

# سلول‌های بنیادی مشتق از چربی روش‌ها و پروتکل‌ها (ویرایش دوم)

## مترجمین:

دکتر مهدیه السادات قیائی

دکتری تخصصی فناوری های علوم پزشکی، پژوهشکده علوم اعصاب «بازتوانی عصبی»، مرکز تحقیقات  
ضایعات مغزی و نخاعی، دانشگاه

دکتر سحر فرزانه

دانشجوی دکتری تکوین، دانشگاه آزاد اسلامی واحد پرند

دکتر سید خلیل پسته ای

استادیار گروه بیهوشی، مجتمع بیمارستانی امام، MD, MPH، خمینی، دانشکده پزشکی دانشگاه  
علوم پزشکی تهران

عنوان و نام پدیدآور	: سلولهای بنیادی مشتق از چربی (روشها و پروتکلها) ویرایش دوم/مولفان [صحیح: ویراستاران] بروس آ. بونل، جفری م. گیمبل؛ مترجمین مهدیه السادات قیائی، سحر فرزانه، سیدخلیل پسته‌ای.
مشخصات نشر	: تهران: شایان نمودار، ۱۴۰۲.
مشخصات ظاهری	: ۲۳۹ ص: مصور.
شابک	: ۹۷۸-۹۶۴-۲۳۷-۷۱۷-۶
وضعیت فهرست نویسی	: فیبا
یادداشت	: عنوان اصلی: Adipose-derived stem cells : methods and protocols, 2nd.ed, 2018.
یادداشت	: کتابنامه.
موضوع	: یاخته‌های بنیادی، Stem cells، بافت‌های چربی، Adipose tissues
شناسه افزوده	: بائل، بروس ا.
شناسه افزوده	: Bunnell, Bruce A.
شناسه افزوده	: گیمبل، جفری ام.
شناسه افزوده	: Gimble, Jeffrey M.
شناسه افزوده	: قیائی، مهدیه السادات، ۱۳۶۰- مترجم
شناسه افزوده	: فرزانه، سحر، ۱۳۶۸- مترجم
شناسه افزوده	: پسته‌ای، سیدخلیل، ۱۳۴۷- مترجم
رده بندی کنگره	: QH۵۸۸
رده بندی دیویی	: ۶۱۶/۰۲۷۷۴
شماره کتابشناسی ملی	: ۹۴۵۵۰۸۷

#### نام کتاب: سلول‌های بنیادی مشتق از چربی - روش‌ها و پروتکل‌ها (ویرایش دوم)

مترجمین: دکتر مهدیه السادات قیائی، دکتر سحر فرزانه، دکتر سیدخلیل پسته‌ای

ناشر: انتشارات شایان نمودار

شمارگان: ۵۰۰ جلد

مدیر تولید: مهندس علی خزعلی

حروفچینی و صفحه آرایی: انتشارات شایان نمودار

طرح جلد: آتلیه طراحی شایان نمودار

نوبت چاپ: اول

تاریخ چاپ: زمستان ۱۴۰۲

شابک: ۹۷۸-۹۶۴-۲۳۷-۷۱۷-۶

قیمت: ۴,۳۰۰,۰۰۰ ریال



انتشارات شایان نمودار

دفتر مرکزی: تهران/ میدان فاطمی/ خیابان چهلستون/ خیابان دوم/ پلاک ۵۰/ بلوک B/ طبقه همکف/ تلفن: ۸۸۹۸۸۸۶۸

وب سایت: [shayannemoodar.com](http://shayannemoodar.com)

اینستاگرام: Shayan.nemoodar

(تمام حقوق برای ناشر محفوظ است. هیچ بخشی از این کتاب، بدون اجازه مکتوب ناشر، قابل تکثیر یا تولید مجدد به هیچ شکلی، از جمله چاپ، فتوکپی، انتشار الکترونیکی، فیلم و صدا نیست.

این اثر تحت پوشش قانون حمایت از مولفان و مصنفان ایران قرار دارد.)

## مقدمه

سلول بنیادی، مادر تمام سلول‌ها است و توانایی تبدیل به تمام سلول‌های بدن را دارد. این سلول‌ها توانایی خود نوسازی (Self Renewing) و تمایز (Differentiating) به انواع سلول‌ها از جمله سلول‌های خونی، قلبی، عصبی و غضروفی را دارند. هم‌چنین در بازسازی و ترمیم بافت‌های مختلف بدن بدنبال آسیب و جراحت موثر بوده و می‌توانند به درون بافت‌های آسیب دیده‌ای که بخش عمده سلول‌های آنها از بین رفته است، پیوند زده‌شوند و جایگزین سلول‌های آسیب دیده شده و به ترمیم و رفع نقص در آن بافت بپردازند. سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی، سلول‌های بنیادی مزانشیمی با ظرفیت خود نوسازی و توانایی تمایز هستند و می‌توان به آسانی از بافت‌های چربی جدا کرد و در درمان با سلول‌های بنیادی و پزشکی بازساختی استفاده نمود.

## فهرست مطالب

فصل اول: جداسازی و تجزیه و تحلیل فلوسیتومتری شکاف عروقی استرومال جدا شده از بافت چربی موش.....	۵
فصل دوم: روش جداسازی سلول‌های شکاف عروق استرومایی در یک چارچوب زمانی مناسب بالینی.....	۱۳
فصل سوم: کشت سه بعدی بدون داربست، با اندازه کنترل شده سلول‌های بنیادی مشتق از چربی خرگوش.....	۲۱
فصل چهارم: تمایز سلول‌های اجدادی چربی قهوه‌ای مشتق از سلول‌های بنیادین پرتوان القا شده‌ی انسانی.....	۳۰
فصل پنجم: هیدروژلهای برگشت‌پذیر حرارتی مبتنی بر متیل سلولز.....	۳۸
فصل ششم: داربستهای بافت چربی سلول‌زدایی شده برای احیا بافت نرم و انتقال سلول‌های بنیادی/استرومایی مشتق از چربی.....	۴۷
فصل هفتم: القای تحمل پیوند پوستی آلوگراف در موش با استفاده از سلول‌های استرومایی مشتق از چربی انسان.....	۶۳
فصل هشتم: روش‌های تصویربرداری هم‌کانونی (کانفوکال) با وضوح بالا برای توصیف صفات جایگزین‌های مهندسی بافت شده.....	۷۷
فصل نهم: سلول‌های مشتق از چربی استرومایی عروق و پلاسمای غنی از پلاکت: پیامدهای اساسی و بالینی برای درمانهای مهندسی بافت در جراحی ترمیمی.....	۸۹
فصل دهم: تمایز میوژنیک ASCها با استفاده از القا بیوشیمیایی و بیوفیزیکی.....	۱۰۱
فصل یازدهم: جداسازی سلول‌های بنیادی/ استرومایی مشتق از چربی جوندگان برای تمایز آدیپوپروژنیک یا مبتنی بر آنالیز فلوسایتومتری.....	۱۱۲
فصل دوازدهم: سیستم جاذبه مغناطیسی سه بعدی محیط کشت بافت چربی سفید را تحریک می‌کند.....	۱۲۱
فصل سیزدهم: جداسازی سلول‌های بنیادی مشتق از چربی انسان از لیپواسپیراتها.....	۱۲۹
فصل چهاردهم: جداسازی سلول‌های بنیادی/استرومایی مشتق از چربی جوندگان با استفاده از یک.....	۱۳۷
فصل پانزدهم: تمایز و جداسازی سلول استرومایی چند توان مشتق از بافت چربی گربه بالغ.....	۱۴۲
فصل شانزدهم: جداسازی و خصوصیات سلول‌های استرومایی چندتوان مشتق از بافت چربی سگ‌سانان بالغ.....	۱۵۵
فصل هفدهم: بازسازی بافت نرم.....	۱۶۷
فصل هجدهم: تحریک مکانیکی سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی برای مهندسی بافت عملکردی سیستم عضلانی-اسکلتی از طریق فشار هیدرواستاتیک چرخه‌ای، ریزگرانش شبیه‌سازی شده، و کرنش کششی چرخه‌ای.....	۱۷۶
فصل نوزدهم: پروتکل‌های انجمادی سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی انسانی بالغ.....	۱۸۹
فصل بیستم: بازسازی استخوان با ترکیبی از سلول‌های بنیادی مشتق از چربی و پلاسمای غنی از پلاکت.....	۲۱۲
فصل بیست و یکم: جداسازی و تمایز از سلول‌های چربی اولیه قهوه‌ای/بژ.....	۲۲۲

## فصل ۱:

# جداسازی و تجزیه و تحلیل فلوسایتومتری شکاف عروقی استرومال

## جدا شده از بافت چربی موش

Annie C. Bowles, Alan Tucker, and Bruce A. Bunnell

### چکیده

شواهد حاصل از تحقیقات پیش بالینی و آزمایشات بالینی استفاده از بخش عروقی استرومایی (SVF) را به عنوان درمان برای مورد استفاده‌های متعدد نشان می‌دهد. این نتایج نشان می‌دهد که SVF اتولوگ نه تنها بی‌خطر و مؤثر است، بلکه اثرات ضد التهابی، تعدیل‌کننده ایمنی و ترمیمی قوی را در داخل بدن ارائه می‌کند. قدرت SVF به ترکیب سلولی مربوط می‌شود که شامل سلول‌های بنیادی مشتق از چربی (ASCs)، سلول‌های چربی، سلول‌های اندوتلیال و سلول‌های مختلف ایمنی می‌باشد. همانطور که از نام آن پیداست، این سلول‌های SVF از محفظه استرومای چربی یا چربی حاصل می‌شوند. پس از هضم، سلول‌های تشکیل دهنده چربی آزاد می‌شوند و به عنوان SVF جمع می‌شوند. فرکانسهای سلولی موجود در SVF را می‌توان با استفاده از یک روش مبتنی بر آنتی بادی فلورسنت که به عنوان فلوسایتومتری جریان شناخته می‌شود، ارزیابی کرد. در فصل بعد یک پروتکل عملیاتی استاندارد ارائه شده است که این برداشت بافت چربی از موشهای آزمایشگاهی گرفته تا جداسازی و توصیف SVF را شرح می‌دهد.

کلمات کلیدی: شکاف عروق استرومال، سلول‌های بنیادی مشتق از چربی، بافت چربی، فلوسایتومتری، ایمونوفنوتایپینگ

### ۱- مقدمه

چربی بزرگترین عضو غدد درون ریز بدن که در تنظیم حرارت، عایق بندی، ضربه گیر و ذخیره انرژی درگیر است [۱، ۲]. این یک بافت بسیار عروقی است که عمدتاً از بافت همبند و سلول‌های چربی تشکیل شده است و منبع جذب سلول‌های بنیادی به نام سلول‌های بنیادی مشتق از چربی (ASCs) است [۳، ۴]. هنگام جمع آوری، هضم و سانتریفیوژ چربی، سه لایه ایجاد می‌شود. لایه زیرین یا رسوب را شکاف عروقی استرومال (SVF) مینامند [۵، ۴]. این رسوب سلولی غلیظ حاوی سلول‌های چربی، ASC، سلول‌های اندوتلیال و انواع بیشماری از سلول‌های ایمنی است [۳، ۲]. از نظر بالینی، اهداکنندگان چربی اتولوگ می‌توانند با یک روش لیپوساکشن با حداقل تهاجمی از بین بروند و سپس به سرعت هضم، پردازش و مجدداً در همان روش به بیمار SVF تجویز شوند [۶]. این منبع فراوان سلول‌ها اثرات ضد التهابی، ایمنی بدن و اثرات جبرانی را در داخل بدن نشان داده است [۷]. در انسان، SVF معمولاً برای تکمیل پیوند چربی در جراحی‌های زیبایی و بازسازی مورد استفاده قرار می‌گیرد و اعتقاد بر این است که روند جذب را کاهش می‌دهد [۸، ۶]. داروهای دامپزشکی، درمان بی‌خطر و مؤثر از آسیب دیدگی استخوان، تاندون و مفاصل و آرتروز را در بیش از هزاران حیوان بزرگ نشان داده است [۱۰، ۹]. در یک مدل موش مالتیپل اسکلروزیس، SVF تضعیف بیماری، مدولاسیون محیط التهابی و بهبود عملکرد حرکتی را نشان داده است [۱۲، ۱۱]. در مجموع، این شواهد نشان دهنده استفاده بی‌خطر و مؤثر از SVF برای درمان بسیاری از نشانه‌های پزشکی است.

در این فصل روشی که به طور گسترده‌ای مورد استفاده قرار گرفته در جداسازی SVF از چربی موش است که نتایج مداوم را به همراه دارد و به راحتی تکثیر می‌شود. پروتکل با برداشت بافت چربی سفید کشاله ران از موشها شروع می‌شود و سپس روشهای هضم، جداسازی و خصوصیات ترکیب SVF را شرح می‌دهد. علاوه بر این، یک قطعه جامع از نشانگرهای سلولی برای آنالیز فلوسیتومتری جریان برای تعیین فراوانی انواع سلول‌های مورد نظر در SVF فراهم شده است.

## ۲- مواد

۲,۱ حیوانات ۱. موشهای C57BI / ۶.

۲,۲ معرف ها ۱ (DMEM/F-۱۲) (Dulbecco's modified Eagle medium: Ham's F-۱۲) ۱۲-۱۲.

۲. سرم جنین گاو (FBS)، اهمیت انتخاب، هیبریدوما واجد شرایط گرما غیرفعال نیست.

۳. گلوتامین-۲۰۰ mM (L) در محلول از ۰,۸۵٪ سدیم کلراید (NaCl).

۴. آنتی بیوتیک - ضد میکروبی (anti-anti×; ۱۰۰).

۵. بافر فسفات نمک دار (PBS) بدون  $Ca^{2+}$  یا  $Mg^{2+}$ .

۶. آلبومین سرم گاوی (BSA)، پودر لیوفیلیزه، اساساً فاقد اسید چرب.

۷. کلاژناز نوع I، ۳۹۰ U/mg.

۸. ۰,۲۵٪ تریپسین و ۱ میلی مولار اسید اتیلن دی آمینتراستیک (EDTA) در حلقه محلول متعادل نمک (HBSS).

۹. ۰,۴٪ Trypan Blue در محلول از ۰,۸۵٪ NaCl.

۱۰. آب مقطر، دیونیزه شده (DDI-H<sub>2</sub>O).

۱۱. ۴٪ پارا فرمالدئید (PFA) در PBS.

۱۲. تثبیت کننده/کنسانتره نفوذپذیری.

۱۳. تثبیت کننده /رقیق کننده نفوذپذیری.

## ۲,۳ لوازم

۱. آنتی بادیه‌های فلوسیتومتری (جدول ۱ را ببینید).

۲. ۵۰۰ میلی لیتر واحد تصفیه محور خلاء با اندازه منافذ ۰,۲۲ میکرومتر.

۳. قیچی استریل و فورسپس.

۴. لوله‌های جمع آوری پلی استایرن ۵۰ میلی لیتری استریل.

۵. ۵۰ میلی لیتر واحد تصفیه محور خلاء با اندازه منافذ ۰,۲۲ میکرومتر.

۶. لوله های میکروسانتریفیوژ استریل.

۷. میکروپیپتورها و پیپتورها با سریه‌های استریل.

۸. پارافیلیم

جدول ۱: آنتی بادیهای ضد موشی تعیین فرکانس سلول در SVF

Antibody	Clone	Isotype	Affinity
CD3	17A2	IgG	All T cells
CD4	GK1.5	IgG2b	Helper T cells, regulatory T cells
CD8	53-6.7	IgG2b	Cytotoxic T cells
CD14	SA2-8	IgG2a	Monocytes/macrophages
CD19	1D3	IgG2a	B cells
CD25	7D4	IgG2a	Regulatory T cells
CD31	390	IgG2a	Endothelial cells, lymphocytes
CD34	RAM34	IgG2a	HSC, dendritic cells
CD36	72-1	IgG2a	Dendritic cells, monocytes/macrophages
CD45	30-F11	IgG2b	All leukocytes
CD68 <sup>a</sup>	FA11	IgG2a	Monocytes/macrophages
CD90	HIS51	IgG2a	HSC, MSC, monocytes/macrophages
F4/80	BM8	IgG2a	Dendritic cells, monocytes
FCeR1	MAR-1	IgG	Mast cells
foxp3 <sup>a</sup>	FJK-16 s	IgG2a	Regulatory T cells
Ly6G	RB6-8C5	IgG2	Granulocytes
Sca-1	D7	IgG2a	HSC, MSC

سلول های بنیادی خونساز HSC ، سلول های بنیادی مزانشیمی MSC نشانگرهای داخل سلولی که به پروتکل تثبیت و نفوذپذیری نیاز دارند

## ۲,۴ تجهیزات

۱. ترازو میلی گرم تا اندازه گیری گرم.
۲. اتاق ایمنی بیولوژیکی ، کلاس II با منبع آسپیراسیون خلاء با لوله و ظروف زباله.
۳. انکوباتور، گرماگیر آبی و مرطوب ساختن با ۵٪ CO<sub>2</sub> ، در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد حفظ می شود.
۴. میکروسکوپ کنتراست فاز معکوس.
۵. سانتریفیوژهای بزرگ و کوچک.
۶. انکوباتور راکر
۷. فلوسایتومتر ، با قابلیت هشت رنگ.
۸. حمام آب با آب اتوکلاو شده، در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری می شود.

## ۲,۵ محلولها

۱. محیط کشت کامل Ham's F (12-CCM): Dulbecco's modified Eagle medium: کامل
- ۱۰٪ سرم جنین گاوی.
- ۱٪ ۲ mM L-گلوتامین.
- ۱٪ آنتی بیوتیک - ضد میکروبی.
۲. محلول هضم چربی (W / V ؛ گرم از چربی به میلی لیتر از PBS):
  - ۱٪ کلاژناز نوع I
  - ۱٪ BSA
  ۳. ۱٪ PFA (اختیاری): ۴٪ PFA در DDI-H<sub>2</sub>O (۱: ۳).

۴. تثبیت کار/ محلول نفوذپذیری : کنسانتره تثبیت / نفوذپذیری در رقیق کننده (۱:۳).

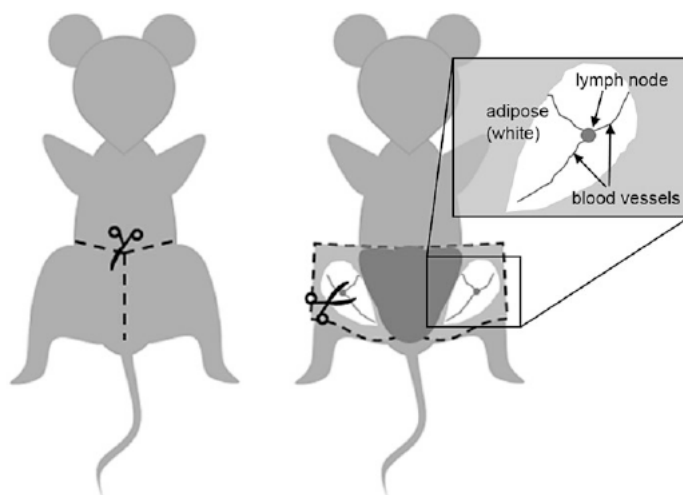
Working Perm. Buffer. ۵ × ۱

Perm. Buffer in DDI-H<sub>2</sub>O × ۱۰. (۱:۱۰)

### ۳- روش

#### ۳.۱ جداسازی بافت چربی سفید کشاله ران

- روش زیر بعد از کشتن حیوانات آزمایشی انجام می شود. توصیه می شود که هر حیوان از پشت سر در جایی که سطح بطن برای جداسازی بافت چربی سفید از ناحیه درونی در دسترس است ، امن باشد (شکل ۱).
۱. با استفاده از فورسپس و قیچی جراحی برش کوچکی را در زیر ساق پا ایجاد کنید.
۲. قیچی را درون برش و ایجاد شکاف بین پوست و حفره تشکیل دهید.
۳. از برش اولیه تا ناحیه دستگاه تناسلی برش بزرگ و عمودی ایجاد کنید.
۴. با ایمن کردن پوست با فورسپس و قرار دادن قیچی بین پوست و صفاقی و به دنبال آن شکاف های صاف ، شکاف هایی در اطراف هر پهلو درست کنید.
۵. از برش اولیه تا پشت یک طرف موش برش افقی ایجاد کنید.
۶. پد چربی اینگوینال را که بین پوست و حفره قرار دهید.
۷. پوست داخل را ببندید و گوشه شل را با اطمینان بچسبانید.
۸. غدد لنفاوی واقع در وسط پت چربی را شناسایی و از بین ببرید (به یادداشت ۱ مراجعه کنید).
۹. کل پد چربی را با دقت جدا کرده و چربی را در یک لوله مخروطی جمع کنید.
۱۰. برای برداشتن پد چربی اینگوینال جایگزین، مراحل ۹-۵ را تکرار کنید.



شکل ۱. جداسازی بافت چربی سفید اینگوینال از موش ها

#### ۳.۲ جداسازی از شکاف عروقی استرومال

۱. بافت چربی را در یک لوله مخروطی ۵۰ میلی لیتری جمع کنید.
۲. چربی را وزن کنید.



زیر یک هود ایمنی زیستی:

۳. با اضافه کردن مقدار زیادی PBS چربی را بشویید و به شدت لوله مخروطی بسته شده را تکان دهید.
  ۴. چربی را به یک لوله تازه منتقل کنید.
  ۵. مراحل ۳ و ۴ را تکرار کنید تا محلول پاک شود.
  ۶. چربی شسته شده را به یک لوله تازه منتقل کنید. لوله مخروطی حاوی بافت چربی را کنار بگذارید.
  ۷. در یک لوله مخروطی ۵۰ میلی لیتری تازه، محلول هضم را تهیه کنید.
  ۸. به آرامی لوله مخروطی را تکان دهید تا املاح حل شود؛ پیچ ندهید.
  ۹. سیستم تصفیه خلاء یکبار مصرف ۵۰ میلی لیتر با اندازه منافذ ۰٫۲۲ میکرومتر را به لوله مخروطی با محلول هضم ایمن کنید.
  ۱۰. لوله های خلا را به قسمت فیلتر و درگاه خلاء وصل کنید.
  ۱۱. محلول هضم را درون لوله جمع آوری شده ملحق کنید.
  ۱۲. محلول هضم فیلتر شده را به لوله حاوی بافت چربی اضافه کنید.
  ۱۳. یک تایمر را به مدت ۱ ساعت شروع کنید.
  ۱۴. سریعاً چربی موجود در محلول هضم را با قیچی با برش حرکت به سمت پایین در لوله مخلوط کنید (به نکته ۲ مراجعه کنید).
  ۱۵. پارافیلیم را در بالای لوله قرار دهید تا محکم چسبانده شود.
  ۱۶. لوله با بافت چربی را در محلول هضم داخل یک شیکر انکوباتور قرار دهید.
  ۱۷. چربی را در محلول هضم در ۳۷ درجه سانتیگراد در انکوباتور برای مدت زمان باقی مانده انکوبه کنید. سرعت شیکر را روی ۱۰۰ دور در دقیقه تنظیم کنید.
  - از این پس تحت یک اتاق ایمنی بیولوژیکی ادامه دهید.
  ۱۸. ۵۰۰ میلی لیتر CCM را آماده کنید.
  ۱۹. با استفاده از واحد تصفیه ۵۰۰ میلی لیتری خلاء با اندازه منافذ ۰٫۲۲ میکرومتر، CCM را درون مخزن مجموعه فیلتر کنید.
  ۲۰. CCM گرم شده در حمام آب در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد (به یادداشت ۳ مراجعه کنید).
  ۲۱. پس از ۱ ساعت کمون چربی در محلول هضم، لوله را از شیکر انکوباتور جدا کرده و در زیر هود ایمنی زیستی برگردانید.
  ۲۲. محلول هضم را با اضافه کردن CCM (( $v/v$ ) به لوله خنثی کنید.
  ۲۳. درپوش لوله را گذاشته و چندین بار معکوس کنید تا مخلوط شود.
  ۲۴. لوله مخروطی را به مدت ۵ دقیقه در  $50 \times$  گرم در دمای اتاق سانتیفریوژ کنید (RT).
  ۲۵. لوله مخروطی را جدا کرده و تکان دهید تا در آزاد سازی سلول ها از بافت کمک کند.
  ۲۶. دوباره لوله مخروطی را به مدت ۵ دقیقه در  $50 \times$  گرم در RT سانتیفریوژ کنید.
  ۲۷. لوله مخروطی را با دقت از سانتیفریوژ جدا کنید. مطمئن باشید که لایه ها را مختل نمی کنید.
  ۲۸. لایه های بالای مایع را با احتیاط خالی کنید و رسوبی از کسر عروقی استروما (SVF) را باقی بگذارید.
  ۲۹. CCM را به لوله مخروطی اضافه کنید تا سلول های SVF را با پیپ کردن چندین بار به حالت تعلیق درآورد.
  ۳۰. سیستم تعلیق سلولی را از طریق گاز استریل فیلتر کنید تا موها یا بقایای بزرگ برداشته شود و در یک لوله مخروطی ۵۰ میلی لیتری تازه جمع شود.
  ۳۱. سلول های زنده را با استفاده از روش حذف Trypan Blue بشمارید و تعداد سلول های زنده را تعیین کنید.
- محلول اکنون شامل یک سیستم تعلیق تک سلولی سلول های SVF است. سلول ها را می توان در محلول نمکی جهت استفاده آزمایشی تهیه کرد یا با تجزیه و تحلیل فلوسایتومتری جریان داد، همانطور که در زیر شرح داده شده است.

### ۳.۳ رنگ آمیزی سلولها برای تجزیه و تحلیل فلوسایتومتری

۱. غلظت سلول های زنده SVF را در حجم شناخته شده PBS تعیین کنید.
۲. برای هر پروتکل تقریباً تقسیم سلول های بین  $2.5 \times 10^5$  و  $5 \times 10^5$  در هر  $100$  میکرولیتر در هر لوله میکروسانتریفیوژ قرار دارد (جدول ۲؛ توجه داشته باشید ۴).
۳. رنگ کردن سلول های در هر لوله میکروسانتریفیوژ با پیپتینگ ۵-۱ ul از هر آنتی بادی در هر صفحه با توجه به جدول ۲. تیتراسیون اولیه آنتی بادی ها، میزان مناسب آنتی بادی مورد استفاده در هر نمونه را تعیین می کند. (آنتی بادی اضافی برای رنگ آمیزی زنده و مرده اختیاری است).
۴. لوله ها را به مدت ۵ ثانیه بیوشانید و پیچ دهید.
۵. لوله ها را به مدت ۱۵ دقیقه در RT در تاریکی انکوبه کنید.
۶. با اضافه کردن  $1.0-1.5$  میلی لیتر PBS به هر لوله بشویید.
۷. لوله ها را در  $500 \times$  گرم به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ کنید.
۸. خیلی سریع لوله را معکوس کنید و یکبار ضایعات آن را در بشر خالی کنید. این کار باعث می شود تقریباً  $100$  میکرولیتر بر روی رسوب سلول باقی بماند.
۹. (اختیاری) مراحل ۶-۱۱ را برای آنتی بادهای ثانویه تکرار کنید.
۱۰. دوباره با تکرار مراحل ۹-۱۱ دوباره بشویید.

جدول ۲: پانل نمونه برای تجزیه و تحلیل فرکانسهای زیر مجموعه‌ها در SVF

Panel	Antibody-fluorochrome
Protocol 1 Requires fixation and permeabilization <sup>a</sup>	CD4-PE CD3-PE610 CD8-PerCPy5 foxp3-APC <sup>a</sup>
Protocol 2	CD19-PE610 FCεRI-PerCPy7 CD45-APC
Protocol 3	CD31-PE CD90-PE610 Sca-1-PerCPy5
Protocol 4 Isotype controls	IgG1-FITC IgG2a-PE

† این پانل می تواند برای تجزیه و تحلیل یا سلول های GFP+ یا سلول های -GFP با استفاده از FL ۱ (۵۳۰/۴۸۸ نانومتر) برای ارزیابی جمعیت های بیانگر GFP استفاده شود [۱۳].  
a مارکهای داخل سلولی که نیاز به پروتکل ثابت و نفوذپذیری نیاز دارند

- سلولها برای تجزیه و تحلیل فوری با استفاده از یک دستگاه فلوسایتومتری آماده می شوند.
- از طرف دیگر، سلول های برچسب خورده را می توان با تثبیت نگه داشته و در دمای ۴ درجه سانتیگراد برای تجزیه و تحلیل تا ۱ هفته ذخیره کرد. در صورت تمایل، مراحل بعدی برای این پروتکل باید انجام شود:
۱. سلول ها را با اضافه کردن  $500$  میکرولیتر از  $1\%$  پارافرمالدئید به هر لوله ثابت کنید.
  ۲. سلول ها را به مدت ۵ دقیقه در RT در تاریکی انکوبه کنید.

۳. ۱,۰ میلی لیتر PBS اضافه کنید.
۴. لوله ها را در ۵۰۰ × گرم به مدت ۵ دقیقه سانتیفریوژ کنید.
۵. لوله را خیلی سریع برعکس کنید و یکبار ضایعات آن را در بشر خالی کنید.
۶. به هر لوله ۱,۰ میلی لیتر PBS اضافه کنید.
۷. لوله ها را در ۵۰۰ × گرم به مدت ۵ دقیقه سانتیفریوژ کنید.
۸. مراحل ۵ و ۶ را تکرار کنید.
۹. ۴۰۰ میکرولیتر PBS به هر لوله اضافه کنید (به یادداشت ۵ مراجعه کنید).
۱۰. بیچنانید. نمونه ها می توانند بلافاصله در دمای ۴ درجه سانتیگراد تجزیه و تحلیل و یا ذخیره شوند (جدول ۳).

جدول ۳: استراتژی گتینگ برای شناسایی زیر مجموعه های سلولهای موجود در SVF

Cell type	Cell marker expression
Adipocytes	CD45 <sup>+</sup> CD34 <sup>-</sup> CD36 <sup>+</sup>
Hematopoietic stem cells	CD45 <sup>+</sup> CD34 <sup>+</sup> CD31 <sup>-</sup> Sca-1 <sup>+</sup> CD90 <sup>+</sup>
Mesenchymal stem cells	CD45 <sup>-</sup> CD31 <sup>-</sup> Sca-1 <sup>+</sup> CD90 <sup>+</sup>
Smooth muscle cells	CD45 <sup>-</sup> CD34 <sup>dim</sup> CD31 <sup>-</sup>
Endothelial cells	CD45 <sup>-</sup> CD34 <sup>+</sup> CD31 <sup>+</sup> CD36 <sup>+</sup>
Granulocytes	CD45 <sup>+</sup> CD34 <sup>-</sup> Ly6G <sup>+</sup>
B cells	CD45 <sup>+</sup> F4/80 <sup>-</sup> CD19 <sup>+</sup>
Natural killer cells	CD45 <sup>+</sup> F4/80 <sup>-</sup> CD19 <sup>-</sup>
Dendritic cells	CD45 <sup>+</sup> F4/80 <sup>+</sup> CD34 <sup>+</sup>
Monocytes/macrophages	CD45 <sup>+</sup> F4/80 <sup>+</sup> CD14 <sup>+</sup> CD68 <sup>+</sup>
Regulatory T cells	CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> foxp3 <sup>+</sup>
Cytotoxic T cells	CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>
Helper T cells	CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>-</sup>
Mast cells	CD45 <sup>+</sup> FcεRI <sup>+</sup>

#### ۴- یادداشتها

۱. گره لنفاوی را می توان در همگرایی عروق خونی به راحتی شناسایی کرد.
۲. هرچه بیشتر بافت خرد شود، سطح بیشتری از سلولهای SVF برای عملکرد بالاتر آزاد می شود.
۳. CCM را تا زمان استفاده در یک حمام آب ۳۷ درجه سانتیگراد قرار دهید.
۴. استفاده از لوله های میکروسانتیفریوژ بسیار مهم است با یک ته برجسته در خیلی خوب سرازیر کردن سفارش شده است. برای راه اندازی اولیه تجزیه و تحلیل فلوسایتومتری، لازم است کنترل هایی مانند نمونه های بدون رنگ آمیزی، نمونه های تک رنگ از هر آنتی بادی و نمونه های رنگ آمیزی شده با کنترل ایزوتایپ تجزیه و تحلیل شود.
۵. حجم نهایی ۵۰۰ میکرولیتر برای تجزیه و تحلیل توصیه می شود.

## References

1. Fruhbeck G (2008) Overview of adipose tissue and its role in obesity and metabolic disorders. *Methods Mol Biol* 456:1–22
2. Coelho M, Oliveira T, Fernandes R (2013) Biochemistry of adipose tissue: an endocrine organ. *Arch Med Sci* 9:191–200
3. Boutens L, Stienstra R (2016) Adipose tissue macrophages: going off track during obesity. *Diabetologia* 59(5):879–894
4. Lin G, Garcia M, Ning H et al (2008) Defining stem and progenitor cells within adipose tissue. *Stem Cells Dev* 17:1053–1063
5. Gimble JM, Katz AJ, Bunnell BA (2007) Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circ Res* 100:1249–1260
6. Wu AY (2013) Autologous fat transfer with in-situ mediation (AIM): a novel and compliant method of adult mesenchymal stem cell therapy. *J Transl Med* 11:136
7. Leto Barone AA, Khalifian S, Lee WP et al (2013) Immunomodulatory effects of adipose-derived stem cells: fact or fiction? *Biomed Res Int* 2013:383685
8. Trojahn Kolle SF, Oliveri RS, Glovinski PV et al (2012) Importance of mesenchymal stem cells in autologous fat grafting: a systematic review of existing studies. *J Plast Surg Hand Surg* 46:59–68
9. Volk SW, Theoret C (2013) Translating stem cell therapies: the role of companion animals in regenerative medicine. *Wound Repair Regen* 21:382–394
10. Black LL, Gaynor J, Gahring D et al (2007) Effect of adipose-derived mesenchymal stem and regenerative cells on lameness in dogs with chronic osteoarthritis of the coxofemoral joints: a randomized, double-blinded, multicenter, controlled trial. *Vet Ther* 8:272–284
11. Semon JA, Zhang X, Pandey AC et al (2013) Administration of murine stromal vascular fraction ameliorates chronic experimental autoimmune encephalomyelitis. *Stem Cells Transl Med* 2:789–796
12. Bowles AC, Strong AL, Wise RM, Thomas RC, Gerstein BY, Dutreil MF, Hunter RS, Gimble JM, Bunnell BA (2017) Adipose stromal vascular fraction-mediated improvements at late-stage disease in a murine model of multiple sclerosis. *STEM CELLS* 35(2):532–544
13. Ludwig DB, Trotter JT, Gabrielson JP, Carpenter JF, Randolph TW (2011) Flow cytometry: A promising technique for the study of silicone oil-induced particulate formation in protein formulations. *Anal Biochem* 410(2):191–199

## فصل ۲:

# روش جداسازی سلول‌های شکاف عروق استرومایی در یک چارچوب زمانی مناسب بالینی

Joel A. Aronowitz, Ryan A. Lockhart, and Cloe S. Hakakian

### چکیده

علاقه‌مندی به کاربردهای بالینی سلول‌های بنیادی مشتق از چربی (ASC) و جداسازی استرومای عروقی (SVF) بر اساس داده‌های پیش‌بالینی رو به افزایش است. از آنجایی که درمان‌های چربی مشتق شده شروع به تفسیر زمینه‌های کلینیکی می‌کنند، حفظ ایمنی بیمار، به خوبی یکنواختی در تکنیک بسیار مهم است. در اینجا ما روشی را برای جداسازی سلول‌های استرومای عروقی را در چهارچوب زمان مناسب بالینی شرح می‌دهیم. تجزیه تحلیل‌های آزمایشگاهی یادآوری می‌شود، اما پروتکل‌های مربوطه در اینجا ارائه نمی‌شود.

**کلمات کلیدی:** سلول‌های بنیادی مشتق از چربی ASCs، جداسازی سلول‌های استرومایی عروقی، جداسازی SVF، جداسازی ADSC.

### ۱- مقدمه

سلول‌های بنیادی مشتق از چربی (ASC) در دهه گذشته توجه چشمگیری را به خود برای کاربردهای بالینی جلب کرده‌اند. ترکیب اثرات پاراکراین و ظرفیت تمایز چندگانه ASCها [۷-۱] برای انواع کاربردهای بالینی آزموده شدند که شامل بازسازی / تقویت پستان، تسهیل در ترمیم زخم دیابتی، جوان‌سازی صورت، حالت‌های مختلف ارتوپدی، ترمیم بافت عضله قلبی پس از انفارکتوس میوکارد و مواد دیگر [۸-۱۲]، از آنجا که بسیاری از این کاربردها امید را برای کاربردهای بالینی برپایه یافته‌های آزمایشگاهی نشان داده‌اند، در هر دو مدل حیوانی و *in vitro*، گروه‌هایی در سراسر جهان شروع به تفسیر این تکنولوژی‌ها در زمینه بالینی کرده‌اند. درمان‌ها بر پایه سلول‌های بنیادی مزانشیمی با جداسازی SVF آغاز می‌شود. جداسازی سلول‌های استرومایی می‌تواند از طریق دو راه متفاوت انجام می‌شود: همراه و بدون آنزیم‌های تجزیه‌کننده بافت. روش‌های غیر آنزیمی در مقایسه با همتایان آنزیمی نسبت به روش‌های ارزان‌تر تمایل دارند اما در هر میلی‌لیتر بازده سلولی کمتری در هر پروسه لیپوآسپیریشن دارند. به علاوه حاصل ترکیب جمعیت‌های سلولی مختلف با روش‌های ساخت مکانیکی اثر کمتری از تولید سلول‌ها و اثر بیشتر سلول‌های  $Cd45^+$  را نشان می‌دهند [۱۳-۱۶]. به طور کلی، اختلالات پروتئولایسیک ماتریکس خارج سلولی امکانی برای بهبودی بیشتر سلول را فراهم می‌کند. در حالی که ظاهراً روش ترجیح داده شده، جداسازی آنزیمی به علاوه فاکتورهای اضافه شده ایمنی بیماران را در واکنش آلرژیک نسبت به آنزیم تجزیه‌کننده بافتی است.

پس از جداسازی SVF، روشهای درمانی می‌توانند از SVF در درمان و یا کشت گسترده سلولها استفاده کنند. توسعه کشت سلولی مزیت های بیشتر جمعیت‌های سلولی هموزن و تعداد بیشتر ASC ها را ارائه می‌دهد، اما نیازمند حداقل دو روش درمانی کامل می‌باشد: یکی برای لیپوساکشن/هاروست و دوم برای درمان پس از کشت گسترده سلولها. استفاده از سلول‌های SVF در یک چهارچوب مناسب کلینیکی ۶۰-۹۰ دقیقه‌ای را شرح می‌دهیم. این روش به طور متوسط قادر به جداسازی  $2/0 \times 10^5$  هسته سلول ها در هر میلی لیتر از لیپوآسپیریشن با متوسط بقاء  $>90\%$  است.

## ۲- مواد

### ۲-۱ فراهم کردن لیست برای جداسازی

- ۱- بسته بندی استریل برای جداسازی
- ۲- کیسه های ۱۰۰۰cc از محلول استریل رینگر لاکتیکی (۱۳۰ mmol/L n  
 $(+Na^+, 109 \text{ mmol/L Cl}^-, 28 \text{ mmol/L lactate}, 1.5 \text{ mmol/L Ca}^{2+}, 4 \text{ mmol/L K}$   
 ۳-۵۰۰ml شکننده شیشه (برای ضایعات و بافر)  
 ۴-۵۰۰ml کیف جدا کننده همراه با پایه حلقه‌ای .  
 ۵- دستکش لاتکس یکبارمصرف، بسته بندی شده اختصاصی و استریل (در صورت نیاز)  
 ۶- سرنگ ۳cc بسته بندی شده اختصاصی، استریل با نیدل ۱۸ گیج.  
 ۷- سرنگ ۱cc استریل، بسته بندی شده اختصاصی با نیدل ۱۸ گیج.  
 ۸-۱۲ml آب استریل.  
 ۹- چهار ویال Vitacyte Clzyme AS (wunsch ۳۵ واحد کلاژناز فعال شده در هر ویال).  
 ۱۰-  $100 \mu\text{m}$  صافی سلول، استریل، بسته بندی شده اختصاصی.

### ۲-۲ آماده سازی آنزیم

- ۱- استفاده از سرنگ ۳cc، انتقال ۳cc از آب استریل در دمای اتاق به داخل هر چهار ویال از آنزیم تجزیه کننده بافتی لیپوفیلیز شده در راستای معلق شدن (یادداشت ۱ را مشاهده کنید).
- ۲- حل کامل آنزیم در یک مرتبه، حذف محلول آنزیمی از ویال با استفاده از سرنگ ۳cc و انتقال محتویات هر ویال به داخل لوله‌های ۵۰ml سانتریفیوژ. افزایش حجم هر چهار لوله تا حجم نهایی ۵۰cc با استفاده از محلول رینگر لاکتیکی گرم.
- ۳- قرار دادن لوله‌ها در شیکر گرم برای سی دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و  $200 \text{ rpm}$ . حتما تا زمان استفاده گرم نگهدارید و تکان دهید.

### ۲-۳ تهیه محلول Tumescant

- محلول Tumescant بوسیله تکنسین آموزش داده شده جراحی در اتاق عمل تهیه شود.
- ۱- ۵۰ سانتی متر مکعب از لیدوکائین به داخل کیسه استریل ۱۰۰۰cc از محلول نمکی تزریق شود.
  - ۲- دو میلی لیتر از محلول AMP اپی نفرین در نسبت ۱:۱۰۰ به داخل محلول نمکی/لیدوکائین تزریق می شود.

## ۳- روش‌ها

تمام آماده‌سازی‌ها و جداسازی‌ها در کنار چند ایستگاه P&C رخ می‌دهد (شکل-۱) ایستگاه چندگانه شامل سانتریفیوژ (گنجایش ۴۰۰cc) و یونیت تکان دهنده گرم که در محدوده جریان یک هود لامینار قرار دارد. تمام مراحل و آماده سازی ها باید در

داخل جریان هود لامینار هدایت شوند. تمام ظروف شیشه‌ای قبل از استفاده اتوکلاو می‌شوند. جریان هود لامینار باید قبل و بعد از جداسازی استریل شود. دستکش‌های استریل شده باید همیشه برای جلوگیری از آلودگی نمونه‌ها، پوشیده شوند.

### ۳-۱ اسپیراسیون لیپید

تمام تجهیزات/تدارکات مورد نیاز برای لیپوساکشن شامل این پروتکل نمی‌شوند. زیرا آنها می‌توانند از امکاناتی به امکانات دیگر متغیر باشند. کمک ساکشن در لیپوساکشن با استفاده از هدایت «فوق مرطوب» محلول Tumescent (قسمت زیر تیترا ۲ و بخش ۳ را مشاهده کنید) و یک بلانت ۷/۲ mm و کانولا خمیده همراه با فشار خالص ۲۵mmHg انجام شود.



شکل ۱- داخل ایستگاه چندگانه P&C. سمت چپ شامل سانتریفیوژ با ظرفیت ۴۰۰cc و سمت راست شامل یونیت شیکر گرم شده است.

۱- سایت هاروست از بیماری به بیمار دیگر متغیر است که بر پایه قابلیت دسترسی به سایت اهدا کننده و تمایلات زیبایی شناختی بیمارار است. انتخاب سایت اهدا کننده به عهده بیمار و جراح است.

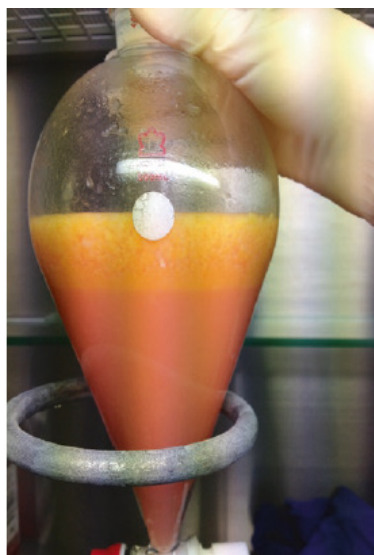
۲- قبل از هاروست، بیمار با ۷۵۰-۱۰۰۰cc از محلول Tumescent نفوذ می‌کند. (زیر تیترا ۲ و بخش ۳ را برای دستورالعمل مشاهده کنید) که کمبود خون و درد و کبودی ناشی از هاروست را محدود می‌کند. Tumescent اجازه می‌دهد قبل از هاروست برای ۱۵-۱۰ دقیقه نفوذ کند.

۳- یا استفاده از یک بلانت خمیده کانولا ۷/۲ mm، بافت چربی به داخل قوطی‌های استریل اسپیره می‌شود. (یادداشت ۲ را مشاهده کنید)

۴- لیپوآسپیره سپس به داخل کیف جداسازی استریل ۵۰۰ml برای جداسازی منتقل می‌شود. جداسازی توسط یک تکنسین در جریان هود زیستی لامینار انجام می‌شود. (یادداشت ۳ را مشاهده کنید)

### ۳-۲ جداسازی SVF

۱- لیپوآسپیریت را با حجم برابری از محلول گرم (۳۷ درجه سانتیگراد) رینگر لاکتیک (RL) شسته می‌شود. پس از اضافه کردن LR، ملایم آنها را مخلوط کرده و اجازه دهید مخلوط جدا شود. مخلوط به دو پروتئین متمایز جدا می‌شود، لایه آبی در پایین (واضح/قرمز) و لایه چربی در بالا (زرد/صورتی) قرار دارد. لایه آبی پایینی دور ریخته می‌شود. سه مرتبه و یا تا زمانی که لایه چربی زرد شود (دیگر صورتی نباشد) بشویید (شکل ۲-).



شکل ۲- لیپوآسپیریت در مخروط جدا کننده، جدا شده است. بالا، لایه زرد لیپوآسپیریت است. لایه پایینی صورتی مخلوط خون و tumescent است.

۲- الیکوت ۲۵CC لیپوآسپیریت شسته شده را در درون لوله های ۵۰CC استریل شده سانتریفیوژ قرار می دهیم. (یادداشت های ۱ و ۴ را مشاهده نمایید).

۳- ۲۵CC از محلول گرم (۳۷ درجه سانتیگراد) محلول آنزیم تجزیه کننده بافتی را به هر الیکوت ۲۵CC از لیپوآسپیریت شسته شده اضافه میکنیم. معکوس شدن مخلوط.

۴- انکوباسیون لیپوآسپیریت/محلول آنزیمی درون شیکر گرم در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد ، ۲۰۰rpm برای ۲۰-۳۰ دقیقه (یادداشت های ۵ را مشاهده نمایید).

۵- در ادامه انکوباسیون سانتریفیوژ لوله ها در ۲۰۰rpm (۷۰۰g) برای ۱۰ دقیقه تا جداسازی اجزاء صورت پذیرد.

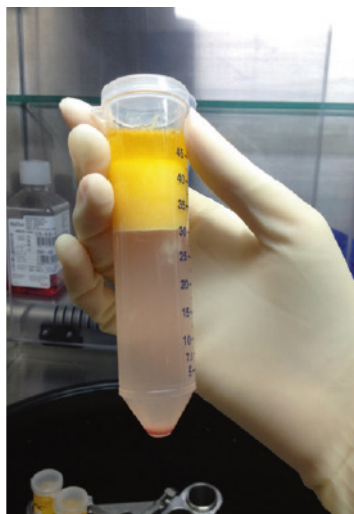
۶- پس از سانتریفیوژ در لوله ها سه لایه کاملاً قابل مشاهده است. لایه بالایی حاوی چربی و روغن است. لایه وسط، لایه آبی خواهد شد که به صورت قرمز/واضح ظاهر خواهد شد. در زیر لوله ها یک قرص وجود دارد. قرص حاوی سلول های جدا شده استرومای عروقی است (شکل-۳)

۷- لایه های آبی و چربی/روغن را حذف کنید. تمام مواد مستعد آسیب زنده زیستی را به درستی در ظروف زباله های زیست محیطی قرار دهید.

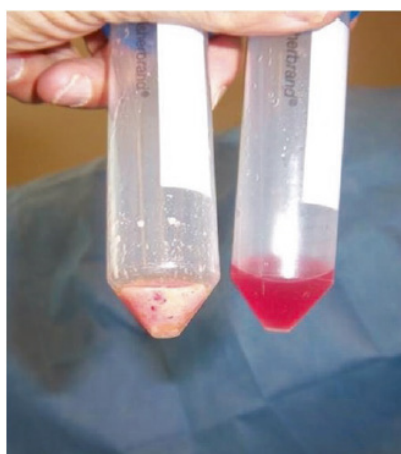
۸- قرصها SVF را درون دو لوله ۵۰CC استریل شده ترکیب کنید (چهار قرص درون هر لوله) قرصها بوسیله معلق شدنشان در مقدار کمی از LR گرم ترکیب می شوند.

۹- رساندن حجم هر لوله محتوی قرصها به ۵۰CC با استفاده از LR گرم (یادداشت ۷ را مشاهده کنید).



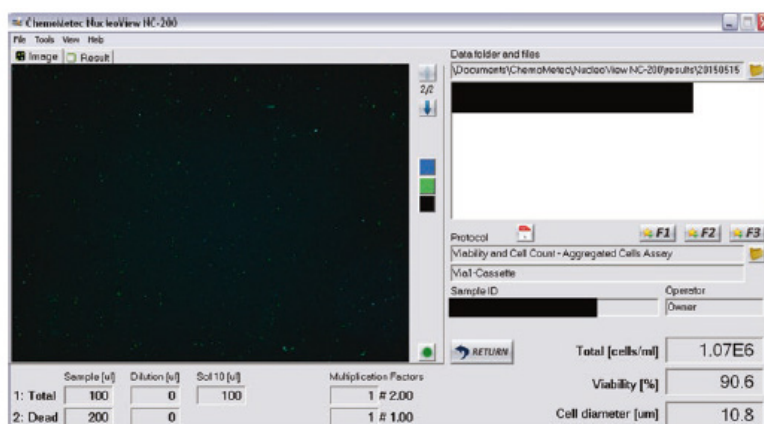


شکل ۳- نتیجه حاصل از سانتریفیوژ لیپوآسپیریت پس از هضم آنزیمی



شکل ۴- لوله سمت چپ حاوی ضایعات و قطعات بافتی است که بوسیله صافی سلولی  $100\ \mu\text{m}$  حذف می شود. لوله سمت راست حاوی SVF ضعیف است.

- ۱۰- شستشو: سانتریفیوژ در  $700 \times g$  برای پنج دقیقه. قرصها را ذخیره کنید و لایه آبی را بریزید. این کار را دوبار تکرار کنید.
  - ۱۱- پس از سومین بار و آخرین مرتبه شستشو دو دو قرص باقیمانده را در لوله تکی ترکیب کنید. اضافه کردن مقدار کمی از LR ممکن است انتقال را آسانتر کند.
  - ۱۲- به منظور حذف قطعات بافتی که از هضم بافت چربی باقیمانده اند فیلتراسیون از طریق صافی سلولی  $100\ \mu\text{m}$  انجام می شود. با استفاده از LR سلول در میان صافی شستشو داده می شود. (شکل-۴) (یادداشت ۸ را مشاهده نمایید)
  - ۱۳- با استفاده از LR گرم حجم نهایی را به  $15\ \text{cc}$  برسانید (یادداشت ۹ را مشاهده نمایید).
  - ۱۴- حجم ها ذیل برای آنالیز گرفته شده اند (یادداشت ۸ را مشاهده نمایید):
    - (a)  $1/10$  تا  $2/10$  سی سی برای شمارش و زنده مانی سلول با استفاده از کموتک NC- $200$  (یادداشت ۱۱ را مشاهده نمایید) (شکل ۵)
    - (b)  $2/1\ \text{cc}$  برای آزمایش استریلاسیون رنگ SVF  $<0/1\ \text{cc}$  Gram مورد نیاز است. دو هفته کشت هوازی:  $1\ \text{cc}$ ، SVF در  $9\ \text{cc}$  TBS (Tryptic soy broth) دو هفته کشت بی هوازی:  $1\ \text{cc}$ ، SVF در  $9\ \text{cc}$  Thioglycollat broth
    - (c)  $2\ \text{cc}$  برای فلوسلیتومتری
- مارکهای آزمایش = FITC-CD $31$ ، APC-CD $34$ ، PE-CD $45$
- ۱۵- حجم باقی مانده به جراح بازگردانده می شود.



شکل ۵- نمایشگر بازخوانی شمارش هسته NC-200. نمونه مورد آزمایش تولین نهایی SVF ۱۰٪ رقیق شده بود. حجم نهایی ۱۰cc SVF است. ۴۰۰cc از رلیوآسپیریت پردازش شد. تعداد نهایی سلول هسته دار برای کل نمونه‌های SVF، ۱۲۸/۴ میلیون سلول هسته دار بود. ۳۲۱۰۰۰ سلول‌های هسته دار در هر ۱cc از رلیوآسپیریت پردازش و شسته شده وجود دارد.

#### ۴- یادداشتهای

- ۱- محلول آنزیم تجزیه کنندگی بافتی که در اینجا استفاده شد شامل کلاژناز و پروتئاز خنثی (Dispase) است. سطح فعالیت کلاژناز ۳۵ واحد Wunsch [۱۷] در هر ویال است، اما فعالیت نهایی تخریب‌پذیری کلاژن ۳۳۰۰۰ واحد [۱۸] در هر ویال گزارش شده است. مطمئن شوید که آنزیم‌ها در گرید GMP هستند. آگاه باشید که سطح فعالیت و واحدهای استفاده شده برای بیان میزان فعالیت بین سازندگان متفاوت است و فعالیت ممکن است از دسته‌ای به دسته دیگر از سازنده یکسان متفاوت باشد. دریافت گواهی تجزیه و تحلیل با آنزیم‌ها سطح دقیق فعالیت را نشان خواهد داد. فراهم کردن آنزیم مناسب ممکن است بین تولیدات متفاوت باشد و باید بر اساس توصیه‌های تولید کننده انجام شود.
- ۲- حجم رلیوآسپیریت به عنوان حجم بعد از شستشو اندازه گیری می شود. حجم بیشتر، معمولاً از جراحی دریافت می شود، اما معمولاً شامل میزان قابل توجهی از محلول tumescent است که در طول شستشو حذف می شود. در استفاده از این روش، ما بین ۵۰cc تا ۸۰cc فرآوری شده از رلیوآسپیریت شسته شده را داریم.
- ۳- قیف استریل ممکن است انتقال را برای حجم‌های بزرگتر از رلیوآسپیریت را آسانتر کند.
- ۴- رلیوآسپیریت شسته شده از قیف جدا کننده به ظرف ۵۰۰ml منتقل می شود. این آسان تر از الیکوت رلیوآسپیریت شسته شده از ظرف به عنوان مقابل در قیف جدا کننده است.
- ۵- ممکن است نیاز شود لوله‌ها بصورت دستی معکوس شوند و هر ۵ تا ۱۰ دقیقه مخلوط شوند، همان گونه که رلیوآسپیریت ممکن است در انتهای یک لوله انتخاب شود. مخلوط شدن، بافت هضم شده بیشتری را فراهم خواهد کرد.
- ۶- تعداد قرصها بر اساس میزان بافت چربی فرآوری شده متفاوت می باشد. هر ۲۵cc از چربی برابر با یک قرص است. ۲۰۰cc از رلیوآسپیریت برابر با ۸ قرص است.
- ۷- در مطالعه قبلی ما توانستیم مقدار ناچیزی از کلاژناز را پس از سه مرحله شستشو نشان دهیم [۱۹]. اگر تمایل داشته باشید، با استفاده از سرم اتولوگ می توان کلاژناز را خنثی کرد. این کار بوسیله شستشو در ۲۰٪ سرم انجام می شود. که می توان از ۱۰cc سرم و ۴۰cc LR برای یک مرحله شستشو استفاده کرد. سرم را می توان بوسیله سانتریفیوژ کردن خون هپارینه شده در ۸xg برای ده دقیقه تولید کرد.
- ۸- میزان ضایعات بسته به حجم رلیوآسپیریت فرآوری شده متفاوت است. اگر نمونه حاوی مقدار زیادی از قطعات بافتی باشد، ممکن است صافی بسته شود و SVF نتواند از آن عبور کند. اگر این اتفاق بیافتد، ممکن است یک صافی اضافی برای فیلتر قسمت باقی مانده استفاده شود. همه سلولها پس از عبور از صافی دوباره بدست نمی آیند، زیرا برخی از آنها در دام قرص قطعات بافتی می افتند. شستشوی اضافه و صاف کردن ضایعات می تواند موجب هدایت بسوی افزایش بازده سلولی شود، اما این باعث طولانی شدن زمان جداسازی می شود.

- ۹- حجم نهایی ۱۵cc ایده آل است و می تواند براساس ترجیحات شخصی متفاوت باشد. هنگامی که SVF را برای cell-assisted transfer(CAL) ترکیب میکنیم ، حجم نهایی چندان مهم نیست زیرا معمولاً حجم بیشتری از جربی وجود دارد، اما هنگامی که SVF به طور مستقیم تزریق می شود حجم کمتری (۱۰cc-۵cc) مورد نظر می باشد.
- ۱۰- نمونه ها با  $> 80\%$  زنده مانده برای استفاده های بالینی مورد تایید قرار نخواهند گرفت. نمونه هایی که در آنها هرگونه آلودگی در طول رنگ آمیزی گرم یافت می شود نمی توانند برای استفاده های بالینی مورد تایید قرار خواهند گرفت. بیماری که نمونه آن دارای کشت مثبت هوازی/غیرهوازی می توانند از نزدیک برای مانیتورینگ عفونت مورد بررسی قرار گیرند. کشت مثبت به این معنی نیست که بیمار مبتلا به عفونت است.
- ۱۱- رقیق شدن SVF تولید شده نهایی ممکن است نیازمند غلظت سلول در محدوده قابل خواندن برای استفاده از روش شمارش سلولی باشد. به طور معمول رقت ۱:۱۰ در LR کارآمد است، اما در چند مورد نادر ممکن است رقت ۱:۱۰۰ مورد نیاز باشد.

---

## افشا

هیچ یک از نویسندگان سهم مالی از محصولات، وسایل، یا داروهای اشاره شده در این فصل ندارند.

## References

1. Ude CC, Sulaiman SB, Min-Hwei N et al (2014) Cartilage regeneration by chondrogenic induced adult stem cells in osteoarthritic sheep model. *PLoS One* 9(6):e98770
2. Planat-Bernard V, Silvestre JS, Cousin B et al (2004) Plasticity of human adipose lineage cells towards endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives. *Circulation* 109:656–663
3. Naderi N, Wilde C, Haque T et al (2014) Adipogenic differentiation of adipose-derived stem cells in a 3-dimensional spheroid culture (microtissue): implications for the reconstructive surgeon. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 67(12):1726–1734
4. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H et al (2001) Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 7:211–229
5. Yoshimura K, Sato K, Aoi N et al (2008) Cell-assisted lipotransfer for cosmetic breast augmentation: supportive use of adipose-derived stem/stromal cells. *Aesthet Plast Surg* 32(1):48–55
6. Rehman J, Traktuev D, Li J et al (2004) Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation* 109:1292–1298
7. Kapur SK, Katz AJ (2013) Review of the adipose derived stem cell secretome. *Biochimie* 95:2222–2228
8. Matsumoto D, Sato K, Gonda K et al (2006) Cell-assisted lipotransfer: supportive use of human adipose-derived stem cells for soft tissue augmentation with lipoinjection. *Tissue Eng* 12(12):3375–3383
9. Lee HC, An SG, Lee HW et al (2012) Safety and effect of adipose tissue-derived stem cell implantation in patients with critical limb ischemia. *Circ J* 76:1750–1760
10. Salibian AA, Widgerow AD, Abrouk M et al (2013) Stem cells in plastic surgery: a review of current clinical and translational applications. *Arc Plast Surg* 40:666–675
11. Michalek J, Moster R, Lukac L et al (2015) Autologous adipose tissue-derived stromal vascular fraction cells application in patients with osteoarthritis. *Cell Transplant*. <https://doi.org/10.3727/096368915X686760>
12. Gautam M, Fujita D, Kimura K et al (2015) Transplantation of adipose tissue-derived stem cells improves cardiac contractile function and electrical stability in a rat myocardial infarction model. *J Mol Cell Cardiol* 81:139–149
13. Shah FS, Wu X, Dietrich M et al (2013) A non-enzymatic method for isolating human adipose-derived stromal stem cells. *Cytotherapy* 15:979–985
14. Markarian FM, Frey GZ, Silveira MD et al (2014) Isolation of adipose-derived stem cells: a comparison among different methods. *Biotechnol Lett* 36:693–702
15. Baptista LS, do Amaral RJ, Carias RB et al (2009) An alternative method for the isolation of mesenchymal stromal cells derived from lipoaspirate samples. *Cytotherapy* 11(6):706–715
16. Yoshimura K, Shiguera T, Matsumoto D et al (2006) Characterization of freshly isolated and cultured cells derived from the fatty and fluid portions of liposuction aspirates. *J Cell Physiol* 208:64–76
17. Wunsch E, Heidrich HG (1963) On the qualitative determination of collagenase. *Z Physiol Chem* 333:149
18. McCarthy RC, Spurlin B, Wright MJ et al (2008) Development and characterization of a collagen degradation assay to assess purified collagenase used in islet isolation. *Transplant Proc* 40:339
19. Aronowitz JA, Ellenhorn JD (2013) Adipose stromal vascular fraction isolation: a head-to-head comparison of four commercial cell separation systems. *Plast Reconstr Surg* 132(6):932e–939e

## فصل ۳:

# کشت سه بعدی بدون داربست، با اندازه کنترل شده سلول‌های بنیادی مشتق از چربی خرگوش

Christina L. Rettinger, Kai P. Leung, and Rodney K. Chan

### چکیده

سلول‌های بنیادی مشتق از چربی قادر به خودبازسازی و تمایز بین رده‌های سلولی متعدد هستند و کاربردهای بالقوهای در طیف گسترده‌ای از روشهای درمانی دارند. ASCها معمولاً به صورت تکلیف بر پلاستیک کشت بافت کشت داده می‌شوند، اما شواهدی وجود دارد که بیان می‌کند ممکن است خواص خاص سلولی خود را با گذشت زمان در شرایط آزمایشگاهی از دست بدهند. به کشت سلول‌های چسبنده با استفاده از تکنیکهای سه بعدی علاقه رو به رشدی وجود دارد، بر این اساس که سلول‌هایی که بر سطح پلاستیک رشد می‌کنند را نمی‌توان به طور کامل در شرایط داخل بدن به صورت سه بعدی نشان داد. در اینجا روشی جدید برای تولید و کشت ASCهای خرگوش به صورت سه بعدی بدون داربست از طریق تکنیک جمع‌آوری اجباری توصیف می‌کنیم.

کلمات کلیدی: کلونی سلول/اسفروئید، سلول‌های بنیادی مشتق از چربی خرگوش، کشت سه بعدی

### ۱- مقدمه

بیشتر کارهایی که بر سلول‌های بنیادی بالغین انجام شده است بر سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSCها) موجود در استروما مغز استخوان تمرکز کرده‌اند. سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان (BM-MSC) به انواع مختلفی از سلول، از جمله سلول‌های چربی، سلول‌های غضروفی، سلول‌های عضلانی و سلول‌های استخوانی تمایز یابند [۱-۵]. با این حال، روشهای سنتی تهیه مغز استخوان دردناک هستند و اغلب به بیهوشی عمومی نیاز دارند و منجر به عملکرد کم سلول می‌شوند. طی دهه‌های گذشته، بافت چربی به عنوان منبعی جذاب، جایگزین سلول‌های بنیادی بالغین چندگانه (ASC) شناخته شده است. ASCها می‌توانند به سادگی از طریق لیپوساکشن جدا شده یا بافت چربی بریده شده از طریق هضم کلاژناز و سانتریفیوژ تشخیصی جدا شوند. می‌توان آنها را در شرایط آزمایشگاهی برای مدتی با دوبرابر شدن جمعیت و سطح کم پیری حفظ کرد [۶،۷]. این خصوصیات، همراه با دسترسی آسان به آنها، آسیب کم محل اتصال، و توانایی تمایز گسترده آنها، ASCها را به کاندید عالی برای طیف گسترده‌ای از درمانهای مبتنی بر سلول تبدیل کرده است.

ASCها معمولاً به صورت تک لایه با استفاده از تکنیکهای سنتی کشت بافت، کشت داده می‌شوند. این روشها مناسب هستند اما گزارشاتی مبنی بر کاهش توانایی تکثیر سلولی، کارآمدی تشکیل کلونی، و ظرفیت تمایز در MSCها با گذشت زمان وجود دارد [۸-۱۰]. در نتیجه، نسبت به کشت سلولهای چسبیده با استفاده از روشهای کشت سه بعدی سلول علاقه رو به رشدی وجود دارد و شواهد تفاوت‌های قابل توجهی بین فنوتیپ سلولی و پاسخ بیولوژیکی سلولهای کشت شده به صورت تک لایه با کشت سه بعدی نشان می‌دهند.

رویکردهای مورد استفاده برای تهیه محیطی سه بعدی برای سلولها شامل داربستهای متخلخل، هیدروژل، و کلونیهای چندسلولی هستند، که هر کدام با انواع مختلفی سلول نتیجه موفقیت‌آمیز داشته‌اند [۱۱-۱۶]. استفاده از کلونی چندسلولی نسبت به بقیه تکنیکها، به علت ماهیت خودتجمعی و عدم وجود لایه‌های آگزوزن در آنها، جذابتر است. تجمعهای سه بعدی سلول در تحقیقات سرطان برای تقلید میکرومحیط تومور، به طور گسترده مورد استفاده قرار می‌گیرند [۱۷، ۱۳]. همچنین برای تقلید جنینزایی برای کشتهای سلول بنیادی استفاده شدند [۱۱، ۱۸].

روشهای مورد استفاده برای تولید تجمعهای سلولی شامل کشت سلول بر سطوح غیرچسبیده یا در معرض جاذبه گذاشتن آنها برای افزایش خودتجمعی اسفونئیدهای سلول می‌باشد. با این حال، این روشها دشوار هستند و تجمعهای سلولی تولید می‌کنند که از نظر اندازه ناهمگن هستند [۱۷، ۱۸]. اخیراً، Ungrin و همکاران [۱۹]، یک سطح غیرچسبیده مبتنی بر میکروساخت (AggreWell، فناوریهای سلول بنیادی، ونکوور، BC) برای کشت سلولهای جنینی ایجاد کردند تا همسانی و تمایز اجسام جنینی را بهبود بخشند. تعدادی از گروه‌ها این تکنولوژی را برای تحقیقات سلول بنیادی مزانشیمی استفاده کردند و اکثر این مطالعات آزمایشگاهی بر تمایز احتمالی تجمعهای سه بعدی سلولهای بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان انسانی یا موشی تمرکز کردند (BMSC ها) [۲۰-۲۳].

از آنجایی که روشهای مورد استفاده برای استخراج سلولها از بافت چربی ابتدا در دهه ۱۹۶۰ توسط Rodbell و همکارانش گزارش شده است [۲۴]، ASCها نه تنها از بافت چربی انسانی، بلکه از بافت چربی بسیاری از گونه‌های دیگر، شامل جوندگان کوچک، خرگوش، تا حیوانات بزرگ مانند خوک و میمونهای رزوس جدا شد. خرگوشها از نظر فیلوژنتیکی به پرماتها نزدیکتر هستند تا به جوندگان، و در پر کردن فاصله بین مدل‌های حیوانی کوچک و مدل‌های حیوانی بزرگ مورد نیاز برای تحقیقات بالینی ارزشی ندارند. خرگوشهای سفید نیوزلند (NZW) معمولاً برای مدلسازی شرایط مختلف آسیب و بیماری انسان استفاده می‌شوند. در اینجا، روشهایی برای جداسازی و کشت سلولهای بنیادی مشتق از چربی خرگوش (rbASC) و تکنیکهای مورد استفاده برای تولید تجمعهای rbASC سه بعدی بدون داربست کنترلشده ارائه می‌دهیم.

## ۲- مواد

### ۲.۱ بافت

۱. پدهای چربی اینگوبنال به دست آمده از خرگوشهای نیوزلند سفید مونث جوان تحت بیهوشی عمومی یا پس از مرگ (۳ تا ۴ ماهه، ۲،۵-۳،۵ کیلوگرم، آزمایشگاههای Harlan)

### ۲.۲ تدارکات عمومی

۱. لوازم محافظت شخصی
۲. واحد فیلتر ۰،۲ میکرومتری
۳. لوله مخروطی ۱۵ میلی‌لیتری
۴. لوله مخروطی ۵۰ میلی‌لیتری
۵. فلاسکهای کشت بافت ۷۵ سانتیمتر مربعی (T۷۵)
۶. کرایو ویال (نالژین)

۷. چاقوی جراحی یکبار مصرف استریل
۸. فورسپس و قیچی استریل اتوکلاو شده
۹. صافی یا ورقهای گازی استریل ۱۰۰ میکرومتری
۱۰. دستگاه انجماد (کانتینر انجماد Mr.Frosty).

### ۲,۳ تجهیزات

۱. میکروسکوپ نوری معکوس (ژئیس آکسیو ورت)
۲. میکروسکوپ کانفوکال (ژئیس LSM ۷۱۰)
۳. حمام آب لرزان (حمام آب لرزان دو طرفه Precision)
۴. شیکر چرخشی (Thermolyne Roto Mix مدل ۵۰۸۰۰)
۵. سانتریفیوژ (سانتریفیوژ ۵۸۱۰R Eppendorf)
۶. انکوباتور کشت بافت تنظیم شده در ۳۷ درجه، ۵٪ CO<sub>۲</sub>
۷. شمارشگر سلول خودکار (Countess)
۸. پردازشگر بافت (Leica ASP ۶۰۲۵)
۹. ترمو هیستوستار
۱۰. ماده رنگی اسلاید خودکار (Leica Autostainer XL)

### ۲,۴ جداسازی، کشت و نگهداری در حالت انجماد

۱. سالین بافری فسفات (PBS)
۲. محلول نمکی بافری هانک (HBSS)
۳. محلول کلاژناز: ۰,۰۷۵٪ نوع II کلاژناز (Gibco)، آماده شده در HBSS، فیلتر شده از غشاء ۰,۲ میکرومتری
۴. بافر تخریبی اریتروسیت: ۱۰ میلیمول KHCO<sub>۳</sub>، ۱۵۰ میلیمول NH<sub>۴</sub>Cl، ۱ میلیمول EDTA آماده شده در آب مقطر، فیلتر شده از غشاء ۰,۲ میکرومتری
۵. محیط کشت سلولی: Dulbecco's Modified Eagle Medium: ترکیب مغذی F۱۲ (DMEM/F۱۲) به همراه ۱۰٪ سرم گاوی جنینی (FBS) و ۱٪ پنی سیلین/استرپتومایسین.
۶. تریپسین EDTA
۷. تریپان بلو
۸. محیط انجماد: محیط کشت کامل با ۱۰٪ دیمتیلسولفاید (DMSO)
۹. ایزوپروپانول

### ۲,۵ تشکیل توده

۱. صفحات ۴۰۰ AggreWell/۴۰۰ Ex/۸۰۰ (فناوریهای سلولهای بنیادی)
۲. محلول شستشوی AggreWell (فناوریهای سلولهای بنیادی)
۳. ۶ صفحه با چسبندگی بسیار پایین (Corning)

### ۲,۶ زیست پذیری و تکثیر سلولی

۱. کیت زیست پذیری/اسیتوتوکسیته زنده/مرده: AM کلسین و هومودایمر-۱ اتیدیوم (Invitrogen)
۲. کیت ارزیابی تصویربرداری Click iT EdU با الکسا فلور ۴۸۸ (Invitrogen)
۳. ۴٪ پارافورمالدئید

۴. ۱۰٪ بافر فرمالین
۵. آلومین سرم گاوی (سیگما)
۶. فیبرینوزن (سیگما)
۷. ترومبین (سیگما)

### ۳- روش‌ها

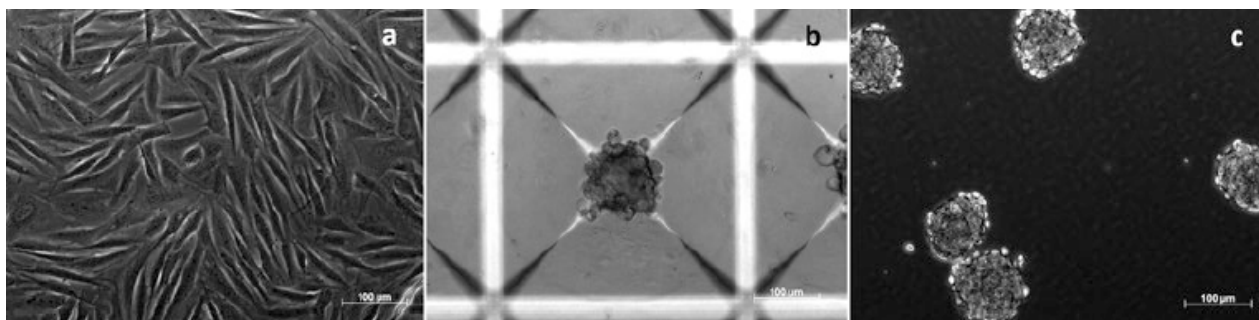
همه محیطها، لوله‌ها، فلاسکها و سلولها باید استریل باشند. همه کارها باید در هود ایمنی انجام شود و تکنیکهای استریل اعمال شوند.

PBS، محلول کلاژناز، بافر لیز کننده اریتروسیت، و محیط کشت سلول را قبل از استفاده، در حمام آب ۳۷ درجه قرار دهید. محلول کلاژناز باید تازه باشد و طی ۱ ساعت استفاده شود.

#### ۳.۱ جداسازی و کشت ASC خرگوش

۱. با برش مرکزی میانی از درم خرگوش NZW در ناحیه اینگوئینال شروع کنید، سپس برشهایی پهلو به پهلو در جنبه‌های سری و دم میانی بزنید. پوست را از بافت چربی زیرین جدا کنید و به آرامی لایه‌های چربی اینگوئینال را بردارید. لایه‌های چربی جدا شده را در PBS از پیش گرم شده استریل قرار دهید. هر گونه رگ قابل مشاهده را بردارید.
۲. بافت را وزن کنید و ۱۰-۵ گرم بافت را در هر لوله مخروطی ۵۰ میلی‌لیتری قرار دهید.
۳. بافت را کاملاً در PBS بشویید. اگر نگران آلودگی باشیم، PBS را می‌توان با آنتیبیوتیکهایی مانند پنی‌سیلین/استرپتومایسین، جنتامایسین، و آمفوتریسین b تغذیه کرد. بافت را با دست به اندازه پوره سیب خورد کنید، و در محلول کلاژناز نوع II ۰.۷۵٪ برای ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه در یک حمام آب لرزان هضم کنید. نمونه گرداب (یا به طور دستی لوله مخروطی را برعکس کنید) هر از گاهی به روند هضم سرعت میبخشد.
۴. بعد از ۱ ساعت، پس از غیرفعال کردن کلاژناز، ترکیب هضم شده را با فیلتر توری نایلون استریل، فیلتر کنید و در ۱۰۰۰ rpm (تقریباً ۱۶۴×گرم) برای ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ کنید.
۵. بعد از اسپیراسیون دقیق چربیهای بالغ در مایع شناور، گلوله را در ۱۰ میلی‌لیتر از بافر لیز کننده اریتروسیت شناور کنید، و اجازه دهید در دمای اتاق برای ۱۰ دقیقه بماند. برای ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰ rpm سانتریفیوژ کنید. این گلوله از قطعات عروقی استرومال (SVF)، حاوی جمعیت ناهمگنی از سلولها، که شامل فیبروبلاست، پرئوسیت، سلولهای اندوتلیال، پرادپوسیت، و ASC می‌باشد، تشکیل شده است.
۶. بعد از سانتریفیوژ، گلوله حاصل را در محیط کشت ASC کامل با ۱۰٪ FBS شناور کنید و در فلاسک Ty5 قرار دهید.
۷. بعد از کشت یکشنبه، فلاسک را چندبار با PBS بشویید و با محیط کشت ASC کامل تازه مجدداً پر کنید. محیط را هر ۳ روز عوض کنید. ASCهای خرگوش کشت اولیه طی ۷ روز با یکدیگر ادغام می‌شوند (شکل ۱.الف).
۸. نگهداری در حالت انجماد rbASCها: برای نگهداری در حالت انجماد/انجماد، rbASCها را باید در ۷۵-۸۰٪ ادغام برداشت کرد. سلولها را برداشت کنید و بشمارید. بعد از شمارش، گلوله را در محیط انجماد با غلظت ۱-۲×۱۰۶ سلول/میلی‌لیتر معلق کنید. کرایوبالها را در دستگاه انجماد در فریزر -۸۰ درجه قرار دهید. روز بعد، سلولها را برای ذخیره طولانی مدت به نیتروژن مایع منتقل کنید.





شکل ۱. تصاویر فاز کنتراست rbASC به صورت مونولایه‌های دوبعدی ادغام شده بر پلاستیک کشت بافت (الف)، به صورت توده‌های سلولی سه بعدی در میکروچاه‌ها (ب)، یا در کشت سوسپانسیون (ج). بزرگنمایی تصویر ۱۰۰x است.

### ۳,۲ تشکیل تجمع ASC و ماندگاری

- صفحات AggreWell™ را با محلول ۱ میلی‌لیتری شستشوی AggreWell بشویید، در ۲۰۰۰× گرم برای ۵ دقیقه سانتریفیوژ کنید، و به طور مکرر با PBS بشویید.
- مونولایه‌های ASC را با ECTA تریپسین جدا کنید، بشمارید، به صفحات AggreWell اضافه کنید، و در ۳۰۰× گرم برای ۵ دقیقه سانتریفیوژ کنید تا سلولها در microwells رسوب کنند. انکوباتور شبانه در ۳۷ درجه و ۵٪ CO<sub>2</sub> برای تحریک تشکیل توده لازم است.
- توده‌های ASC با اندازه‌های متفاوت را می‌توان با تغییر تعداد سلول‌های قرار داده شده در هر چاه ایجاد کرد (به نکته ۱ مراجعه کنید)
- توده‌های ASC را می‌توان در صفحات AggreWell در محیط رشد کامل با ۱۰٪ FBS برای مدت طولانی نگهداری کرد (همانطور که در شکل ۱.ب نشان داده شده است) یا می‌توان آنها را از میکروچاه‌ها استخراج کرد و به عنوان توده‌های سلولی شناور آزاد (شکل ۱.ج). در شش صفحه با چسبندگی بسیار پایین همراه با تحریک از طریق شیکر چرخشی کشت داد (به نکته ۲ مراجعه کنید).
- خصوصیات سطحی توده‌های rbASC را می‌توان از طریق اسکن میکروسکوپی الکترونی بررسی کرد (به نکته ۳ مراجعه کنید).

### ۳,۳ میزان زنده ماندن توده‌های ASC

- میزان زنده ماندن توده‌های ASC در کشت را می‌توان با استفاده از کیت ارزیابی زیست‌پذیری/سیتوتوکسیسیته زنده/مرده به طور کیفی ارزیابی کرد (CA, Carlsbad, Invitrogen). ارزیابی زنده/مرده یک ارزیابی زیست‌پذیری سلولی فلورسانس دو رنگ است که بر اساس تعیین همزمان سلول‌های زنده و مرده با دو پروبی که پارامترهای زیست‌پذیری سلول را اندازه می‌گیرند، می‌باشد: فعالیت استراز درون سلولی در سلول‌های زنده که توسط AM کلسین اندازه‌گیری می‌شوند و به خطر افتادن یکپارچگی غشای پلاسما در سلول‌های مرده (که توسط هومودایمر-۱ اتیدیوم (EthD-۱) اندازه‌گیری می‌شود).
- توده‌های ASC را از صفحات AggreWell از طریق نمونه‌برداری مکرر با استفاده از پیپت برداشت کنید. چندین بار با PBS بشویید تا محیط کشت سلولی حذف شود. قبل از برداشتن مایع رویی، صبر کنید تا توده‌های ASC در انتهای لوله مخروطی ته‌نشین شوند.
  - محلولی حاوی ۲ میکرومول AM کلسین و ۴ میکرومول EthD-۱ در PBS آماده کنید و دور از نور نگهدارید.
  - توده‌های ASC را با محلول حاوی AM کلسین و EthD-۱ برای ۳۰ دقیقه در RT انکوباتور کنید. چندین بار با PBS بشویید.
  - توده‌های رنگی ASC را بر یک اسلاید شیشه‌ای پیپت کنید، پوشش را قرار دهید، و فوراً از طریق میکروسکوپی کانفوکال (مثلاً زیس LMS ۷۱۰) تصویر را مشاهده کنید. سلول‌های زیست‌پذیر سبز می‌شوند در حالی که سلول‌های زیست‌ناپذیر قرمز می‌شوند.

## ۳،۴ تکثیر توده‌های ASC

توانایی تکثیر توده‌های ASC را می‌توان به طور کیفی بر اساس پیوستگی EdU (۵-اتینیل-۲-دئوکسییوریدین) با استفاده از کیت ارزیابی تصویربرداری Click-iT EdU Invitrogrm با الکسا فلور ۴۸۸ ارزیابی کرد. مشابه BrdU (برومو-دئوکسییوریدین)، EdU یک آنالوگ نوکلئوزیدی از تیمیدین است، و در طول سنتز فعال DNA، به DNA متصل می‌شود. تشخیص بر اساس واکنش کلیک است، که یک واکنش کووالانس کاتالیز شده با مس بین آزید و آلکین و رنگ الکسا فور حاوی آزید است. تثبیت استاندارد و نفوذپذیری مواد شوینده برای معرف تشخیص Click-iT کافی است تا به DNA دسترسی یابد (هیچ کار سختی مانند دناتوراسیون DNA برای افشای BrdU لازم نیست).

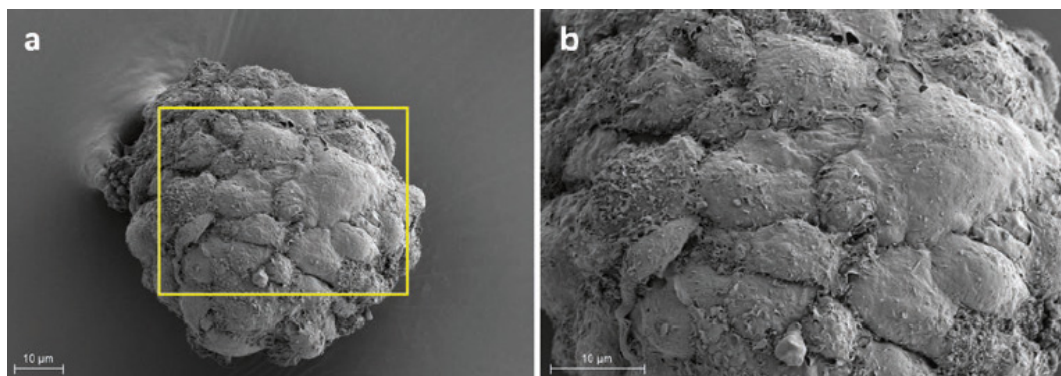
۱. توده‌های ASC در کشت با ۱۰ میکرومول EdU برای ۲۴ ساعت تحریک می‌شوند.
۲. توده‌های ASC را از با استفاده از نمونه‌برداری از طریق پیپت از میکروچاه‌ها جمع‌آوری کند. بعد از ته‌نشین شدن توده‌ها در انتهای لوله مخروطی ۱۵ میلی‌لیتری و تشکیل گلوله قابل رویت، چندین بار آن را با PBS بشوید و برای ۳۰ دقیقه در پارافورمالدهید ۴٪ تثبیت کنید.
۳. توده‌های ASC را با تریتون ۵٪، ۰-X-۱۰۰ نفوذپذیر کنید و چندین بار با محلول BSA ۳٪ بشوید. در یک مخلوط واکنش click-iT، حاوی ۱× بافر واکنش click-iT،  $CuSO_4$ ، الکسا فلور آزید، و بافر واکنش اضافی، به مدت ۳۰ دقیقه در RT انکوباتور کنید، سپس با ۱× محلول ۳۳،۳۴۲ هوجی برای شمارشگر رنگی DNA انکوباتور کنید.
۴. سوسپانسیونی از توده سلولی رنگی به اسلاید شیشه‌ای اضافه می‌شود و فوراً از طریق فلورسانس یا میکروسکوپی کانفوکال تصویربرداری می‌شود (نکته ۵).
۵. توده‌های ASC تحریک شده می‌توانند در ژل فیبرین کپسوله شوند و برای جاسازی پارافین به عنوان میکروبافت پردازش شوند (نکته ۶).
۶. تعیین تکثیر یا رشد سلولی با گذشت زمان نیز امکان‌پذیر است (نکته ۷).

## ۴- نکات

۱. ASC‌های خرگوش در تراکم‌های مختلف به صورت فشرده قرار داده شدند تا بعد از کشت یکشنبه در صفحات حاوی میکروچاه، توده سلولی تشکیل دهند. توده‌های سلولی که با استفاده از این روش تولید شدند بسیار یک اندازه هستند. زمانی که توده‌های سلولی در میکروچاه‌ها برای دوره‌های طولانی بمانند، تراکم بیشتر توده سلولی را می‌توان مشاهده کرد. ناحیه مقطع یا قطر توده‌های rbASC را می‌توان با استفاده از نرم‌افزار تجزیه و تحلیل عکس Image J تصاویر فاز کنتراست که در زمانهای مختلف گرفته شده‌اند، تعیین کرد.
۲. ASC‌های مونولایه را می‌توان با قرار دادن توده‌های سلولی دست نخورده بر صفحات یا فلاسکهای کشت بافت، از توده‌های rbASC نیز به دست آورد. سلولها طی ۱-۲ روز از توده‌های صفحه‌ای خارج می‌شوند.
۳. اسکن میکروسکوپی الکترون می‌تواند خصوصیات سطحی توده‌های rbASC را نشان دهد. هر توده سلولی از بسیاری از تک سلول‌های شدیداً متراکم تشکیل شده است، برخی از آنها فاقد مرزهای سلولی مشخص هستند (شکل ۲).
۴. مطالعات انجام شده در آزمایشگاه ما نشان می‌دهند که rbASC‌ها قادر به تشکیل توده‌های سلولی متراکم و زیست‌پذیر ماندن در کشت ایستای سه بعدی تا حدود ۷ روز هستند [۲۵]. با این حال، سلول‌های زیست‌ناپذیر در توده‌های سلولی با قطر بیشتر از ۲۰۰ میکرومتر مشاهده شدند (معمولاً توده‌ها از بیشتر از ۴۰۰۰ سلول/تجمع تشکیل شده‌اند).
۵. تکثیر سلولی محدود در توده سلولی همه اندازه‌ها بر اساس آزمایشات انجام شده در آزمایشگاه ما مشاهده شد. داده‌های ما نشان می‌دهند که اکثر سلول‌های موجود در توده در فاز G<sub>1</sub> چرخه سلول نهفته یا خاموش بودند [۲۵].
۶. توده‌های ASC می‌توانند در ژل فیبرین کپسوله شوند، در فرمالین بافری ۱۰٪ تثبیت شوند، و از طریق یک پردازنده بافت، برای تعبیه پارافین پردازش شوند. محلولهای ذخیره ۱۷،۳ میلی‌گرم/میلی‌لیتر فیبروزن و ۱۶۷ واحد/میلی‌لیتر ترومبین تهیه کنید.

با استفاده از تکرار نمونه‌برداری از طریق پیپت، توده‌های ASC را از میکروچاه‌ها استخراج کنید، توده‌ها را در محلول فیبروزن در قالب فلزی معلق کنید و حجم برابری از ترومبین اضافه کنید. توده‌های ASC کپسوله ژل فیبرین را در فرمالین بافری ۱۰٪ برای ۳۰ دقیقه در RT تنظیم کنید. به دقت ژل را از قابل فلزی جدا کنید و در یک کاست بافت پوشیده شده با کاغذ نمونه قرار دهید. این نمونه‌ها را می‌توان به صورت دستی نیز پردازش کرد. نمونه‌های دهیدریده و پارافینی شده در پارافین گرم قرار می‌گیرند و برای برش بافت‌شناسی آماده می‌شوند. قطعات توده‌های ASC در ژل فیبرین را می‌توان با هماتوکسیلین و ائوسین (H&E) یا سایر نشانگرهای مورد علاقه، با استفاده از تکنیکهای ایمونوهیستوکمستری استاندارد رنگ‌آمیزی کرد.

۷. توده‌های ASC را می‌توان از طریق انکوباتور در EDTA تریپسین ۰٫۲۵٪ در ۳۷ درجه برای ۱۵ تا ۳۰ دقیقه (بر اساس اندازه توده) با تحریک مکانیکی برای به دست‌آوردن سوسپانسیون یک سلولی، جداسازی کرد. سوسپانسیون سلولی حاصل را می‌توان با هموسیتومتر یا شمارنده سلولی خودکار شمارش کرد.



شکل ۲ اسکن تصاویر میکروسکوپی الکترونی ASCها به صورت توده سلولی سه بعدی در ۵۰۰ سلول/تجمع (الف). (ب) نمای نزدیکی از ROI نشان داده شده در (الف)

## قدردانی

این کار توسط فرماندهی تحقیقات پزشکی و مواد ارتش ایالات متحده (W81XWH-۱۰-۲-۰۵۴) پشتیبانی شد. نظرات یا اظهارات مندرج در اینجا نظرات شخصی نویسندگان است و نباید به عنوان منعکس کننده نظرات وزارت دفاع یا دولت ایالات متحده تلقی شود. یکی از نویسندگان (KPL) کارمند دولت ایالات متحده است و این اثر به عنوان بخشی از وظایف رسمی او تهیه شده است.

## References

1. Beresford JN, Bennett JH, Devlin C, Leboy PS, Owen ME (1992) Evidence for an inverse relationship between the differentiation of adipocytic and osteogenic cells in rat marrow stromal cell cultures. *J Cell Sci* 102(Pt 2):341–351
2. Caplan AI (1991) Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 9(5):641–650. <https://doi.org/10.1002/jor.1100090504>
3. Cheng SL, Yang JW, Rifas L, Zhang SF, Avioli LV (1994) Differentiation of human bone marrow osteogenic stromal cells in vitro: induction of the osteoblast phenotype by dexamethasone. *Endocrinology* 134(1):277–286. <https://doi.org/10.1210/endo.134.1.8275945>
4. Johnstone B, Hering TM, Caplan AI, Goldberg VM, Yoo JU (1998) In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Exp Cell Res* 238(1):265–272. <https://doi.org/10.1006/excr.1997.3858>
5. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR (1999) Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284(5411):143–147
6. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH (2002) Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 13(12):4279–4295. <https://doi.org/10.1091/mbc.E02-02-0105>
7. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH (2001) Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 7(2):211–228. <https://doi.org/10.1089/107632701300062859>
8. Banfi A, Muraglia A, Dozin B, Mastrogiacomo M, Cancedda R, Quarto R (2000) Proliferation kinetics and differentiation potential of ex vivo expanded human bone marrow stromal cells: implications for their use in cell therapy. *Exp Hematol* 28(6):707–715
9. Baxter MA, Wynn RF, Jowitt SN, Wraith JE, Fairbairn LJ, Bellantuono I (2004) Study of telomere length reveals rapid aging of human marrow stromal cells following in vitro expansion. *Stem Cells* 22(5):675–682. <https://doi.org/10.1634/stemcells.22-5-675>
10. Reiser J, Zhang XY, Hemenway CS, Mondal D, Pradhan L, La Russa VF (2005) Potential of mesenchymal stem cells in gene therapy approaches for inherited and acquired diseases. *Expert Opin Biol Ther* 5(12):1571–1584. <https://doi.org/10.1517/14712598.5.12.1571>
11. Baharvand H, Hashemi SM, Shahsavani M (2008) Differentiation of human embryonic stem cells into functional hepatocyte-like cells in a serum-free adherent culture condition. *Differentiation* 76(5):465–477. <https://doi.org/10.1111/j.1432-0436.2007.00252.x>
12. Bittinger F, Brochhausen C, Skarke C, Kohler H, Kirkpatrick CJ (1997) Reconstruction of peritoneal-like structure in three-dimensional collagen gel matrix culture. *Exp Cell Res* 236(1):155–160. <https://doi.org/10.1006/excr.1997.3724>
13. Kelm JM, Timmins NE, Brown CJ, Fussenegger M, Nielsen LK (2003) Method for generation of homogeneous multicellular tumor spheroids applicable to a wide variety of cell types. *Biotechnol Bioeng* 83(2):173–180. <https://doi.org/10.1002/bit.10655>
14. Takahashi T, Ogasawara T, Asawa Y, Mori Y, Uchinuma E, Takato T, Hoshi K (2007) Three-dimensional microenvironments retain chondrocyte phenotypes during proliferation culture. *Tissue Eng* 13(7):1583–1592. <https://doi.org/10.1089/ten.2006.0322>
15. Tong JZ, Sarrazin S, Cassio D, Gauthier F, Alvarez F (1994) Application of spheroid culture to human hepatocytes and maintenance of their differentiation. *Biol Cell* 81(1):77–81
16. Wang Y, Kim UJ, Blasioli DJ, Kim HJ, Kaplan DL (2005) In vitro cartilage tissue engineering with 3D porous aqueous-derived silk scaffolds and mesenchymal stem cells. *Biomaterials* 26(34):7082–7094. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.05.022>

17. Timmins NE, Dietmair S, Nielsen LK (2004) Hanging-drop multicellular spheroids as a model of tumour angiogenesis. *Angiogenesis* 7(2):97–103. <https://doi.org/10.1007/s10456-004-8911-7>
18. Kurosawa H (2007) Methods for inducing embryoid body formation: in vitro differentiation system of embryonic stem cells. *J Biosci Bioeng* 103(5):389–398. <https://doi.org/10.1263/jbb.103.389>
19. Ungrin MD, Joshi C, Nica A, Bauwens C, Zandstra PW (2008) Reproducible, ultra high-throughput formation of multicellular organization from single cell suspension-derived human embryonic stem cell aggregates. *PLoS One* 3(2):e1565. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001565>
20. Baraniak PR, McDevitt TC (2012) Scaffold-free culture of mesenchymal stem cell spheroids in suspension preserves multilineage potential. *Cell Tissue Res* 347(3):701–711. <https://doi.org/10.1007/s00441-011-1215-5>
21. Cook MM, Futrega K, Osiecki M, Kabiri M, Kul B, Rice A, Atkinson K, Brooke G, Doran M (2012) Micromarrows--three-dimensional coculture of hematopoietic stem cells and mesenchymal stromal cells. *Tissue Eng Part C Methods* 18(5):319–328. <https://doi.org/10.1089/ten.TEC.2011.0159>
22. Kabiri M, Kul B, Lott WB, Futrega K, Ghanavi P, Upton Z, Doran MR (2012) 3D mesenchymal stem/stromal cell osteogenesis and autocrine signalling. *Biochem Biophys Res Commun* 419(2):142–147. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.01.017>
23. Markway BD, Tan GK, Brooke G, Hudson JE, Cooper-White JJ, Doran MR (2010) Enhanced chondrogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in low oxygen environment micropellet cultures. *Cell Transplant* 19(1):29–42. <https://doi.org/10.3727/096368909X478560>
24. Rodbell M (1966) Metabolism of isolated fat cells. II. The similar effects of phospholipase C (*Clostridium Perfringens* Alpha toxin) and of insulin on glucose and amino acid metabolism. *J Biol Chem* 241(1):130–139
25. Rettinger CL, Fourcaudot AB, Hong SJ, Mustoe TA, Hale RG, Leung KP (2014) In vitro characterization of scaffold-free three-dimensional mesenchymal stem cell aggregates. *Cell Tissue Res* 358(2):395–405. <https://doi.org/10.1007/s00441-014-1939-0>

# تمایز سلول‌های اجدادی چربی قهوه‌ای مشتق از سلول‌های بنیادین پرتوان القا شده‌ی انسانی

Anne-Laure Hafner, Tala Mohsen-Kanson, and Christian Dani

### چکیده

در این فصل، ما پروتکلی برای القای میزان بالای تمایز سلول‌های اجدادی سلول‌های چربی شبه قهوه‌ای/قهوه‌ای (BAP ها)<sup>۱</sup> مشتق از سلول‌های بنیادین پرتوان القا شده‌ی انسانی (hiPSC ها)<sup>۲</sup> را شرح می‌دهیم. همچنین شرایط کشت به منظور نگهداری hiPSC ها و ایجاد hiPSC-BAP ها را شرح می‌دهیم. این سیستم کشت جدید یک منبع نامحدود از سلول‌های چربی<sup>۳</sup> قهوه‌ای انسانی و یک ابزار منحصر به فرد برای مطالعه‌ی حوادث تنظیم‌کننده‌ی تولید و به کارگیری BAP های انسانی فراهم می‌کند.

**کلمات کلیدی:** سلول‌های بنیادی چندتوان القا شده‌ی انسانی، چربی قهوه‌ای، سلول‌های چربی، تمایز، سلول‌های اجدادی

چربی

### ۱- مقدمه

در پستانداران، سه نوع سلول چربی؛ یعنی سلول‌های چربی قهوه‌ای، بژ و سفید وجود دارد که با وجود داشتن عملکردهای متضاد، همگی در تنظیم تعادل انرژی نقش دارند. بافت چربی سفید (WAT)<sup>۴</sup> در سراسر بدن پخش شده است و به طور عمده در ذخیره‌سازی انرژی نقش دارد. بر خلاف WAT، بافت چربی قهوه‌ای (BAT)<sup>۵</sup> برای مصرف انرژی اختصاصی شده است. BAT فعال، سوپسترای متابولیک را مصرف می‌کند و به لطف پروتئین جدا کننده‌ی یک (UCP-۱)<sup>۶</sup>، چربی را برای تولید گرما می‌سوزاند. سلول‌های چربی بژ به تازگی به عنوان سلول‌های چربی شبه قهوه‌ای توصیف شده‌اند و نوع سوم از سلول‌های چربی را ارائه می‌دهند که در خدمت WAT هستند [۱]. فعال‌سازی BAT یا به کارگیری سلول‌های چربی بژ منجر به اثرات ضد دیابتی و ضد چاقی قدرتمندی در موشها می‌شود [۲،۳]. پیش از این گزارش شده بود که کاشت<sup>۷</sup> های BAT قادرند در موشهای دیابتی، مقدار قند خون طبیعی (نرموگلیسمی) را بازیابی کنند. بنابراین، مفهوم پیوند اجداد سلول‌های چربی (AP ها)<sup>۸</sup> قهوه‌ای یا بژ در مبتلایان به

1- brown/brown like adipocyte progenitors

2- Human induced pluripotent stem cells

3- Adipocyte

4- White adipose tissue

5- Brown adipose tissue

6- Uncoupling Protein

7- Implant

8- Adipocyte Progenitors