ضروریات مطالعات سلولی است. افزایش آگاهی از شناسایی صحت کشت سلولی و برطرف کردن آلودگی‌های احتمالی سلولی در حین کار، این الزام را برای محققان ایجاد کرد که کمیته‌ای برای تایید هویت رده سلولی ایجاد شود (ICLAC, The International Cell Line Authentication Committee). این کمیته موظف بود شناسایی نادرست رده‌های سلولی را آشکار کند و این آگاهی را افزایش دهد. تکنیک افتراق داخل گونه‌ای این امکان را فراهم می‌کند که هر فرد یا سلول مجزا در داخل یک گونه را از هم تفکیک کند و در این راستا از مارکرهای مولکولی توالی‌های کوتاه پشت سر هم (STR) و تکنیک مولکولی PCR بهره می‌گیرد. این مارکرها بخوبی در مولکول DNA پراکنده شده و از چندشکلی کافی برای صحت عمل برخوردار است (۳۶). با توجه به مسائل فوق در این طرح به منظور استاندارد سازی و افزایش اعتبار به رده های سلولی تولید شده، آزمایش STR بر روی کلیه رده های به دست آمده انجام گردید.

زوک و همکارانش در سال ۲۰۰۱ توانایی تمایز سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی را به سلول‌های غضروفی و استخوانی بررسی کرده و نشان دادند این سلول ها قادر به تمایز به چندین رده سلولی هستند و از لحاظ بیان مارکرهای سطحی همانند سلول‌های بنیادی مغز استخوان قادرند مارکرهای CD105، CD73 و CD90 را به میزان بالایی بیان کنند؛ با این حال این سلول ها از لحاظ بیان مارکرهای CD45، CD34 و CD14 منفی هستند. همچنین در این مطالعه اذعان شده است که با توجه به ظرفیت بالای این سلول‌ها در تکثیر و تمایز، می‌توان از آنها به عنوان منبعی مناسب برای کاربرد در بخش سلول درمانی استفاده نمود (۳۷).

در مطالعه انجام گرفته توسط آیوست و همکارانش در سال ۲۰۰۴ بر روی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی این نکته ذکر شده است که نمونه هایی به دست آمده از فرایند لیپوساکشن می‌توانند به عنوان منبعی مناسب برای جداسازی سلول‌های بنیادی بزرگسالان به کار روند. این سلول‌ها قادرند به چندین رده سلولی تمایز یابند، به طوری که در طی فرآیند کشت سلولی در شرایط آزمایشگاهی از سرعت رشد مناسبی برخوردار هستند(۳۸). استفاده از سلول‌های بنیادی بزرگسالان به عنوان منبعی مناسب در مبحث سلول درمانی مطرح است و با توجه به حضور سلول‌های بنیادی در بافت‌های مختلف بدن و لزوم استفاده از بافتی که برای بیمار کمترین آسیب را به همراه داشته باشد، در نتیجه بافت چربی به عنوان منبعی با دسترسی آسان و کم خطر برای اهداف سلول درمانی به صورت اتولوگ مطرح است. از اینرو مطالعات بسیار زیادی در زمینه جداسازی و بهینه سازی روش های استخراج و تعیین هویت این سلول ها انجام گردیده است (۴۱-۳۹).

براساس مطالعاتی که بصورت مقایسه‌ای بر روی

سلول های جداشده از بافت پالپ دندان‌های شیری و دائمی انجام شده است، نتایج نشان می دهد که سلول های جدا شده از دندان های شیری سرعت رشد بالاتری را در قیاس با سلول های مشتق از دندان های دائمی دارند. همچنین در این سلول ها میزان بالاتری از مارکر های پرتوان بیان شده است(۴۲). در مطالعه حاضر از دندان‌های دائمی برای جداسازی سلول‌های پالپ دندان استفاده گردید. سلول‌های جدا شده از نظر مورفولوژی فیبروبلاستی بوده و نرخ رشد مطلوبی را نشان دادند. هوانگ و همکارانش در سال ۲۰۰۸ جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از پالپ دندان را بررسی کرده و نشان داده‌اند که این سلول‌ها قادر به تمایز به سلول‌های مختلف هستند و مارکرهای سلول‌های بنیادی مزانشیمی را بیان می‌کنند (۴۳). در گزارش کاواشیما که در سال ۲۰۱۲ انجام گرفته است، مطالعه جامعی بر روی نشانگرهای پالپ دندان انجام شده است. از مهم ترین نشانگرهای این سلول‌ها مارکرهای CD90، CD105، CD29، CD146 و CD166 هستند. اگرچه سلول‌های جدا شده از پالپ دندان ویژگی‌های منحصر بفردی همچون پتانسیل رشد بالا، چند توانی و بیان نشانگرهای سطحی متنوعی را نشان می‌دهند با این حال، بیان نشانگرهای سطحی آن‌ها تا حدودی متفاوت از یکدیگر است(۴۴). در مطالعه‌ای که بر روی جداسازی و بررسی ویژگی‌های سلول‌های بنیادی پالپ دندان که از دندان عقل جدا شده انجام پذیرفته است، بیش از ۹۰ درصد سلول‌ها در پاساژ سوم بیان مارکرهای سطحی سلول‌های مزانشیمی (CD90 و CD105 و CD44 و CD73) را نشان داده اند و کمتر از ۲ درصد از سلول‌ها مارکرهای هماتوپویتیک را بیان کرده‌اند لذا این داده‌ها با نتایج حاصل از این طرح همخوانی داشت (۴۵). در مطالعه دیگری که بر روی سلول‌های بنیادی پالپ دندان بر روی شامپانزه انجام گردیده است، میزان بیان مارکرهای سطحی CD29, CD73, CD90, CD59 ,CD166، CD44 و CD105) در سلول-های جدا شده از پالپ دندان ۹۹ درصد، گزارش شده است. این در حالی است که در همین مطالعه این سلول‌ها بیان مارکرهای هماتوپویتیک را نشان نداده اند (۴۶).

با توجه به تقاضای فراوان جامعه علمی کشور به سلول‌های مزانشیمی برای تحقیقات مختلف، در این طرح سلول‌های بنیادی مزانشیمی از بافت چربی و پالپ دندان، بر اساس استانداردهای بین المللی جداسازی و تعیین هویت شده است تا در این زمینه بستری مناسب برای تحقیقات سلولی فراهم گردد. آنچه در این طرح حائز اهمیت است، معرفی رده‌های سلولی استاندارد مزانشیمی تعیین هویت شده و شناسنامه دار است، که باعث تسهیل و تسریع تحقیقات زیست پزشکی در زمینه سلول‌های مزانشیمی انسانی همراه با کاهش قابل توجه هزینه‌ها در کشور می‌شود.

تقدیر و تشکر

مطالعه حاضر با حمایت علمی و مالی مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی، بانک سلول‌های انسانی و جانوری ایران انجام شده است و رده های سلولی تولید شده در سایت www.ibrc.ir در دسترس محققین قرار گرفته است.

منابع

1. Jones E, Schäfer R. Biological differences between native and cultured mesenchymal stem cells: implications for therapies. Stem Cell Protocols. 2015. 105-20.
2. Feisst V, Locke MB. Adipose-Derived Stem Cells: Isolation and Culturing. Cellular Therapy for Stroke and CNS Injuries: Springer; 2015. 163-72.
3. Markarian CF, Frey GZ, Silveira MD, Milani AR, Ely PB, Horn AP, et al. Isolation of adipose-derived stem cells: a comparison among different methods. Biotechnology letters. 2014;36(4):693-702.
4. Anzalone R, Timoneri F, La Rocca G, Iacono ML, Amico G, Corsello T, et al. Isolation and phenotypical characterization of mesenchymal stem cells from the Wharton's jelly of preterm human umbilical cord. Italian Journal of Anatomy and Embryology. 2014;119(1): 11.
5. Zhang X, Hirai M, Cantero S, Ciubotariu R, Dobrila L, Hirsh A, et al. Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from human umbilical cord blood: reevaluation of critical factors for successful isolation and high

ability to proliferate and differentiate to chondrocytes as compared to mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue. Journal of cellular biochemistry. 2011;112(4):1206-18.

6. Van Pham P, Vu NB, Pham VM, Truong NH, Pham TL-B, Dang LT-T, et al. Good manufacturing practice-compliant isolation and culture of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells. Journal of translational medicine. 2014;12(1):1.

7. Ahmadbeigi N, Soleimani M, Vasei M, Gheisari Y, Mortazavi Y, Azadmanesh K, et al. Isolation, characterization, and transplantation of bone marrow-derived cell components with hematopoietic stem cell niche properties. Stem cells and development. 2013;22(23):3052-61.

8. Mantovani C, Terenghi G, Shawcross SG. Isolation of adult stem cells and their differentiation to Schwann cells. Progenitor Cells: Methods and Protocols. 2012:47-57.

9. Hilkens P, Gervois P, Fanton Y, Vanormelingen J, Martens W, Struys T, et al. Effect of isolation methodology on stem cell properties and multilineage differentiation potential of human dental pulp stem cells. Cell and tissue research. 2013;353(1):65-78.

10. Buehring GC, Eby EA, Eby MJ. Cell line cross-contamination: how aware are Mammalian cell culturists of the problem and how to monitor it? In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal. 2004;40(7):211-5.

11. Drexler HG, Uphoff CC, Dirks WG, MacLeod RA. Mix-ups and mycoplasma: the enemies within. Leukemia research. 2002;26(4):329-33.

12. Lincoln CK, Gabridge MG. Cell culture contamination: sources, consequences, prevention, and elimination. Methods in cell biology. 1998;57:49-65.

13. MacLeod RA, Dirks WG, Matsuo Y, Kaufmann M, Milch H, Drexler HG. Widespread intraspecies cross-contamination of human tumor cell lines arising at source. International Journal of Cancer. 1999;83(4):555-63.

14. Masters JR. Human cancer cell lines: fact and fantasy. Nature reviews Molecular cell biology. 2000;1(3):233-6.

15. Behrens I, Kissel T. Do cell culture conditions influence the carrier-mediated transport of peptides in Caco-2 cell monolayers? European journal of pharmaceutical sciences. 2003; 19(5):433-42.

16. Briske-Anderson MJ, Finley JW, Newman SM. The influence of culture time and passage number on the morphological and physiological development of Caco-2 cells. Experimental Biology and Medicine. 1997;214(3):248-57.

17. Chang-Liu C-M, Woloschak GE. Effect of passage number on cellular response to DNA-damaging agents: cell survival and gene expression. Cancer letters. 1997;113(1):77-86.

18. MacLeod R, Dirks W, Reid Y, Hay R, Drexler H. Identity of original and late passage Dami megakaryocytes with HEL erythroleukemia cells shown by combined cytogenetics and DNA fingerprinting. Leukemia. 1997;11(12):2032-8.

19. Bubenik J. Cross-contamination of cell lines in culture. Folia biologica. 2000;46(5):163.

20. BECKERJ JDK, JURGENS H, GROSS R. Falsification of Tetrazolium Dye (MTT) Based Cytotoxicity Assay Results due to Mycoplasma Contamination of Cell Cultures. Anticancer research. 1999;19:1245-8.

21. Drexler H, Dirks W, Matsuo Y, MacLeod R. False leukemia–lymphoma cell lines: an update on over 500 cell lines. Leukemia. 2003;17(2):416-26.

22. Garnick R. Raw materials as a source of contamination in large-scale cell culture. Developments in biological standardization. 1997;93:21-9.

23. Langdon SP. Cell Culture Contamination. Cancer cell culture: methods and protocols. 2004:309-17.

24. Ryan JA. Understanding and managing cell culture contamination. Corning Incorporated. 1994.

25. Wenzel U, Daniel H. Reconsidering cell line cross-contamination in NCOL-1. Cancer genetics and cytogenetics. 2005;163(1):95-6.

26. Vierck JL, Dodson MV. Interpretation of cell culture phenomena. Methods in cell science. 2000;22(1):79-81.

27. Wenger SL, Senft JR, Sargent LM, Bamezai R, Bairwa N, Grant SG. Comparison of established cell lines at different passages by karyotype and comparative genomic hybridization. Bioscience reports. 2004;24(6):631-9.

28. Hartung T, Balls M, Bardouille C, Blanck O, Coecke S, Gstraunthaler G, et al. Good cell culture practice. ATLA 2002; 30:407-414.

29. Liu MY, Lin S-C, Liu H, Candal F, Vafai A. Identification and authentication of animal cell culture by polymerase chain reaction amplification and DNA sequencing. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal. 2003;39(10):424-7.

30. Nardone RM. Eradication of cross-contaminated cell lines: a call for action. Cell biology and toxicology. 2007;23(6):367-72.

31. Hay RJ, Caputo J, Macy M. ATCC quality control methods for cell lines: Amer Type Culture Collection; 1992.

32. Planat-Benard V, Silvestre J-S, Cousin B, André M, Nibbelink M, Tamarat R, et al. Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells physiological and therapeutic perspectives. Circulation. 2004;109(5):656-63.

33. Gimble JM, Guilak F. Adipose-derived adult stem cells: isolation, characterization, and

differentiation potential. Cytotherapy. 2003; 5(5):362-9.

34. De Ugarte DA, Morizono K, Elbarbary A, Alfonso Z, Zuk PA, Zhu M, et al. Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. Cells tissues organs. 2003; 174(3):101-9.

35. 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(4):315-7.

36. Castro F, Dirks WG, Fähnrich S, Hotz-Wagenblatt A, Pawlita M, Schmitt M. High-throughput SNP-based authentication of human cell lines. International journal of cancer. 2013;132(2):308-14.

37. 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.

38. Aust L, Devlin B, Foster S, Halvorsen Y, Hicok K, Du Laney T, et al. Yield of human adipose-derived adult stem cells from liposuction aspirates. Cytotherapy. 2004;6(1):7-14.

39. Choi MR, Kim HY, Park J-Y, Lee TY, Baik CS, Chai YG, et al. Selection of optimal passage of bone marrow-derived mesenchymal stem cells for stem cell therapy in patients with amyotrophic lateral sclerosis. Neuroscience letters. 2010;472(2):94-8.

40. Lee P, Kim J, Bang O, Ahn Y, Joo I, Huh K. Autologous mesenchymal stem cell therapy delays the progression of neurological deficits in patients with multiple system atrophy. Clinical Pharmacology & Therapeutics. 2008;83(5):723-30.

41. Duijvestein M, Vos ACW, Roelofs H, Wildenberg ME, Wendrich BB, Verspaget HW, et al. Autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cell treatment for refractory luminal Crohn's disease: results of a phase I study. Gut. 2010;59(12):1662-9.

42. Govindasamy V, Ronald VS, Abdullah ANB, Ganesan Nathan KR, Aziz ZACA, Abdullah M, et al. Human platelet lysate permits scale-up of dental pulp stromal cells for clinical applications. Cytotherapy. 2011;13(10):1221-33.

43. Huang G-J, Gronthos S, Shi S. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. Journal of dental research. 2009;88(9):792-806.

44. Kawashima N .Characterisation of dental pulp stem cells: a new horizon for tissue regeneration? Archives of oral biology. 2012;57(11):1439-58.

45. Eslaminejad MB, Nazarian H, Shariati M, Vahabi S, Falahi F. Isolation and in vitro characterization of mesenchymal stem cells derived from the pulp tissue of human third molar tooth. Iranian Journal of Medical Sciences. 2015;35(3):216-25.

46. Cheng P-H, Snyder B, Fillos D, Ibegbu CC, Huang AH, Chan AW. Postnatal stem/progenitor cells derived from the dental pulp of adult chimpanzee. BMC cell biology. 2008;9(1):20.

Isolation, characterization and standard storage of human mesenchymal stem cell derived from adipose and dental pulp tissue

Meysam GanjiBakhsh, PhD student of Reproductive Biology, Human and Animal Cell Bank, Iranian Biological Resource Center (IBRC), ACECR, Tehran, Iran, and Department of Anatomy, Faculty of Medicine , Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. Meysam_ganjy@yahoo.com
Abolhassan Shahzadeh Fazeli, PhD, Associate Professor of Medical Genetics, Department of Molecular and Cellular Biology, Faculty of Basic Sciences and Advanced Technologies in Biology, University of Science and Culture, Tehran, Iran and Human and Animal Cell Bank, Iranian Biological Resource Center (IBRC), ACECR, Tehran, Iran. fazeli@ibrc.ir
Neda Sadat Gohari, MSc in Genetics, Human and Animal Cell Bank, Iranian Biological Resource Center (IBRC), ACECR, Tehran, Iran. N.gohari@yahoo.com
Hedieh Rahmati, MSc in Microbiology. Human and Animal Cell Bank, Iranian Biological Resource Center (IBRC), ACECR, Tehran, Iran. rahmati@ibrc.ir
Zahra Elyasi Gorji, PhD student of Biophysics, Human and Animal Cell Bank, Iranian Biological Resource Center (IBRC), ACECR, Tehran, Iran. elyasi@ibrc.ir
Mehrnaz Izadpanah, PhD student of Applied Cell Sciences, Human and Animal Cell Bank, Iranian Biological Resource Center (IBRC), ACECR, Tehran, Iran. izadpanah@ibrc.ir
Shiva Mohammadi, MSc in Genetics, Human and Animal Cell Bank, Iranian Biological Resource Center (IBRC), ACECR, Tehran, Iran. mohammadi@ibrc.ir
Masome Asadi, MSc in Histology, Human and Animal Cell Bank, Iranian Biological Resource Center (IBRC), ACECR, Tehran, Iran. masome.asadi@gmail.com
Sepideh Ashori, PhD student of Reproductive Biology, Human and Animal Cell Bank, Iranian Biological Resource Center (IBRC), ACECR, Tehran, Iran. ashouri@ibrc.ir
***Parvaneh Farzaneh**, PhD, Associate Professor of Immunology, Human and Animal Cell Bank, Iranian Biological Resource Center (IBRC), ACECR, Tehran, Iran (*Corresponding author). farzaneh@ibrc.ir

Abstract

Background: Due to extensive use of cell cultures in biomedical investigations and researches, there has been a great need to identify, authenticize and accurate quality control of cells. Stem cells are characterized by their self-renewal and differentiation potential. Mesenchymal stem cells are found in various tissues. These cells are vastly used in cell therapy and regenerative medicine and many other cell related studies.

Methods: After separation of cells from adipose and dental pulp tissues and confirmation of quality controls, authentication of mesenchymal stem cells were determined by monitoring growth, morphology, expression of specific molecular markers, and the ability to differentiate into adipocyte and osteoblast.

Results: In this study, 6 mesenchymal stem cell lines were established from adipose and dental pulp tissues. These cells which were positive for CD90, CD105 and CD29 and negative for CD34 and CD45 expression were isolated, authenticated and stored. Moreover, these cells showed no contamination including bacterial, viral and mycoplasma and are able to differentiate into adipocyte and osteoblast *in vitro*.

Conclusion: The outcome of this project would be introducing authenticated mesenchymal stem cells with related identity documents which facilitate and accelerate the biomedical research in the field of human mesenchymal cells along with a substantial reduction of costs and time.

Keywords: Human mesenchymal cells, Characterization, Adipose tissue, Dental pulp