جداسازی و تعیین هویت سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی

سعید سلالی[۱](M.Sc)، سعید کاویانی[۱*](Ph.D)، مسعود سلیمانی[۱](Ph.D)، زهرا ذنوبی [۲](M.D)

۱- *گروه هماتولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران*

۲- *بخش زنان و زایمان، بیمارستان مهدیه، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران*

چکیده

سابقه و هدف: سلول‌های بنیادی مزانشیمی (Mesenchymal Stem Cell, MSC) گروهی از سلول‌های بنیادی بالغین هستند که به‌صورت طبیعی در بدن وجود داشته و حضور این سلول‌ها در بافت‌های مختلف گزارش شده است. امروزه به‌دلیل قابلیت ذاتی این سلول‌ها در تمایز به رده‌های مختلف، توجه زیادی را در زمینه‌های سلول درمانی و ژن‌درمانی به خود معطوف کرده‌اند. مغز استخوان و بافت چربی به‌عنوان دو منبع عمده این سلول‌ها هستند.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی از بافت چربی انجام شد و تعیین هویت این سلول‌ها به‌وسیله شاخص‌های تعیین شده از طرف کمیته بین‌المللی سلول‌درمانی (ISCT)، صورت گرفت.

یافته‌ها: سلول‌های جداسازی شده دارای قابلیت چسبندگی به سطح پلاستیکی بودند و در کشت با محیط‌های تمایزی چربی و استخوانی، این رده‌ها را ایجاد کردند. هم‌چنین برای مارکرهای CD90 (۹۶/۳٪) و CD73 (۹۷/۷٪) مثبت و از نظر CD45 (۰/۳۴٪)، CD34 (۰/۹۹٪) و CD31 (۰/۴۱٪) منفی بودند.

نتیجه‌گیری: بافت چربی به‌دلیل دسترسی نسبتاً آسان و کم‌تر تهاجمی بودن نسبت به سایر منابع به‌ویژه مغز استخوان، منبع مناسبی برای MSCها می‌باشد. هم‌چنین میزان فراوانی MSCها در بافت چربی بیش‌تر بوده و قدرت تکثیر بیش‌تری نیز دارند. به‌نظر می‌رسد بافت چربی در آینده به یک منبع پرطرفدار برای کاربردهای بالینی و تحقیقاتی تبدیل شود.

واژه‌های کلیدی: سلول بنیادی مزانشیمی، بافت چربی

مقدمه

در سال ۱۹۸۷، فریدنشتاین و همکارانش موفق به جداسازی گروهی از سلول‌ها از مغز استخوان شدند که تحت شرایط ویژه‌ای قادر به تمایز به سلول‌های بافت هم‌بند از قبیل سلول‌های استخوانی، غضروف و چربی بودند. این سلول‌ها در کشت In Vitro بعد از ۳۰-۲۰ پاساژ قادر به حفظ قابلیت تشکیل استخوان و غضروف هستند و به‌عنوان سلول‌های بنیادی مزانشیمی (Mesenchymal Stem Cell, MSC) یا سلول‌های استرومایی مغز استخوان نامیده شدند [۱].

اگر چه MSCها برای اولین بار از مغز استخوان گزارش شدند، در حال حاضر مشخص شده است که این سلول‌ها در بافت هم‌بند تمامی ارگان‌های بدن وجود دارند [۲] که می‌توان به بافت چربی [۳] اشاره کرد که یک سیستم جامع و پیچیده را تشکیل می‌دهد و در سراسر بدن پراکنده شده است [۴]. هم‌چنین سلول‌های بنیادی مزانشیمی را می‌توان از بافت‌های بالغین و جنینی مانند، قلب، عضلات اسکلتی، بافت سینوویال، پانکراس، پریوستئوم، خون محیطی، جفت، بند ناف و مایع آمنیوتیک جداسازی کرد [۵].

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۱-۸۲۸۸۴۵۰۷

Email: kavianis@modares.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۶/۱۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۹/۲۹

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-13]

سلول‌های بنیادی مزانشیمی در In Vitro فنوتیپ پایداری دارند و به صورت تک لایه باقی می‌مانند و قادر به تمایز به استخوان، غضروف، بافت چربی، تاندون، عضله و بافت فیبری می‌باشند [۱]. جهت شناسایی MSC ها، با توجه به اختلاف نظرها و متغیر بودن شاخص‌های مطرح شده در مطالعات مختلف، کمیته بین‌المللی سلول درمانی شاخص‌های حداقلی جهت شناسایی MSC ها ارائه کرده است که شامل سه گروه شاخص‌های کشت، فنوتیپ و قدرت تمایز می‌باشند و عبارتند از: ۱. کشت: اتصال به سطح پلاستیکی در شرایط کشت استاندارد، ۲. فنوتیپ: بیان مثبت (≤ ۹۵٪) شاخص‌های CD73، CD90، CD105 و بیان منفی (≥ ۲٪) شاخص‌های CD14 یا CD11b، CD19 یا CD79α، CD34،CD45 و HLA-DR، ۳. تمایز در in vitro: تحت تحریک اختصاصی، سلول‌ها باید به استئوبلاست‌ها، آدیپوسیت‌ها و کندروست‌ها تمایز یابند [۶].

MSCها به‌دلیل ویژه‌گی‌های منحصر به فردی که دارند توجه محققین زیادی را به خود جلب کرده‌اند این ویژگی‌ها عبارتند از: ۱- دسترسی آسان به این سلول‌ها با استفاده از روش‌های کم‌تر تهاجمی و هم‌چنین کشت و تکثیر آسان MSCها در آزمایشگاه [۷]، مطالعات نشان داده‌اند که MSCها در شرایط کشت قادر به ۵۰ مرتبه تقسیم هستند بدون از دست دادن فنوتیپ و پتانسیل چندقوه‌ای خود [۸]. ۲- MSCها توانایی زیادی در مهاجرت به محل‌های آسیب، التهاب و توموری دارند [۹]. ۳- MSCها دارای ایمونوژنیسیته کم و میزان کم جهش‌های داخلی می‌باشند [۱۰]. ۴- این سلول‌ها قابلیت تومورزایی و یا سمیت عصبی ندارند [۱۱،۱۰]. ۵- از لحاظ ژنتیکی امکان تغییر MSCها برای اهدافی مانند بیان پروتئین‌های درمانی و ترشح این عوامل به ریز محیط التهاب و تومور وجود دارد [۱۲].

شواهد رو به رشد نشانگر این است که پیوند سلول‌های بنیادی مزانشیمی در اختلالات با آسیب سلولی یا از دست دادن سلول، مفید می‌باشد در این مورد می‌توان به سکته قلبی [۱۳]، آسیب مغزی [۱۴]، بیماری پارکینسون [۳۱]، دیابت تیپ ۱ [۱۵] و بیماری کبدی [۱۶] اشاره کرد.

با افزایش روزافزون توجه به درمان‌های جدید از جمله سلول درمانی و در رأس آن استفاده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی، انتخاب منبعی مناسب جهت به‌دست آوردن این سلول‌ها از اهمیت زیادی برخوردار است.

در مطالعه حاضر هدف ما جداسازی MSCها از بافت چربی به‌عنوان یک منبع مهم برای MSCها و هم‌چنین تعیین هویت سلول‌های جداسازی شده با استفاده از پارامترهای تعریف شده از طرف ISCT، می‌باشد.

مواد و روش‌ها

کشت سلول. بافت چربی شکمی افراد تحت سزارین از بیمارستان مهدیه تهران تهیه شد. از بیماران رضایت‌نامه کتبی دریافت شد و فرآیند جداسازی سلولی از بافت چربی حداکثر تا ۴ ساعت انجام شد. تحت شرایط استریل بافت چربی با استفاده از قیچی و تیغ جراحی به قطعات ریز خرد شد و تا حد ممکن عروق خونی و بافت هم‌بند از بافت چربی زرد رنگ حذف شدند. در فرآیند خرد کردن بافت جهت زدودن آلودگی با گلبول‌های قرمز شست و شو با PBS استریل انجام شد. بعد از خرد کردن بافت چربی، آنزیم کلاژناز نوع ۳ (۰/۰۷۵٪) به مقدار ۵-۴ میلی‌لیتر به قطعات چربی اضافه شد و با استفاده از سرنگ پیپتاژ انجام شد تا حد ممکن بافت هموژن شود و سلول‌ها آزاد شوند. سپس تمامی آن به یک لوله فالکون ۵۰ میلی‌لیتری منتقل گشت و به مدت ۱ ساعت در شیکر انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و در فواصل زمانی ۱۵ دقیقه هم‌زده شد تا به‌خوبی مخلوط شود. سپس به مدت ۵ دقیقه با دور ۱۲۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. در شرایط استریل روغن و مایع رویی پلاک سلولی برداشته شد و با افزودن محیط کشتDMEM با ۱۰٪ FBS و آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین- استرپتومایسین به نسبت ۱ به ۱۰۰، پلاک سلولی به فلاسک کشت سلول T75 منتقل شد.

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-13]

جهت فراهم شدن زمان مناسب برای چسبیدن حداکثری سلول‌های، تا روز ۴ تعویض محیط انجام نشد. در روز چهارم تعویض محیط انجام شد و تا رسیدن به Confluency ۹۰-۸۰٪ در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد با فشار ۵٪ دی‌اکسید کربن نگه‌داری شدند. تعویض محیط هر دو روز یک‌بار با استفاده از محیط DMEM + FBS ۱۰٪ انجام شد. از این سلول‌ها در پاساژ ۲ و ۳ برای آزمایشات تعیین هویت استفاده شد.

تمایز استئوبلاستی و آدیپوسیتی. برای تمایز استئوبلاستی از محیط DMEM + 10% FBS حاوی اسید اسکوربیک (۰/۰۵ گرم در لیتر)، بتا گلیسروفسفات (۱۰ میلی‌مولار در لیتر) و دگزامتازون (۸-۱۰ مول در لیتر) استفاده شد. تعداد ۱۵۰۰۰ سلول MSC در هر چاهک پلیت ۲۴ خانه کشت شد و از محیط تمایزی به چاهک‌ها اضافه شد. برای سلول‌های کنترل منفی از محیط DMEM + 10% FBS استفاده شد. القای تمایز تا ۲۱ روز انجام شد و هر ۳ روز یک‌بار با محیط تمایزی تعویض محیط انجام شد و در پایان ۲۱ روز محیط از روی سلول‌ها خارج شد و با PBS شست وشو داده و فیکساسیون با استفاده از فرمالدئید ۱۰٪ به مدت ۱۵ دقیقه انجام شد سپس سه بار با آب مقطر به آرامی شست و شو داده شد و به هر چاهک ۱ میلی‌لیتر از محلول رنگی آلیزارین رد اضافه کرده و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای محیط انکوبه شد. سپس رنگ را خارج کرده و سه بار با آب دیونیزه شست و شو داده و با بزرگ‌نمایی ۴۰* میکروسکوپ بررسی شد.

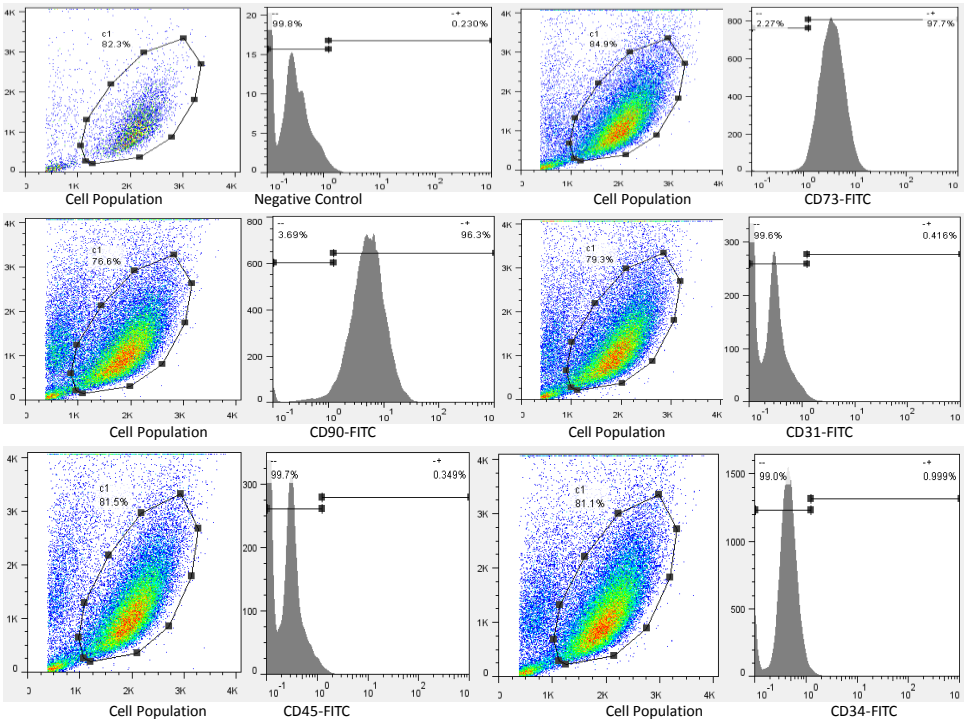
برای تمایز چربی از محیط DMEM + 10% FBS حاوی اسید آسکوربیک (۰/۰۵ گرم در لیتر) و دگزامتازون (۶-۱۰ مول در لیتر) استفاده شد. در هر چاهک تعداد ۱۵۰۰۰ سلول MSC کشت شد و در دو چاهک به عنوان کنترل منفی از محیط DMEM + 10% FBS استفاده شد. تعویض محیط با فواصل هر ۳ روز یک‌بار تا ۱۴ روز انجام شد. برای بررسی تمایز آدیپوسیتی از رنگ‌آمیزی Oil Red استفاده شد. برای این منظور ابتدا محیط روی سلول‌ها را خارج کرده و با PBS شست وشو داده شد سپس با فرمالدئید ۱۰٪ به مدت ۱۵ دقیقه فیکس کرده سپس با آب مقطر شست وشو داده شد و ۱ میلی‌لیتر ایزوپروپانول ۶۰٪ بر روی سلول‌ها افزوده و در دمای محیط ۵ دقیقه انکوبه شد. سپس ۱ میلی‌لیتر از رنگ رقیق شده Oil-Red به نسبت ۲ به ۳ با آب مقطر، به سلول‌ها اضافه کرده و به مدت ۱۵ دقیقه انکوبه می‌شود. سپس با آب مقطر کاملاً شست وشو داده و در زیر میکروسکوپ با بزرگ‌نمایی ۴۰* مشاهده شد.

فلوسیتومتری. از آنتی‌بادی‌های Anti-CD73 (3 µl)، Anti-CD90(3 µl)، Anti-CD45 (5 µl)، Anti-CD34 (4µl) Anti-CD31(4 µl) استفاده شد. در ۷ عدد میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتر تعداد $۱۰^{۶} \times ۱$ سلول در ۱ میلی‌لیتر PBS ریخته و به هر میکروتیوب یک نوع آنتی‌بادی اضافه کرده به یکی از نمونه‌ها آنتی‌بادی ایزوتایپ کنترل را اضافه کرده و به یک نمونه هیچ آنتی‌بادی را اضافه نمی‌کنیم (گروه کنترل). سپس به مدت ۱ ساعت روی یخ در محیط تاریک انکوبه کرده و سپس فلوسیتومتری انجام شد.

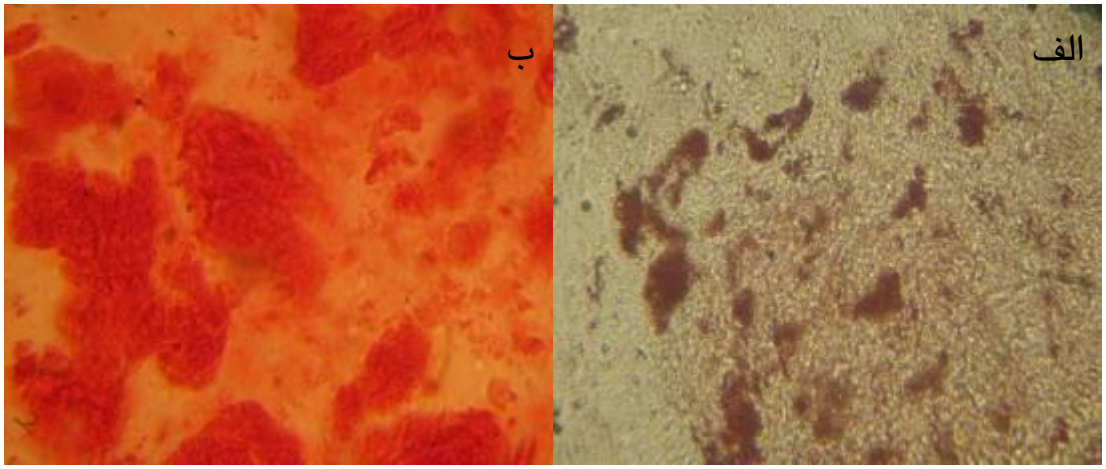
نتایج

سلول‌های MSC مشتق از بافت چربی در کشت، چسبنده، دوکی شکل و دارای موفولوژی شبه فیبروبلاستی بودند. این سلول‌ها از نظر مارکرهای CD90 (۹۶/۳٪) ، CD73 (۹۷/۷٪) که به‌عنوان مارکرهای سلول‌های بنیادی مزانشیمی تلقی می‌شوند، مثبت بودند و از نظر مارکرهای رده اریتروئیدی CD34 (۰/۹۹٪)، CD45 (۰/۳۴٪) و CD31 (۰/۴۱٪) مثبت بودند (شکل ۱). قدرت تمایزی MSCهای جداسازی شده بعد از کشت با محیط‌های القایی بررسی شد. در رنگ‌آمیزی Oil red این سلول‌ها، قطرات چربی مشاهده شد که نشانگر تمایز سلول‌های جداسازی شده به سلول‌های آدیپوسیتی می‌باشد و در رنگ‌آمیزی Alizarin red S، رسوبات کلسیم مشاهده شد که نشانگر تمایز سلول‌های جداسازی به سلول‌های استئوسیتی می‌باشد (شکل ۲).

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-13]



شکل ۱: نتایج فلوستومتری از نظر مارکرهای مثبت (CD90, CD73) و مارکرهای منفی (CD34, CD45, CD31) برای MSCهای مشتق از بافت چربی



شکل ۲: تصاویر مربوط به تمایز MSCها به رده آدیپوسیتی (رنگ آمیزی اویل رد) (الف) و رده استخوانی (رنگ آمیزی آلیزارین رد) (ب)

بحث و نتیجه‌گیری

از زمان آزمایشات اولیه فریدنشتاین، تلاش‌های زیادی جهت شناسایی مستقیم MSC ها از مغز استخوان و سایر بافت‌ها انجام شده است [۱۷]. MSC هایی که در in vitro کشت می‌شوند فاقد شاخص‌های اختصاصی و منحصر به خود هستند. در کل یک اجماع کلی وجود دارد که سلول‌های MSC انسانی سطوح متغیری از CD44، CD71، CD73، CD90، CD105، گانگلیوزید GD2 و CD271 را بیان می‌کنند در حالی که شاخص‌های هماتولوژیک CD34، CD14 و CD45 یا مولکول‌های کمک تحریکی CD80، CD86، CD40 را بیان نمی‌کنند. سطوح بیان متغیر این شاخص‌ها، احتمالاً ناشی از تفاوت‌های گونه‌ها، منبع بافتی و شرایط کشت باشد [۱۸]. در واقع هم اکنون، MSC ها به‌وسیله ترکیبی از ویژگی‌های فیزیکی، فنوتیپی و عملکردی شناسایی می‌شوند [۱۹]. با توجه به عدم وجود نتایج کاملاً یک‌دست در مطالعات مختلف، کمیته بین‌المللی سلول‌درمانی (International Society For Cellular Therapy, ISCT) جهت تعریف

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-13]

MSC ها شاخص‌های حداقلی را مشخص کرده است که می‌توان به عنوان دستورالعمل کلی در این زمینه استفاده کرد.

ما نیز بر اساس معیارهای ISCT، چسبندگی سلول‌های جداسازی شده از بافت چربی را به سطح پلاستیکی فلاسک کشت سلولی مشاهده کردیم، هم‌چنین به‌وسیله فلوسیتومتری بیان مثبت مارکرهای CD90، CD73 و بیان منفی CD45، CD34 و CD31 را مشاهده کردیم و هم‌چنین در محیط آزمایشگاه با استفاده از محیط‌های تمایزی، قابلیت تمایز سلول‌های جداسازی شده را به رده‌های استخوانی و چربی مشاهده کردیم.

در مطالعه حاضر ما برای جداسازی سلول‌ها از بافت چربی از آنزیم کلاژناز استفاده کردیم اما Ghorbani و همکارانش نشان دادند که بدون استفاده از آنزیم نیز می‌توان اقدام به جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی کرد. آن‌ها بافت چربی حاصل از لیپوساکشن چربی شکمی را به قطعات کوچک خرد کردند و سپس کشت دادند که شاهد رشد و تکثیر سلول‌های MSC بودند [۲۰].

با شناسایی پتانسیل چندرده‌ای MSC ها، در دهه گذشته علاقه وافری در زمینه زیست پزشکی نسبت به این سلول‌ها ایجاد شده است [۲۱]. به‌دلیل ویژگی‌ها و قابلیت‌هایی که این سلول‌ها دارند به گزینه جذابی به‌عنوان عوامل سلول‌درمانی تبدیل شده‌اند. مغز استخوان نخستین منبعی است که وجود چنین سلول‌هایی از آن گزارش شد. به نظر می‌رسد مغز استخوان به‌دلیل فرآیند اهدای تهاجمی و کاهش تعداد سلول و قدرت تمایز سلولی با افزایش سن اهداکنندگان، برای اهداف بالینی مناسب نباشد [۲۲].

Sakaguchi و همکارانش MSCها را از مغز استخوان، سینوویوم، پریوستئوم، عضله اسکلتی و بافت چربی جداسازی کرده و تحت شرایط تعریف شده قدرت کلنی‌زایی و تمایز این سلول‌ها را مطالعه کردند. از نظر استئوژنز، فراوانی کلنی‌های آلیزارین- رد مثبت به ترتیب در MSC های مشتق از سینوویوم و پریوستئوم بیش‌ترین مقدار بود در حالی که MSCهای مشتق از پریوستئوم بیش‌ترین ظرفیت تولید کندروسیت‌ها را داشتند. از نظر آدیپوژنز، بیش‌ترین فراوانی کلنی‌های اویل- رد مثبت مربوط به MSCهای مشتق از بافت چربی و سینوویوم بود [۲۳].

Karn و همکارانش در مقایسه MSCها از سه منبع، مغز استخوان (BM)، بافت چربی (AT) و خون بند ناف (UCB) نشان دادند که میزان موفقیت در جداسازی MSC از بافت چربی و مغز استخوان ۱۰۰٪ می‌باشد در حالی که این میزان در مورد خون بند ناف به ۶۰٪ کاهش می‌یابد هم‌چنین آن‌ها در بررسی قدرت تمایز به رده‌های مختلف، موفق به القای تمایز آدیپوسیتی در MSCهای حاصل از UCB نشدند. در حالی که این سلول‌ها به رده‌های کندروسیتی و استئوبلاستی تمایز یافتند. آن‌ها در MSCهای حاصل از بافت چربی قابلیت تمایز به هر سه رده را مشاهده کردند اما در مورد نمونه‌های مغز استخوان در تمامی نمونه‌ها قابلیت تمایز به هر سه رده را مشاهده نکردند. این تغییرات در قدرت تمایزی که در سلول‌های حاصل از خون بند ناف و مغز استخوان مشاهده شد می‌تواند ناشی از سن افراد و محل نمونه‌گیری باشد [۲۴].

Pendleton و همکارانش قدرت تکثیر و مهاجرت MSCهای بافت چربی و مغز استخوان را در in vitro بررسی کردند آن‌ها از MSCهای تجاری و کشت اولیه استفاده کردند سرعت تکثیر سلول‌های تجاری بیش‌تر بود و در مقایسه با سلول‌های کشت اولیه اختلاف معنی‌داری داشتند. در بررسی قدرت مهاجرت به سمت سلول‌های گلیومایی، تفاوتی در بین سلول‌های بافت چربی و مغز استخوان مشاهده نشد [۲۵].

با توجه به حجم زیاد چربی شکمی، دسترسی آسان به آن و دور ریختن چربی حاصل از لیپوساکشن شکمی در افراد چاق، در اکثر مطالعات انجام شده تا به امروز، از چربی شکمی به‌عنوان منبع اصلی جهت جداسازی MSCها استفاده شده است. با این وجود برخی از مطالعات از بافت چربی دیگر نواحی بدن استفاده کرده‌اند. Khan و همکارانش جهت جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی از بافت چربی اطراف زانو استفاده کردند بدین منظور بافت چربی دور زانوی افرادی که تحت عمل جراحی تعویض استخوان کشکک قرار

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-13]

می‌گرفتند جمع‌آوری شده و MSCهای آن جداسازی شد و بعد از کشت، قدرت تکثیر و تمایز و هم‌چنین حفظ ویژگی‌های سلول بنیادی در پاساژهای مختلف مورد بررسی قرار گرفت. سلول‌های جداسازی شده در سه پاساژ ۲، ۱۰ و ۱۸ از نظر شاخص‌های سطح سلولی بیان بالایی از CD90 و CD105 داشتند و فاقد بیان CD34 و CD56 بودند قدرت تمایز آدیپوسیتی در هر سه پاساژ مشاهده شد هم‌چنین قدرت تکثیر در سه پاساژ متفاوت اختلاف معنی‌داری با هم‌دیگر نداشتند در این مطالعه قدرت تمایز استئوبلاستی بررسی نشد [۲۶].

مطالعات پیشین نشان داده‌اند که بافت چربی در مقایسه با مغز استخوان سلول‌های MSC بیش‌تری دارد. در یک نمونه مغز استخوان تقریباً در هر میلی‌لیتر ۶×۱۰^{۶} سلول هسته‌دار وجود دارد [۲۷] که تنها ۰/۰۰۱–۰/۰۱٪ از آن را سلول‌های بنیادی تشکیل می‌دهند. در مقایسه، تعداد سلول‌های جزء استروماواسکولار (Stroma-Vascular Fraction, SVF) که می‌توان از آسپیره‌های لیپوساکشن زیر جلدی به‌دست آورد تقریباً حاوی $۰/۵ - ۲ \times ۱۰^{۶}$ سلول در هر گرم از بافت چربی می‌باشد و بر این اساس درصد سلول‌های بنیادی ۱۰–۱٪ می‌باشد [۲۸]. بنابراین در افراد متفاوت از هر گرم بافت چربی تقریباً $۰/۵ \times ۱۰۴$ تا ۲×۱۰۵ سلول بنیادی می‌توان جداسازی کرد [۲۹].

فراوانی سلول‌های MSC و ظرفیت گسترش این سلول‌ها می‌تواند تأثیر زیادی بر به‌کارگیری این سلول‌ها در بالین داشته باشد و از این رو به نظر می‌رسد منابع بافت چربی و مغز استخوان با توجه به موفقیت ۱۰۰ درصدی در جداسازی MSCها از این دو منبع، گزینه‌های قابل اعتمادی باشند [۳۰]. یک بحث در مورد MSCهای بافت چربی، محدودیت در میزان چربی در بعضی افراد می‌باشد اما با این وجود به نظر می‌رسد با توجه به فراوانی AD-MSC، حتی مقادیر کم چربی ذخیره‌ای نیز می‌تواند برای جداسازی این سلول‌های کافی باشد. BM-MSCها در مواردی مانند درمان استئوژنز ایمپرفکتا، بیماری بافت علیه میزبان (GVHD) و سکته قلبی حاد به‌عنوان منبع سلول‌های MSC مورد استفاده قرار گرفته‌اند [۳۲،۳۱]. از آن‌جائی‌که تعداد، فراوانی و ظرفیت تمایزی BM-MSC ارتباط منفی با سن فرد دارند، بنابراین MSCها در صورت جداسازی از مغز استخوان افراد مسن، نمی‌تواند برای اهداف بالینی مفید باشد که در این شرایط، رویکرد آلوژنیک مورد نیاز می‌باشد و با توجه به این‌که سازگاری اهداکننده ضروری است تهیه مغز استخوان یا بافت چربی از بستگان با HLA یکسان، خویشاوندان با HLA نیمه یکسان یا از اهداکنندگانی که مورد غربالگری قرار گرفته‌اند بهترین گزینه می‌باشد. با در نظر گرفتن نیاز به مقادیر زیاد MSC برای مصارف درمانی، بافت چربی با توجه به فراوانی، جمع‌آوری نسبتاً آسان و جمعیت سلولی بیش‌تر منبع مناسبی می‌باشد [۲۴].

MSCها در حال ظهور به‌عنوان یک ابزار نوین قدرتمند جهت درمان بیماری‌های مختلف می‌باشند که بعضی از این بیماری‌ها گزینه‌های درمانی محدودی دارند. اگر چه در واقع MSCها در تمامی ارگان‌ها یافت می‌شوند، MSCهای مشتق از بافت چربی و مغز استخوان به‌خوبی شناسایی شده‌اند و مرسوم‌ترین گزینه‌ها در استفاده برای آزمایشات بالینی هستند. با وجود تفاوت‌هایی در بین MSCهای با منشأ چربی و مغز استخوان، داده‌های بالینی و آزمایشگاهی استفاده از هر دو منبع MSC را برای کاربردهای بالینی حمایت می‌کند. در مجموع، به نظر می‌رسد AD-MSCها در مقایسه با BM-MSCها به‌دلیل فروانی MSCهای بافت چربی، گزینه بهتری برای کاربردهای بالینی باشند. به‌علاوه فراوانی بافت چربی بیش‌تر است، دسترسی به آن راحت‌تر است و خطرات جمع‌آوری بافت چربی در مقایسه با مغز استخوان کم‌تر می‌باشد.

تشکر و قدردانی

مطالعه حاضر مستخرج از رساله دکتری تخصصی آقای سعید سلالی به شماره تصویب (۵۲/۱۲۷۰د) در تاریخ ۱۳۹۱/۰۵/۱۳می باشد که تأمین مالی آنرا دانشگاه تربیت

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-13]

مدرس انجام داده و بدین وسیله مراتب تشکر و قدردانی خود را از آن دانشگاه اعلام می داریم.

منابع

[1] Hu YL, Fu YH, Tabata Y, Gao JQ. Mesenchymal stem cells: A promising targeted-delivery vehicle in cancer gene therapy. J Control Release 2010; 147: 154-162.

[2] da Silva Meirelles L, Chagastelles PC, Nardi NB. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. J Cell Sci 2006; 119: 2204-2213.

[3] 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 Eng 2001; 7: 211-228.

[4] Strioga M, Viswanathan S, Darinskas A, Slaby O, Michalek J. Same or not the same? Comparison of adipose tissue-derived versus bone marrow-derived mesenchymal stem and stromal cells. Stem Cells Dev 2012; 21: 2724-2752.

[5] Vaananen HK. Mesenchymal stem cells. Ann Med 2005; 37: 469-479.

[6] Dai LJ, Moniri MR, Zeng ZR, Zhou JX, Rayat J, Warnock GL. Potential implications of mesenchymal stem cells in cancer therapy. Cancer Lett 2011; 305: 8-20.

[7] Compte M, Cuesta AM, Sanchez-Martin D, Alonso-Camino V, Vicario JL, Sanz L, Alvarez-Vallina L. Tumor immunotherapy using gene-modified human mesenchymal stem cells loaded into synthetic extracellular matrix scaffolds. Stem Cells 2009; 27: 753-760.

[8] In 't Anker PS, Scherjon SA, Kleijburg-van der Keur C, de Groot-Swings GM, Claas FH, Fibbe WE, Kanhai HH. Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta. Stem Cells 2004; 22: 1338-1345.

[9] Studeny M, Marini FC, Champlin RE, Zompetta C, Fidler IJ, Andreeff M. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells as vehicles for interferon-beta delivery into tumors. Cancer Res 2002; 62: 3603-3608.

[10] Sotiropoulou PA, Perez SA, Salagianni M, Baxevanis CN, Papamichail M. Characterization of the optimal culture conditions for clinical scale production of human mesenchymal stem cells. Stem Cells 2006; 24: 462-471.

[11] Sato H, Kuwashima N, Sakaida T, Hatano M, Dusak JE, Fellows-Mayle WK, et al. Epidermal growth factor receptor-transfected bone marrow stromal cells exhibit enhanced migratory response and therapeutic potential against murine brain tumors. Cancer Gene Ther 2005; 12: 757-768.

[12] Yip S, Sabetrasekh R, Sidman RL, Snyder EY. Neural stem cells as novel cancer therapeutic vehicles. Eur J Cancer 2006; 42: 1298-1308.

[13] Choi YH, Kurtz A, Stamm C. Mesenchymal stem cells for cardiac cell therapy. Hum Gene Ther 2011; 22: 3-17.

[14] Zhang ZX, Guan LX, Zhang K, Zhang Q, Dai LJ. A combined procedure to deliver autologous mesenchymal stromal cells to patients with traumatic brain injury. Cytotherapy 2008; 10: 134-139.

[15] Li DS, Warnock GL, Tu HJ, Ao Z, He Z, Lu H, Dai LJ. Do immunotherapy and beta cell replacement play a synergistic role in the treatment of type 1 diabetes? Life Sci 2009; 85: 549-556.

[16] Dai LJ, Li HY, Guan LX, Ritchie G, Zhou JX. The therapeutic potential of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on hepatic cirrhosis. Stem Cell Res 2009; 2: 16-25.

[17] Pittenger MF, Martin BJ. Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics. Circ Res 2004; 95: 9-20.

[18] Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease. Nat Rev Immunol 2008; 8: 726-736.

[19] Giordano A, Galderisi U, Marino IR. From the laboratory bench to the patient's bedside: an update on clinical trials with mesenchymal stem cells. J Cell Physiol 2007; 211: 27-35.

[20] Ghorbani A, Jalali SA, Varedi M. Isolation of adipose tissue mesenchymal stem cells without tissue destruction: a non-enzymatic method. Tissue Cell 2014; 46: 54-58.

[21] Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. Nature 2002; 418: 41-49.

[22] Shah K. Mesenchymal stem cells engineered for cancer therapy. Adv Drug Deliv Rev 2012; 64: 739-748.

[23] Sakaguchi Y, Sekiya I, Yagishita K, Muneta T. Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues: superiority of synovium as a cell source. Arthritis Rheum 2005; 52: 2521-2529.

[24] Kern S, Eichler H, Stoeve J, Kluter H, Bieback K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. Stem Cells 2006; 24: 1294-1301.

[25] Pendleton C, Li Q, Chesler DA, Yuan K, Guerrero-Cazares H, Quinones-Hinojosa A. Mesenchymal stem cells derived from adipose tissue vs bone marrow: in vitro comparison of their tropism towards gliomas. PLoS One 2013; 8: e58198.

[26] Khan WS, Adesida AB, Tew SR, Longo UG, Hardingham TE. Fat pad-derived mesenchymal stem cells as a potential source for cell-based adipose tissue repair strategies. Cell Prolif 2012; 45: 111-120.

[27] 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: 101-109.

[28] Baer PC, Geiger H. Adipose-derived mesenchymal stromal/stem cells: tissue localization, characterization, and heterogeneity. Stem Cells Int 2012; 2012: 812193..

[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 Func 2008; 26: 664-675.

[30] Bieback K, Kern S, Kluter H, Eichler H. Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. Stem Cells 2004; 22: 625-634.

[31] Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, Gotherstrom C, Hassan M, Uzunel M, Ringdén O. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. Lancet 2004; 363: 1439-1441.

[32] Chen SL, Fang WW, Qian J, Ye F, Liu YH, Shan SJ, et al. Improvement of cardiac function after transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cells in patients with acute myocardial infarction. Chin Med J 2004; 117: 1443-1448.

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-13]

Isolation and characterization of mesenchymal stem cells derived from adipose tissue

Saeed Solali (M.Sc)[1], Saeid Kaviani (Ph.D)[1*], Masoud Soleimani (Ph.D)[1], Zahra Zonubi (M.D)[2]
1 - Hematology Dept, Medical Science Faculty, TarbiatModares University, Tehran, Iran
2 - Department of Obstetrics and Gynecology, Mahdiyeh Hospital, ShahidBeheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

(Received: 10 Sep 2014; Accepted: 20 Dec 2014)

Introduction: Mesenchymal stem cells (MSCs) are a group of adult stem cells naturally found in the body. These cells were reported from many sources. Bone marrow and adipose tissue are two main sources of human MSCs. MSCs have attracted considerable attention in the fields of cell and gene therapy due to their intrinsic characteristics and ability to differentiate into multiple lineages.

Materials and Methods: In this study MSCs were isolated from adipose tissue and the harvested cells were characterized, using minimal criteria defined by International Society for Cellular Therapy (ISCT) for human MSCs.

Results: Adipose tissue derived MSCs (AD-MSCs) were adherent to plastic surface of culture flask. In the culture with defined differentiation condition, these cells differentiated to adipocyts and osteoblasts. Also immunophenotyping using flow cytometry showed CD90 (96.3%), CD73 (97.7%) positive and CD34 (0.99%), CD45 (0.34%), CD31 (0.41%) negative cells.

Discussion: Adipose tissue due to its easy accessibility and less aggressiveness in compare to other organs, such as bone marrow, seems to be an ideal source for human MSCs. Besides, frequency of MSCs in adipose tissue is higher than bone marrow and adipose-MSCs can easily be isolated by tissue digestion. It is anticipated that adipose tissue would become a popular source for MSC studies in future.

Key words: Mesenchymal Stem Cell, Adipose Tissue

* Corresponding author. Fax: +98 21 82884507 Tel: +98 21 82884507
kavianis@modares.ac.ir

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-13]