

مقاله پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان

دوره ، اسفند

مقایسه درصد حیات و تمایز خود به خودی سلول‌های بنیادی بافت چربی و سلول‌های

استرومایی مغز استخوان در پاساژهای طولانی مدت

علیرضا عبدانی پور^۱، علی نوری زاده^۲، زهرا محمدی^۳، فاطمه رشیدشیر احمد^۴، پریسا اکبری^۴

دریافت مقاله: ۹۳/۶/۳ ارسال مقاله به نویسنده جهت اصلاح: ۹۳/۸/۱۰ دریافت اصلاحیه از نویسنده: ۹۳/۹/۱۹ پذیرش مقاله: ۹۳/۹/۲۶

چکیده

زمینه و هدف: سلول‌های بنیادی بافت چربی از نظر ظاهری بسیار شبیه به سلول‌های استرومایی مغز استخوان هستند و میتوانند جایگزینی مناسب برای این سلول‌ها باشند. هدف از این مطالعه بررسی و مقایسه درصد حیات و تمایز خود به خودی سلول‌های بنیادی بافت چربی و سلول‌های استرومایی مغز استخوان در پاساژهای طولانی مدت می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه آزمایشگاهی ابتدا سلول‌های بنیادی بافت چربی و مغز استخوان از موش‌های صحرایی تهیه شد و سپس در پاساژهای مختلف درصد سلول‌های مرده با روش (live and dead cells assay) و توانایی تمایز خود به خودی سلول‌ها به سلول‌های چربی‌ساز و استخوان‌ساز به ترتیب با استفاده از رنگ آمیزی Oil Red O و Alizarin red بررسی شد. اطلاعات به دست آمده توسط Student t-test و روش آماری آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) بررسی گردید.

یافته‌ها: نتایج به دست آمده از این مطالعه نشان داد میانگین درصد سلول‌های مرده در پاساژهای پنجم، دهم و پانزدهم برای سلول‌های استرومایی مغز استخوان به ترتیب $(۲/۲۶ \pm ۰/۳۶)$ ، $(۳/۳۹ \pm ۰/۴۵)$ و $(۶/۹۲ \pm ۰/۹۵)$ و برای سلول‌های بنیادی بافت چربی به ترتیب $(۰/۷ \pm ۰/۱۹)$ ، $(۰/۸۹ \pm ۰/۳۹)$ و $(۳/۲۳ \pm ۰/۵۵)$ بدست آمد. همچنین، در بررسی تمایز خود به خودی به سلول‌های استخوان‌ساز نتایج بدست آمده در پاساژ پانزدهم برای سلول‌های استرومایی مغز استخوان $(۳/۲۵ \pm ۰/۳۸)$ و برای سلول‌های بنیادی بافت چربی $(۰/۴۸ \pm ۰/۳)$ بود، که این نتایج دارای اختلاف معنی‌دار بودند ($p < ۰/۰۵$). همچنین، در بررسی تمایز سلول‌ها به سلول‌های چربی‌ساز نتایج نشان داد تا پاساژ ۱۵ سلول‌های بنیادی بافت چربی توانایی تمایز خود به خودی به سلول‌های چربی‌ساز را ندارند ولی سلول‌های مغز استخوان در پاساژ پانزدهم به میزان $۱/۰۷ \pm ۰/۲۴$ تمایز را نشان دادند.

نتیجه‌گیری: با توجه به درصد سلول‌های مرده و تمایز خودبه‌خودی در پاساژهای طولانی مدت، سلول‌های بنیادی بافت چربی می‌توانند منبع جایگزین مناسبی برای سلول‌های بنیادی مغز استخوان به منظور کاربردهای درمانی باشند.
واژه‌های کلیدی: سلول بنیادی بافت چربی، سلول‌های بنیادی مغز استخوان، تمایز خود به خودی، حیات سلول‌ها

۱- (نویسنده مسئول) استاد یار گروه آموزشی علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران
تلفن: ۰۲۴-۳۳۴۴۰۳۰۱، دورنگار: ۰۲۴-۳۳۴۴۹۵۵۳، پست الکترونیکی: abdani.anatomy@yahoo.com

۲- دانشجوی دکترای تخصصی بیوشیمی مرکز تحقیقات علوم اعصاب شفای بیمارستان خاتم الانبیا، تهران، ایران

۳- دانشجوی کارشناس مامایی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اردبیل، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، اردبیل، ایران

۴- دانشجوی پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اردبیل، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، اردبیل، ایران

مقدمه

نتایج تحقیقات بیانگر این مهم هستند که تمایز سلول‌ها بنیادی بافت چربی به سلول‌های بالغ در مقایسه با سلول‌های استرومایی مغز استخوان در شرایط آزمایشگاهی نیازمند دوزهای قوی از فاکتورهای رشد می‌باشد. سلول‌های ADSCs به راحتی به سلول‌های بالغ متمایز نمی‌شوند. البته مکانیسم این فرآیند به خوبی مشخص نشده است [۱۱-۱۰]. همچنین، نشان داده شده است که سلول‌های بنیادی بافت چربی نسبت به مغز استخوان مقاومتر هستند و در مقایسه با سلول‌های مغز استخوان در سنین بالا دارای محدودیت از نظر تعداد نمونه و قدرت تکثیر نیستند. این ویژگی بیانگر مزیت استفاده از سلول‌های بنیادی بافت چربی در مقایسه با مغز استخوان در سلول درمانی افراد مسن می‌باشد [۱۲].

با توجه به این که در کلینیک از لحظه تهیه نمونه تا رسیدن سلول‌ها به تعداد مناسب جهت پیوند زمان طولانی سپری می‌شود، لذا باید سلولی برای این منظور انتخاب شود که با طولانی شدن زمان کشت و تعداد پاساژهای سلولی دستخوش تغییرات زیادی نشود. با در نظر گرفتن علاقه مندی اکثر محققین به استفاده از سلول‌های بنیادی مغز استخوان در سلول درمانی توجه به تمایز خود به خودی و درصد حیات سلول‌ها تا رسیدن به تعداد مناسب سلول به منظور پیوند بسیار ضروری است. با توجه به مشکلات موجود در تهیه نمونه مغز استخوان از لحاظ دردناک بودن روش، محدودیت در تعداد سلول‌ها در افراد مسن، کاهش قدرت تقسیم در پاساژهای بلند مدت و تمایز خودبه خودی هدف از این مطالعه بررسی و مقایسه درصد حیات و تمایز خود به خودی سلول‌های بنیادی بافت چربی و سلول‌های استرومایی مغز استخوان در پاساژهای طولانی مدت می‌باشد.

سلول‌های بنیادی مشتق شده از بافت چربی Adipose derived stem cells (ADSCs) از نظر ظاهری شبیه به سلول‌های استرومایی مغز استخوان Bone marrow stromal cells (BMSCs) هستند و می‌توانند جایگزینی مناسب برای سلول‌های استرومایی مغز استخوان باشند. این سلول‌ها دارای ویژگی‌های مشترک با سلول‌های بنیادی مزانشیمی هستند که از جمله می‌توان به قدرت خود تجدیدی، پرتوان بودن، نمای فیبروبلاستی، قدرت اتصال به ظروف پلاستیکی کشت و قدرت تمایز به سایر رده‌های مزانشیمی اشاره نمود [۱]. تمایز این سلول‌ها به سلول‌های چربی [۲]، سلول‌های استخوانی [۳]، سلول‌های غضروفی [۴]، سلول‌های عضلانی اسکلتی [۵] و سلول‌های عضلانی قلبی [۶] در سال‌های مختلف توسط دیگر محققین گزارش شده است. همچنین، سلول‌های بنیادی بافت چربی همانند سلول‌های استرومایی مغز استخوان می‌توانند با واسطه مواد القاکننده عصبی به رده‌های اکتودرمال (مانند سلول‌های عصبی و گلیالی) تبدیل شوند [۷].

انتخاب نوع سلول به منظور سلول درمانی از موضوعاتی است که مورد توجه محققین بوده است. در این انتخاب علاوه بر در نظر گرفتن مشکلات اخلاقی [۸]، تومورزایی، قابل دسترس بودن و فراوانی سلول بنیادی، استخراج آسان و کم خطر برای بیماران، توانایی تبدیل به سایر رده‌های سلولی، ایمنی برای فرد گیرنده و عدم رد پیوند [۹]، باید به تمایز خود بخودی سلول‌ها و درصد حیات سلول‌ها در پاساژهای طولانی توجه داشت.

مواد و روش‌ها

مطالعه انجام شده از نوع بنیادی- پژوهشی می‌باشد که در سال ۱۳۹۲ در آزمایشگاه سلول‌های بنیادی دانشگاه آزاد اسلامی واحد اردبیل انجام شده است. در این مطالعه به منظور جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی بافت چربی و نمونه مغز استخوان با رعایت اصول کار با حیوانات (مورد تأیید دانشگاه تربیت مدرس) از موش‌های صحرایی نر بالغ نژاد Sprague-Dawley (با ۱۲ هفته سن) استفاده شد. در این تحقیق برای استخراج سلول‌های بنیادی از نمونه چربی از روش متداول Zuk و همکارانش البته با کمی تغییر استفاده شده است [۱۳]. بعد از کشتن موش در بیهوشی کامل، در شرایط کاملاً استریل بافت چربی از نواحی زیر جلدی پایین شکم و اطراف کلیه‌ها جدا گردید و چندین بار در فسفات بافر سالین حاوی آنتی‌بیوتیک شستشو داده شد. هم حجم نمونه برداشته شده آنزیم Collagenase Type I با غلظت ۰/۰۷۵٪ اضافه گردید و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد برای مدت ۳۰ الی ۶۰ دقیقه در دستگاه تکان دهنده اتوماتیک قرار داده شد. پس از خنثی‌سازی آنزیم توسط Fetal Bovine Serum (FBS) محلول شیری رنگ به دست آمده به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. رسوب سلولی با ۲ میلی لیتر محیط کشت مخلوط و سپس با پیپت پر و خالی شد و سوسپانسیون سلولی از فیلتر نایلونی ۱۰۰ میکرومتری عبور داده شد. سپس مایع عبور داده شده از فیلتر به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. رسوب سلولی بعد از مخلوط و پر و خالی کردن با پیپت به فلاسک ۲۵ سانتی منتقل و با محیط کشت Dulbecco's (UK, Gibco) DMEM

Modified Eagle Medium حاوی ۱۰٪ سرم (FBS) (UK, Gibco) درون انکوباتور با ۳۷ درجه سانتی گراد حرارت، ۹۵٪ رطوبت و ۵٪ CO₂ کشت داده شد. هنگامی که جمعیت سلولی درون ظروف کشت به ۹۰٪ رسید، پاساژ سلولی انجام شد. برای جداسازی سلول‌ها از کف ظروف کشت از محلول تریپسین ۰/۰۴٪ و EDTA ۰/۲۵٪ برای مدت ۳ دقیقه استفاده شد. در این مطالعه سلول‌ها تا ۱۵ پاساژ کشت داده شدند.

به منظور جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی مغز استخوان موش صحرایی در بیهوشی کامل توسط کلروفورم کشته شد و سپس استخوان‌های ساق و فمور از بدن حیوان جدا شدند. بعد از جداسازی عضلات، استخوان‌ها در داخل پتری دیش حاوی فسفات بافر سالین و پودر پنی‌سیلین قرار گرفتند و به زیر هود منتقل شدند. دو سر استخوان توسط قیچی استریل و در زیر هود قطع گردید و به وسیله سرنگ ۵ سی‌سی حاوی محیط کشت و سرم ۲۰ درصد محتویات داخل کانال استخوان‌ها بداخل فلاسک مخصوص کشت تخلیه شد. فلاسک حاوی سلول در داخل انکوباتور با دمای ۳۷°C و رطوبت ۹۵٪ و CO₂ ۵٪ قرار گرفت. پس از ۴۸ ساعت محیط کشت سلول‌ها تعویض شدند. بعد از ۲ الی ۳ روز سلول‌ها بر اثر تکثیر کف فلاسک را پر کردند و در این هنگام پاساژ اول برای کشت سلول انجام شد که در طی این عمل با استفاده از محلول تریپسین/ EDTA سلول‌ها از کف فلاسک جدا شدند. در این مطالعه پاساژ سلولی تا ۱۵ مرحله تکرار شد [۱۴].

به منظور بررسی تأثیر زمان و شرایط کشت بر روی حیات سلول‌های BMSCs و ADSCs در شرایط آزمایشگاهی، ابتدا سلول‌ها به تعداد صد هزار سلول در هر

یک از خانه‌های پلیت ۲۴ تایی کشت داده شد و سپس از کیت live/dead viability/cytotoxicity و مطابق با دستور شرکت سازنده (Invitrogen) استفاده شد. به طور خلاصه سلول‌ها با calcein acetoxymethyl ester موجود در کیت با تابش فلورسنت نشاندار شدند. سپس سلول‌ها برای مدت یک دقیقه در معرض اتیدیوم بروماید قرار گرفتند [۱۵].

اتیدیوم بروماید در سلول‌های مرده و سلول‌هایی که غشای آنها آسیب دیده نفوذ کرده و وارد هسته شده و آن را به رنگ قرمز نشان می‌دهد. در این مطالعه درصد سلول‌های مرده در پاساژهای سلولی ۵، ۱۰ و ۱۵ با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت مورد ارزیابی قرار گرفت.

بررسی تمایز سلول‌های بنیادی به سلول‌های چربی و استخوانی در پاساژهای ۵، ۱۰ و ۱۵ توسط رنگ‌آمیزی Alizarin red S (رنگ‌آمیزی سلول‌های استخوان‌ساز) و Oil Red O (رنگ‌آمیزی سلول‌های چربی‌ساز) انجام شد. در طی تمایز خود به خودی سلول‌ها به سلول‌های چربی‌ساز و زیکول‌های چربی در فضای داخل سلول‌ها نمایان می‌شود. محیط کشت سلول‌های ADSCs دور ریخته شد و سه مرتبه و هر مرتبه به مدت ۵ دقیقه با فسفات بافر سالین شستشو داده شد. سپس سلول‌ها با استفاده از فرمالین ۱۰ درصد به مدت ۳۰ الی ۶۰ دقیقه در دمای اتاق فیکس شدند. بعد از انجام مرحله فیکس سلول‌ها با آب مقطر شستشو داده شدند و بعد از شستشو ۲ میلی‌لیتر ایزوپروپانول ۶۰٪ روی سلول‌ها اضافه شد. بعد از ۵ دقیقه ایزوپروپانول از روی محیط سلول‌ها خارج شد و ۲ میلی‌لیتر از محلول کار (رنگ‌آمیزی) روی سلول‌ها اضافه شد. سلول‌ها برای مدت ۵ دقیقه و در دمای اتاق با رنگ Oil Red O انکوبه شدند. بعد از رنگ‌آمیزی سلول‌ها توسط آب مقطر شستشو داده شدند و با استفاده از

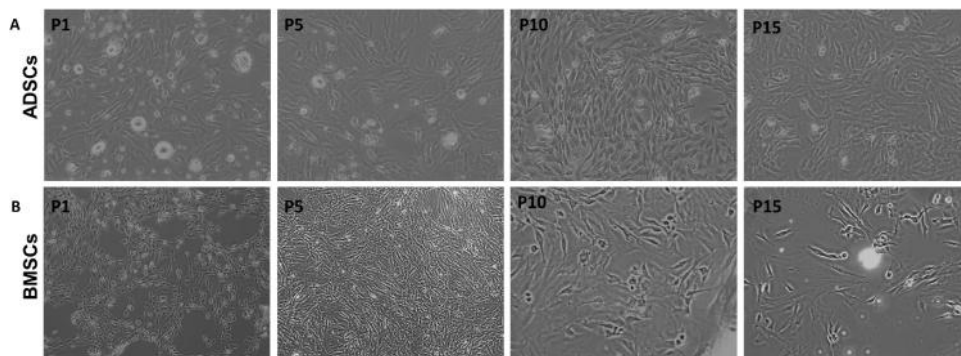
میکروسکوپ نوری مورد مطالعه قرار گرفتند [۱۶]. همچنین، در طی تمایز خود به خودی سلول‌ها به سلول‌های استخوان‌ساز املاح معدنی در فضای بین سلولی مشخص و با استفاده از Alizarin red S (Sigma) تأیید شدند. به منظور بررسی سلول‌های استئوبلاستی تولید شده محیط کشت سلول‌های دور ریخته شد و سه مرتبه و هر مرتبه به مدت ۵ دقیقه با PBS شستشو داده شد. سپس سلول‌های متمایز شده با استفاده از اتانول ۷۰ درصد به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد فیکس شدند. بعد از انجام مرحله فیکس سلول‌ها با آب مقطر شستشو داده شدند و بعد از شستشو اجازه داده شد تا کاملاً خشک شوند. در مرحله بعدی سلول‌ها برای مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق با رنگ Alizarin red S ۰.۲٪ pH=۲/۷ انکوبه شدند. بعد از رنگ‌آمیزی سلول‌ها توسط آب مقطر شستشو داده شدند و با استفاده از میکروسکوپ نوری مورد مطالعه قرار گرفتند [۱۷].

در بررسی‌های آماری تمام مقادیر بر حسب خطای استاندارد میانگین (standard error of the mean) یا SEM) با پنج بار تکرار ارائه شده است. تعداد نمونه‌ها ۵ پلیت سلولی و از هر پلیت ۵ فیلد مورد ارزیابی قرار گرفته‌اند. اطلاعات به دست آمده توسط Student T-test و روش آماری آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) و بدنبال آن آزمون TUKEY و به وسیله نرم افزار SPSS نسخه ۱۵ بررسی گردید. سطح معنی‌داری $p < 0.05$ در نظر گرفته شد.

نتایج

در شرایط یکسان از نظر کشت نتایج نشان داد سلول‌های بنیادی بافت چربی همانند سلول‌های

مغز استخوان سریعتر تعویض می‌شود. در این مطالعه ما مشاهده کردیم که سلول‌های ADSCs بعد از گذشت ۷ روز از شروع کشت قطری در حدود ۳۰ میکرومتر پیدا می‌کنند و برای پاساژ سلولی آماده می‌شوند. به دلیل حضور قطرات چربی درون سیتوپلاسمی سلول‌های ADSCs تا پاساژ چهارم برای انجام ادامه تحقیق مناسب نیستند و این در حالی است که سلول‌های استرومایی مغز استخوان از پاساژ دوم قابل استفاده هستند. سلول‌های ADSCs بعد از گذشت ۱۱، ۱۳ روز از شروع کشت به ترتیب به پاساژ دوم و سوم رسیدند. در پاساژ چهارم و پنجم سلول‌ها به جمعیت هموزن و یک دستی رسیدند. همچنین، در این مطالعه ما به این نتیجه رسیدیم که سلول‌های بنیادی استخراج شده از بافت چربی نسبت به سلول‌های استرومایی مغز استخوان مقاومتر هستند و تا پاساژهای بالا به حالت متمایز نشده باقی می‌مانند ولی سلول‌های استرومایی مغز استخوان بعد از پاساژ هفتم دارای فنوتیپ متفاوتی می‌شوند (شکل ۱ A,B).



شکل ۱- مقایسه مراحل کشت سلول‌های بنیادی بافت چربی و مغز استخوان: فوتومیکروگراف‌ها نشان دهنده سلول‌های بنیادی استخراج شده از بافت چربی (A) و سلول‌های استرومایی مغز استخوان (B) در پاساژهای پنجم، دهم و پانزدهم می‌باشد. حضور گرانول‌های چربی در سیتوپلاسم سلول‌های چربی از پاساژ اول تا پاساژ پنجم قابل مشاهده است. در پاساژهای بالا فنوتیپ سلول‌های BMSCs نسبت به سلول‌های ADSCs بیشتر دچار تغییرات می‌شوند. (بزرگنمایی ۲۰۰ برابری).

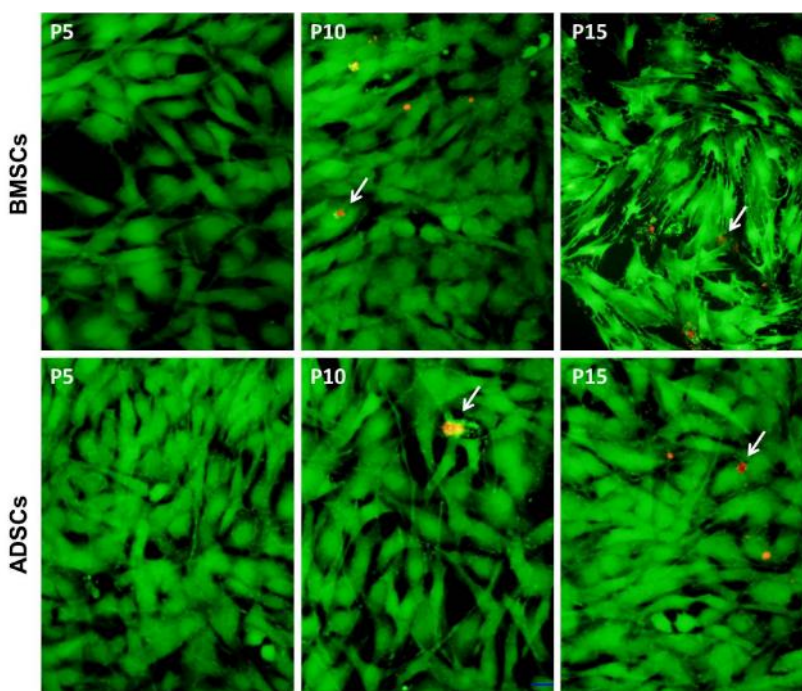
داده شده‌اند. درصد سلول‌های مرده (فلورسنت قرمز رنگ) در پاساژهای پنجم، دهم و پانزدهم برای سلول‌های

استرومایی مغز استخوان دارای ظاهری شبیه به سلول‌های فیبروبلاستی هستند که توانایی اتصال به ظروف کشت و تقسیم را دارند. در چند ساعت ابتدایی از شروع کشت سلول‌های ADSCs به شکل سلول‌های گرد و شناور با هسته غیر قابل مشاهده در محیط کشت دیده شدند. زمان اتصال این سلول‌ها به ظروف کشت در حدود ۱۲ الی ۲۴ ساعت بود و این در حالی است که زمان اتصال سلول‌های استرومایی مغز استخوان در حدود ۶ الی ۱۲ ساعت دیده شد. سلول‌ها متصل شده به ظرف کشت بعد از گذشت ۲۴ تا ۴۸ ساعت از شروع کشت همانند سلول‌های استرومایی مغز استخوان ظاهری کشیده (شبیه فیبروبلاست) پیدا کردند و در این مدت گرانول‌های چربی درون سیتوپلاسم سلول‌ها ظاهر شدند. بعد از گذشت چند روز گرانول‌ها به هم‌دیگر متصل شدند و قطرات بزرگ چربی سیتوپلاسمی را ایجاد کردند که این قطرات به فضای محیط کشت رها شدند. به همین دلیل محیط کشت سلول‌های بنیادی مشتق شده از بافت چربی نسبت به سلول‌های استرومایی

درصد سلول‌های مرده با روش (The live/dead cell assay) انجام شد. نتایج به دست آمده در شکل ۲ نمایش

یکسان مقاومتر بوده و درصد کمتری از سلول‌های مرده را نشان می‌دهند. در هر سه پاساژهای سلولی اشاره شده اختلاف معنی‌دار بین BMSCs و ADSCs قابل مشاهده است.

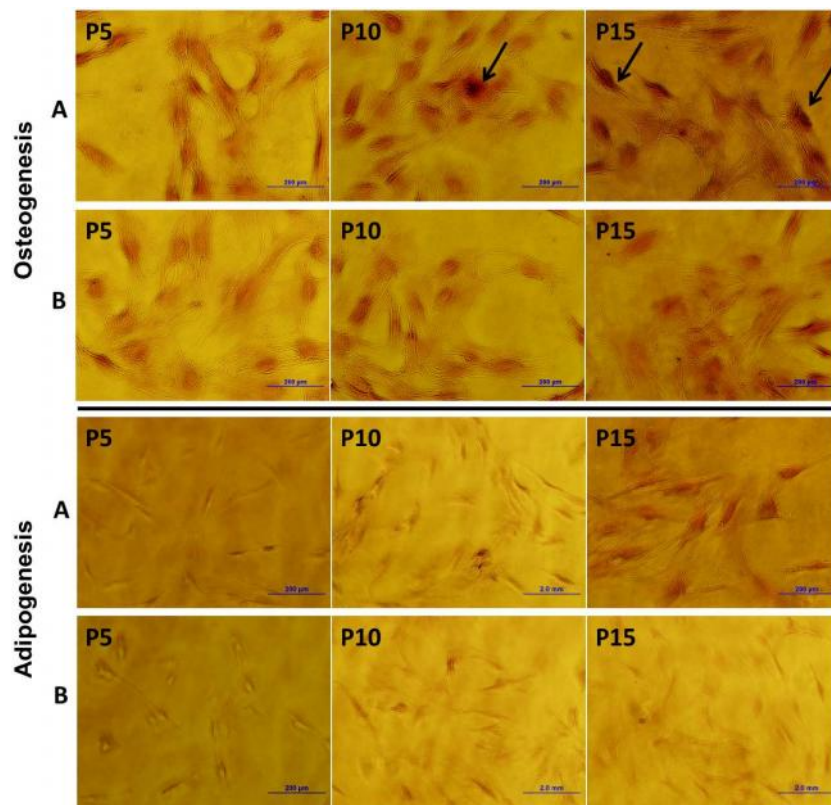
BMSCs به ترتیب $(۲/۲۶ \pm ۰/۳۶)$ ، $(۳/۳۹ \pm ۰/۴۵)$ و $(۶/۹۲ \pm ۰/۹۵)$ برای سلول‌های ADSCs به ترتیب $(۰/۷ \pm ۰/۱۹)$ ، $(۰/۸۹ \pm ۰/۳۹)$ و $(۳/۲۳ \pm ۰/۵۵)$ بدست آمد (Student T-test، $p < ۰/۰۵$). نتایج نشان داد سلول‌های ADSCs نسبت به سلول‌های BMSCs در شرایط کشت



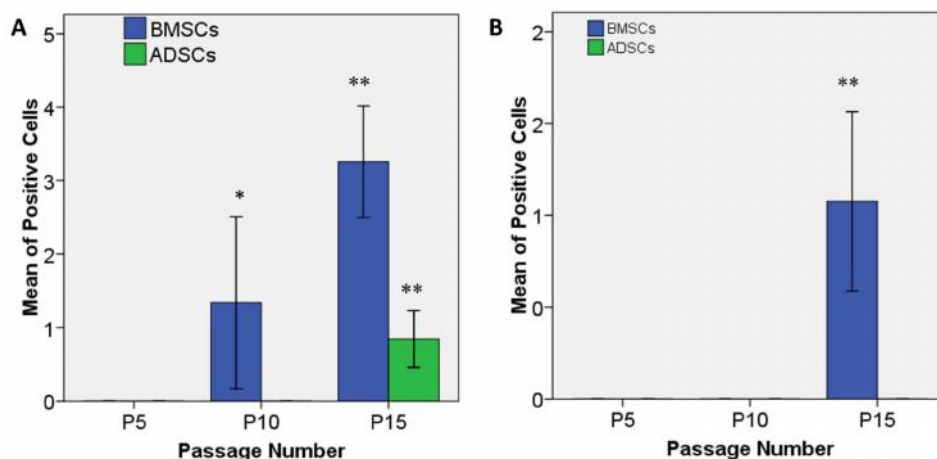
شکل ۲- مقایسه سلول‌های زنده و مرده در BMSCs و ADSCs در شرایط کشت یکسان. پانل بالا نشان دهنده سلول‌های BMSCs و پانل پایین نشان دهنده سلول‌های ADSCs در پاساژهای سلولی پنجم، دهم و پانزدهم می‌باشد. پیکان‌های سفید نمایانگر سلول‌های مرده می‌باشد. رنگ فلورسنت سبز (Green Fluorescence) و قرمز (Red Fluorescence) به ترتیب نمایانگر سلول‌های زنده و مرده می‌باشند. (بزرگنمایی تصاویر ۲۰۰ برابری می‌باشد).

پاساژ پانزدهم برای سلول‌های BMSCs $(۳/۲۵ \pm ۰/۳۸)$ و برای سلول‌های ADSCs $(۰/۴۸ \pm ۰/۳)$ بود. همچنین، در بررسی تمایز سلول‌ها به سلول‌های چربی‌ساز نتایج نشان داد که تا پاساژ ۱۵ سلول‌های ADSCs توانایی تمایز خود به خودی به سلول‌های چربی‌ساز را ندارند ولی سلول‌های BMSCs در پاساژ پانزدهم به میزان $۱/۰۷ \pm ۰/۲۴$ تمایز را نشان دادند. نتایج و مقایسه آماری در شکل ۴ نمودار A و B نمایش داده شده است.

برای ارزیابی تمایز خودبه خودی سلول‌های بنیادی بافت چربی و مغز استخوان به سلول‌های چربی‌ساز (Adipogenesis) و استخوان‌ساز (Osteogenesis) در شرایط یکسان و در پاساژهای سلولی پنجم، دهم و پانزدهم به ترتیب از رنگ‌آمیزی Oil Red O و Alizarin Red استفاده شد (شکل ۳). در بررسی تمایز خود به خودی به سلول‌های استخوان‌ساز نتایج بدست آمده از درصد سلول‌های مثبت در رنگ‌آمیزی Alizarin Red



شکل ۳- نمایش تمایز خودبه خودی سلول‌های *ADSCs* و *BMSCs* به سلول‌های چربی ساز و استخوان ساز در شرایط کشت یکسان. پانل بالا نمایانگر رنگ آمیزی *Alizarin red* و تمایز خود به خودی سلول‌های *BMSCs* (A) و *ADSCs* (B) به سلول‌های استخوان ساز و پانل پایین نمایانگر رنگ آمیزی *Oil Red O* و تمایز خود به خودی سلول‌های *BMSCs* (A) و *ADSCs* (B) به سلول‌های چربی ساز در پاساژهای سلولی پنجم، دهم و پانزدهم می‌باشد. پیکان‌های سیاه نمایانگر رسوبات املاح استخوانی در سلول‌های تمایز یافته می‌باشند. (بزرگنمایی تصاویر ۲۰۰ برابر می‌باشد).



شکل ۴- نمودار ANOVA بررسی میانگین درصد تمایز خودبه خودی سلول‌های *ADSCs* و *BMSCs* به سلول‌های چربی ساز و استخوان ساز در شرایط کشت یکسان. نمودار A نشان دهنده میانگین درصد تمایز خود به خودی سلول‌های *BMSCs* و *ADSCs* به سلول‌های استخوان ساز (Osteogenesis) و نمودار B نشان دهنده میانگین درصد تمایز خود به خودی سلول‌های به سلول‌های چربی ساز (Adipogenesis) در شرایط کشت یکسان و در پاساژهای پنجم، دهم و پانزدهم می‌باشند. خطای معیار (SEM) برای ۵ تکرار، $p < 0.05$ نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار با P5 ; نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار با P5, P10

بحث

نتایج به دست آمده از این مطالعه نشان داد درصد رشد و حیات در سلول‌های بنیادی بافت چربی در مقایسه با سلول‌های استرومایی مغز استخوان در پاساژهای بالا بیشتر بوده و این سلول‌ها تمایز خود به خودی کمتری را به سمت سلول‌های چربی‌ساز و استخوان‌ساز از خود نشان می‌دهند.

تحقیقات نشان داده است سلول‌های ADSCs همانند سلول‌های BMSCs قابلیت اتصال به ظروف کشت را دارند، ظاهری دوکی شکل دارند و توانایی تمایز به سایر رده‌های سلولی را نیز دارا می‌باشند [۱۸]. مشاهدات ما در این مطالعه نیز تأییدی بر این یافته‌ها می‌باشد. در پاساژهای بالاتر (پاساژ ششم به بعد) یافته‌های ما نشان داد فنوتیپ سلول‌های BMSCs از حالت دوکی خارج شد و اکثریت سلول‌ها به شکل پهن و متفاوت مشخص شدند. این در حالی است که در شرایط یکسان سلول‌های ADSCs فنوتیپ هموزن و یکنواختی را نشان می‌دادند. بررسی‌های انجام شده توسط محققین نشان می‌دهد، در شرایط کشت برابر در پاساژ چهارم سلولی هر دو رده سلولی توانایی بیان مارکرهای سطحی مزانشیمی مانند CD13, CD29 (β 1-integrin), CD44, CD58, CD90, CD105 را دارند [۱۹] و از نظر ظاهری جمعیت هموزنی را از خود به نمایش می‌گذارند [۲۰]. ما نیز در این مطالعه یافتیم که تا پاساژ ۵ سلولی، سلول‌های BMSCs از نظر فنوتیپ و سرعت رشد نسبت به سلول‌های ADSCs ارجحیت دارند. مشاهدات ما نشان داد که تا پاساژ دوم و سوم قطرات چربی در سیتوپلاسم سلول‌های بنیادی استخراج شده از بافت چربی وجود داد. با توجه به این ویژگی استفاده از سلول‌های بنیادی بافت چربی در

پاساژهای پایین‌تر و روزهای اولیه مقدور نیست و این در حالی است که سلول‌های استرومایی مغز استخوان از پاساژ دوم قابل استفاده هستند. همچنین، ما مشاهده کردیم که سلول‌های ADSCs بعد از ۴ پاساژ سلولی جمعیتی هموزن و ظاهری فیبروبلاستی پیدا می‌کنند. این یافته ما مطابق با گزارش Fraser و همکارانش در سال ۲۰۰۶ بود [۱]. در این تحقیق بعد از ۴۵ روز به پاساژ سلولی ۱۵ رسیدیم و از نظر شکل ظاهری هیچگونه تغییری در فنوتیپ سلول‌ها دیده نشد. این تحقیق نشان داد که سلول‌های بنیادی بافت چربی با توجه به داشتن ویژگی زیستی مشترک با سلول‌های مغز استخوان، در پاساژهای طولانی مدت سلول‌های نسبت به سلول‌های مغز استخوان دارای توان تکثیری بالاتری هستند و کمتر دچار پیری و تغییر فنوتیپ می‌شوند. این ویژگی در پاساژهای سلولی پایین‌تر نیز قبلاً توسط محققین گزارش شده است [۲۶].

نتایج تحقیقات بیانگر این مهم هستند که سلول‌ها استرومایی مغز استخوان در پاساژهای پنجم به بعد دستخوش تمایز خود به خودی می‌شوند و بیشتر تمایل دارند که به سلول‌هایی با ویژگی‌های سلول‌های استخوانی متمایز شوند و این در حالی است که تمایز خود به خودی در سلول‌های بنیادی بافت چربی به ندرت دیده می‌شود [۲۲]. محققین نشان داده اند که در شرایط کشت یکسان و با محیط کشت فاقد القاگر هر دو رده سلول‌های بنیادی چربی و مغز استخوان رفتارهای یکسانی را نشان می‌دهند. با توجه گزارش Huang و همکارانش از جمله ویژگی‌های دیگر سلول‌های ADSCs این است که تا پاساژ ۱۵ و یا بالاتر تمایز خود به خودی در آن‌ها دیده نمی‌شود [۲۱]. این درحالی است که در هنگام استفاده از القاء کننده مناسب سلول‌های BMSCs بیشترین درصد تمایز به

می‌باشد و از نظر مواد و تجهیزات مورد نیاز برای بررسی بیان ژن‌ها دارای محدودیت هستیم. در این مطالعه بهتر بود سلول‌ها در پاساژهای مختلف از نظر بیان ژن‌های مربوط به استئوژنیک و لیپوژنیک مورد ارزیابی قرار می‌گرفتند.

نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که در پاساژهای طولانی مدت پایین بودن درصد سلول‌ها مرده و پایین بودن تمایز خود به خودی در ADSCs مزیت این سلول‌ها نسبت به BMSCs می‌باشد. بنابراین سلول‌های ADSCs سلول‌های مقاومتری نسبت به سلول‌های بنیادی مغز استخوان هستند که با توجه به در نظر گرفتن زمان طولانی از لحظه تهیه نمونه تا پیوند در بیمارانی که کاندید سلول درمانی می‌باشند، سلول‌های ADSCs می‌توانند جایگزین مناسبی برای این منظور تلقی شوند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان بر خود لازم می‌دانند که از حمایت‌های بی‌دریغ جناب آقای دکتر سید سعید هاشمین (معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد اردبیل) به واسطه حمایت از این طرح تشکر و قدردانی نمایند.

سلول‌های استخوانی را در مقایسه با ADSCs از خود نشان می‌دهند. ما نیز در این مطالعه یافتیم که سلول‌های ADSCs توانایی تمایز خود به خودی کمتری را به رده استئوبلاستی و آدیپوبلاستی از خود نشان می‌دهد. نمونه‌گیری از موش‌هایی که دارای سن پایین‌تری هستند می‌تواند در نتایج بدست آمده تأثیر داشته باشد. در این آزمون ما از موش‌های بالغ ۱۲ هفته‌ای استفاده کردیم.

محققین ثابت کرده‌اند سلول‌های ADSCs نمی‌توانند در شرایط عادی و بدون حضور محیط القاء‌کننده به سلول‌های چربی تبدیل شوند. حتی تا پاساژ ۳۰ سلولی نیز هیچ‌گونه واکوئل چربی در سلول‌های بنیادی بافت چربی دیده نمی‌شود [۲۳]. همچنین، تحقیقات نشان داده است که در پاساژهای طولانی درصد بسیار معدودی از این سلول‌ها نشانگر آستروسیتی GFAP و نشانگر عصبی نستین را بیان می‌کنند و توانمندی تبدیل شدن به رده‌های عصبی را نیز دارند [۲۴]. با توجه به این ویژگی‌ها این سلول‌ها کاندید مناسبی به منظور درمان بیماری‌های مخرب سیستم عصبی محسوب می‌شوند [۲۵].

مهمترین محدودیت مطالعه ما این است که آزمایشگاه سلول‌های بنیادی در دانشگاه آزاد اردبیل تازه تاسیس

References

- [1] Fraser JK, Wulur I, Alfonso Z, Hedrick MH. Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. *Trends in Biotechnology* 2006; 24(4): 150-4.
- [2] Kim EH, Heo CY. Current applications of adipose-derived stem cells and their future perspectives. *World J Stem Cells* 2014; 6(1): 65-8.
- [3] Ren Y, Han C, Wang J, Jia Y, Kong L, Eerdun T, et al. Identification of genes associated with the

- differentiation potential of adipose-derived stem cells to osteocytes or myocytes. *Mol Cell Biochem* 2015; 400(1-2): 135-44.
- [4] Winter A, Breit S, Parsch D, Benz K, Steck E, Hauner H, et al. Cartilage-like gene expression in differentiated human stem cell spheroids: a comparison of bone marrow-derived and adipose tissue-derived stromal cells. *Arthritis Rheum* 2003; 48(2): 418-29.
- [5] Bacou F, Andalousi RB, Daussin PA, Micallef JP, Levin JM, Chammas M, et al. Transplantation of adipose tissue-derived stromal cells increases mass and functional capacity of damaged skeletal muscle. *Cell Transplant* 2004; 13(2): 103-11.
- [6] Planat-Bénard V, Menard C, André M, Puceat M, Perez A, Garcia-Verdugo JM, et al. Spontaneous cardiomyocyte differentiation from adipose tissue stroma cells. *Circ Res* 2004; 94(2): 223-9.
- [7] Mostafavi FS, Razavi S, Mardani M, Esfandiari E, Esfahani HZ, Kazemi M. Comparative Study of Microtubule-associated Protein-2 and Glial Fibrillary Acidic Proteins during Neural Induction of Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells and Adipose-Derived Stem Cells. *Int J Prev Med* 2014; 5(5): 584-95.
- [8] Lo B, Parham L. Ethical issues in stem cell research. *Endocr Rev* 2009; 30(3): 204-13.
- [9] Pachón-Peña G, Yu G, Tucker A, Wu X, Vendrell J, Bunnell BA, et al. Stromal stem cells from adipose tissue and bone marrow of age-matched female donors display distinct immunophenotypic profiles. *J Cell Physiol* 2011; 226(3): 843-51.
- [10] Gimble JM. Adipose tissue-derived therapeutics. *Expert Opin Biol Ther* 2003; 3(5): 705-13.
- [11] Brayfield C, Marra K, Rubin JP. Adipose stem cells for soft tissue regeneration. *Handchir Mikrochir Plast Chir* 2010; 42(2): 124-8.
- [12] Chen HT, Lee MJ, Chen CH, Chuang SC, Chang LF, Ho ML, et al. Proliferation and differentiation potential of human adipose-derived mesenchymal stem cells isolated from elderly patients with osteoporotic fractures. *J Cell Mol Med* 2012; 16(3): 582-93.
- [13] 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(2): 211-218.
- [14] Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, Black IB. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *The Journal of Neuroscience Research* 2000; 61(4): 364-370.
- [15] Han SB, Shin YJ, Hyon JY, Wee WR. Cytotoxicity of voriconazole on cultured human corneal endothelial cells. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55(10): 4519-23.
- [16] Eslaminejad MB, Nikmahzar A, Taghiyar L, Nadri S, Massumi M. Murine mesenchymal stem cells isolated by low density primary culture system. *Dev Growth Diff* 2006; 48(6): 361-70.

- [17] Cowan CM, Shi YY, Aalami OO, Chou YF, Mari C, Thomas R, et al. Adipose-derived adult stromal cells heal critical-size mouse calvarial defects. *Nat Biotechnol* 2004; 22(5): 560-7.
- [18] Konno M, Hamabe A, Hasegawa S, Ogawa H, Fukusumi T, Nishikawa S, et al. Adipose-derived mesenchymal stem cells and regenerative medicine. *Dev Growth Differ* 2013; 55(3): 309-18.
- [19] Gronthos S, Graves SE, Ohta S, Simmons PJ. The STRO-1+ fraction of adult human bone marrow contains the osteogenic precursors. *Blood* 1994; 84(12): 4164-73.
- [20] De Ugarte DA, Morizono K, Elbarbary A, Alfonso Z, Zuk PA, Zhu M, et al. Comparison of multilineage cells from human adipose tissue and bone marrow. *Cells Tissues Organs* 2003; 174(3): 101-109.
- [21] Huang T, He D, Kleiner G, Kuluz J. Neuron-like differentiation of adipose-derived stem cells from infant piglets in vitro. *The Journal of Spinal Cord Medicin* 2007; 1: 35-40.
- [22] Wang CY, Yang F, He XP, Je HS, Zhou JZ, Eckermann K, et al. Regulation of neuromuscular synapse development by glial cell line-derived neurotrophic factor and neurturin. *J Biol Chem* 2002; 277(12): 10614-25.
- [23] Yagi K, Kondo D, Okazaki Y, Kano K. A novel preadipocyte cell line established from mouse adult mature adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 321(4): 967-974.
- [24] Rodriguez AM, Elabd C, Delteil F, Astier J, Vernochet C, Saint-Marc P, et al. Adipocyte differentiation of multipotent cells established from human adipose tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 315(2): 255-63.
- [25] Cho MS, Lee YE, Kim JY, Chung S, Cho YH, Kim DS, et al. Highly efficient and large-scale generation of functional dopamine neurons from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105(9): 3392-7.
- [26] Lin TM, Tsai JL, Lin SD, Lai CS, Chang CC. Accelerated growth and prolonged lifespan of adipose tissue-derived human mesenchymal stem cells in a medium using reduced calcium and antioxidants. *Stem Cells Dev* 2005; 14(1): 92-102.

Comparison of Adipose-Derived Stem Cells and Bone Marrow Stromal Cells in Prolonged Passages Based on Viability and Auto-Differentiation

A.R. Abdanipour¹, A. Noori-Zadeh², Z. Mohamadi³, F. Rashid Sheykh Ahmad⁴, P. Akbari⁴

Received: 25/08/2014 Sent for Revision: 01/11/2014 Received Revised Manuscript: 10/12/2014 Accepted: 17/12/2014

Background and Objective: Adipose tissue-derived stem cells (ADSCs) are very similar in their cell properties to bone marrow stromal cells (BMSCs) and can be a suitable alternative for cell therapy trials. The purpose of this study is comparison of adipose-derived stem cells (ADSCs) and bone marrow stromal cells (BMSCs) in prolonged passages based on viability and auto-differentiation toward adipocytes and osteocytes, respectively.

Materials and Methods: In this experimental study, stem cells were harvested from adipose tissue and bone marrow, then, at different cell passages the percentage of dead cells was assessed by live and dead cells assay and spontaneous differentiation toward adipocytes and osteocytes evaluated using Oil Red O and Alizarin red staining, respectively. T-test and one-way ANOVA statistical analysis was used for assessment of obtained data.

Results: Attained results of this study showed that the mean percentage of death cells during 5th, 10th and 15th for BMSCs were (2.26±0.36, 3.39±0.45, 6.92±0.95) and for ADSCs were (0.7±0.19, 0.89±0.39, 3.23±0.55), respectively. Also spontaneous differentiation into bone-forming cells of ADSCs and BMSCs in 15th passage shown significant difference for BMSCs (3.25± 0.38) and ADSCs (0.48±0.3) (p< 0.05). Our data show that ADSCs did not spontaneously adipogenic differentiate during 15th passage, but adipogenic differentiation for BMSCs was positive (1.07±0.24).

Conclusion: Considering of the percentage of dead cells and spontaneous differentiation with long passages revealed that ADSCs can be a suitable alternative source for BMSCs in therapeutic applications.

Key words: Adipose tissue-derived stem cells, Bone marrow stromal cells, Spontaneous differentiation, Survival cells

Funding: This research was funded by Ardabil branch, Islamic Azad University of Medical Sciences.

Conflict of interest: None declared.

Ethical approval: The Ethics Committee of Tarbiat Modarres University of Medical Sciences approved the study.

How to cite this article: Abdanipour A.R, Noori-Zadeh A, Mohamadi Z, Rashid Sheykh Ahmad F, Akbari P. Comparison of Adipose-Derived Stem Cells (ADSCs) and Bone Marrow Stromal Cells (BMSCs) in Prolonged Passages Based on Viability and Auto-Differentiation. *J Rafsanjan Univ Med Sci* 2015; 13(12): 1141-52. [Farsi]

1-Assistant Prof., Dept. of Anatomy, School of Medicine, Zanjan University of Medical Sciences (ZUMS), Zanjan, Iran

(Corresponding Author) Tel: (24) 33440301, Fax: (024) 33449553, E-mail: abdani.anatomy@yahoo.com

2-PhD student of Biochemistry, Shefa Neuroscience Research Center, Khatam Al-Anbia Hospital, Tehran, Iran

3- BSc Student of Medwifery, Young Researchers and Elite Club, Ardabil Branch, Islamic Azad University, Ardabil, Iran

4- Medical Student, Young Researchers and Elite Club Ardabil Branch, Islamic Azad University, Ardabil, Iran