مقاله پژوهشی

مقایسه اثر سرم جنین گاو (FBS) و سرم انسان (HS) بر جداسازی، تکثیر و تمایز استئوژنیک سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی

حسین محمد پور[۱]، وحید رزبان[۲]، مهدی محمودی[۳]، محمد رضا حاجی زاده[۳]، مریم حسینی پور[۱]، آتنا سادات قریشی[۱]، گیتی فارسی[۱]، فرزانه سادات حسینی[۱]، علیرضا خوشدل[۴]

۱- گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، رفسنجان، ایران
۲- دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران
۳- مرکز تحقیقات پزشکی مولکولی و گروه آموزشی بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، رفسنجان، ایران
۴- گروه بیوشیمی بالینی دانشکده پزشکی و مرکز تحقیقات سلامت پسته، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، رفسنجان، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۵/۰۷/۲۰ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۵/۱۱/۲۲

چکیده

زمینه و هدف: سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی (ADSCs)، به‌عنوان یک منبع برای برنامه‌های کاربردی درمانی و مهندسی بافت بررسی شده‌اند. پروتکل‌های تکثیر رایج ازسرم جنین گاوی (FBS) به‌عنوان فاکتور رشد استفاده می‌کنند که یک منبع بالقوه پاتوژن و حاوی آنتی‌ژن‌های حیوانی است که می‌تواند بعد از پیوند ایجاد واکنش‌های حساسیتی کند و از منظر ایمنی، سرم انسانی (HS) می‌تواند جایگزین مناسبی برای آن باشد. این مطالعه مقایسه‌ای بین محیط کشت غنی‌شده با FBS یا HS در رشد و تمایز ADSCs است.

مواد و روش‌ها: سرم انسانی از ۹۰ میلی‌لیتر خون وریدی یک فرد سالم به دست آمد. ADSCs از بافت چربی زائد عمل لیپولیز استخراج و کشت در محیط غنی‌شده با HS یا FBS انجام گرفت. بیان مارکرهای سطحی سلولی ADSCs به‌وسیله فلوسایتومتری بررسی شد. ارزیابی تمایز استخوانی با استفاده از رنگ‌آمیزی آلیزارین رد بررسی گردید.

نتایج: جداسازی و رشد hADSCs در محیط غنی‌شده با HS همانند محیط غنی‌شده با FBS بوده، اما تمایز در محیط دارای HS چشمگیرتر و اختلاف معنی‌دار ($p>0.05$) است.

نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان داد که HS قابلیت جایگزینی FBS را در جداسازی، تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی در محیط را کشت دارد.

کلمات کلیدی: سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی (ADSCs)، سرم انسانی (HS)، سرم جنین گاوی (FBS)

مقدمه

در سال‌های اخیر سلول‌درمانی به دلیل توانایی سلول‌های بنیادی در احیای بافت و ارگان‌های آسیب‌دیده توجه زیادی را به‌سوی خود جلب نموده است. امروزه بسیاری از این سلول‌ها ازجمله سلول‌های بنیادی جنینی، چندتوان القاءشده و سلول‌های بنیادی پیش ساز بافت‌های بزرگ‌سال موارد امیدبخشی برای سلول‌درمانی هستند (۱). به‌علاوه از سلول‌های بنیادی می‌توان در تولید سلول‌ها و درنهایت بافت‌های گوناگون در بدن موجود زنده استفاده کرد (۲). محدودیت‌های اخلاقی در زمینه استفاده از سلول‌های بنیادی جنینی، دانشمندان را بر این داشت که تحقیقات بیشتری پیرامون سلول‌های بنیادی بالغ داشته باشند (۳). از مهم‌ترین سلول‌های بنیادی بالغین که امروزه توجه اکثر محققین را به خود جلب کرده است می‌توان به سلول‌های بنیادی مزانشیم اشاره کرد. سلول‌های بنیادی مزانشیمی Mesenchymal Stem Cells (MSCs) برای اولین بار در سال ۱۹۶۶ در تحقیقات Friedenstein و Petrakova، که موفق به جداسازی سلول‌های اجدادی تشکیل‌دهنده استخوان از مغز استخوان موش آزمایشگاهی شدند، مطرح شد (۴). تقریباً تمام بافت‌های بالغ دارای سلول‌های بنیادی مزانشیمی هستند که ازجمله می‌توان به پوست، کبد (۵)، بافت چربی (۶)، مغز

*نویسنده مسئول: **علیرضا خوشدل**، گروه بیوشیمی بالینی دانشکده پزشکی و مرکز تحقیقات سلامت پسته، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، رفسنجان، ایران
Email: alireza.khoshdel@gmail.com

استخوان (۷)، رگ‌های خونی و عضلات اسکلتی (۸) اشاره نمود. سلول‌های مزانشیمی، پتانسیل تمایز به سلول‌های مزودرم احشایی، استئوبلاست، آدیپوسیت، کندروسیت و میوسیت را دارا می‌باشند. هم‌چنین در مطالعات اخیر نشان داده شده که در محیط مناسب، سلول‌های مزانشیمی می‌توانند به کاردیومیوسیت و یا حتی سلول‌هایی از مشتقات غیر مزودرمی نظیر هپاتوسیت‌ها و نورون‌ها، تمایز یابند (۹). خصوصیات ذکرشده، سلول‌های بنیادی مزانشیمی را تبدیل به منبع سلولی مناسب جهت کاربرد در مهندسی بافت و سلول‌درمانی ساخته است. سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSCs) سلول‌های بنیادی بالغ و چندتوان با پتانسیل بالا در تکثیر هستند که اکثراً این سلول‌ها نه‌تنها خاصیت خود تجدیدی با مورفولوژی فیبروبلاستی را تا حدود ۲۰ تا ۳۰ پاساژ دارند، بلکه هم چنان پتانسیل تمایز به انواع بافت‌های همبندی مثل ماهیچه، استخوان، غضروف، تاندون، چربی، بافت‌های کبدی و عصبی را تا تقسیمات بالا حفظ می‌کنند (۳). یکی دیگر از ویژگی‌های سلول‌های بنیادی مزانشیمی این است که پتانسیل انجماد و ذوب مجدد داشته و به دنبال خروج از این شرایط، قادر به تکثیر و تمایز به رده‌های مزانشیمی هستند (۱۰). کاربرد متداول کلینیکی سلول‌های بنیادی در موارد مختلف ازجمله درمان استئوژنز ناقص، آسیب مغزی، پارکینسون، انفارکتوس قلبی، التیام شکستگی، پاره شدن تاندون، درمان بیماری‌های مفصلی، درمان بیماری‌های کبد و اختلالات ایجادشده دیگر در بدن به‌خوبی نشان داده شده است (۱۱). درواقع سلول‌های بنیادی مزانشیمی نخستین بار به‌عنوان سلول‌های بنیادی غیر خون‌ساز در مغز استخوان شناسایی شدند. این سلول‌های چندتوان به‌راحتی و با استفاده از خاصیت چسبندگی خود به سطح پلاستیکی فلاسک‌های کشت در آزمایشگاه، جداسازی، تکثیر و تمایز داده می‌شوند. به علت اینکه سلول‌های بنیادی مزانشیمی قدرت خود ترمیمی و تکثیری بالایی دارند، این سلول‌ها اهداف مناسبی جهت ژن‌درمانی با استفاده از وکتورهای رتروویروسی می‌باشند (۱۲). سلول‌های استرومایی چسبنده می‌توانند همراه با وکتورها تبدیل به یک سلول نوترکیب شده و به مدت طولانی و به‌طور مؤثر ژن مربوطه را بیان کنند. لذا ابزار مناسبی جهت سلول‌درمانی و ژن‌درمانی محسوب می‌گردند (۱۳). نشان داده شده که بافت چربی انسانی، منبع بافتی مناسبی برای جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی است چراکه این بافت به‌راحتی و به‌طور روتین در مقادیر مناسب از جراحی لیپوساکشن در دسترس بوده و بازده سلولی آن نسبت به منبع بافتی مغزاستخوان بسیار بالاتر است (۱۴). به‌علاوه Adipose-derived Stem Cells (ADSCs) در شرایط آزمایشگاهی و بدن مصونیت از پاسخ ایمنی (۱۵) جلوگیری از بیماری پیوند علیه میزبان را نشان داده (۱۶) و درکشت طولانی ازنظر ژنتیکی نسبت به Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells (BMSCs) بسیار پایدارترند (۱۷). بافت چربی زیر جلدی فراوان و به سهولت قابل‌دسترسی است (۱۸). باوجوداین مزایا ADSCs باید کشت سالم و سریع داشته باشد، درحالی‌که پتانسیل چندتوانی آن حفظ شود (۱۹). اگرچه Human ADSCs امیدواری زیادی برای سلول‌درمانی در آینده ایجاد نموده، تحقیقات فعلی روی ایجاد روش کشت مورد استفاده حاوی سرم با مکمل‌های مختلف تمرکز نموده‌اند (۲۰). دستورالعمل‌های رایج برای آزمایش‌های بالینی و تحقیقات بنیادی با به‌کارگیری hADSCs از محیط کشت تکمیل‌شده با سرم جنین گاوی Fetal Bovine Serum (FBS) استفاده می‌کنند (۲۱)؛ اما FBS ممکن است به‌طور ناخواسته منبع آنتی‌ژن‌های گوناگون حیوانی باشد که باعث سرایت بیماری‌های مشترک بین انسان و حیوان (Zoonoses)، از قبیل ویروس‌ها یا پریون‌های حیوانی گردد. به‌علاوه FBS می‌تواند در بیماران گیرنده سلول‌های تکثیر یافته در محیط حاوی FBS در واکنش‌های آنافیلاکتیک یا ازدیاد حساسیت دخالت کند (۲۲). اگرچه محیط کشت تکمیل‌شده با FBS درکشت hADSCs استفاده وسیعی دارد، سلول‌های کشت‌شده در این محیط‌ها آنتی‌ژن‌های حیوانی N-گلیکوزیل نورامینیک اسید (Neu 5 Gc) را بیان می‌کنند (۲۳). بالا بردن پتانسیل سلول‌درمانی مورداستفاده در آزمایش‌های بالینی برای دامنه وسیعی از بیماری‌ها اهمیت یافته است (۲۴). این مسائل بسیاری از محققین را به تمرکز برای یافتن سرم ایمن، مناسب و اقتصادی رهنمون می‌نماید که خواص شبیه FBS داشته اما از منبع حیوانی نباشد (۲۵). برای کشت سلولی در شرایط آزمایشگاهی هم‌اکنون سرم انسانی Human Serum (HS) به‌عنوان جایگزینی برای FBS مطرح گردیده است. HS حاوی پروتئین‌های بسیاری شامل فاکتورهای رشد، ایمنوگلوبولین‌ها،

کمپلمان و ایجاد اثرات وسیع گوناگون درکشت سلول است که ممکن نیست به‌آسانی به فاکتورهای رشد نوترکیب جبران شوند (۲۶).

هدف از این مطالعه، مقایسه اثر سرم انسان در برابر سرم جنین گاو روی تکثیر و به‌طور ویژه تمایز ADSCs (که در مطالعات قبلی کمتر به آن پرداخته شده) درکشت سلولی است.

مواد و روش‌ها

آماده‌سازی محیط و سرم HS

در این مطالعه حدود ۹۰ میلی‌لیتر خون وریدی از یک فرد سالم (ترجیحاً با گروه خونی AB که سرم آن فاقد آنتی‌بادی‌های A و B است) و با رضایت‌نامه کتبی، به‌تناوب چندروزه گرفته شد. جهت جداسازی سرم، خون گرفته شده در ۲۵۰۰rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ و سرم جدا گردید. سرم جداشده به مدت ۳۰ دقیقه در ۵۶°C گرما داده شد تا غیرفعال شود، سپس در دمای ۸۰°C- تا زمان استفاده نگهداری گردید (۲۷).

استخراج و کشت سلول

در این مطالعه از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی انسانی (hADSc) استفاده شد، برداشت نمونه بافت چربی با دریافت رضایت‌نامه شخصی از فرد دهنده داوطلب عمل لیپولیز، توسط پزشک جراح، در اتاق عمل و تحت شرایط استریل انجام گرفت. در حدود ۵۰ گرم از نمونه بافت چربی در ظرف استریل به اتاق کشت منتقل گردید. ابتدا به‌منظور حذف سلول‌های خونی، نمونه چربی چندین بار توسط محلول Phosphate-Buffered Saline (PBS) (Shellmax) شستشو داده شده، جهت جلوگیری از آلودگی میکروبی و قارچی به آن محلول پنی‌سیلین- استرپتومایسین (Shellmax) اضافه شد و بافت چربی سفید باقی‌مانده داخل پلیت به قطعات ریز تبدیل گردید. بعدازاین مرحله در حدود یک میلی‌لیتر آنزیم کلاژناز نوع I (۰/۰۷۵٪) (Gibco) محلول در PBS به پلیت افزوده شده و توسط یک پیپت پاستور با دیسپنس متوالی با بافت چربی مخلوط گردید. بعد از هضم نسبی قطعات ریز داخل پلیت به لوله فالکون منتقل شده و مجدداً یک میلی‌لیتر آنزیم کلاژناز نوع I (۰/۰۷۵٪) به آن اضافه شده و در حمام آب گرم ۳۷ درجه به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شد. در طول این مدت هر ۵ دقیقه لوله حاوی نمونه را تکان داده تا به تجزیه بیشتر بافت چربی کمک شود. بعد از مرحله تجزیه آنزیمی، محتویات را به ۲ لوله مجزا که یکی حاوی مقداری محیط Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Shellmax) غنی‌شده با ده درصد HS و لوله دیگر محتوی غنی‌شده با DMEM غنی‌شده با ۱۰ درصد FBS (Shellmax) منتقل نموده تا به‌وسیله پروتئازهای سرم، کلاژناز خنثی شود. سپس لوله‌های مذکور با دور ۱۳۰۰ rpm به مدت پنج دقیقه سانتریفیوژ شد. روغن و بافت چربی رویی به‌آرامی برداشته و محلول قسمت پایین لوله که حاوی سلول‌های مزانشیمی بافت چربی بود با PBS شستشو شده و بعد از سانتریفیوژ مجدد و رسوب سلول‌ها با دور ریختن محلول رویی، به سلول‌های ته‌نشین شده در هر لوله به‌طور مجزا محیط DMEM غنی‌شده با HS یا FBS اضافه و بعد از همگن شدن سلول‌ها در محیط، به داخل فلاسک‌های مخصوص کشت سلول منتقل شدند.

درنهایت فلاسک حاوی سلول داخل انکوباتور ۳۷ درجه و ۵ درصد CO_2 قرار داده شد (۱۹).

تکثیر سلول ADSCs

سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی مورد آزمایش در محیط کشت غنی‌شده با FBS حاوی ۱۰ درصد FBS آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین (100u/ml) و استرپتومایسین (100gr/ml) و (DMEM) و یا محیط کشت غنی‌شده با HS حاوی ۱۰ درصد HS، آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین (100u/ml) و استرپتومایسین (100gr/ml) (Shellmax) و DMEM در انکوباتور ۳۷ درجه با ۵ درصد CO_2 و ۹۰٪ رطوبت انکوبه شدند. محیط کشت هر سه روز یک‌بار با محیط تازه جایگزین شد. پس از رسیدن تعداد سلول‌ها به حد لازم (پوشش بالای ۹۰٪) با تریپسینه کردن (تریپسین/EDTA ۰/۲۵٪) (Bio Idea) فلاسک، سلول‌ها جدا و جهت پاساژ سلولی و یا آنالیزهای بعدی استفاده شدند (۱۹).

جهت محاسبه تکثیر سلول‌ها در هر دو محیط HS و FBS، بعد از پاساژ دوم، قسمتی از سلول‌ها با چگالی 10^3، در شرایط سلول‌های کشت شده در فلاسک کشت، در پلیت‌های ۴ خانه، کشت شده و در روزهای ۳، ۵، ۷ و ۹ مورد شمارش قرار گرفتند.

پاساژ سلول‌های بنیادی

هنگامی‌که سلول‌ها ۷۰-۶۰٪ سطح فلاسک را پر کردند، پاساژ داده شدند. محیط رویی سلول‌ها را دور ریخته سلول‌ها با

PBSشستشو گردیدند. سپس به فلاسک تریپسین اضافه شده، ۲ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. زمانی که ۹۰٪ سلول‌ها از فلاسک جدا شدند به آن‌ها محیط کشت DMEM حاوی FBS یا HS اضافه شد تا تریپسین غیرفعال شود. سپس محلول حاوی سلول‌ها به یک فالکون ۱۵ml منتقل و به مدت ۵ دقیقه در ۱۰۰۰rpm سانتریفوژ شد. بعد از خارج کردن محلول رویی، رسوب سلولی در ۱ml محیط کشت به‌طور یکنواخت حل گردید.

جهت شمارش سلول‌ها، ۱۰ میکرولیتر از محیط همگن شده با ۱۰ میکرولیتر تریپان بلو مخلوط شده و سلول‌ها شمارش شد. همچنین درصد سلول‌های زنده نیز ارزیابی گردید.

با استفاده از لام نئوبار تعداد سلول‌ها در خانه‌های مربوط به گلبول سفید (در چهار ناحیه حاوی ۱۶ مربع) شمارش شده و تعداد سلول‌ها طبق فرمول زیر محاسبه گردید.

تعداد سلول در میلی‌لیتر = میانگین تعداد سلول‌های شمرده شده در چهارخانه × 10^4

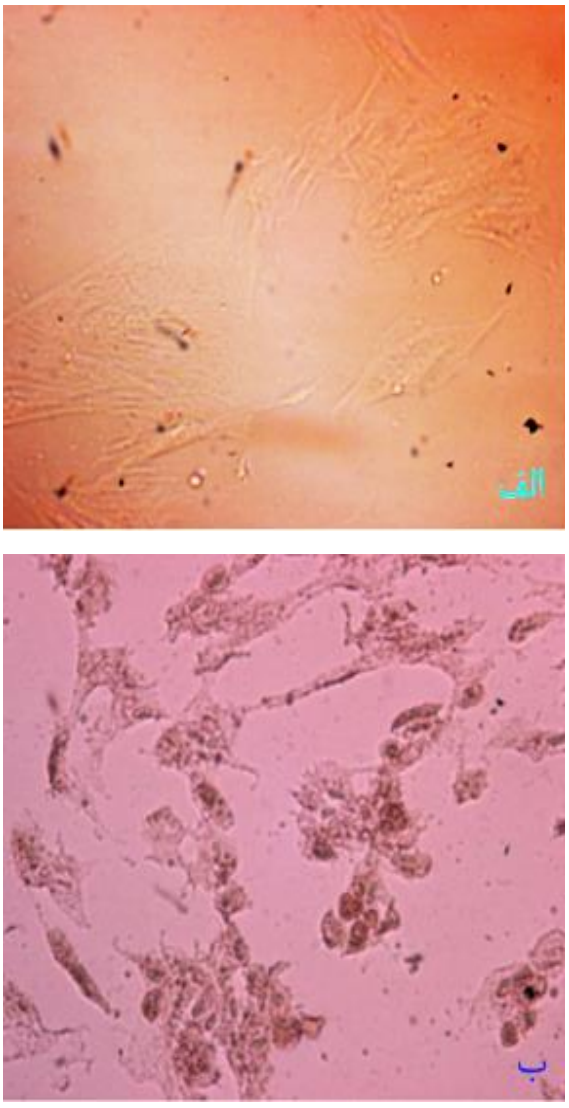
آنالیز فلوسایتومتری

برای تائید مزانشیمی بودن سلول‌های جدا شده از بافت چربی علاوه بر خاصیت چسبندگی سلول‌های بنیادی از فلوسایتومتری استفاده شد. در پاساژ چهارم، بعدازاینکه سلول‌ها به‌وسیله تریپسین-EDTA ۰/۲۵٪ جداسازی شدند و سوسپانسیون سلولی در DMEM تهیه گردید، سلول‌ها با لام نئوبار شمارش شدند. قسمتی از سوسپانسیون سلولی حاوی 1×10^5 سلول با Ab محلول در PBS حاوی ۳٪ FBS و ۵٪ NaN_3 برای مدت ۳۰ دقیقه روی یخ انکوبه شدند. آنتی‌بادی کونژوگه ضد مارکرهای سطحی سلول شامل CD90، CD34 و CD105 استفاده شدند. فلوسایتومتری با استفاده از دستگاه فلوسایتومتری شرکت Bio-Rad آمریکا انجام گرفت (۱۹).

ارزیابی ظرفیت تمایز به رده استخوان

برای تمایز به رده استخوان، در پاساژ چهارم، بعد از جدا شدن سلول‌ها در هرکدام از فلاسک‌های حاوی HS و یا FBS، به‌وسیله تریپسین-EDTA ۰/۲۵٪، از هرکدام آن‌ها سوسپانسیون سلولی تهیه گردید.

۳۰۰ میکرولیتر از محیط القاکننده تمایز به استخوان (sigma) را به هر یک از چاهک‌های پلیت ۴ خانه اضافه کرده و ۵۰ هزار سلول به آهستگی از جداره چاهک (به شکلی که نوک سرسمپلر به کف چاهک نچسبد) با حرکت حلزونی شکل به سمت مرکز چاهک ریخته شد. پلیت به مدت ۱۰ دقیقه زیر هود قرار گرفت و بعد به آهستگی به درون انکوباتور منتقل و به مدت ۲ ساعت در این حال قرار داده شد. سپس مجدداً



شکل ۱- الف: سلول‌های ADSCs در محیط غنی‌شده با HS.
ب: تمایز به استخوان در حضور HS بدون رنگ‌آمیزی (۴۰۰x)

۲۰۰ میکرولیتر از محیط تمایز بافت استخوانی به درون چاهک اضافه گردید. سلول‌ها به مدت ۲۱ روز با محیط تمایزی شامل DMEM همراه با دگزامتازون ۱ Mμ، ۵۰ μg/ml اسید آسکوربیک ۲-فسفات در هرکدام از دو محیط غنی‌شده با ۱۰ درصد HS یا FBS انکوبه شدند. محیط تمایزی بر اساس دید چشم یا با استفاده از میکروسکوپ معمولاً ۲ بار در هفته

تعویض شد. تمایز سلول‌ها با روش هیستوشیمی (رنگ‌آمیزی) مورد ارزیابی قرار گرفت. جهت بررسی تمایز استخوان از رنگ‌آمیزی آلیزارین رد (Alizarin Red) استفاده شد (۱۹).

آنالیز آماری داده‌ها

نتایج به‌وسیله نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۷ و با استفاده از آزمون t (t-test) آنالیز شدند. تمام مقادیر به‌صورت «میانگین ± انحراف معیار» بیان شده، سطح معنی‌داری در آزمون‌ها کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج

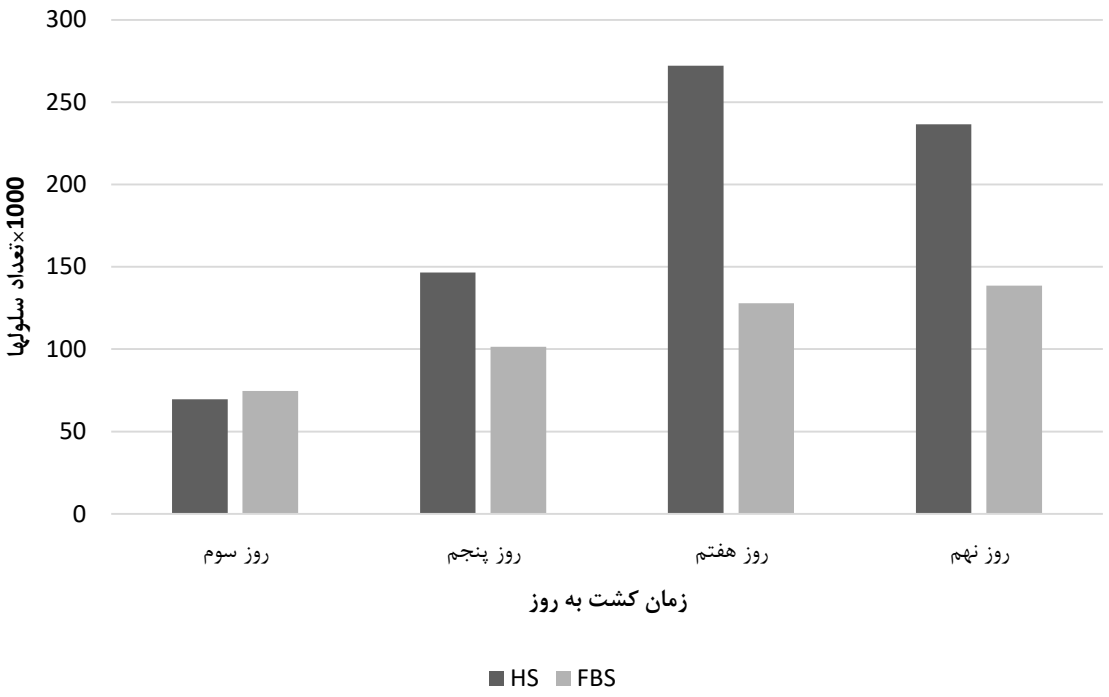
تکثیر ADSCs

در این مطالعه بعد از استخراج ADSCs از بافت چربی و کشت در محیط‌های حاوی HS و FBS، مشاهده شد که سرعت رشد و تکثیر سلول‌های ADSCs در روزهای ابتدایی در محیط غنی‌شده با HS همانند سرعت آن در محیط غنی‌شده با FBS بود و تفاوت قابل‌توجهی میان آن‌ها مشاهده نگردید ($p>0.05$). (شکل ۱)

هرچند از روز پنجم کشت، اختلاف در تعداد سلول‌ها به سطح معنی‌داری رسید و تکثیر آن‌ها در محیط غنی‌شده با HS سریع‌تر از محیط غنی‌شده با FBS شد ($p<0.05$). (شکل ۲)

بیان مارکرهای سطحی سلولی

در آنالیز فلوسیتومتری که روی سلول‌های برداشت شده از پاساژ چهارم انجام گرفت مشخص گردید که الگوی بیان مارکرهای سطحی در سلول‌های تکثیر یافته در محیط کشت غنی‌شده با HS، با سلول‌های کشت داده شده در محیط غنی‌شده با FBS که در مطالعات قبلی گزارش شده بود (۲۸) مشابه است. در هر دو محیط سلول‌ها مارکرهای CD90 و CD105 را بیان می‌نمایند (بیان در حدود ۸۵٪ سلول‌ها) درحالی‌که بیان مارکر سطحی CD34 در هر دو محیط منفی بود (بیان در حدود ۳٪ سلول‌ها). (شکل ۳)



شکل ۲- تفاوت تعداد سلول‌ها در روزهای متوالی کشت در هردو محیط غنی‌شده با HS و FBS
*اختلاف از روز پنجم به سطح معنی‌داری رسید ($p<0.05$).

بیان مارکرهای سطحی در محیط HS، همانند الگوهای بیان در محیط حاوی FBS بوده و ازنظر بیان CD90 و CD105 مثبت و ازنظر بیان CD34 منفی است.

پتانسیل تمایز به سلول‌های استخوانی

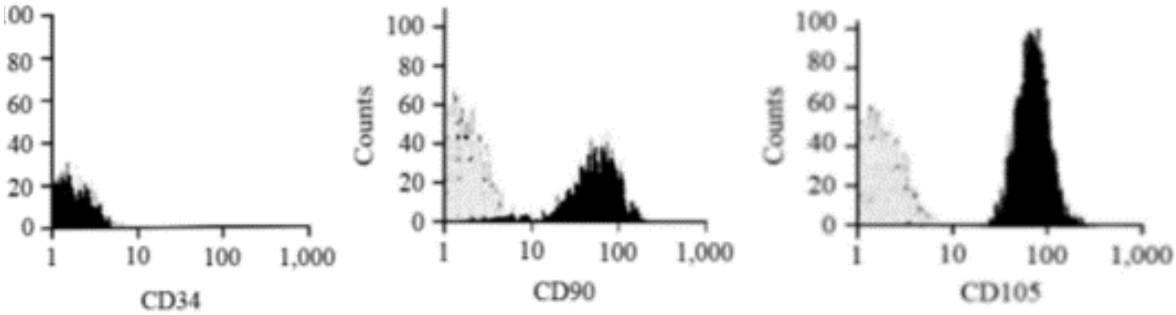
بعد از القای تمایز سلول‌های ADSCs به رده استخوان در هر دو محیط تمایزی حاوی HS یا FBS، از روز دهم رسوب کلسیم که شاخص اصلی ما برای تمایز به استخوان بود، در مشاهده میکروسکوپی مشخص شد که این تمایز و رسوب در روز پانزدهم_جهت رنگ‌آمیزی به سطح مطلوب رسید.

در این مشاهدات مشخص گردید که تمایز سلول‌های ADSCs در محیط غنی‌شده با HS سریع‌تر و بارزتر از تمایز آن‌ها در محیط غنی‌شده با FBS است، به‌طوری‌که هر چه از

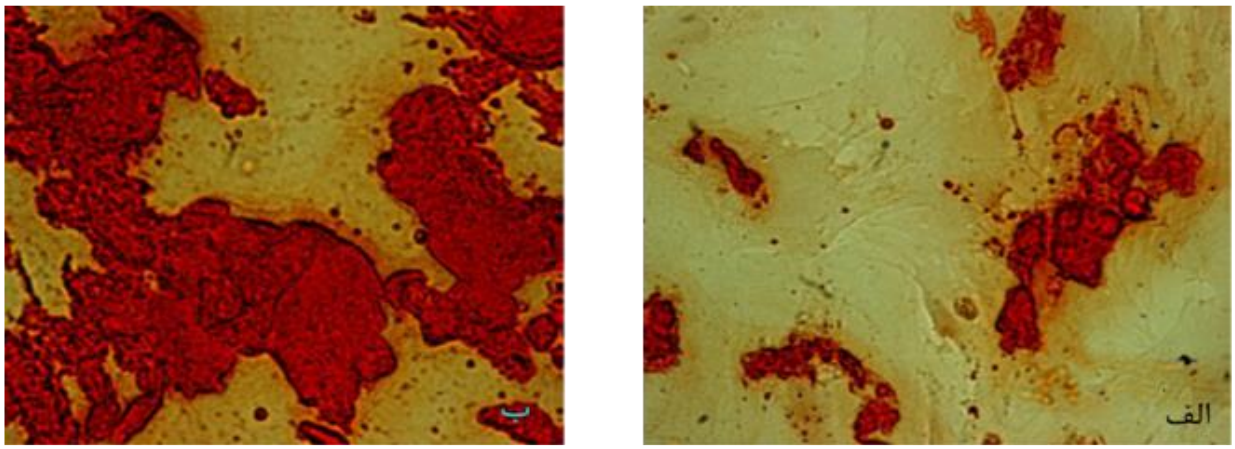
بحث و نتیجه‌گیری

تحقیقات بسیاری درباره تمایز MSCs انجام شده و همچنین، آزمایش‌های پیش بالینی گوناگونی با استفاده از hADSCs در حال انجام است تا به کمک نتایج آن‌ها بتوان به درمانی برای حالات مختلف مانند انفارکتوس میوکارد (۲۹) و نارسایی کبد (۳۰) دست یافت.

دستورالعمل‌های رایج برای آزمایش‌های بالینی و تحقیقات بنیادی با به‌کارگیری hADSCs از محیط کشت غنی‌شده با FBSاستفاده می‌کنند (۲۱)، اما این مکمل رشد حاوی



شکل ۳- نمودار آنالیز فلوسیتومتری بیان مارکرهای سطحی سلولی.
بیان مارکرهای بیان CD34، CD90 و CD105 در محیط غنی‌شده با HS در پاساژ ششم محاسبه گردید.



شکل ۴- رنگ‌آمیزی Alizarin red (۴۰۰x). الف: تمایز به استخوان در حضور FBS. ب: تمایز به استخوان در حضور HS
اختلاف سطح رسوب کلسیم (سطوح قرمزرنگ) در دو محیط قابل مشاهده است.

مدت کشت تمایزی گذشت اختلاف میزان سلول‌ها بیشتر نمایان شد. (شکل ۴)

پروتئین‌های با منشأ حیوانی است که قادر به نفوذ به داخل ADSCs هستند (۳۲). درنتیجه ممکن است برای میزبان

مشکلات بالقوه مانند انتقال ویروس و پریون و واکنش‌های ایمنی به وجود آید (۲۱).

در سال ۲۰۱۱ کمیسیون اروپا سندی برای کاهش خطر انتقال انسفالوپاتی اسفنجی شکل حیوانات از طریق محصولات دارویی انسانی و دامی منتشر کرد که به‌وضوح بیان می‌کند استفاده از مواد با منشأ غیر حیوانی باید ترجیح داده شوند (۳۳).

نتایج تحقیق حاضر نشان می‌دهد که تکثیر سلول‌های ADSCs در محیط کشت غنی‌شده با HS، HS-supplemented control medium (HS-CM) مطلوب‌تر از محیط کشت غنی‌شده با FBS، FBS-supplemented control medium (FBS-CM) است.

همچنین، در این مطالعه مشخص شد که بیان مارکرهای سطحی سلول‌های ADSCs تکثیر یافته در HS-CM همانند سلول‌های کشت داده شده در FBS-CM بوده، الگوهای بیان پس از گذشت چهار پاساژ با آنچه قبلاً گزارش شده بود (۲۸) مشابه است.

این نتایج نشان می‌دهد که HS-CM ازنظر بیان مارکرهای سطحی تفاوتی با FBS-CM ندارد.

بعلاوه نتایج ما نشان داد که به‌طور مشخص پتانسیل تمایزی سلول‌های ADSCs در محیط حاوی HS بسیار بیشتر از سلول‌های کشت شده در محیط همراه به FBS بود؛ و این مشاهدات مشخص کرد که HS اثرات سوء بر روی ویژگی‌های مشخصه یا پتانسیل تمایزی hADSc ندارد و به این مورد که از نقاط قوت این تحقیق محسوب می‌شود، در مطالعات قبلی کمتر پرداخته شده بود.

درمجموع این نتایج پیشنهاد می‌کند که HS جایگزینی مناسب برای FBS در روش‌های معمول کاربردهای بالینی است تا از آن به‌عنوان مکمل محیط کشت استفاده کنند.

مطالعات محدودی تاکنون در مورد استفاده ازسرم انسان برای تکثیر بهینه‌تر سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی صورت گرفته است که نتایج آن‌ها مشابه و موافق با این مطالعه است. مطالعه Lindroos و همکاران نشان داد که تکثیر سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی انسانی (hADSc)، در محیط کشت حاوی سرم انسانی، در مقایسه با محیط کشت حاوی سرم جنین گاوی بیشتر است (۲۰).

Bieback و همکاران نیز بیان کردند که درصد بهینه تکثیر سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی انسانی (hADSc) در محیط رشد حاوی HS بیشتر از محیط کشت حاوی FBS است (۳۴). در تحقیق دیگری Josh و همکاران نشان دادند که رشد سلول‌های مزانشیمی مشتق از بافت چربی انسانی در محیط کشت غنی‌شده با HS سریع‌تر از محیط کشت غنی‌شده با FBS است (۱۹)؛ و در مطالعه‌ای که Bahn و همکاران انجام دادند، نتایج نشان داد که سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی (ADSc) در محیط کشت حاوی HS گسترش و رشد بیشتری نسبت به محیط کشت حاوی FBS دارند؛ بنابراین HS می‌تواند به‌طور بالقوه به‌جای FBS در محیط کشت ADSc استفاده شود (۳۵).

با استفاده از فاکتورهای تمایز می‌توان با کارآیی بالایی سلول‌های بنیادی مزانشیمی را به سلول‌های استئوبلاست تمایز داد.

در مطالعه‌ای که Romanov و همکاران ازنظر عملکردی در خصوص رد پیوند، روی ADSCs در مقایسه با سلول‌های بنیادی مزانشیمی استخراج‌شده از مغز استخوان در میزبان غیرخودی انجام دادند، توان بقاء این سلول‌ها در نبود سرکوب‌کننده‌های سیستم ایمنی مشابه با عملکرد BMSCs بود و این بدان معناست که تحمل سیستم ایمنی بیمار به این سلول‌ها مشابه سلول‌های بنیادی مزانشیمی استخراج‌شده از مغز استخوان است (۳۶). ازنظر توان تمایزپذیری، هنگامی‌که این سلول‌ها در محیط‌های کشت القایی مناسب قرار گیرند، توانایی تمایزپذیری بالایی به سلول‌های رده مزانشیمی شامل استخوان، غضروف و چربی را دارند که از این نظر نیز تفاوت چندانی در مقایسه با دیگر سلول‌های بنیادی مزانشیمی ندارند (۳۷). اگرچه، در مطالعاتی نیز نشان داده شده است که پتانسیل تمایزی و بهبود شرایط بیمار با استفاده از ADSCs نسبت به BMSCs بهتر است. برای مثال، این سلول‌ها در انفارکتوس قلبی و تمایز به سلول‌های شبه کبدی پتانسیل بالاتری دارند (۳۸). اخیراً Dmitrieva و همکاران ویژگی‌های عمومی عملکردی و تأثیرات درمانی سلول‌های مزانشیمی با منشأ مغز استخوان و چربی را در ۴۳ بیمار اهداکننده بررسی کردند و گزارش نمودند که در پاساژهای پایین هردوی این سلول‌ها ازنظر ایجاد تعداد کلونی‌ها، زمان دوبلینگ (سرعت تزاید) و ترشح واسطه‌های سیستم ایمنی نظیر اینترلوکین ۶،

TGF-β و فاکتور رشد سلول‌های اپیدرمی عروقی توان مشابهی دارند، اما در پاساژهای بالاتر، سلول‌های بنیادی مزانشیمی با منشأ مغز استخوان از پاساژ ۴-۳ به بعد علائم سالخوردگی و پیری را نشان می‌دهند و این در صورتی است که سلول‌های بنیادی مزانشیمی با منشأ چربی تا پاساژ هشت نیز علائمی از سالخوردگی نشان نمی‌دهند (۳۹). این بدان معنی است که حتی با فرض نمونه و بازدهی مساوی، با استفاده از سلول‌های مزانشیمی جداشده از بافت چربی به منبع سلولی بالاتری دسترسی خواهیم داشت. لذا روی‌هم‌رفته، سلول‌های بنیادی مزانشیمی جداشده از بافت چربی مزیت‌هایی نسبت به سلول‌های بنیادی مزانشیمی جداشده از مغز استخوان دارند (۳۲).

مطالعات مختلف انجام‌گرفته در مورد سلول‌های بنیادی و روش‌های استخراج و کشت این سلول‌ها، از نتایج این تحقیق مبنی بر ارجحیت استفاده ازسرم انسانی نسبت به سرم جنین گاوی، حمایت می‌کند.

ازآنجایی‌که در پیوند سلول‌های بنیادی، شرایط زیان‌بار محیط گیرنده پیوند ازجمله نبود اکسیژن، فقر غذایی و نبود عروق تغذیه‌کننده، وجود رادیکال‌های آزاد اکسیژن، افزایش سایتوکاین‌های التهابی و عوامل دیگر وجود دارد، تمامی این عوامل باعث مرگ زودرس قسمت اعظم این سلول‌ها در روزهای ابتدایی پس از پیوند می‌شوند که به‌موجب آن میزان کارایی درمان سلولی بسیار پایین‌تر از حد انتظار است (۴۰). بنابراین لازم است برای افزایش کارایی درمان مؤثر، راهکاری ارائه شود تا سلول‌های بنیادی را در برابر این شرایط سخت مقاوم گرداند و هم‌چنین مدت بقای این سلول‌ها را در محیط پیوند افزایش دهد. برای نیل به این هدف، بهتر است در مطالعات آینده، کشت سلول‌های بنیادی در محیط غنی‌شده با HS همراه با استرس‌های محیطی همچون استرس اکسیداتیو یا هیپوکسی صورت پذیرد. هم‌چنین برای بهبود اثر HS در حمایت از کشت و تکثیر سلول‌های بنیادی می‌توان غلظت‌های مختلف HS در محیط کشت مانند ۱۵، ۲۰ و ۳۰ درصد را مطالعه و آزمایش نمود.

با توجه به نتایج به دست آمده این پژوهش می‌توان گفت که با توجه به عملکرد مشابه HS و FBS در استخراج و تکثیر ADSCs و هم‌چنین کارایی بیشتر HS نسبت به FBS در تمایز به استخوان، بهتر است در مطالعات و کاربردهای بالینی آینده از پروتکل تکثیر و تمایز در محیط غنی‌شده با HS استفاده کرد؛ زیرا HS نسبت به FBS سالم و ایمن‌تر و هم‌چنین مقرون‌به‌صرفه تر و در دسترس‌تر است.

تشکر و قدردانی

مقاله فوق نتیجه طرح تحقیقاتی مصوب دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان با کد ۹۴۰۷۸ است. لذا لازم است از حمایت مالی معاونت محترم پژوهشی دانشگاه تقدیر گردد. هم‌چنین از همکاران محترم گروه بیوشیمی بالینی و مرکز تحقیقات پزشکی مولکولی دانشکده پزشکی رفسنجان و کارکنان محترم بیمارستان ارتش کرمان که در این پژوهش ما را یاری نمودند، قدردانی می‌شود.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافعی را اعلام نکرده‌اند.

References

1. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K,et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. Cell. 2007; 131(5):861-72.
2. Watt FM. Hogan BL.Out of Eden: Stem cells and their niches. Science. 2000; 287(5457):1427-30.
3. Kogler G, Sensken S. Wernet P. Comparative generation and characterization of pluripotent unrestricted somatic stem cells with mesenchymal stem cells from human cord blood. Exp Hematol. 2006; 34(11):1589-95.
4. Barry F, Murphy JM. Mesenchymal stem cells: clinical application and biological characterization. Cell Biol. 2004; 36(4):568-84.
5. Oh Sunho, Oh Namsik, Appleford M, Ong JL. Bioceramics for tissue engineering applications– a review. American Journal of Biochemistry and Biotechnology. 2006;2(2): 49-56.

6. Kim KM, Evans GRD. Tissue Engineering: The Future of Stem Cells. In: Ashammakhi N, Reis RL, ed. USA: Topics in tissue engineering. 2005.p. 1-21.
7. Ghung Y, Klimanaskaya I, Becker S, Marh J, Lu SJ, Johnson J,et al. Embryonic and extra embryonic stem cell line derived from signal mouse blastomeres. Nature. 2006; 439(7073):216-9.
8. Furth ME, Atala A. Stem cells sources to treat diabetes. J Cell Bioche. 2009;106(4):507-11
9. Sethe S, Scutt A, Stolzing A. Aging of mesenchymal stem cells. Ageing Res Rev. 2006;5(1):91-116.
10. Izadpanah R, Kaushal D, Kriedt C, Tsien F, Patel B, Dufour J,et al. Long-term in vitro expansion alters the biology of adult mesenchymal stem cell. Cancer Res. 2008;68(11):4229-38.
11. Hung SC, Chen NJ, Hsieh SL, Li H, Ma HL, Lo WH. Isolation and characterization of size-sieved stem cells from human bone marrow. Stem Cells. 2002;20(3):249-58.
12. Yaccoby S. Osteoblastogenesis and tumor growth in myeloma. Leukemia & Lymphoma. 2010;51(2):213- 20.
13. Kumar S, Wan C, Ramaswamy G. Mesenchymal stem cells expressing osteogenic and angiogenic factors synergistically enhance bone formation in a mouse model of segmental bone defect. Molecular Therapy. 2010;18(5):1026-34.
14. 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(5411):143-47.
15. Gonzalez-Rey E, Gonzalez MA, Varela N, O'Valle F, Hernandez-Cortes P, Rico L, et al. Human adipose-derived mesenchymal stem cells reduce inflammatory and T-cell responses and induce regulatory T cells in vitro in rheumatoid arthritis. Ann Rheum. 2010;69(1):241-48.
16. Yanez R. Lamana ML, García-Castro J, Colmenero I, Ramírez M, Bueren JA. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have in vivo immunosuppressive properties applicable for the control of the graft-versus-host disease. Stem Cells. 2006;24(11):2582-91.
17. Meza-Zepeda LA, Noer A, Dahl J.A, Micci F, Myklebost O, Collas P. High-resolution analysis of genetic stability of human adipose tissue stem cells cultured to senescence. J Cell Mol Med. 2008;12(2):553-63.
18. Bunnell BA, Flaat M, Gagliardi C, Patel B, Ripoll C: Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation. Methods. 2008;45(2):115-20.
19. Josh F, Kobe K, Tobita M, Tanaka R, Suzuki K, Ono K, et al. Accelerated and Safe Proliferation of Human Adipose-derived Stem Cells in Medium Supplemented with Human Serum. J Nippon Med Sch. 2012;79(6):444-52
20. Lindroos B, Aho KL, Kuokkanen H, Räty S, Huhtala H, Lemponen R, et al. Differential Gene Expression in Adipose Stem Cells Cultured in Allogeneic Human Serum Versus Fetal Bovine Serum. Tissue Eng. 2010;16(7):2281-94.
21. Selvaggi TA, Walker RE, Fleisher TA. Development of antibodies to fetal calf serum with arthus-like reactions in human immunodeficiency virus-infected patients given syngeneic lymphocyte infusions. Blood. 1997;89(3):776-79.
22. Gregory CA, Reyes E, Whitney MJ, Spees JL. Enhanced engraftment of mesenchymal stem cells in a cutaneous wound model by culture in allogenic species-specific serum and administration in fibrin constructs. Stem Cells. 2006;24(10):2232-43.
23. Komoda H, Okura H, Lee CM, Sougawa N, Iwayama T, Hashikawa T, et al.: Reduction of Nglycolylneuraminic acid xenoantigen on human adipose tissue-derived stromal cellsmesenchymal stem cells leads to safer and more useful cell sources for various stem cell therapies. Tissue Eng Part A 2010; 16(4):1143-55.
24. Mizuno H, Tobita M, Uysal AC. Concise review: Adiposederived stem cells as a novel tool for future regenerative medicine. Stem Cells. 2012;30(5):804-10.
25. Kobayashi T, Watanabe H, Yanagawa T, Tsutsumi S, Kayakabe M, Shinozaki T, et al.: Motility and growth of human bone-marrow mesenchymal stem cells during ex vivo expansion in autologous serum. J Bone Joint Surg Am 2005; 87(10):1426-33.
26. Blande IS, Bassaneze V, Lavini-Ramos C, Fae KC, Kalil J, Miyakawa AA, et al.: Adipose tissue mesenchymal stem cell expansion in animal serum-free medium supplemented with autologous human platelet lysate. Transfusion. 2009;49(12):2680-85.
27. Mizuno N, Shiba H, Ozeki Y, Mouri Y, Niitani M, Inui T, et al. Human autologous serum obtained using a completely closed bag system as a substitute for foetal calf serum in human mesenchymal stem cell cultures. Cell Biol Int. 2006;30(6):521-24.
28. Suga H, Shigeura T, Matsumoto D, Inoue K, Kato H, Aoi N, et al.: Rapid expansion of human adipose-derived stromal cells preserving multipotency. Cytotherapy. 2007; 9(8): 738-745.
29. Miyahara Y, Nagaya N, Kataoka M, Yanagawa B, Tanaka K, Hao H, et al. Monolayered mesenchymal stem cells repair scarred myocardium after myocardial infarction. Nat Med. 2006; 12(4): 459-465.
30. Banas A, Teratani T, Yamamoto Y, Tokuhara M, Takeshita F, Osaki M,et al. Rapid hepatic fate specification of adipose-derived stem cells and their therapeutic potential for liver failure. J Gastroenterol Hepatol. 2009; 24(1):70-77.
32. 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(5):747-56.

33. Note for Guidance on minimizing the risk of transmitting animal spongiform encephalopathy agents via human and veterinary medicinal products (EMA/410/01 rev.3). Official Journal of the European Union. 2011/C 73/01.
34. Bieback K, Ha VA, Hecker A, Grassl M, Kinzebach S, Solz H, et al.: Altered Gene Expression in Human Adipose Stem Cells Cultured with Fetal Bovine Serum Compared to Human Supplements. Tissue Eng. 2010;16(11):3467-84.
35. Bahn JJ, Chung JY, Im W, Kim M, Kim SH. Suitability of autologous serum for expanding rabbit adipose-derived stem cell populations. J. Vet. Sci. 2012;13(4):413-17.
36. 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(1):138-43.
37. 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. 2013;67(2):263-73.
38. AI C. Adult mexenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. Cell physiol. 2007;213(2):341-47.
39. Fukuchi Y, Nakajima H, Sugiyama D, Hirose I, Kitamura T, Tsuji K. Human PlacentaDerived Cells Have Mesenchymal Stem/Progenitor Cell. Stem Cells 2004;22(5):649-58.
40- Toma C, Pittenger MF, Cahill KS, Byrne BJ, Kessler PD. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phen rine heart. Circulation. 2002;105(1):93-98.

Original Article

Comparing the Effects of Fetal Bovine and Human Sera on Isolation, Expansion and Osteogenic Differentiation of Adipose-Derived Stem Cells

Mohammadpour H[1], Razban V[2], Mahmoodi M[3], Hajizadeh MR[3],Hosseinipour M[1],Ghoreishi AS[1], Farsi G[1], Hosseini FS[1], Khoshdel AR[4*]

1. Department of Clinical Biochemistry, Faculty of Medicine, Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, Iran
2. Department of Molecular Medicine, Faculty of Advanced Medical Sciences and Technologies, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran
3. Molecular Medicine Research Center and Department of Clinical Biochemistry, Faculty of Medicine, Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, Iran
4. Department of Clinical Biochemistry, Faculty of Medicine, and Pistachio Safety Research Center, Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, Iran

Received: 11 Oct 2016 Accepted: 10 Feb 2017

Abstract

Background & Objectives: Adipose-derived stem cells (ADSCs) have been investigated as a promising cell source for therapeutic and engineering applications. Common proliferation protocols use fetal bovine serum (FBS) as a growth factor which is potentially a source of pathogens, and contains animal antigens that can cause an allergic reaction after transplantation in the recipient, and regarding immunity, human serum (HS) could be a suitable alternative to it. The aim of this study is to compare the culture medium enriched with FBS or HS as supplements in the proliferation and differentiation of ADSCs.

Materials & Methods: Human serum was extracted from 90 ml venous blood of a healthy person, taken in respective intervals. The ADSCs were isolated according to the protocol from adipose tissue after lipolysis operation and cultured by mediums enriched with FBS or HS. Expression of the surface markers of ADSCs was investigated by flow cytometry. Osteogenic differentiation was evaluated by Alizarin Red staining method.

Results: The analysis of cell growth showed that the isolation and proliferation of ADSCs in both media (HS & FBS) were similar, but there was a significant difference in case of differentiation in the HS medium.

Conclusion: This study showed that FBS could be replaced by HS in case of isolation, proliferation and differentiation of stem cells studies as supplement. Furthermore, our data suggest a fast and safe proliferation protocol by using human serum in the stem cells culture and cell-based therapies.

Keywords: adipose-derived stem cells (ADSCs), human serum (HS), fetal bovine serum (FBS)

***Corresponding author: Alireza Khoshdel**, Department of Clinical Biochemistry, Faculty of Medicine, Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, Iran
Email: alireza.khoshdel@gmail.com