مقاله پژوهشی

مجله سلول و بافت (علمی - پژوهشی)
جلد۸، شماره ٤، زمستان ۱۳۹٦

جداسازی، کشت و تعیین هویت سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی به‌روش اکسپلنت_آنزیمی

محمد حسین محمدی مهدی آبادی حسنی .M.Sc [۱]، محمد نبیونی .Ph.D [۲]، کاظم پریور .Ph.D [۱]، سیامک یاری.Ph.D [۳*]، علیرضا صاحبی M.Sc [۱]

۱- دانشگاه خوارزمی، دانشکده علوم زیستی، گروه علوم جانوری، تهران، ایران

۲- دانشگاه خوارزمی، دانشکده علوم زیستی، گروه سلولی و مولکولی، تهران، ایران

۳- دانشگاه بوعلی سینا، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی، همدان، ایران

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: yarisiamak@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۳/۳۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۳/۶

چکیده

هدف: در این مطالعه، ترکیبی از روش آنزیمی و اکسپلنت را برای جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی چربی مورد استفاده قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: بافت چربی ناحیه‌ی شکم از رَت‌های نر نژاد ویستار جدا شد. بافت‌ها به قطعات کوچک (≈۲mm) تقسیم شدند، سپس آنزیم Trypsin –EDTA با غلظت ۰/۲۵ درصد به بافت‌ها افزوده شد و به‌دنبال آن به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور شیکردار قرار داده شدند. سپس بافت تیمار شده با آنزیم سانتریفیوژ شده و قطعات شناور کشت داده شدند. آنالیزهای آماری مربوط به تعداد سلول‌ها با استفاده از نرم افزار GraphPad Prismv6 مـورد بررسـی قرار گرفت.

نتایج: نتایج نشان داد که جمعیت سلول‌های بنیادی چربی جداسازی شده توسط این روش ترکیبی، تحت تاثیر تنش کمتری قرار خواهند گرفت و جمعیت سلولی همگن و مشابهی را از لحاظ ظاهری و ریخت‌شناسی نشان خواهند داد و نیز آنالیز فلوسایتومتری مارکرهای سطحی نشان داد که این سلول‌ها برای CD73، CD105، CD44 و CD90 مثبت و برای CD34، CD45 و CD11b منفی بودند

نتیجه‌گیری: در این مطالعه نشان داده شد که سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی رت می‌تواند با روش جدید اکسپلنت_آنزیمی جداسازی شوند که این روش، یک روش کشت سلولی با قابلیت تکرارپذیری بالا و بسیار به صرفه از لحاظ اقتصادی برای کاربردهای کلینیکی می‌باشد.

واژگان کلیدی: سلول‌های بنیادی مزانشیمی، بافت چربی، اکسپلنت، رت.

مقدمه

سلول‌های بنیادی مزانشیمی سلول‌های چندتوانی هستند که دارای ویژگی خودتجدید پذیری بوده، این سلول‌ها توانایی تمایز به دودمان‌های مختلف سلولی را دارا می‌باشند (۱). وجود سلول‌های بنیادی مزانشیمی در بافت‌های مختلف نظیر مغز استخوان، مایع آمنیوتیکی، خون بند ناف و دیگر بافت‌های مزودرمی یافت می‌شوند. این نوع سلول‌ها می‌توانند تا نسل‌های متمادی در شرایط آزمایشگاه رشد، تکثیر و تمایز یابند و همچنان مورفولوژی پایدار و حالت طبیعی کروموزوم‌هایشان را حفظ کنند (۲، ۳ و ۴). یکی از منابع استخراج سلول‌های بنیادی مزانشیمی بالغ، بافت چربی می‌باشد که طبق مطالعات، این بافت دارای مزیت‌های متعددی نسبت به سایر منابع استخراج سلول‌های بنیادی مزانشیمی می‌باشد. از جمله این مزیت‌ها می‌توان به درصد بالای سلول‌های بنیادی موجود در این بافت، توان تکثیری بالا و امکان تامین سلول‌های اتولوگ به‌منظور مقاصد درمانی اشاره کرد. ویژگی‌های فوق‌الذکر باعث شده است که این سلول‌ها منبع ایده آلی برای استفاده در اهداف سلول درمانی باشند (۵، ۶ و ۷).

جداسازی، استخراج و تعیین هویت سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی، یکی از مهم‌ترین مراحل کشت این سلول‌ها می‌باشد. مطالعات نشان داده است روشی که برای جداسازی سلول‌ها از بافت هدف به‌کار گرفته می‌شود در ویژگی‌های فنوتیپی و مورفولوژیک، نحوه رشد و تکثیر سلول‌ها موثر می‌باشد. متداولترین روشی که برای این منظور از آن بهره می‌گیرند استفاده از روش هضم آنزیمی بافت چربی هدف با آنزیم کلاژناز و تریپسین می باشد (۸ و ۹). که این روش دارای معایبی نیز می‌باشد در واقع استفاده از بسیاری از آنزیم‌های تجاری و بویژه آنزیم کلاژناز از نظر اقتصادی مقرون به صرفه نبوده و با توجه به اینکه از منابع مختلف بافتی و میکروبی تهیه می‌شود دارای اندوتوکسین‌ها و گزنوآنتی‌ژن‌های متعدد می‌باشد و همچنین متغیر بودن پروفایل پروتئازی و میزان فعالیت آنزیم کلاژناز، منجر به تفاوت در جمعیت‌های سلولی در طی آزمایشات مختلف می‌شود علاوه بر این، تفاوت محتوی پروتئازی بر فنوتیپ سطحی سلول‌ها نیز تاثیر می‌گذارد (۱۰، ۱۱، ۱۲ و ۱۳).

در سال‌های اخیر، روش جایگزین دیگری به‌نام روش اکسپلنت یا همان کشت قطعات ریز بافتی چسبنده به کف ظرف کشت به‌کار گرفته شده است. در این روش از آنزیم‌های مختلف و هضم آنزیمی استفاده نمی‌شود (۱۴، ۱۵، ۱۶ و ۱۷). با توجه به موارد ذکر شده، هدف ما در این مطالعه به‌کارگیری روش تلفیقی اکسپلنت_آنزیمی برای جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی می‌باشد. به‌طوری‌که قطعات ریز بافت چربی مورد استفاده قبل از چسبیدن به کف ظرف کشت به‌مدت کوتاهی در معرض آنزیم Trypsin –EDTA با غلظت ۰/۲۵ درصد قرار می‌گیرند.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه بافت چربی: در این مطالعه تجربی از رت‌های نر بالغ نژاد ویستار در محدوده‌ی وزن تقریبی ۱۸۰ الی ۲۰۰ گرم که در مرکز پرورش حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه خوارزمی (کد اخلاق: ۶۱۶/۹۱۹) واحد کرج تکثیر و پرورش یافته بودند استفاده شد. محل نگه‌داری حیوانات، دارای دوره‌های روشنایی تاریکی ۱۲ ساعته و دمای ۲۳±۲ درجه سانتی‌گراد بود و آب و غذا به‌مقدار کافی در اختیار حیوانات قرار داشت. در طی تمامی مراحل آزمایش طبق اصول نگه‌داری و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی با حیوانات رفتار شد. رت‌های نر بالغ نژاد ویستار با تزریق دوز بالای پنتوباربیتورات کشته شدند و در شرایط کاملا استریل با ایجاد برش عمودی در ناحیه‌ی کشاله ران (inguinal)، قطعات بافت چربی سفید از ناحیه اینگواینال شکمی جدا شدند و در ادامه تا انجام مراحل بعدی جداسازی و کشت به ظرف حاوی محلول ایزوتونیک انتقال یافتند.

استخراج و کشت سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی به‌روش اکسپلنت_ آنزیمی: بافت چربی استخراج شده به پتری دیش استریلی که بر روی یخ قرار دارد منتقل شده و به‌آرامی و با استفاده از قیچی و تیغ بیسوری به قطعات ریزی با اندازه تقریبی ۱ تا ۲ میلی‌متر مکعب، تبدیل شده و جهت زدودن سلول‌های خونی و قطعات بافتی دیگر، چندین مرتبه توسط PBS (Phosphate buffered saline) سرد شستشو داده شدند. سپس این قطعات به فالکون حاوی آنزیم Trypsin-EDTA با غلظت ۰/۲۵ درصد منتقل شدند. ظرف حاوی قطعات ریز چربی همراه با آنزیم Trypsin-EDTA به دستگاه شیکرآنکوباتور Shaker Incubator (SKIR-601) منتقل شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و به‌مدت حداقل ۳۰ دقیقه، حدود ۶۰ دور در دقیقه تکان داده شدند. پس از طی زمان لازم برای هضم بافت، برای مهار فعالیت آنزیم هضم کننده، به‌میزان دوبرابر حجم آنزیم، محیط کشت (Dulbecco's Modified Eagle's medium; Sigma, D5546) DMEM حاوی Fetal bovine serum: Sigma, (10270-106) FBS افزوده شد. پس از مهار فعالیت آنزیم، فالکون حاوی نمونه، به‌مدت ۵ دقیقه با دور۲۰۰۰rpm سانتزیفیوژ شد. پس از اتمام سانتریفیوژ، سه فاز مختلف در فالکون مورد نظر قابل مشاهده بود. این سه بخش شامل بخش کوچکی که ته فالکون ته‌نشین می‌شود، بخش میانی آن و بخشی که در قسمت رویی فالکون واقع شده است و حاوی قطعات ریز و کوچک بافت چربی می‌باشد. در این مطالعه قطعات کوچک شناور بر روی سطح فالکون با سمپلر استریل جدا شده و به فلاسک کشت انتقال داده شد و به فلاسک کشت، محیط کشت حاوی ۱۰درصد FBS و یک درصد آنتی‌یوتیک (پنی‌سیلین_استرپتومایسین) افزوده شد. در روز اول کشت سلول‌ها، حجم کمی از محیط کشت به آن‌ها افزوده شد، به‌طوری‌که تنها سطح بافت پوشیده شود. سلول‌ها به‌درون انکوباتور (co_2 incubator, kenton px-40) در شرایط دمایی ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد دی‌اکسید کربن منتقل شدند و محیط کشت سلول‌ها با فواصل زمانی ۲ روز یک‌بار تعویض شد. زمانی‌که تراکم سلولی به‌میزان ۸۰ حجم فلاسک کشت رسید با استفاده از آنزیم Trypsin-EDTA، سلول‌های چسبیده به کف ظرف جدا شدند و به نسبت ۱ به ۳ در محیط کشت DMEM حاوی FBS رقیق شدند سپس با توجه به تعداد سلول‌های جدا شده آن‌ها را به فلاسک‌های کشت جدید با محیط کشت حاوی ۱۰ درصد FBS و یک درصد آنتی‌بیوتیک (پنی‌سیلین_استرپتومایسین) انتقال داده شدند و مجددا به‌داخل انکوباتور با شرایط دمایی ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد دی‌اکسید کربن باز گردانده شدند. اولین مشاهدات ما ۲۴ ساعت بعد از کشت ریز قطعه‌های بافت چربی بود. خروج سلول‌ها به‌وسیله دوربین عکس‌برداری متصل به میکروسکوپ نوری OLYMPUS(BX53) تصویر برداری و ضبط شد.

استخراج و کشت سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی به‌روش اکسپلنت: در این نوع روش استخراج، بافت چربی از ناحیه کشاله ران با رعایت شرایط استریل جداه شده و بعد از شستشو به محلول ایزوتونیک منتقل شد. سپس با استفاده از قیچی و تیغ بیسوری هضم مکانیکی شده به قطعاتی با اندازه تقریبی ۱ تا ۲ میلی‌متر مکعب، تبدیل شدند و جهت زدودن سلول‌های خونی و قطعات بافت های دیگر، چندین مرتبه توسط PBS سرد شستشو داده شدند. سپس این قطعات بدون دخالت آنزیم و هیچ هضم آنزیمی با استفاده از پنس به فلاسک کشت انتقال داده شد و به ظرف کشت، محیط کشت DMEM حاوی ۱۰ درصد FBS و یک درصد آنتی‌بیوتیک (پنی‌سیلین_استرپتومایسین) افزوده شد. سلول‌ها در شرایط دمایی ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد دی‌اکسید کربن، کشت داده شدند و محیط کشت سلول‌ها با فواصل زمانی ۲ روز تعویض شد. اولین تصاویر ۲۴ ساعت بعد از

کشت ریز قطعه‌های بافت چربی و خروج سلول‌ها به‌وسیله دوربین عکس برداری متصل به میکروسکوپ نوری تصویر برداری و ضبط شد.

استخراج و کشت سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی به‌روش آنزیمی: بافت چربی استخراج شده به پتری دیش استریلی که بر روی یخ قرار دارد منتقل شده و به‌آرامی و با استفاده از قیچی و تیغ بیسوری به قطعات ریزی با اندازه تقریبی ۱ تا ۲ میلی‌متر مکعب، تبدیل شده و جهت زدودن سلول‌های خونی و قطعات بافتی دیگر، چندین مرتبه توسط PBS سرد شستشو داده شدند. سپس این قطعات به فالکون حاوی آنزیم Trypsin-EDTA با غلظت ۰/۲۵ درصد منتقل شدند. ظرف حاوی قطعات ریز چربی همراه با آنزیم Trypsin-EDTA و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد دی‌اکسید کربن به‌مدت حداقل ۶۰ دقیقه به دستگاه انکوباتور منتقل شد. پس از طی زمان لازم برای هضم بافت، برای مهار فعالیت آنزیم هضم کننده، به‌میزان دوبرابر حجم آنزیم، محیط کشت DMEM حاوی FBS افزوده شد. پس از مهار فعالیت آنزیم، فالکون حاوی نمونه، به‌مدت ۵ دقیقه با دور ۲۰۰۰rpm سانتزیفیوژ شد. پس از اتمام سانتریفیوژ، سطح رویی فالکون جدا و دور ریخته شده و سطح زیری آن که فاز مایع می باشد به فلاسک کشت انتقال داده شد و محیط کشت حاوی ۱۰درصد FBS و یک درصد آنتی‌یوتیک (پنی‌سیلین_استرپتومایسین) به فلاسک کشت افزوده شد. سلول‌ها درون انکوباتور در شرایط دمایی ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد دی‌اکسید کربن، کشت داده شدند و محیط کشت سلول‌ها با فواصل زمانی ۲ روز یک‌بار تعویض شد. زمانی‌که تراکم سلولی به‌میزان ۸۰ حجم فلاسک کشت رسید با استفاده از آنزیم Trypsin-EDTA، سلول‌های چسبیده به کف ظرف جدا شدند و به نسبت ۱ به ۳ در محیط کشت DMEM حاوی FBS رقیق گردیدند سپس با توجه به تعداد سلول‌های جدا شده آن‌ها را به فلاسک‌های کشت جدید با محیط کشت حاوی ۱۰ درصد FBS و یک درصد آنتی‌بیوتیک (پنی‌سیلین_استرپتومایسین) انتقال داده شدند و مجددا به‌داخل انکوباتور با شرایط دمایی ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد دی‌اکسید کربن باز گردانده شدند. اولین مشاهدات ما ۲۴ ساعت بعد از کشت و خروج سلول‌ها به‌وسیله دوربین عکس برداری متصل به میکروسکوپ نوری تصویر برداری و ضبط شد.

آنالیز فلوسایتومتری: برای تعیین هویت و اثبات بنیادی بودن سلول‌های جدا شده از بافت‌های چربی روش‌های متنوعی وجود دارد که مرسوم‌ترین روش برای تایید بنیادی بودن سلول‌های مزانشیمی، بررسی نشانگرهای سطحی این سلول‌ها به‌وسیله‌ی تکنیک فلوسایتومتری است. دراین پژوهش آنتی‌بادی‌های کونژوگه PE Mouse Anti-Rat CD44، PE Mouse Anti-Rat CD73، PE Mouse Anti-Rat CD105، FITC Mouse Anti-Rat CD90، PE Mouse Anti-Rat CD45،Rat CD35، PE Mouse Anti-Rat CD11b و همچنین آنتی‌بادی کنترل مورد استفاده قرار گرفت. بعد از پاساژهای متوالی، در پاساژ سوم که سلول‌ها به‌طور کامل همگن شدند از آنزیم Trypsin –EDTA برای جدا کردن سلول‌ها چسبیده به کف ظرف استفاده شد. سپس شمارش سلولی با کمک لام نئوبار انجام گرفت و تعداد 1x106 سلول شمارش شد. در مرحله بعد آنتی بادی‌های نشاندار ذکر شده در یک محیط تاریک باغلظت مناسب (نسبت ۱:۱۰) اضافه شد و به‌مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد و به‌دنبال آن میزان بیان مارکرهای سطحی و درصد جمعیت‌های سلولی بیان‌کننده این مارکرها با دستگاه فلوسایتومتری becton Dickinson و نرم افزار FLOWJ/6 ارزیابی شد.

آنالیز آماری

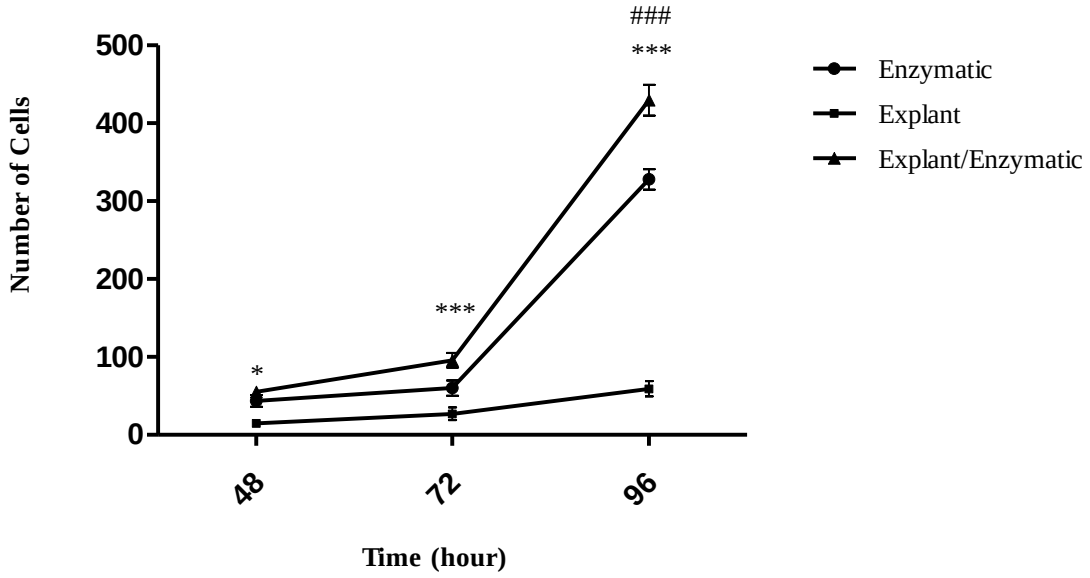
آنالیزهای آماری مربوط به شمارش تعداد سلول‌ها بعد از ۳ بار تکرار انجام شد و متعاقبا با استفاده از نرم افزار GraphPad Prism v6 مـورد بررسـی قرار گرفت.

ارزش p<۰/۰۵ به‌صورت معنی‌دار و ارزش‌های p<۰/۰۱ به‌صورت بسیار معنی‌دار تفسیر شد.

نتایج

نتایج شمارش سلولی

آنالیزهای آماری مربوط به شمارش تعداد سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی بعد از ۳ بار تکرار نشان داد که تعداد این سلول‌ها در در روش اکسپلنت_ آنزیمی در روزهای ۲، ۴ و ۶ بعد از کشت تفاوت معنی‌داری نسبت به‌روش اکسپلنت و روش هضم آنزیمی دارد (شکل ۱).

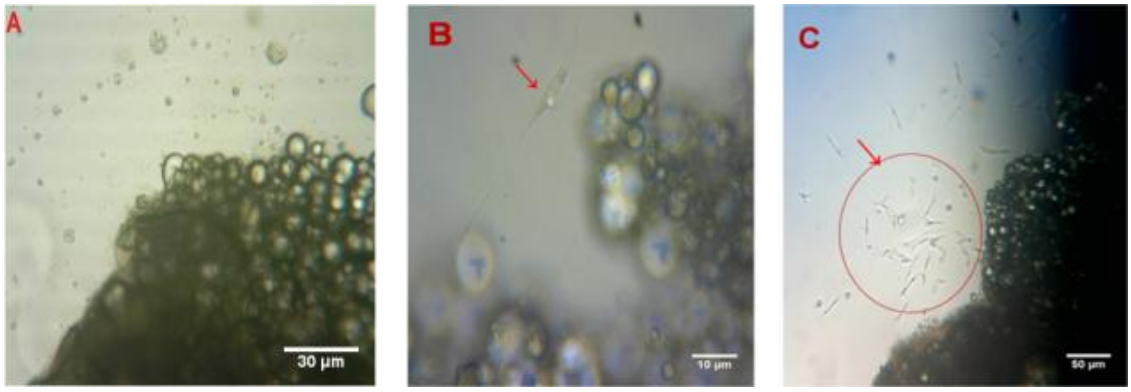


Explant vs Explant/ Enzymatic: *P<0.05, ***P<0.001
Enzymatic vs Explant/ Enzymatic: ###P<0.001

شکل ۱: نمودار مقایسه‌ای تعداد سلول‌های ایجاد شده در روزهای مختلف بین روش‌های اکسپلنت- آنزیمی، آنریمی و اکسپلنت.

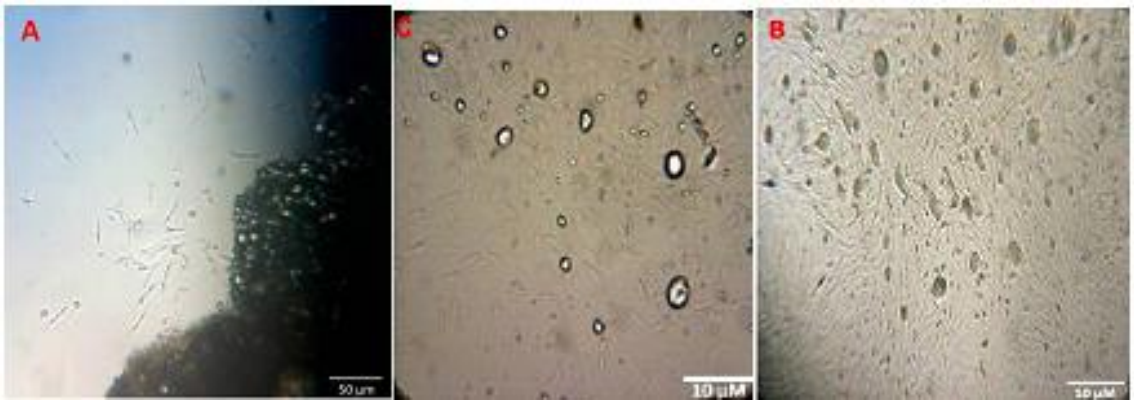
مورفولوژی و رفتارهای تکثیری سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی در روش اکسپلنت _ آنزیمی

مشاهدات نشان داد که پس از گذشت ۱ الی ۲ روز سلول‌های شبه‌فیبروبلاستی (دوکی شکل) که ویژگی‌های مورفولوژیکی سلول‌های بنیادی را دارا می‌باشند شروع به مهاجرت به بیرون از قطعه بافت چربی چسبیده به کف ظرف کردند (شکل ۲B). مشاهدات ما همچنین نشان داد که سلول‌های مزانشیمی بنیادی مشتق از بافت چربی که به روش اکسپلنت_آنزیمی جدا می‌شوند با سرعت بالایی از بافت چربی به بیرون مهاجرت می‌کنند و در کف ظرف گسترش می‌یابند و بعد از گذشت ۴۸ ساعت از ظاهر شدن اولین سلول‌ها میزان آن‌ها به تراکم سلولی ۸۰ درصدی حجم فلاسک کشت می‌رسد. همچنین این سلول‌های بنیادی مزانشیمی از همان روزهای نخست کشت، از نظر مورفولوژیکی کاملاً مشابه می‌باشند و جمعیت همگنی از سلول‌ها را شکل می‌دهند (شکل C ۲).



شکل۲: تصاویر بافت چربی کشت‌شده به‌روش اکسپلنت- آنزیمی. A) بافت چربی، بلافاصله بعد از کشت. B) بافت چربی، ۴۸ ساعت بعد از کشت که اولین سلول‌ها در حال خارج شدن از بافت می باشند. C) خروج ، تکثیر و رشد سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی، ۷۲ ساعت بعد از کشت قطعات بافت چربی. (تصویر A با بزرگنمایی X۴۰، تصویر B با بزرگنمایی X۲۰۰ و تصویر C با بزرگنمایی ×۱۰۰).

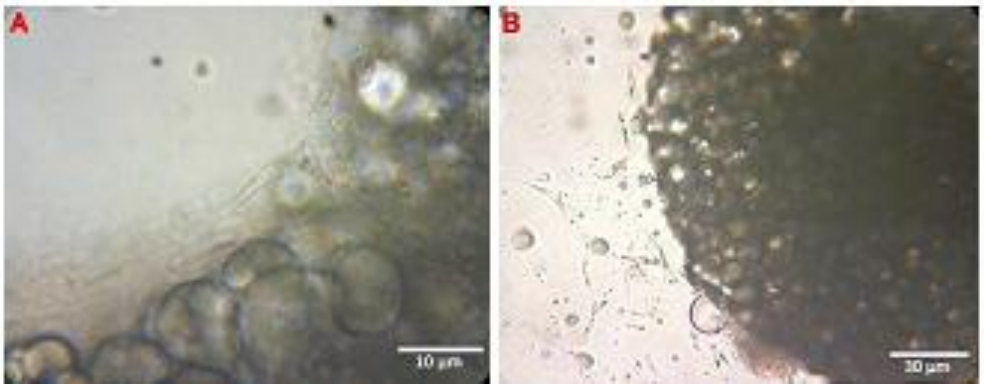
همچنین مشاهدات نشان داد که سلول‌های استخراج شده به این روش سرعت آهنگ رشد بسیار بالایی و کیفیت بالای در توان تمایزی دارند و تراکم سلول‌ها هر ۲۴ ساعت، دوبرابر می‌شود (شکل ۱و شکل۳).



شکل۳: نمای میکروسکوپی از بافت چربی به روش اکسپلنت-آنزیمی. A) جمعیت اولیه‌ی سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی. B) پاساژ اول سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی که کاملا دوکی شکل بوده و با سرعت تکثیر می‌شوند. C) پاساژ سوم که جمعیت یکنواختی از سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی رویت می‌شوند. (تصویر A با بزرگنمایی X۴۰، تصویر B با بزرگنمایی X۱۰۰ و تصویر C با بزرگنمایی ×۱۰۰).

مورفولوژی و رفتارهای تکثیری سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی در روش اکسپلنت

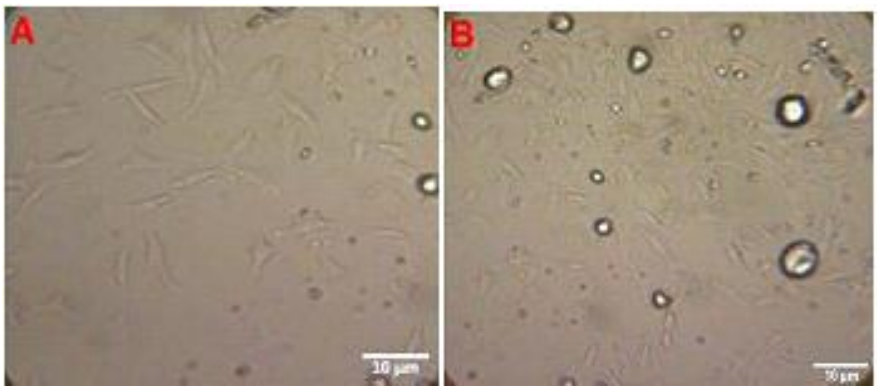
یافته‌ها و مشاهداتی که که توسط گروه ما در این روش صورت گرفت نشان داد که در جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی به‌روش اکسپلنت و بدون دخالت هیچ گونه آنزیمی سرعت بیرون آمدن سلول‌ها از قطعه بافتی بسیار کند می‌باشد به‌طوری‌که تا پنج روز به‌طول می‌انجامد تا اولین سلول‌ها از بافت خارج شوند. علاوه بر این، بازده سلولی این روش بسیار کم می‌باشد، تعامل سلولی که موجب افزایش رشد و تکثیر سلول‌ها شده کاهش می‌یابد و کشت‌های انجام شدیدا تابع تغییرات محیطی و استرس می‌باشند (شکل ۱و شکل۴).



شکل۴: تصاویر بافت چربی کشت شده به روش اکسپلنت. A) بافت چربی، ۵ روز بعد از کشت. B) خروج ، تکثیر و رشد سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی بعد از ۷ روز از کشت قطعات بافت چربی. (تصویر A با بزرگنمایی ×۲۰۰، تصویر B با بزرگنمایی ×۴۰).

مورفولوژی و رفتارهای تکثیری سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی در روش آنزیمی

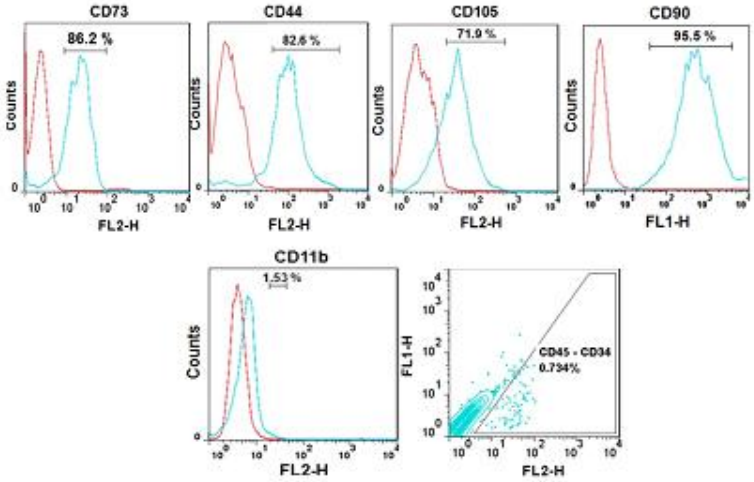
هضم آنزیمی با آنزیم‌های مختلف مثل کلاژنازها، Trypsin-EDTA و حتی ترکیبی از این دو آنزیم، روشی مرسوم در نمونه‌های انسانی و حیوانی برای جداسازی سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی می‌باشد. تعداد و کیفیت سلول‌های استخراج شده از بافت چربی در این روش با توجـه به قدرت هضم و تجزیه‌ی بالا آنزیم تریپسین مورد استفاده در کشت اولیه و استرس بالای که این آنزیم در مدت کوتاهی بر ماتریکس خارج سلولی بافت جربی و همچنین بر سلول بنیادی مشتق از بافت چربی در این بافت می‌گذارد باعث کاهش محسوسی در آهنگ رشد و تکثیر سلول‌ها شده و در زمان بیشتری طول می‌کشد که ظرف کشت را پر کنند و دیرتر نیز به مرحله پاساژ سلولی می‌رسند همچنین این سلول‌ها در طی پاساژهای کم و محدود کهنسال شده و نسبت به القا و تمایز به دودمان‌های مختلف سلولی پاسخ ضعیف‌تری می‌دهند (شکل ۱ و شکل۵).



شکل۵: تصاویر کشت سلولی به روش آنزیمی A،) 48 ساعت بعد از کشت که اولین سلول‌ها در حال ظاهر شدن می باشند. B) تکثیر و رشد سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی، ۷۲ ساعت بعد از کشت. (تصویر A با بزرگنمایی ×۱۰۰، تصویر B با بزرگنمایی ×۱۰۰).

نتایج فلو سایتومتری سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی در روش اکسپلنت_آنزیمی

نتایج تکنیک فلوسایتومتری تایید کرد که سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی بعد از پاساژ سوم وقتی در معرض آنتی بادی‌های مونوکلونال قرار گرفتند نسبت به مارکرهای سطحی مزانشیمی که شامل CD90، CD105، CD44، CD73 بیان مثبت و بالایی داشته و همچنین سلول‌های فوق نسبت به مارکرهای سطحی رده سلول‌های خونی شامل CD45، CD34، CD11b بیان پایین و منفی دارند که این نتایج اثبات کننده‌ی مزانشیمی بودن این سلول‌ها می‌باشد نتایج حاصل از این آنالیزها در شکل ۶ آمده است.



شکل ۶: نمودار هیستوگرام مارکر سطحی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی. سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی نسبت به مارکرهای CD90 (95.5%)، CD105 (71.9%)، CD44 (82.6%)، CD73 (86.2) بیان مثبت داشته و نسبت به مارکرهای CD45 (0.734%)، CD34 (0.734%)، CD11b (1.53%)، بیان منفی دارند.

بحث

این تحقیق نشان داد که با استفاده از روش ترکیبی اکسپلنت_ آنزیمی امکان استخراج سلول‌های بنیادی مزانشیمی از بافت چربی وجود دارد و تاکنون گزارشی مربوط به استخراج سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی از این روش ترکیبی اعلام نشده است. مطالعات قبلی نشان داده است که روش کشت اکسپلنت به‌تنهایی در بافت‌های مختلف همچون بافت عصبی، بند ناف و دیگر بافت‌ها استفاده می‌شود (۱۸) که بر پایه استفاده از ویژگی چسبندگی یک قطعه ریز بافتی به کف ظرف کشت و مهاجرت به بیرون سلول‌های بنیادی درون بافت، استوار است. این روش که در بسیاری از بافت‌های دیگر نیز از آن بهره می‌گیرند، ویژگی‌های ظاهری و عملکردی سلول‌های بنیادی به نحو بهتری حفظ می‌شود و توان تمایزی و کیفیت رشد سلول‌های استخراج شده در این روش مشابه با سلول‌های استخراج شده با استفاده از آنزیم‌های خالص می‌باشد (۱۵). اما بررسی‌هایی که بر روی رفتار تکثیری و نحوه رشد سلول‌های مختلف انجام شده نشان داد که با افزایش مدت زمان دوره کشت سلول‌ها در شرایط in vitro، میزان انکوژنیسیته و تومورزایی سلول‌ها به شدت افزایش می یابد. (۱۹، ۲۰ و۲۱). در روش کشت اکسپلنت، مشاهده شد که زمان لازم برای مهاجرت سلول‌های بنیادی به بیرون از بافت چربی حدود پنج روز به‌طول می‌انجامد که زمان بسیار طولانی برای کشت سلول‌ها نسبت به روش آنزیمی و اکسپلنت_آنزیمی می‌باشد. علاوه بر این سلول‌های بیرون

آمده از بافت، نسبت به تغییرات محیطی بسیار حساس بوده و کمترین استرس فیزیکی، شیمیایی، دمایی و تغذیه‌ای منجر به توقف خروج سلول‌ها و رفتار مهاجرتی آن‌ها می‌شود.

روش دیگر، روش هضم آنزیمی است که آنزیم مرسوم برای جداسازی سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی، استفاده از آنزیم های کلاژناز و یا تریپسین می باشد (۸). Dmitrieva و همکاران (۲۲) نشان دادند که ویژگی‌های عملکردی و درمانی سلول‌های بنیادی مزانشیمی جدا شده از بافت چربی وقتی که تحت تاثیر هضم‌های آنزیمی قرار می‌گیرند بعد از پاساژهای سوم تا چهارم به‌شدت کاهش پیدا می‌کند و نشانه‌های پیری و سالخوردگی سلولی در آن‌ها بروز می‌کند.

علاوه براین، آنزیم کلاژناز مورد استفاده در این روش در مقایسه با دیگر آنزیم‌های مورد استفاده در جداسازی سلول‌ها بنیادی از بافت چربی گران قیمت می‌باشد و در مقیاس‌های بالا و صنعتی، از نظر اقتصادی مقرون به صرفه نمی‌باشند و نیز به هنگام تولید آنزیم، احتمال آلودگی میکروبی محصول بسیار بالا می‌باشد (۱۶).

در این مطالعه، تلفیقی از دو روش برای جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی به کار گرفته شده است و سعی شده معایب هر دو روش مذکور برطرف شود. پیش تیمار بافت چربی با آنزیم تریپسین در روش اکسپلنت_آنزیمی به‌وسیله‌ی آنزیم Trypsin-EDTA موجب هضم اولیه‌ی ماتریکس و داربست سلولی بافت چربی شده،لازم به‌ذکر است که تاثیر آنزیم در این روش هضم کل بافت چربی نبوده، در نتیجه زمان لازم برای شروع مهاجرت سلول‌های بنیادی به بیرون از بافت چربی از پنج روز به ۴۸ ساعت کاهش می‌یابد و سلول‌ها با سرعت و استرس کمتری به خارج از قطعه بافتی مهاجرت می‌کنند. سلول‌ها در این روش جداسازی آهنگ رشد سریعتری داشته و همچنین قدرت تکثیر سلول‌های مذکور بسیار بالا می‌باشد و علاوه بر این در برابر تغییرات شرایط کشت مانند تغییرات دمایی، تغذیه‌ای و دیگر عوامل استرس‌زا مقاومت بهتری دارند. در واقع می‌توان گفت آنزیم با هضم سطحی بافت خروج سلول‌ها از بافت را تسهیل می‌بخشد ولی خود سلول را آزرده نمی‌کند. همچنین پیش تیمار بافت با آنزیم تریپسین قدرت چسبندگی بافت را به کف ظرف کشت افزایش می‌دهد و احتمال جدا شدن بافت از کف ظرف کشت به‌شدت کاهش می‌یابد. از آن‌جایی‌که آنزیم در مدت کوتاهی و تنها بر سطح بافت اثر کرده است سلول‌های درون بافت از تاثیرات منفی هضم آنزیمی به‌دور می‌مانند. لذا روش به‌کار گرفته شده در این مطالعه، تمامی مزیت‌های جداسازی و کشت سلول به‌روش اکسپلنت و روش هضم آنزیمی را دارا می‌باشد و نکته مهم اینکه، معایب این روش نیز با پیش تیمار آنزیمی بافت بر طرف شده است. بررسی ویژگی‌های مزانشیمی بودن سلول‌های استخراج شده در این مطالعه با آنالیز فلوسایتومتری نشان داد که سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی که با این روش جدا می‌شوند دارای بیان مثبت و بالای مارکرهای سطحی سلول‌های بنیادی مزانشیمی می‌باشند و نسبت به مارکرهای سطحی سلول‌های رده خون‌ساز بیان بسیار کمی دارند (۲۳). همچنین این سلول‌ها دارای ویژگی‌های مورفولوژیکی مختص سلول‌های بنیادی مزانشیمی می‌باشند و کاملا دوکی شکل بوده و ظاهری فیبروبلاست مانند دارند. و نیز آنالیزهای آماری مربوط به شمارش تعداد سلول‌ها نشان داد که سلول‌های جدا شده به روش اکسپلنت_آنزیمی توان و قدرت بالای در تکثیر نسبت به سایر روش‌ها داشته، به‌طوری‌که در شرایط مناسب، جمعیت سلولی بعد از خروج سلول‌ها در طی ۲۴ ساعت دو برابر می‌شود. ویژگی دیگری که این جمعیت سلولی دارد این است که جمعیت سلولی استخراج شده در همان روزهای اولیه‌ی کشت کاملا همگن می‌باشد و از نظر مورفولوژی کاملا مشابه بوده درحالی‌که در دیگر روش‌ها ناهمگونی‌هایی در بین سلول‌های بنیادی مزانشیمی دیده می‌شود.

مورفولوژی یکسان سلول‌ها و همگن بودنشان و دیرتر رسیدن آن‌ها به محدوده کهنسالی سلولی این امکان را فراهم کرده تا تاثیرات مختلف القا کننده‌ها به سلول‌ها و تغییرات مورفولوژیکی آن‌ها به آسانی و با دقت بالایی سنجیده شود (۲۴ و۲۵).

نتیجه گیری

ویژگی‌هایی همچون درصد بالای سلول‌های بنیادی مزانشیمی موجود در بافت چربی، قدرت تکثیری بالا این سلول‌ها، حداقل تهاجم برای دستیابی به بافت چربی و امکان تامین سلول‌های اتولوگوس باعث شده است که سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی، منبع ایده‌الی جهت کاربردهای کلینیکی و سلول درمانی باشند و از آن‌جایی‌که برای استخراج سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی نیاز به انبوهی از بافت‌های چربی ناحیه کشاله ران است و متعاقبا به آنزیم کلاژناز بیشتری نیز نیاز است روش جذاسازی با آنزیم کلاژناز خالص برای مقاصد درمانی و کارهای پژوهشی از نظر اقتصادی مقرون به صرفه نیست و دارای محدودیت‌هایی است ما به‌دنبال روشی ارزان، تکرارپذیر، سریع و با بازدهی بالا جهت جداسازی این سلول‌ها بودیم روش اکسپلنت_آنزیمی به‌کار گرفته شده در این مطالعه برای جداسازی سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی، تمامی ویژگی‌های یک روش مناسب را دارا می‌باشد توان و کیفیت سلول‌های حاصل در این روش جداسازی مشابه سلول‌های استخراج شده با استفاده از روش‌های مرسوم در گزارش‌های قبلی است. لذا می‌توان از این روش در مقیاس‌های بالا برای کاربردهای کلینیکی و پژوهشی استفاده کرد.

تشکر و قدردانی

این مطالعه و پژوهش در آزمایشگاه تحقیقاتی سلولی تکوین و مرکز تکثیر و پرورش دانشکده‌ی علوم زیستی دانشگاه خوارزمی به انجام رسید بدین وسیله از ریاست محترم دانشکده و ریاست محترم مرکز تکثیر و پرورش کمال تشکر و قدردانی را داریم.

منابع

1. Barry F, Murphy JM. Mesenchymal stem cells: clinical application and biological characterization. Cell Biol 2004; 36(4): 568-84.

2. Baksh D, Song L, Tuan RS. Adult mesenchymal stem cells. Characterization, differentiation and application in cell therapy. J Cell Mol Med. 2004; 8(3): 301-136.

3. Majumdar MK, Thiede MA, Mosa JD, Moorman M, et al. Phenottypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells. J Cell Physiol. 1998; 176(1):57- 66.

4. Da Silva Meirelles L, Caplan AI, Nardi NB. In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells. Stem Cells. 2008; 26(9): 2287-99.

5. Mizuno H. Adipose-derived stem and stromal cells for cell-based therapy: current status of preclinical studies and clinical trials. Current opinion in molecular therapeutics. 2010 Aug; 12(4): 442-9.

6. Woo DH, Hwang HS, Shim JH. Comparison of adult stem cells derived from multiple stem cell niches. Biotechnology letters. 2016 May 1; 38(5): 751-9.

7. Minteer D, Marra KG, Rubin JP. Adipose-derived mesenchymal stem cells: biology and potential applications. InMesenchymal Stem Cells-Basics and Clinical Application I. Springer, Berlin, Heidelberg. 2012; 129: 59-71.

8. Bunnell BA, Flaat M, Gagliardi C, Patel B, Ripoll C. Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation. Methods. 2008 Jun 1; 45(2):115-20.

9. Gimble JM, Guilak F. Adipose-derived adult stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential. Cytotherapy. 2003 Jan 1; 5(5): 362-9.

10. Igura K, Zhang X, Takahashi K, Mitsuru A, Yamaguchi S, Takahashi TA. Isolation and

characterization of mesenchymal progenitor cells from chorionic villi of human placenta. Cytotherapy. 2004 Dec 1;6(6):543-53.

11. Jahr H, Pfeiffer G, Hering BJ, Federlin K, Bretzel RG. Endotoxin-mediated activation of cytokine production in human PBMCs by collagenase and Ficoll. Journal of molecular medicine. 1999 Jan 1;77(1): 118-20.

12. Wittstock M, Flemmig TF, Schmidt H, Mutters R, et al. Serodiagnosis of porphyromonas gingivalis infection by immunoblot analysis with recombinant collagenase. J Clin Microbiol. 1996; 34(10): 2411-3.

13. Yoshihara K, Matsushita O, Minami J, Okabe A. Cloning and nucleotide sequence analysis of the colH gene from clostnidium histolyticum encoding a collagenase and a gelatinase. J Bacteriol. 1994; 176(21): 6489-96.

14. Klingbeil MF, Herson MR, Cristo EB, Pinto DS, et al. Comparison of two cellular harvesting methods for primary human oral culture of keratinocytes. Cell Tissue Bank. 2009; 10(3): 197–204.

15. Jing W, Xiao J, Xiong Z, Yang X, Huang Y, Zhou M, Chen S, Lin Y, Tian W. Explant Culture: An Efficient Method to Isolate Adipose- Derived Stromal Cells for Tissue Engineering. Artificial organs. 2011 Feb 1; 35(2): 105-12.

16. Priya N, Sarcar S, Majumdar AS, SundarRaj S. Explant culture: a simple, reproducible, efficient and economic technique for isolation of mesenchymal stromal cells from human adipose tissue and lipoaspirate. Journal of tissue engineering and regenerative medicine. 2014 Sep 1;8(9): 706-16.

17. Hendijani F. Explant culture: An advantageous method for isolation of mesenchymal stem cells from human tissues. Cell proliferation. 2017; 50(2): e12334.

18. Ishige I, Nagamura Inoue T, Honda MJ, Harnprasopwat R, et al. Comparison of mesenchymal stem cells derived from arterial, venous, and Wharton's jelly explants of human umbilical cord. Int J Hematol. 2009; 90(2): 261–9.

19. Momin EN, Vela G, Zaidi HA, Quinones Hinojosa A. The Oncogenic Potential of Mesenchymal Stem Cells in the Treatment of Cancer: Directions for Future Research. Curr Immunol Rev. 2010; 6(2): 137–148.

20. Ikegame Y, Yamashita K, Hayashi S, Mizuno H, et al. Comparison of mesenchymal stem cells from adipose tissue and bone marrow for ischemic stroke therapy. Cytotherapy. 2011; 13(6): 675–85.

21. Rubio D, Garcia-Castro J, Martin MC, de la Fuente R, et al. Spontaneous human adult stem cell transformation. Cancer Res. 2005; 65(8): 3035–9.

22. Dmitrieva RI, Minullina IR, Bilibina AA, Tarasova OV, et al. Bone marrow – and subcutaneous adipose tissue – derived mesenchymal stem cells: differences and similarities. Cell Cycle. 2012; 11. 15; 11(2): 377-83.

23. Mitchell JB, McIntosh K, Zvonic S, Garrett S, et al. Immunophenotype of human adipose derived cells: temporal changes in stromal associated and stem cell-associated markers. Stem Cells. 2006; 24(2): 376 –85.

24. Oedayrajsingh Varma MJ, Van Ham SM, Knippenberg M, Helder MN, et al. Adipose tissue derived mesenchymal stem cell yield and growth characteristics are affected by the tissue harvesting procedure. Cytotherapy. 2006; 8(2): 166 –77.

25. Lindroos B, Suuronen R, Miettinen S. The potential of adipose stem cells inregenerative medicine. Stem Cell Rev. 2011; 7(2): 269 –91.

Journal of Cell & Tissue (JCT)
Winter 2018; 8(4)

Original Article

Isolation, Culture and characterization of Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells (ADMSCs) by Explant-Enzymatic Methods

Mohammadi MH, M.Sc[1], Nabiuni M, PhD[2], Parivar K, PhD[1], Yari S, PhD[2*], Sahebi A Msc[1]

1. Department of Animal Biology, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran
2. Department of Biology, Faculty of Basic Science, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran
3. Department of Cellular and Molecular Biology, Faculty of Biological Sciences, , Iran

* Email corresponding author: yarisiamak@yahoo.com

Received: 19 Jun. 2016 Accepted: 27 May. 2018

Abstract

Aim: In this study, we use combination of enzymatic and explant methods, for isolation and culture of ADMSCs.

Materials and Method: Adipose tissues dissected out from the abdominal region of male Wistar rats. Tissues were minced into small pieces (1-2 mm), and then treated with trypsin-EDTA 0.25% for 30 minutes at 37 ℃ in shaker-incubator. Enzymatic treated tissues were centrifuged and floating parts were cultured. Statistical analysis of the cells number was investigated using GraphPad Prismv6 software.

Results: Results showed that ADMSCs isolated with our methods have growth characteristics similar to conventional methods. ADMSCs were maintained up to 10th passage and exhibited a homogeneous population in terms of appearance and morphology. We demonstrated that ADMSCs by these combination methods have mesenchymal characteristic markers (positive for CD90, CD44, CD73, CD105 and negative for CD35, CD45, CD11b).

Conclusion: In the current study, we showed that the combination of enzymatic and explant methods creates a simple, inexpensive and reproducible method for isolation and culture of ADMSCs.

Keywords: Mesenchymal stem cells, Adipose tissue, Explant, Rat