بررسی مورفولوژی و ایمونوفنوتیپ سلول‌های بنیادی مزانشیمی بعد از تعویض سرم گاوی محیط کشت به سرم انسانی

*هاجر شفائی: گروه علوم تشریحی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران (*نویسنده مسئول). shafaei49@gmail.com
ابراهیم اسفندیاری: گروه علوم تشریحی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران. esfandiari@med.mui.ac.ir
حسن باقرنژاد: پارک علم و فن آوری آذربایجان شرقی، شرکت بنیان سلول کوثر، تبریز، ایران. bagernajadhassan@gmail.com

تاریخ دریافت: ۹۵/۶/۲۷ تاریخ پذیرش: ۹۵/۹/۱۵

چکیده

زمینه و هدف: سلول‌های بنیادی مزانشیمی (Mesenchymal Stem Cells-MSC) برای مقاصد سلول درمانی مورد استفاده قرار می‌گیرند. سرم جنین گاوی (Fetal Bovine Serum-FBS) برای رشد سلول‌های بنیادی در محیط کشت ضروری می‌باشد. از آنجایی که ممکن است FBS واکنش‌های ایمونولوژیک را در افراد گیرنده MSC تحریک کند و یا باعث انتقال عوامل پاتوژنیک گردد، لذا در موارد بالینی بایستی FBS از سلول‌ها حذف گردد و با سرم انسانی جایگزین گردد. این مطالعه مشخصات سیتولوژیک و فلوسیتومتریک سلول‌های بنیادی مشتق از چربی (ASCs- Adipose Tissue Stem Cells) را در مدیوم‌های حاوی FBS، سرم انسانی و جایگزینی FBS با سرم انسانی و برعکس مورد ارزیابی قرار داده است.

روش کار: سلول های بنیادی مشتق از چربی بعد از جداسازی کشت داده شدند. جهت بررسی سیتولوژیک سلول‌های پاساژ دوم بر روی لامل کشت داده و بعد از فیکساسیون با هماتوکسیلین و ائوزین رنگ شدند. سلول‌های پاساژ دوم با آنتی بادی‌ها مثبت و منفی CD44، CD90 برای سلول‌های بنیادی، CD45 و CD11 رنگ آمیزی شده و مورد ارزیابی قرار گرفتند.

یافته‌ها: سلول‌های بنیادی تکثیر یافته در FBS شکل پهنی داشته و به کندی تکثیر پیدا کردند در حالی که سلول‌های دارای سرم انسانی دوکی شکل بود و به سرعت رشد می‌کردند. تعویض سرم از FBS به سرم انسانی باعث تغییر شکل سلول‌ها از پهن به دوکی گردید. در نتایج forward scatter سلول‌های بنیادی کشت داده شده در FBS به طور معنی‌داری بزرگ‌تر از سایر گروه‌ها بودند ($p< ۰/۰۵$). تفاوت معنی داری در بیان مارکرهای ایمونوفنوتیپیک مثبت و منفی مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان دهنده این است که سرم انسانی، شرایط کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی را در مقایسه با مدیوم حاوی FBS قابل دسترس تجاری، بهبود می‌بخشد. تعویض FBS به سرم انسانی روش مفید برای سلول‌های بنیادی خواهد بود که قبلاً در FBS کشت داده شده و یا فریز گردیده‌اند.

کلیدواژه‌ها: سرم انسانی، سرم جنین گاوی، سلول‌های بنیادی مزانشیمی، سلول‌های بنیادی مشتق از چربی

مقدمه

اولین مطالعات در مورد سلول‌های بنیادی (Mesenchymal stem cells;MSC) توسط Friedenstein در سال ۱۹۶۶ صورت گرفته شده است (۱). در دهه‌های بعدی کاپلان نشان داد که سلول‌های بنیادی توانایی تمایز به استئوبلاست، کندروبلاست و ادیپوسیت را دارا هستند و چند ظرفیتی بودن آن‌ها به‌عنوان یک شاخص تلقی گردید. امروزه تلاش‌های زیادی برای به خدمت گرفتن این سلول‌ها از منابع بافتی مختلف صورت می‌گیرد و این سلول‌ها بعد از جداسازی، کشت داده می‌شوند. خود نوسازی به‌عنوان یک شاخص دیگر این سلول‌ها، بیانگر قدرت تکثیر و حفظ ظرفیت تمایزی سلول‌های بنیادی می‌باشد (۲). به لحاظ اینکه تعداد سلول‌های بنیادی موجود در بافت‌ها بسیار کم می‌باشد و برای استفاده از آن‌ها جهت مقاصد پژوهشی و درمانی لازم است که تکثیر داده شوند، لذا به‌طور روتین جهت تکثیر سلول‌های بنیادی، سرم جنین گاوی (Fetal Bovine Serum -FBS) به‌عنوان مکمل به کار برده می‌شود (۳). ولی استفاده از FBS از منشأ گاوی برای کشت سلول‌های انسانی می‌تواند مضر

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-07-15]

باشد. FBS می‌تواند به ازاء هر 10^7 سلول، ۳۰-۷ میلی‌گرم پروتئین گاوی را به میزبان منتقل کند و باعث واکنش ایمونولوژیک در فرد بشود و همچنین احتمال انتقال پاتوژن هایی با منشا حیوانی به انسان دریافت‌کننده پیوندِ سلول‌های بنیادی یا سلول تمایزیافته از سلول بنیادی وجود دارد (۴). بنابراین محققین مدیوم حاوی سرم انسانی را جهت تکثیر سلول‌های بنیادی انسانی توصیه نموده‌اند. ارجحیت کاربرد سرم جنین انسانی بر سرم جنین گاوی (FBS) توسط Tonti و همکاران به‌طور مفصل بررسی شده است و سایرین نیز این دو سرم را در تکثیر سلول‌های بنیادی مورد مطالعه قرار داده و بر لزوم استفاده از سرم انسانی تاکید کرده‌اند (۷-۵). Tonti و همکاران محدودیت‌های سرم انسانی اتولوگ را عدم دستیابی به حجم بالائی از سرم اتولوگ و بالا رفتن سن و در نتیجه کاهش فاکتورهای رشد عنوان نموده‌اند (۸). لذا، استفاده از سرم انسانی در آخرین پاساژ جهت کشت سلول‌هایی که قبلاً در FBS تکثیر داده شدند، می‌تواند یک نوع شستشوی سلول‌ها از مواد مضر FBS برای انسان باشد و همچنین تعویض سرم به نوع انسانی برای مواردی کمک کننده خواهد بود که سلول‌های آن‌ها قبلاً در FBS فریز شده است و ممکن است در آینده به آن‌ها نیاز پیدا کند.

سلول‌های بنیادی حداقل دو نوع مورفولوژی دوکی شکل و پهن در محیط کشت از خود نشان می دهند (۹). Colter معتقد است سلول‌های دوکی و کوچک، سلول‌هایی نابالغ و سلول‌های پهن و بزرگ سلول‌هایی بالغ هستند (۱۰). سلول‌های دوکی قدرت چند ظرفیتی بالائی دارند و سریع تر تقسیم می‌شوند (۱۱). در حالی که سلول‌های پهن، خاصیت چند ظرفیتی بودن کمتری دارند و همچنین کمتر تقسیم می‌شوند (۱۲). در بعضی از مطالعات جهت تکثیر سلول‌های بنیادی از سرم انسانی و یا از فاکتورهای رشدی چون FGF استفاده شده است و نتایج این تحقیقات نشان دهنده این است که سلول‌های بنیادی در سرم انسانی تکثیر بهتر و مورفولوژی مطلوبی دارند (۱۵-۱۳). با مقایسه بیان ژنی سلول‌های بنیادی انسانی در کشت با سرم های انسانی و گاوی (FBS) نشان دادند که سلول‌های تکثیر شده در محیط حاوی FBS، به سمت تمایز پیش می روند (۱۶). آنچه مسلم است استفاده از سرم انسانی برای تکثیر سلول‌های بنیادی انسانی به منظور موارد کلینیکی ضروری است (۱۷).

در سطح سلول‌های بنیادی پروتیین هایی سطحی وجود دارند که جهت شناسایی و افتراق آن‌ها از سایر سلول‌ها مورد استفاده قرار می گیرند (۱۸). از مارکرهای مثبت سلول‌های بنیادی CD44، CD73، CD 105 می‌باشد (۱۹) و CD90 مارکر رایج دیگر بر سطح این سلول‌ها می‌باشد. عدم وجود آنتی ژن های منفی مربوط به سلول‌های خونی و یا سلول‌های پیش ساز خونی بر سطح این سلول‌ها نیز می‌تواند درجه خلوص این سلول‌ها را تضمین کند. مارکرهای CD11، ۳ CD3، CD14 و CD45 بر سطح سلول‌های بنیادی وجود ندارند ولی بر سطح لکوسیت ها و سلول‌های هماتوپوئیتیک دیده می‌شوند (۲۰). در مطالعه قبلی ما نشان داده شده بود که سرم انسانی با منشا جفتی و سرم اتولوگ شرایط سلول‌ها در وضعیت بنیادی بهتر حفظ می کند (۲۱). بعضی مواقع کشت یا فریز قبلی سلول‌ها با FBS صورت گرفته است و یا سرم اتولوگ انسانی کافی نیست؛ در این صورت می توان از روش تعویض سرم استفاده کرد. لذا، هدف این مطالعه بررسی مورفولوژیک و ایمونوفنوتیپیک سلول‌های بنیادی بعد از تعویض سرم در مقایسه با سلول‌های تکثیر یافته در FBS و سرم انسانی است.

روش کار

نمونه گیری بافت چربی زیر جلدی و جداسازی سلول‌های بنیادی: نمونه بافت چربی زیر جلدی از بیماران تحت جراحی با کسب رضایت شخصی از آنان، تهیه شد. نمونه ها پس از دو بار شتشو با PBS و خرد شدن، به ازای هر گرم چربی ۰/۵ میلی‌گرم تحت تاثیر آنزیم کلاژناز یک قرار گرفت و به مدت ۶۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد. سپس آنزیم با مدیوم کشت حاوی ۱۰٪ سرم انسانی خنثی گردید و سپس به

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-07-15]

مدت ۱۰ دقیقه با ۱۴۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. رسوب حاصل با مدیوم شستشو داده شد. سلول‌های موجود در رسوب به دست آمده، در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد با CO_2 معادل ۵٪ کشت داده شدند.

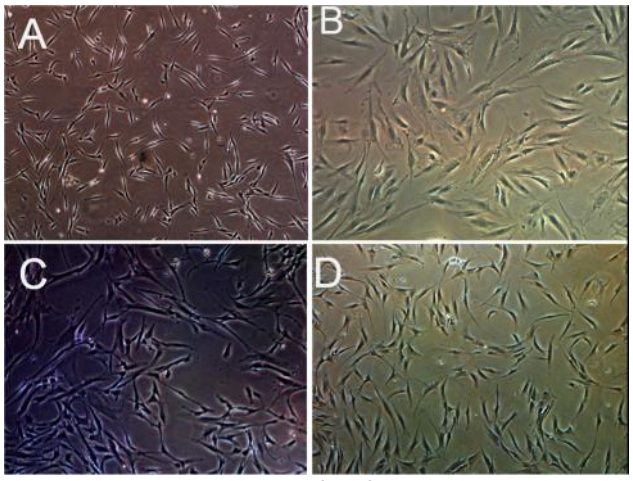
طرز تهیه سرم انسانی: خون جفت نوزادان مادران سزارین شده با تست های خونی منفی برای هپاتیت ب و ایدز تهیه گردید. به طوری که خون جفت بلافاصله بعد از جدا شدن از مادر در شرایط کاملاً استریل با سرنگ ۵۰ سی سی از عروق نافی جفت جمع شد و به مدت ۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری گردید تا لخته تشکیل گردد. سپس محتویات سرنگ به فالکون ۵۰ سی سی منتقل گردید و با دور ۲۵۰۰ به مدت ۱۰ سانتریفوژ شد. سرم زرد و شفاف تشکیل شده در قسمت بالای لوله در میکروتیوب های ۱/۵ میلی لیتری الیکوت و در ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

بررسی سیتولوژیک سلول‌های بنیادی مشتق از چربی: سلول‌های بنیادی در سرم های مربوطه بر روی لامل کشت داده شدند و سپس با PBS شستشو داده شده و با فرمالین ۱۰٪ فیکس گردیدند. بعد از حذف فرمالین و شستشو با آب به مدت ۱۰ دقیقه با هماتوکسیلین رنگ آمیزی شدند. بعد از شستشو با آب به مدت ۱ دقیقه در ائوزین رنگ شدند. بعد از شستشو با آب و خشک شدن لامل ها با چسپ انتلان به روی لام ها قرار داده شدند.

مراحل آماده سازی جهت انجام فلوسیتومتری: از پلت سلولی تشکیل شده در انتهای پاساژ سلولی سوم، 10^5 سلول در سه لوله مخصوص فلوسیتومتری برای هر CD مارکر (نمونه سلولی بدون رنگ آمیزی، آنتی بادی ایزوتایپ و آنتی بادی CD مارکر مورد نظر) آماده گردید. سلول‌های داخل لوله های فلوسیتومتری با PBS دوبار شستشو داده شد و سپس به هر کدام از لوله آنتی بادی های مثبت، CD44 با ماده فلورسنت فیکواریترین (PE) و آنتی بادی CD90 با ماده فلورسنت فلوئوروایزوتیوسیانات (FITC) و آنتی بادی ایزوتایپ نشان دار با هر دو نوع ماده فلوروسنت، اضافه گردید. بعد از دوره انکوباسیون و شستشو با PBS با دستگاه flow cytometry بررسی گردید. این عمل برای مارکرهای منفی (CD14 و CD45) نیز تکرار شد. در رنگ آمیزی دوگانه (Double staining)، دو آنتی بادی کونژوگه شده با فلورسنت های FITC و PE همزمان به لوله ها اضافه شدند. داده ها با نرم افزار Win Mdi مورد آنالیز قرار گرفتند.

یافته‌ها

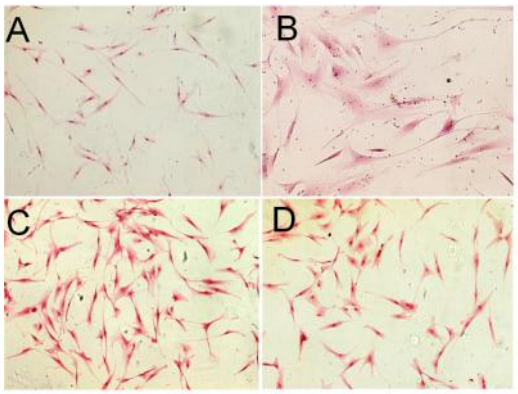
نتایج بررسی مورفولوژیک سلول‌های بنیادی: جمعیت سلول‌های بنیادی کشت داده شده در سرم انسانی از نظر مورفولوژی هموژن، دوکی و کوچک بودند (تصویر A ۱ و تصویر ۲A) و



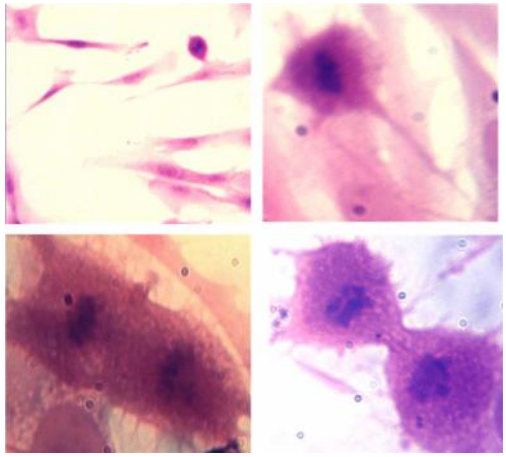
تصویر ۱- فوتومیکروگراف سلول‌هایASC کشت داده شده در انواع مدیوم (X40) . A) سلول‌های کشت داده شده با مدیوم حاوی سرم انسانی؛ B) سلول‌های کشت داده شده با مدیوم حاویFBS؛ C) در پاساژ بعدی سرم انسانی به جای FBS مدیوم جایگزین شده است. D) سرم انسانی مدیوم با FBS جایگزین شده است.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-07-15]

بعضی از آن‌ها در حال میتوز بودند و به شکل گرد در آمدند. وجود سلول‌های گرد و کوچک در حال میتوز موید قدرت تکثیر بالای این سلول‌ها است. در حالی که سلول‌های بنیادی تکثیر یافته در FBS ، بزرگ، پهن و کند تقسیم می باشند (تصویر ۲B)، ولی بعد از افزودن سرم انسانی، مورفولوژی این سلول‌ها به سمت سلول‌های تکثیر یافته در سرم انسانی تغییر یافت (تصویر ۱C و ۲C) و میزان تکثیر نیز بالا رفت، به‌طوری که شمارش تعداد سلول‌های در حال میتوز مطابقت داشت. تعویض سرم از FBS به سرم انسانی باعث تغییر شکل سلول ها از پهن به دوکی گردید و پاساژهای متوالی لازم بود تا خصوصیات مشابه سلول هایی را پیدا کنند که از ابتدا در سرم انسانی



تصویر ۲- فوتومیکروگراف های سلول های بنیادی رنگ آمیزی شده با H&E (X100). (A) سلول های بنیادی تکثیر یافته در سرم انسانی ،FBS (B) ، FBS (C) به سرم انسانی و (D) سرم انسانی بهFBS .

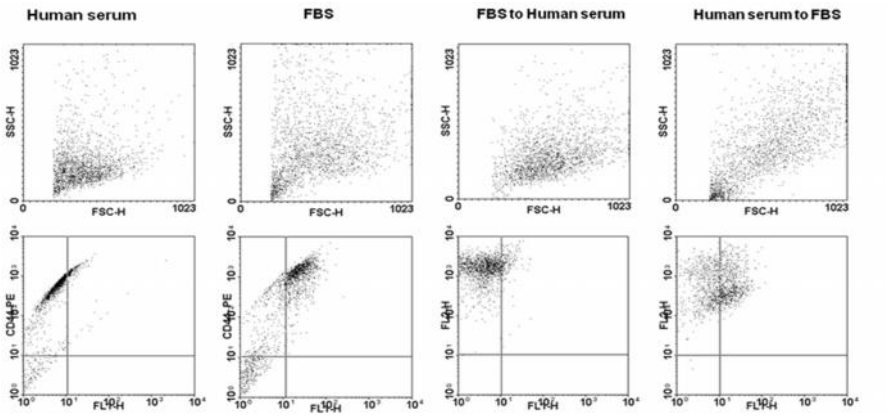


شکل ۳- میکروگراف ها سلول های بنیادی را در مراحل میتوز با رنگ آمیزی H&E نشان می دهد. A) سلول های بنیادی دوکی شکل با بزرگ نمایی، فلش سلول بنیادی میتوزی گرد و کوچک را نشان می دهد۲۰۰×. سلول های میتوزی با بزرگ نمایی ۱۰۰۰ در مراحل (B) متافاز، (C) آنافاز، (D) تلوفاز.

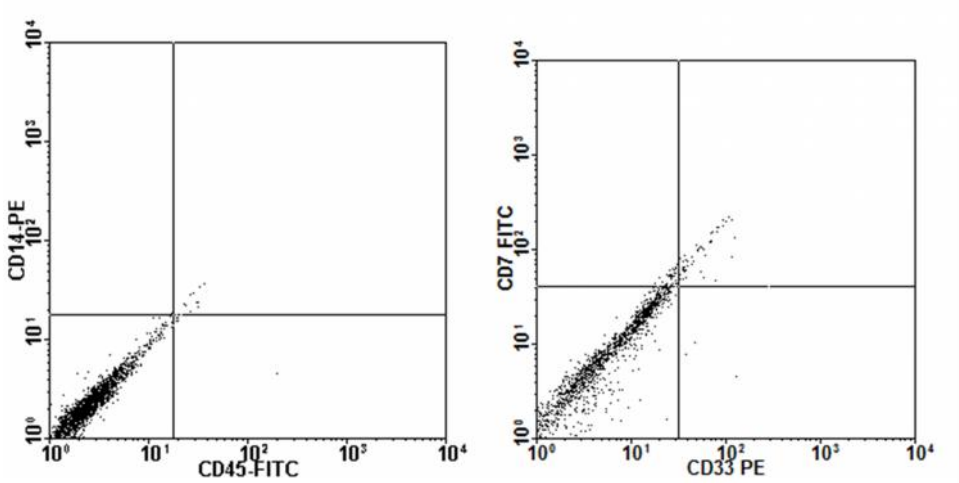
کشت داده شده بودند. همچنین جایگزینی سرم انسانی با FBS باعث تغییر شکل سلول‌ها از فرم دوکی به سلول‌هایی پهن گردید (تصویر 1D و ۲D). تصویر ۳ مراحل مختلف میتوز در سلول‌های بنیادی کشت داده شده در سرم انسانی را با رنگ آمیزی H&E نشان می دهد. این سلول‌ها ۱/۵ ٪ سلول‌ها را تشکیل می دادند.

نتایج بررسی مارکرهای سطحی سلول‌های بنیادی: Forward Scatter سلول‌های بنیادی کشت داده شده در سرم انسانی نشان داد اندازه سلول‌ها یکنواخت است و از نظر گرانولیتی در نمودار Side Scatter، در یک محدوده مجتمع می باشند که FSCتقریباً ۷۷/۴٪ سلول‌ها را شامل می شد؛ در حالی که سلول‌های تکثیر شده در FBS بزرگ تر با FSCتقریباً ۳۸/۱٪ و دارای گرانولیتی بیشتری (SSC تقریبی ۵۲/۷٪) نسبت به سلول‌های حاوی سرم انسانی (SSC تقریبی ۷۸/۶٪) بودند (تصویر ۴؛ ردیف اول). آخرین سرم موجود در مدیوم در تعیین این ویژگی سلول‌ها موثر می‌باشد، زیرا گرانولیتی سلول‌هایی که آخرین بار سرم انسانی گرفتند کمتر از (۴۰٪) سلول‌هایی که آخرین بار سرم گاوی دریافت نموده‌اند (۶۰/۲٪) (تصویر۴؛ ردیف اول). میزان بیان مارکرهای مثبت در سلول‌های بنیادی در انواع مدیوم ها تقریباً مشابه بودند (تصویر ۴). با این حال میانگین شدت فلورسنسی (Mean fluorescence intensity) بالا در مورد CD44، در سلول‌های حاوی سرم انسانی و تعویض سرم از FBS به سرم انسانی مشاهده گردید. میزان بیان این پروتئین های سطحی در مقایسه با ایزوتایپ کنترل سنجیده شد. مقایسه ایزوتایپ کنترل هر نمونه با نمونه های رنگ نشده نشان داد رنگ آمیزی زمینه ای حداقل می‌باشد. رنگ آمیزی میزان بیان آنتی ژن های CD14 و CD45 ، بعد از رنگ آمیزی با آنتی بادی های مربوطه برای گروه FBS کمتر از ۱٪ بود (تصویر ۴). بیان آنتی ژن‌های منفی CD7 و CD33، بعد از رنگ آمیزی با آنتی بادی های مربوطه برای گروه FBS به ترتیب کمتر از ۳/۵٪ و۲/۳٪ بود (تصویر ۵).

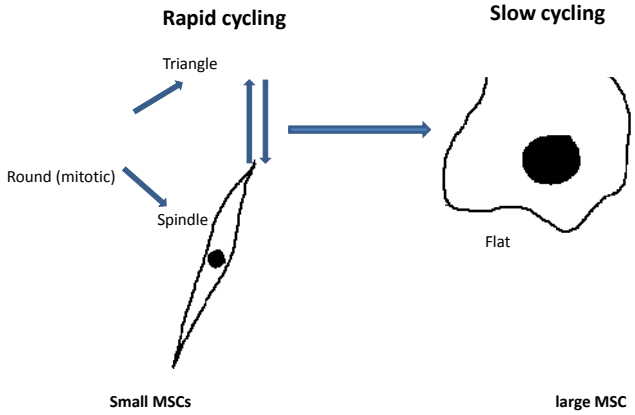
[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-07-15]



شکل ۴- مشخصات ایمونوفنوتیپیک سلول های بنیادی مشتق از چربی در مدیوم های مختلف. ردیف اول: Forward scatter و Side scatter سلول‌های بنیادی در سرم انسانی، FBS، FBS به سرم انسانی و سرم انسانی به FBS. ردیف دوم: بیان CD44 در سرم های ذکر شده.



شکل ۵- بیان مارکرهای منفی CD7، CD14، CD33، CD45 در سلول های بنیادی چربی با روش رنگ آمیزی دوگانه



شکل ۶- تصویر شماتیک جمعیت سلولی در کشت سلول‌های بنیادی و تغییر درصد سلول های دوکی با تغییر سرم محیط کشت (۲۱).

بحث و نتیجه‌گیری

سلول بنیادی مطلوب از نظر ویژگی‌های شناخته شده از جمله مورفولوژی، قدرت تکثیر و تمایز و مارکرهای سطحی دارای اهمیت ویژه در سلول درمانی است. با جایگزین کردن سرم جنین انسانی بجای سرم جنین گاوی (FBS) علاوه بر بر طرف شدن مشکل انتقال عوامل ایمونولوژیک و پاتوژنیک، نتایج این مطالعه نشان داد که

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-07-15]

خصوصیات مورفولوژیک و ایمونوفنوتیپیک سلول‌ها نیز بهبود می یابد. تکثیر بالای سلول‌های بنیادی با استفاده از سرم جنین انسانی می‌تواند به علت وجود فاکتورهای رشد در خون جنین انسانی باشد.

سلول‌های بنیادی از نظر تکثیر شامل دو دسته سلول‌هایی دوکی با سیکل سلولی سریع (Rapid cycling) و سلول‌هایی پهن با سیکل سلولی کند (Slow cycling) می باشند (۱۰). در این بررسی نیز مورفولوژی سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی عمدتاً دوکی شکل، کوچک و سریع تقسیم بودند. در مقابل سلول‌های بنیادی بزرگ و پهن را کند تقسیم مشاهده کرده‌اند که در مدیوم های حاوی FBS مشاهده گردید (۹). نمودار Forward Scatter بررسی فلوسیتومتری مطالعه حاضر نشان داد در سوسپانسیون سلولی نیز سلول‌های تکثیر یافته در سرم انسانی اندازه کوچکی دارند که در تائید گزارش های قبلی می‌باشد (۲۲). Sekiya در مطالعه خود اشاره می کند که سلول‌های بنیادی کوچک و سریع تقسیم، توانایی تمایز بالاتری دارند (۲۳). علاوه بر این مطالعه حاضر نشان داد در نتیجه مصرف سرم انسانی، جمعیت سلولی در شرایط چسبیده و سوسپانسیون، هموژن و دوکی می باشند. جمعیت سلولی در کشت سلول‌های بنیادی به صورت شماتیک نشان داده شده است (تصویر ۶).

این یافتهٔ مشابه با نتایج دیگر محققان می‌باشد که از سرم انسانی به جای FBS استفاده کرده‌اند (۲۴) و محققان بر این باورند که جمعیت سلولی دوکی شکل، چند ظرفیتی هستند و جهت سلول درمانی مناسب می باشند (۲۵). لذا یک دست بودن سلول‌ها به لحاظ دوکی شکل بودن از اهمیت ویژه ای برخوردار است؛ Tuan نیز به این نکته کلیدی تاکید دارد که برای موفقیت در سلول درمانی با استفاده از MSCs بایستی مشکل هتروژنیسیتی سلول‌های بنیادی را حل نمود (۲۶). نکته حائز اهمیت دیگر این مطالعه، دوکی بودن سلول‌های بنیادی در نسل ۱۰۰ می‌باشد که نشان دهنده حفظ خصوصیات بنیادی در این سلول‌ها است (۲۷). این یافته در جهت مشاهدات سایر محققین است که سرم انسانی را جایگزین FBS نموده‌اند(۱۶، ۲۳، ۲۸). این مطالعه نشان داد حتی می توان مورفولوژی و قدرت تکثیر سلول‌ها را با سرم انسانی بهبود بخشید. هیچ مطالعه ای در زمینه بهبود مورفولوژی سلول‌ها با تغییر FBS به سرم انسانی انجام نشده است و این مطالعه برای اولین بار تغییر سرم را جهت افزایش تکثیر سلول‌ها و بهبود کیفیت سلول‌ها پیشنهاد می کند.

سلول‌های بنیادی در این مطالعه از نظر بیان مارکرهای سطحی CD44، CD90 مانند سایر مطالعات مثبت بودند (۳ و ۱۸) و این ویژگی را در پاساژ بالای ۱۵ نیز حفظ کرده بودند.Zhu نیز با نشان دادن فاکتور رونویسی Oct4 بر حفظ ویژگی بنیادی بودن در پاساژ ۳۰ تاکید نمود (۲۹) و سایر محققین میزان بیان بالایی از مارکرهای CD44، CD90 وCD105 را در سلول‌های بنیادی چربی مشابه سلول‌های بنیادی مغز استخوان و پالپ دندان مشاهده کرده‌اند (۳۴-۳۰). همچنین مطالعه حاضر تائید نمود که آنتی ژن های CD7، CD33، CD14و CD45 که در سطح سلول‌های بنیادی حضور ندارند (۱۸، ۲۰، ۲۳). در این مطالعه بالا بودن میزان شدت فلورسنسی CD44 در گروه های حاوی سرم انسانی می‌تواند بیانگر حضور بیشتر این آنتی ژن در مدیوم حاوی سرم انسانی باشد و دلیل حفظ ویژگی بنیادی بودن سلول در نظر گرفته شود.

در نتیجه گیری می توان گفت به کار بردن سرم انسانی به جای FBS یک گام به سمت کاربرد کلینیکی این سلول‌ها برداشته شده است. همچنین استفاده از سرم انسانی در تکثیر سلول‌های بنیادی حتی بعد از مواجهه با FBS می‌تواند مشخصات مورفولوژیک، قدرت تکثیر و ایمونوفنوتیپیک آن‌ها را بهبود بخشد. به دلیل کمبود سرم انسانی اتولوگ برای تکثیر طولانی سلول‌ها، سرم انسانی با منشا جفتی علاوه بر مزایای یکسان بودن گونه سرم و سلول، کم هزینه می باشد.

تقدیر و تشکر

از زحمات دکتر فرشته حقیقت که در تامین نمونه های انسانی همکاری نمودند، سپاسگزاری می گردد.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-07-15]

منابع

1. Friedenstein AJ, Piatetzky II S, Petrakova KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. J Embryol Exp Morphol 1966;16:381-90.

2. Caplan AI. Mesenchymal stem cell. J Orthop Res 1991;9:641-50.

3. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science (New York, NY. 1999 Apr 2;284(5411):143-7.

4. Spees JL, Gregory CA, Singh H, Tucker HA, Peister A, Lynch PJ, et al. Internalized antigens must be removed to prepare hypoimmunogenic mesenchymal stem cells for cell and gene therapy. Mol Ther 2004;9:747-56.

5. Tonti GA, Mannello F. from bone marrow to therapeutic applications: different behaviour and genetic/epigenetic stability during mesenchymal stem cell expansion in autologous and foetal bovine sera? Int J Dev Biol 2008;52:1023-32.

6. Stute N, Holtz K, Bubenheim M, Lange M, Blake F, Zander AR. Autologous serum for isolation and expansion of human mesenchymal stem cells for clinical use. Exp Hematol 2004;32:1212-25.

7. Lindroos B, Boucher S, Chase L, Kuokkanen H, Huhtala H, Haataja R, et al. Serum-free, xeno-free culture media maintain the proliferation rate and multipotentiality of adipose stem cells in vitro. Cytotherapy 2009;11(7):958-72.

8. Mannello F, Tonti GA. Concise review: no breakthroughs for human mesenchymal and embryonic stem cell culture: conditioned medium, feeder layer, or feeder-free; medium with fetal calf serum, human serum, or enriched plasma; serum-free, serum replacement non conditioned medium, or ad hoc formula? All that glitters is not gold! . Stem Cells 2007;25:1603-9.

9. Colter D, Class R, DiGirolamo CM, Prockop DJ. Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. Proc Natl Acad Sci 2000;97(7)3213-3218.

10. Colter DC, Sekiya I, Prockop DJ. Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells. Proc Natl Acad Sci Total Environ 2001; 98:7841-5.

11. D'Ippolito G, Howard GA, Roos BA, Schiller PC. Isolation and characterization of marrow-isolated adult multilineage inducible (MIAMI) cells. Exp Hematol 2006;34:1608-10.

12. Digirolamo CM, D S, D C, Phinney DG, Class R, Prockop DJ. Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate. Br J Haematol 1999;107:275-81.

13. Choi SC, Kim SJ, Choi JH, Park CY, Shim WJ, Lim DS. Fibroblast growth factor-2 and -4 promote the proliferation of bone marrow mesenchymal stem cells by the activation of the PI3K-Akt and ERK1/2 signaling pathways. Stem Cells Dev 2008;17(4):725-36.

14. Baghaban Eslaminejad M, Rouhi L, Arabnajafi M, Baharvand H. Rat marrow-derived mesenchymal stem cells developed in a medium supplemented with the autologous versus bovine serum. Cell Biol Int 2009;20:1-10.

15. Zaragosi LE, Ailhaud G, Dani C. Autocrine fibroblast growth factor 2 signaling is critical for self-renewal of human multipotent adipose derived stem cells. stem Cells 2006;24:2412-9.

16. Shahdadfar A, Frønsdal K, Haug T, Reinholt FP, Brinchmann JE. In vitro expansion of human mesenchymal stem cells: Choice of serum is a determinant of cell proliferation, differentiation, gene expression, and transcriptome stability. Stem Cells 2005;23:1357-66.

17. Kuang WY, Zhou XF, Zhang GS, Liu LH, Chen SF, Li RJ, et al. In vitro expansion of the adult human bone marrow mesenchymal stem cells for clinic application in HSCT. Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi 2008;16(3):633-8.

18. Kolf CM, Cho E, Tuan RS. Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. Arthritis Res Ther 2007;9(1):204.

19. Baber MA, Caplan AI. Cell surface antigens on human marrow-derived mesenchymal cells are detected by monoclonal antibodies. BMT 1992;13:69-80.

20. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. Mol Biol Cell 2002 Dec;13(12):4279-95.

21. Shafaei H, Esmaeili A, Mardani M, Razavi S, Hashemibeni B, Nasr-Esfahani MH, et al. Effects of human placental serum on proliferation and morphology of human adipose tissue-derived stem cells. BMT 2011 Nov;46(11):1464-71.

22. Majore N, Moretti P. Hass R, Kasper C. Identification of subpopulations in mesenchymal stem cell-like cultures from human umbilical cord. Cell Commun Signal. 2009;7: 6.

23. Sekiya I, Larson BL, Smith JR, Pochampally R, Cui JG, Prockop DJ. Expansion of human adult stem cells from bone marrow stroma: Conditions that maximize the yields of early progenitors and evaluate their quality. Stem Cells 2002; 20:530-41.

24. Stute N, Holtz K, Bubenheim M, Lange M, Blake F, Zander AR. Autologous serum for isolation and expansion of human mesenchymal stem cells for clinical use Exp Hematol 2004;32:1212-25.

25. Neuhuber B, Swanger SA, Howard L, Mackay A, Fischer I. Effects of plating density and culture time on bone marrow stromal cell characteristics. Exp Hematol 2008;36:1176-85.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-07-15]

26. Tuan RS. Stemming cartilage degeneration: adult mesenchymal stem cells as a cell source for articular cartilage tissue engineering. Arthritis Rheum 2006;54(10):3075-8.

27. Song K, Xiubo Fan, Ma X, Cui Z. Adipose-derived stem cell: a better stem cell than BMSC .Cell Biochem Funct 2008;26:664-75.

28. Shetty P, Bharucha K, Tanavde V. Human umbilical cord blood serum can replace fetal bovine serum in the culture of mesenchymal stem cells. Cell Biol Int 2007;31:293-8.

29. Zhu Y, Liu T , Song K, Fan X, Ma X, Cui Z. Adipose-derived stem cell: a better stem cell than BMSC. Cell Biochem Funct 2008;26: 664-75.

30. Djouad F, Mrugala D, Noel D, Jorgensen C. Engineered mesenchymal stem cells for cartilage repair. Regen Med 2006 Jul;1(4):529-37.

31. Liu TM, Martina M, Hutmacher DW, Hui JH, Lee EH, Lim B. Identification of common pathways mediating differentiation of bone marrow- and adipose tissue-derived human mesenchymal stem cells into three mesenchymal lineages. Stem Cells 2007 Mar;25(3):750-60.

32. De Ugarte DA, Alfonso Z, Zuk PA, Elbarbary A, Zhu M, Ashjian P, et al. Differential expression of stem cell mobilization-associated molecules on multi-lineage cells from adipose tissue and bone marrow. Immunol Lett 2003 Oct 31;89(2-3):267-70.

33. Lee RH, Kim B, Choi I, Kim H, Choi SC, Suh KT, et al. Characterization and expression analysis of mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue. Cell Physiol Biochem 2004;14:311-24.

34. Dahl JA, Duggal S, Coulston N, Millar D, Melki J, Shahdadfar A, et al. Genetic and epigenetic instability of human bone marrow mesenchymal stem cells expanded in autologous serum or fetal bovine serum. Int J Dev Biol 2008;52:1033-42.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-07-15]

Evaluation of morphology and immunephenotype of mesenchymal stem cells after switching of bovine serum of media to human serum

***Hajar Shafaei,** Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran (*Corresponding author). shafaei49@gmail.com
Ebrahim Esfandiary, Department of Anatomical Sciences and Molecular Biology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran. esfandiari@med.mui.ac.ir
Hassan Baghernezhad, Bonyan Cellular Kosar Company, East Azarbaijan Science and Technology Park, Tabriz, Iran. bagernajadhassan@gmail.com

Abstract

Background: Mesenchymal Stem Cells (MSCs) are used for cell therapy purposes. Fetal Bovine Serum (FBS) in culture media is essential for growth. As FBS may induce an immunological reaction and transfer pathogenic agents to MSC recipients, this study was designed to evaluate Adipose Tissue Stem Cells (ASCs) in FBS, human serum, switching of FBS to human serum and vice versa by cytology and flow cytometry.

Results: ASCs isolated and expanded in medium containing FBS were flat shape and slowly growing versus to those grown in medium containing human serum. The forward scatter data significantly demonstrated ASCs in FBS had large size as compared to others ($p<0.05$). Morphology of ASCs were similar to flow cytomertic findings. There are no significant differences in immunophenotypic markers of ASCs such as CD44, and CD90 grown in different media. However mean fluorescence intensity was higher for CD44 in human serum groups.

Conclusion: These results indicate that medium enriched with human serum improved the culture condition of ASCs in comparison with medium enriched with commercially available FBS. Switching of FBS to human serum may be a useful method for stem cells that are grown in medium containing FBS or frozen in FBS.

Keywords: Human serum, FBS, MSC, ASC

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-07-15]