

بررسی منابع آلودگی میکروبی سلول های بنیادی برای استفاده در سلول درمانی

حسن نیک نژاد^{۱*} (PhD)، فاطمه عاصی طهرانی^۱ (MSc)، حبیب اله پیروی^۱ (MD)، حسن ابوالقاسمی^۲ (MD)

۱- مرکز تحقیقات نانو تکنولوژی پزشکی و مهندسی بافت، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
۲- گروه مهندسی بافت، دانشکده فناوری های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

دریافت: ۹۱/۱۱/۹، اصلاح: ۹۲/۲/۱۱، پذیرش: ۹۲/۴/۱۹

خلاصه

سابقه و هدف: با توجه به پیشرفت دانش و تکنولوژی در علوم پزشکی استفاده از سلول های بنیادی، به یکی از امیدهای بشر برای درمان بسیاری از بیماری ها تبدیل شده است. محققین به دنبال یافتن بهترین شرایط برای کشت سلول های بنیادی هستند تا بتوان از این سلول ها در درمان بیماری ها استفاده کرد. این سلول ها به دلیل ویژگی هایی مثل خودنوزایی و پرتوانی، توانایی تولید و تکثیر دودمان های سلولی تمایز نیافته و ترمیم بافت های اطراف خود را دارند. این ویژگی ها در داخل بدن توسط محیط اطراف سلول یا کنام سلول (niche) کنترل می شود. در نتیجه بازسازی کنام سلولی بصورت برون تن برای حفظ ویژگی های سلول ضروری است. در این مقاله، منابع اصلی آلودگی سلول های بنیادی مورد بحث قرار خواهند گرفت و راهکارهایی برای رفع آنها معرفی خواهد شد.

مواد و روشها: جستجو در pubmed و Science Direct و Google Scholar با کلید واژه های Microbial Contamination, Stem Cells و Cell Therapy صورت گرفت و نتایج انواع مطالعات حیوانی و انسانی انجام شده در این زمینه تا سال ۲۰۱۲ مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها: دهنده سلول های بنیادی، لایه مغزی، سرم حیوانی و عوامل محیطی و شرایط کار از عمده ترین منابع آلودگی سلول های بنیادی می باشند. انجام تست های لازم برای دهنده سلول های بنیادی، حذف یا جایگزین نمودن لایه مغزی، جایگزین کردن سرم های انسانی مانند سرم آلبومین بجای سرم های حیوانی و بهینه کردن شرایط کار از جمله راهکارهای لازم برای جلوگیری از آلودگی سلول های بنیادی می باشند.

نتیجه گیری: برای فراهم کردن کنام لازم در کشت سلول به گروهی از فرآورده های انسانی و حیوانی نیاز است که می توانند باعث آلودگی سلول ها شوند. بنابراین، در صورت استفاده بالینی از این سلول ها، عوامل زئون، باکتری ها، ویروس ها و سایر عوامل بیماریزا به گیرنده سلول منتقل خواهند شد.

واژه های کلیدی: سلول های بنیادی، آلودگی میکروبی، سلول درمانی

مقدمه

خطرات در همه مراحل کار ضروری است. این مقاله به بررسی منابع آلودگی در کشت سلول های بنیادی و روش های جایگزین برای حذف یا کاهش آلودگی در کشت این سلول ها می پردازد. در این مقاله ابتدا ویژگی های سلول های بنیادی که حفظ آنها در محیط کشت ضروری است مورد بررسی قرار گرفته سپس منابع رایج آلودگی در کشت سلول بنیادی و همچنین، روش های جایگزین برای کاهش یا حذف این آلودگی ها ارائه می شود.

مواد و روشها

جستجو در pubmed و Science Direct و Google Scholar با کلید واژه های Microbial Contamination, Stem Cells و Cell Therapy صورت گرفت و نتایج انواع مطالعات حیوانی و انسانی انجام شده در

درمان با سلول های بنیادی یکی از روش های درمانی است که افق های جدیدی در بیماری های صعب العلاج بر پایه سلول درمانی باز نموده است. در تحقیقاتی که تاکنون انجام شده، محققان به دنبال یافتن بهترین شرایط کشت برای سلول های بنیادی بوده اند. اما از آنجا که هدف از کشت این سلول ها استفاده بصورت بالینی می باشد، به بررسی های بیشتر و دقیق تری در مورد خطرات احتمالی آن نیاز است. روش های موجود برای کشت سلول های بنیادی عمدتاً بر پایه استفاده از محصولات حیوانی و یا انسانی بنا شده اند. در نتیجه، استفاده از این فرآورده ها می تواند باعث انتقال عوامل زئون، باکتری ها، ویروس ها و سایر عوامل بیماریزا شود (۱). هر آلودگی میکروبی چه با منشاء دهنده سلول باشد و یا در حین کشت سلول ایجاد شده باشد، می تواند به گیرنده سلول و افرادی که بر روی آن کار می کنند، منتقل شود (۲). علاوه بر آلودگی ها، احتمال بروز پاسخ های ایمنی در برابر محصولات غیرانسانی نیز وجود دارد (۳). بنابراین شناسایی و حذف این

این مقاله حاصل پایان نامه فاطمه عاصی طهرانی دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبی شناسی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی می باشد.

* مسئول مقاله: دکتر حسن نیک نژاد

آدرس: تهران، بیمارستان طالقانی، ولنجک، مرکز تحقیقات نانو تکنولوژی پزشکی و مهندسی بافت، تلفن: ۰۲۱-۲۲۴۳۹۸۴۸

e-mail: niknejad@sbmu.ac.ir

نشان می دهند. مسیر بیوشیمیایی LIF/gp130/stat3 جزء اولین مسیرهای شناخته شده ای بود که می توانست خاصیت خودنوزایی را در سلول های بنیادی جنینی موش حفظ کند (۱۳). در بررسی Mitsui و همکارانش مشخص گردید که حضور LIF برای ایجاد خاصیت خودنوزایی و پرتوانی سلول های بنیادی جنینی انسانی کافی نیست، زیرا هموپروتئین Nanog می تواند به صورت مستقل از مسیر LIF/Stat3، پرتوانی و عدم تمایز را در سلول های ICM (Inner cell mass) و سلول های بنیادی جنینی انسانی حفظ کند، به طوری که حذف Nanog باعث از بین رفتن پرتوانی در این سلول ها می شود (۱۴).

نحوه کشت سلول های بنیادی: برای تکثیر بدون تمایز سلول های بنیادی جنینی انسان، اغلب از روش هم کشتی (Co-Culture) بر روی یک لایه مغذی (feeder layer) از فیبروبلاست جنین موش (mEFs, Murrin Embryonic Fibroblast Cells) در محیطی حاوی سرم گاوی (FBS, Fetal Bovine Serum) استفاده می شود (۱۵).

لایه مغذی بوسیله اشعه گاما یا میتومایسین C (۱۶)، از نظر تقسیم سلولی غیرفعال شده و بستر مناسبی را برای اتصال سلول های بنیادی جنینی انسانی فراهم می کند (۱۵). این لایه با آزادسازی مواد غذایی و فاکتورهای رشد، موجب تشکیل کنام سلول شده که در نتیجه باعث رشد و تکثیر بدون تمایز سلول های بنیادی جنینی انسانی (۱۷ و ۱۸) و حفظ خاصیت خودنوزایی در محیط کشت می شود (۱۹). ارتباط بین این دو نوع سلول از طریق فاکتورهای ترشحی به محیط کشت، ماتریکس خارج سلولی و یا پروتئین های موجود در غشا است (۲۰). بنابراین اتصال سلول های لایه مغذی و سلول های بنیادی، از طریق ایجاد اتصال بین رسپتورها و لیگاند ها به طور مستقیم و ترشح فاکتورهای فعال، به طور غیرمستقیم بر سلول های بنیادی تاثیر می گذارند. همچنین ممکن است ترکیبی از هر دو روش مستقیم و غیرمستقیم در آن نقش داشته باشد (۱۹).

سرم گاوی یکی دیگر از مواد مورد استفاده در کشت سلول های بنیادی است که به عنوان منبع فاکتورهای رشد و عناصر کمیاب، به محیط اضافه می شود (۲۱). سرم حاوی فاکتورهای فعال زیستی (bioactive) با وزن مولکولی کم است. این فاکتورها نقش حیاتی در کاهش اثرات سمی ناشی از سیگنال های ثانویه نکروتیک و آپوپتوتیک دارند (۲). یکی از این فاکتورها سروفنیک اسید (serofendic acid) است که یک دی ترپنوئید atisane-type بوده و با ممانعت از دیپولاریزه شدن غشا میتوکندریایی، فعالیت محافظتی برای سلول های عصبی (Neuroprotective) دارد. به علاوه این مولکول تشکیل ROS (Reactive oxygen species) و رادیکال های هیدروکسیل را هم مهار کرده (۲۲) و در نتیجه باعث حفاظت سلول در برابر استرس های اکسیداتیو می شود (۲۳).

منشاء آلودگی ها در کشت سلولی های بنیادی: در پروتوکول های رایج تحقیقاتی برای ایجاد کنام سلول از فرآورده های بافتی حیوانی یا انسانی استفاده می شود. این فرآورده ها می توانند باعث انتقال میکروارگانیسم های زئونز یا برخی بیماری ها، در اثر آلودگی با باکتری ها، ویروس ها، پرئونها و سایر عوامل عفونی مثل بیماری آنسفالوپاتی (Transmissible Spongiform Encephalopathies (TSEs)) به گیرنده شوند (۱).

منابع اصلی آلودگی در سلول های بنیادی را می توان به صورت زیر

تقسیم بندی نمود:

این زمینه تا سال ۲۰۱۲ مورد بررسی قرار گرفت. در صورت وجود مقالات فارسی که خلاصه انگلیسی آن ها دارای یکی از کلید واژه های ذکر شده بود به متن مقاله فارسی مراجعه شد.

یافته ها

ویژگی های سلول های بنیادی: سلول های بنیادی دارای دو ویژگی اصلی هستند: اول، دارای ظرفیت بالایی برای خود نوزایی (self-renewal) هستند. خود نوزایی نوعی از تقسیم سلولی است که در آن یک یا هر دو سلول دختری حاصل تمایز نیافته باقی می ماند. این سلول ها می توانند سلول های بنیادی دیگری با توانایی تکثیر مشابه به عنوان سلول والد تولید کنند (۴). علاوه بر این، اکثر سلول های بنیادی بصورت پرتوان (Pluripotent) یا چندتوان (Multipotent) بوده و توانایی تولید دودمان های تمایز یافته مثل سلول های قلبی، عصبی، انسولین ساز و سایر سلول ها را دارند. تکثیر سلول های بنیادی بوسیله گروهی از مکانیسم های تنظیمی داخل و خارج سلولی کنترل می شود که به این محیط، کنام (niche) سلول بنیادی گفته می شود (۵). بر این اساس کنام می تواند خاصیت خود نوزایی را تسهیل کرده و تمایز در شرایط کشت آزمایشگاهی (ex-vivo) را کنترل نماید (۷).

فاکتورهای رشد و سایر عوامل موثر در پرتوانی و تمایز سلول های بنیادی جنینی، بخشی از کنام سلول بنیادی هستند (۸). از بین انواع مسیرهای سیگنالینگ موجود در سلول های بنیادی جنینی انسانی مسیرهای فاکتورهای رشد $TGF\beta$ (Transforming growth factor beta) ، FGF (Fibroblast growth factor) و Wnt در ایجاد خودنوزایی اثر بیشتری دارند. bFGF (Basic fibroblast growth factor) یک لیگاند در مسیر علامت دهی فیبروبلاستی است؛ براین اساس bFGF اگزوزن برای ایجاد و ادامه این خاصیت در سلول های بنیادی جنینی انسانی ضروری است (۹). اخیراً مسیرهای دیگری که خودنوزایی سلول های بنیادی را تنظیم می کنند، شامل hedgehog و Notch نیز در حال بررسی هستند. این مسیرها در تنظیم خودنوزایی سلول های بنیادی هماتوپویتیک، نورونی و پستانی نقش دارند. نبود کنام مناسب می تواند موجب بی نظمی در این مسیرها شده و باعث تشکیل تومور شود (۱۰).

تحقیقات اولیه در زمینه سلول های بنیادی بر روی سلول های حیوانی بخصوص سلول های بنیادی جنینی موش صورت گرفت؛ از این رو اصول و معیارهای کشت سلول با توجه به این سلول ها پایه ریزی شده است. پس از جداسازی سلول های بنیادی جنینی انسان از توده سلولی داخل بلاستوسیست در سال ۱۹۹۸، مطالعات بیولوژیکی و کاربردی برای استفاده از آنها افزایش یافت (۱۱). در طی بررسی ها تفاوت های مورفولوژیکی و رفتاری زیادی بین سلول های بنیادی جنینی موشی (mESCs) و انسانی (hESCs) مشاهده شد. سلول های بنیادی جنینی انسانی نسبت به سلول های بنیادی جنینی موشی در محیط کشت کندتر رشد کرده و به جای کلونی های کروی، کلونی های مسطح تولید می کنند. همچنین در حضور LIF (Leukemia inhibitory factor) نمی توانند حالت بدون تمایز خود را حفظ کنند (۱۲). سلول های بنیادی انسانی در سطح خود تعدادی از مارکرهای پرتوانی کلاسیک مثل OCT4 و alkaline phosphatase را بیان می کنند و همچنین سطح بالایی از فعالیت تلومراز را

و در نتیجه مانع استریل شدن با فیلترهای معمول کشت سلول می‌شوند. علاوه بر این، ذراتی مشابه با نانوباکترها (Nanobacteria like particles) در سرم و سایر محصولات خونی انسان یافت شده است (۳۱). در مقایسه با سایر باکتری‌ها، از بین بردن نانوباکترها به سختی صورت می‌گیرد. نانوباکترها به وسیله پنی سیلین، سفالوسپورین‌ها و ماکرولیدها و بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌های دیگر، دمای زیر ۹۱ درجه سانتیگراد (196 °F)، فریز کردن، دهیدراسیون و اشعه گاما زیر 15 Mrad کشته نمی‌شوند. علاوه بر این باکتری‌ها و ویروس‌های دیگر بر آنها بی‌اثرند. دوزهای بالای اشعه گاما یا آنتی‌بیوتیک‌های آمینوگلیکوزیدی فقط می‌توانند از تکثیر آنها جلوگیری کند. نانوباکترها فقط بوسیله EDTA و تتراسیکلین از بین می‌روند (۳۲).

۴- آلودگی رده‌های سلولی: رده‌های سلولی می‌توانند یکی از منابع مهم آلودگی باشند. میزان آلوده‌کنندگی این سلول‌ها به نحوه کشت و سابقه بروز میکروارگانیسم‌ها در آن بستگی دارد. اکثر میکروارگانیسم‌های موجود در رده‌های سلولی و محیط‌های کشت، پاتوژن‌های انسانی فرصت‌طلب هستند که بطور طبیعی در پوست انسان، مخاط و اوروفارنکس زندگی می‌کنند و در محیط وجود دارند. بنابراین این میکروارگانیسم‌ها می‌توانند به‌عنوان یک منبع نهفته همراه هوا منتقل شوند و بر سطح محیط کشت سلول بنشینند و آن را آلوده نمایند (۳).

گزارش‌های زیادی در مورد آلودگی میکروبی رده‌های سلولی وجود دارد. باکتری‌ها (به‌خصوص مایکوپلاسماها)، قارچ‌ها، مخمرها و ویروس‌ها، آلوده‌کننده‌های اصلی رده‌های سلولی هستند (۳۳). آلودگی باکتریایی (بجز مایکوپلاسما) و قارچی معمولاً باعث افزایش ناگهانی کدورت و تغییر رنگ محیط کشت می‌شوند (۲۵). این تغییر رنگ در اثر تغییر pH و تخریب سلول‌ها است (۳۴). با اینکه رعایت اصول اولیه کشت سلول باعث کاهش میزان آلودگی باکتریایی و قارچی می‌شود، با این حال مایکوپلاسماها هنوز به‌عنوان معضلی اساسی در کشت سلول‌های بنیادی مورد بحث می‌باشند.

مایکوپلاسما که برای اولین بار در سال ۱۹۵۶ از کشت سلولی جدا شد، مربوط به رده Mollicutes می‌باشد. این رده دارای میکروارگانیسم‌های پارازیتی است که می‌توانند خارج یا داخل سلولی باشند. مایکوپلاسماها جزء کوچک‌ترین پروکاریوت‌ها (۰/۲-۰/۸ μm) هستند؛ به بتالاکتام‌ها مقاوم بوده و می‌توانند از فیلترهای 0.45 μm عبور کنند (۳۵).

به‌طور معمول میزان آلودگی در کشت‌های اولیه سلول ۱٪ و در پاساژهای ابتدایی ۵٪ است. این مقدار در رده‌های سلولی با کشت پیوسته، ۳۵-۱۵٪ می‌باشد؛ اما مقادیر بیشتر نیز گزارش شده است. سطح آلودگی در کشت‌های سلول یوکاریوتی آلوده شده با مایکوپلاسما حدود ۱۰^۶-۱۰^۸ ارگانیسم در هر میلی‌لیتر است (۳۵). عوارض آلودگی با مایکوپلاسماها قابل پیش‌بینی نیست؛ اما می‌تواند بر نرخ رشد، ساختار کروموزومی، سنتز اسیدهای نوکلئیک و اسیدهای آمینه، متابولیسم و تغییرات دیواره سلولی اثر بگذارد و همچنین نتایج تکنیک‌های شناسایی را تغییر دهد. ارگانیسم‌های آلوده‌کننده رده‌های سلولی عموماً از اعضای خانواده‌های Mycoplasmataceae و Acholeplasmataceae هستند. گرچه حداقل ۲۰ گونه از این خانواده‌ها از رده‌های سلولی جدا شده است، اما رایج‌ترین گونه‌ها Mycoplasma fermentans, M. orale, M. hyorhina و Brown و همکارانش M. hyorhina را هم جزء آلوده‌کننده‌های

۱- دهنده‌های سلول بنیادی: منابع متعددی برای سلول‌های بنیادی وجود دارد که میزان تمایز در آنها متفاوت است. این منابع می‌توانند به‌صورت بزرگسال باشند و از مغز استخوان یا اعضا خاصی تهیه شوند و یا در حالت جنینی و از خون بند ناف یا جنین‌های سقط شده فراهم شوند (۲۴). همه سلول‌های انسانی (به‌ویژه سلول‌های جنسی) توانایی انتقال بیماری‌های عفونی را دارند. بنابراین افراد دهنده سلول باید از نظر آلودگی‌های ویروسی و غیرویروسی بررسی شوند. اما به‌علت وجود دوره نهفتگی (window period) در تعدادی از این عفونت‌ها، تشخیص آنها با استفاده از پاسخ‌های آنتی‌بادی ممکن نیست (۲۵).

۲- آلودگی‌های لایه مغزی: لایه مغزی که به‌طور معمول در کشت سلول‌های بنیادی برای ایجاد کنام مناسب استفاده می‌شود، دارای منشأ حیوانی (موشی) است. از این‌رو موجب آلودگی سلول‌های بنیادی جنینی انسانی می‌شود. در صورت استفاده از این سلول‌ها در سلول درمانی، پاتوژن‌های حیوانی به انسان منتقل می‌شوند (۲۶). همچنین نشان داده شد که سلول‌های بنیادی جنینی انسانی بعد از رشد بر روی لایه مغزی، سیالوپروتئین غیر انسانی بیان می‌کنند که باعث تحریک سیستم ایمنی انسان می‌شود (۲۷).

هر عامل زئون می‌تواند باعث مرگ گیرنده شود و در صورت ورود به ژنوم انسان باعث ایجاد بیماری ناشناخته انسانی وسیعی در جامعه گردد (۱). ژنوم موش سکناس‌های وابسته به رتروویروس‌ها را در درون خود کد می‌کند (۲۸). رتروویروس‌هایی شناخته شده‌اند که می‌توانند وارد DNA ژنومی میزبان شوند و به نسل‌های بعدی انسان انتقال پیدا کنند؛ که این نوع انتقال می‌تواند اثرات مخربی بر فرد گیرنده و جمعیت وسیعی از افراد جامعه داشته باشد (۳). علاوه بر این گروهی از ویروس‌های موشی مثل سیتومگالوویروس، آدنوویروس، ویروس پنهونی، ویروس اکرومیلیا و رتروویروس موش سوری و تولان و کیلام ویروس موش صحرایی شناسایی شده‌اند که جزء عوامل بیماری‌زا نیستند اما می‌توانند به‌صورت ژنومی، سلول‌های انسان و پستانداران را آلوده کنند و بر آنها اثر بگذارند (۲۹). وجود هر کدام از این عوامل مانع استفاده درمانی از این سلول‌ها می‌شود (۲۴). از این‌رو، روش‌های حذف یا جایگزینی لایه مغزی بسیار مورد توجه است. اما حذف این لایه از محیط کشت، با ایجاد تغییر در کنام، سلول‌های بنیادی جنینی انسانی را برای تمایز خود به خودی مستعد می‌سازد (۲۹). برای رفع این مشکل روش‌های مختلفی در حال مطالعه است. به‌طور کلی این روش‌ها سیستم‌های تغذیه‌ای کارآمدتری هستند که در ادامه مورد بحث قرار می‌گیرند.

۳- آلودگی‌های سرم: سرم مورد استفاده در کشت سلول‌های بنیادی اغلب منشأ غیرانسانی دارد. سرم گاوی که معمولاً استفاده می‌شود، می‌تواند به‌صورت بارز یا نهفته، منبع آلودگی‌های زئون، ویروسی و پریونی باشد و حتی باعث تحریک پاسخ ایمنی به‌وسیله پروتئین‌های خارجی شود. برای مثال آپروتینین موجود در سرم گاوی، که خود به‌عنوان سوبسترای برای کشت سلول استفاده می‌شود، باعث افزایش خطر آلودگی میکروبی، ویروسی (مثل پاروویروس‌ها) و یا پریونی می‌شود. علاوه بر این خود آپروتینین گاوی خالص، به‌عنوان یک منبع ایجاد آلرژی و حتی آنافیلاکسی کشنده ثبت شده است (۱).

نانوباکترها یکی دیگر از عوامل آلوده کننده سرم (FBS) می‌باشند. این میکروارگانیسم‌ها کوچکترین باکتری‌های دارای دیواره هستند که به‌علت ویژگی‌های غیرطبیعی، با روش‌های معمول به‌سختی جدا می‌شوند. اندازه آنها حدود 0.05-0.5 μm است و می‌توانند از فیلترهای 0.2 μm عبور کنند (۳۰)

(۲۹). بنابراین امروزه علاوه بر پاسخ های آنتی بادی، از روش های پیشرفته تری برای شناسایی اسید نوکلئیک آنها (مثل PCR)، استفاده می شود (۲۶). عوامل ایجاد کننده بیماری های انسانی که می توانند بوسیله خون و بافت منتقل شوند و تست های تشخیصی آنها، بیان شده است (جدول ۱). FDA پیشنهاد کرده است سلول ها و بافت های مربوط به سیستم تناسلی از نظر نایسریا گونه و کلامیدیا تریکوماتیس و سایر بیماری هایی که از طریق جنسی منتقل می شوند، نیز بررسی شوند.

جدول ۱: نمونه هایی از آلودگی ها و تست های شناسایی آنها در بافت های مورد استفاده

آلودگی	تست های تشخیصی
اچ ای وی-۱	Anti-HIV-1 ^۱ ، تست اسید نوکلئیک
اچ ای وی-۲	Anti-HIV-2، تست اسید نوکلئیک
B ویروس هپاتیت	HBsAg , anti-core HBc , تست اسید نوکلئیک
C ویروس هپاتیت	Anti-HCV، تست اسید نوکلئیک
HTLV-1	Anti-HTLV-1
HTLV-2	Anti-HTLV-2
سایتمگالو ویروس	IgG anti-CMV
اِشْتِین بار ویروس	تست اسید نوکلئیک
تریپونما پالیدوم	TPHA
نایسریا گونه ^۲	کشت باکتری
کلامیدیا تریکوماتیس ^۲	IgG anti-chlamydia
Transmissible spongiform encephalopathies (TSEs)	وسترن بلات، تست اسید نوکلئیک

۱. NAT, Nucleic Acid Test (تست اسید نوکلئیک)

۲. برای دهنده های سلول های جنسی

ایجاد تغییر در بستر کشت: برای حذف خطرات لایه مغذی موشی روش های جایگزین زیادی پیشنهاد شده است. یکی از این روش ها استفاده از سلول های STO است. STO، رده سلولی نامیرایی از فیبروبلاست جنینی موش (mEFCs) است که به آسانی تکثیر می شود. علی رغم اینکه این سلول ها دارای منشا موشی هستند، اما آلودگندگی آنها به شدت کاهش یافته است (۴۳). تهیه و نگهداری این سلول ها برای استفاده به عنوان لایه مغذی ساده تر از mEFCs است (۴۴). به علاوه، این سلول ها می توانند LIF تولید کنند. سلول های بنیادی کشت شده بر روی STO، پرتوان، تمایز نیافته، دارای مارکرهای سطحی و فاقد ناهنجاری در کاربوتایپ هستند؛ اما در کشت بدون لایه مغذی و به صورت condition medium با STO تمایز سلولی افزایش می یابد (۴۵).

استفاده از condition medium یکی از روش هایی است که در آن توسعه سلولی در غیاب لایه مغذی انجام می گیرد. این محیط معمولاً به وسیله

اصلی می دانند (۳۶). در نتایج ارائه شده دیگری حدود ۹۵-۹۰٪ آلودگی های ایجاد شده مربوط به ۶ گونه است که علاوه بر گونه های ذکر شده، گونه M. hominis هم وجود دارد. M. orale، M. fermentaus و M. Hominis گروه مایکوپلاسمای انسانی را تشکیل می دهند. M. orale شایع ترین گونه مایکوپلاسماست، که در حفره دهانی انسان وجود دارد و حدود ۴۰-۲۰٪ آلودگی های کشت سلولی را ایجاد می کند. M. arginini و A. laidlawii منشا گاوی داشته و M. hyorhinitis در حفره بینی خوک زندگی می کند (۳۵). منابع اصلی آلودگی مایکوپلاسمها، نمونه بافتی مورد استفاده (ورود کشت سلولی یا لاین سلولی)، سرم، محیط آزمایشگاه و تماس انسانی است (۳۳ و ۳۵).

۵- عوامل محیطی و شرایط کار: منبع دیگر آلودگی، افرادی هستند که

با کشت های سلولی در تماس هستند. در این نوع آلودگی منبع، میکروارگانیسم های ساپروفیت موجود در فلور پوست و دستگاه تنفس انسان است. این افراد می توانند یکی از منابع مایکوپلاسمها هم باشند (۳۵). انسان ها صدها و گاهی هزاران باکتری را در هر دقیقه در هوا پخش می کنند که این آلودگی می تواند از طریق هوا، لباس، افراد و زمین منتقل شود. آلودگی ابزار و وسایل مورد استفاده مثل ظرف های کشت، پیپت ها و سایر وسایل مورد استفاده، منبع دیگری از آلودگی هستند. استفاده مجدد از وسایل استفاده شده و عدم انجام صحیح روش های مختلف استریلیزاسیون مثل اتوکلاو یا حرارت خشک، می تواند موجب افزایش آلودگی شود (۳۴).

۶- سایر منابع آلودگی: علاوه بر عوامل ذکر شده، مواد دیگری در

کشت سلول استفاده می شود. مقدار این مواد بسیار کم بوده ولی از آنجا که اغلب منشا حیوانی دارند، می توانند خطر ساز باشند. یکی از این مواد آنزیم هایی مانند پیپسین، تریپسین و کلاژناز هستند که برای جداسازی سلول های بنیادی از بستر کشت استفاده می شوند. استفاده از این آنزیم ها خطر ایجاد ناهنجاری های ژنتیکی را در کشت برون تن نیز افزایش می دهد (۳۷).

فاکتورهای رشد مثل TGF (transforming growth factor)، LIF، bFGF، BMP (bone morphogenic protein)، EGF (epidermal growth factor)، RA (retinoic acid) با فعال سازی مسیرهای مختلف علامت دهی در ایجاد انواع سلول های بنیادی نقش دارند (۳۸ و ۳۹). از آنجا که این مواد منشا غیر انسانی دارند می توانند منبعی برای ایجاد آلودگی باشند (۴۰). مواد زیستی (Biomaterials) مورد استفاده در کشت سلول هم می توانند در انتقال آلودگی نقش داشته باشند. این مواد دارای پروتئین های زئون هستند که می تواند باعث ایجاد پاسخ ایمنی فرد گیرنده شود (۴۱). برای مثال کلاژنی که به عنوان داربست در کشت سلول استفاده می شود، اغلب منشا حیوانی داشته و می تواند باعث تحریک سیستم ایمنی و آلودگی گیرنده شود (۴۲).

روش های مورد استفاده برای حذف آلودگی

۱- بررسی دهنده های سلول بنیادی: جلوگیری از انتقال عوامل

بیماری زا از فرد دهنده بهترین راه برای آلوده نشدن گیرنده سلول بنیادی است. بنابراین بررسی دقیق فرد دهنده اهمیت زیادی دارد. بررسی بیماری های دوران کودکی، سطح بهداشت محیط، منطقه جغرافیایی محل سکونت و شیوه زندگی فرد دهنده، می تواند در شناسایی عفونت های باز و نهفته فرد دهنده سلول موثر باشد

استفاده از میکروگراویتی بدون حضور LIF یکی دیگر از این روش‌ها است، که در آن سلول‌های بنیادی بر روی یک محیط سه بعدی و با استفاده از میکروگراویتی کشت داده می‌شود. این محیط باعث تکثیر بدون تمایز سلول‌های بنیادی انسانی می‌شود. به‌علاوه در این روش بر خلاف سایر روش‌ها نیازی به پوشاندن بستر کشت با مواد مشتق شده حیوانی مثل کلاژن یا ژلاتین نیست (۴۹). با اینکه نشان داده شده است که سلول‌های بنیادی جنینی انسانی رشد کرده بدون لایه مغذی می‌توانند مارکرهای SSEA4, SSEA3, Tra-1-60, Tra-1-81 و Nanog را بیان کنند، اما بنظر می‌رسد که استفاده از این شرایط در حالت بهینه نیاز به بررسی‌ها و مطالعات دقیق‌تر و جامع‌تری دارد. به‌عنوان مثال نشان داده شده است که کشت بدون لایه مغذی می‌تواند باعث ناهنجاری در کاربوتایپ سلول‌های بنیادی شود (۴۴).

۲- ایجاد تغییر در سرم گاوی: با شناسایی خطرات و آلودگی‌های سرم، روش‌هایی برای حذف و جایگزینی سرم پیشنهاد شد. در بعضی از این روش‌ها ترکیبی از فاکتورهای رشد و مواد مورد نیاز سلول، به‌جای سرم مورد استفاده قرار می‌گیرد. مثلاً گاهی ترکیبی از انسولین، ترنسفرین و سلیوم (ITS) به جای سرم استفاده می‌شود (۳۹).

KSR (Knock-out Serum Replacement) در سال ۱۹۹۸ برای نگهداری سلول‌های بنیادی جنینی در محیط کشت معرفی شد. گرچه ترکیب شیمیایی آن هنوز دقیقاً مشخص نشده است، اما تقریباً همه فاکتورهای رشد و تمایز موجود در آن شناخته شده است. تکثیر سلول در محیط حاوی سرم سریع‌تر از محیط حاوی KSR است. از KSR برای استقرار لاین‌های سلولی و منجمد کردن سلول‌ها هم استفاده می‌شود. همچنین به‌عنوان یک محیط انتقالی برای تزریق سلول‌های بنیادی جنینی به بلاستوسیت کاربرد دارد (۲۱).

استفاده از محیط بدون سرم یکی دیگر از راه‌های مورد بررسی برای کشت سلول‌های بنیادی است. بر اساس برخی مطالعات در شرایط فاقد سرم (Serum-free) کاربوتایپ طبیعی و مارکرهای پرتوانی حفظ می‌شوند. اما مطالعات دیگر نشان داده‌اند که در محیط بدون سرم، سلول‌ها بنیادی رشد بدون تمایز ندارند و تکثیر آنها تاحدی کاهش می‌یابد (۵۰). همچنین گزارش شده است که محیط‌های فاقد سرم نمی‌توانند بدون اضافه کردن سیتوکین‌ها و یا فاکتورهای رشد، باعث تکثیر سلول‌های بنیادی جنینی انسانی شوند. ازسوی دیگر سرم باعث نوسانات کلسیم درون سلولی می‌شود که برای تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی ضروری است (۳). بنابراین به بررسی‌های بیشتر در این زمینه برای رفع مشکلات موجود نیاز است.

۳- استفاده از محصولات انسانی به عنوان لایه مغذی و سرم:

استفاده از بافت‌های انسانی مثل پرده آمنیون (۵۱ و ۵۲)، پوست و عضلات جنینی، foreskin (۳۲)، سلول‌های عضلانی و لوله فالوپ، سلول‌های مغز استخوان و سلول‌هایی با منشأ جفت (۵۳) به‌عنوان لایه مغذی و استفاده از سرم انسانی (ایجاد شرایط Xeno-free) احتمال بروز خطرات جانبی را کم می‌کند یا از بین می‌برد. تحقیقات نشان داده سلول‌های بنیادی جنینی انسانی رشد کرده در سرم انسانی تمام خواص سلول‌های بنیادی جنینی را بعد از کشت‌های طولانی حفظ می‌کنند و توانایی رشد نامحدود و بدون تمایز با حفظ کاربوتایپ طبیعی را دارند (۱۷). برای مثال از رده سلولی foreskin به‌عنوان بستری برای کشت سلول‌های بنیادی جنینی انسانی استفاده کرده‌اند. سلول‌های رشد کرده در این شرایط توانستند پس

یک شب انکوباسیون محیط کشت رشد (مانند DMEM و RPMI) با لایه مغذی از فیبروبلاست جنینی موش تهیه می‌شود. این دو لایه با هم تماس داشته و قبل از استفاده برای کشت سلول‌های بنیادی جنینی انسانی جدا می‌شوند (۳۷). بررسی‌ها نشان می‌دهد پروتئین‌های زیادی از لایه مغذی موشی به محیط کشت ترشح می‌شود. این پروتئین‌ها بخشی از کنام سلول هستند و در رشد و تمایز سلول‌ها نقش دارند (۲۰).

در اولین سیستم فاقد لایه مغذی از ماتریژل (Matrigel) استفاده شد که دارای منشأ موشی و حاوی ماتریکس خارج سلولی و فاکتورهای رشد است (۴۶). ماتریژل یک اسم تجاری برای ماتریکس خارج سلولی با منشأ تومور Engelbreth-Holm-Swarm است. این ماتریکس حاوی مقدار زیادی لامینین و کلاژن است و می‌تواند رشد بدون تمایز سلول‌های بنیادی جنینی انسانی را حفظ کند (۲۶). علی‌رغم پیشرفت‌های صورت گرفته همچنان ماتریژل دارای منشأ حیوانی است و فاکتورهای رشد محلول مورد نیاز نیز به‌وسیله یک شب انکوباسیون با فیبروبلاست جنینی موش یا سایر انواع سلول‌های لایه مغذی تهیه می‌شود (۴۴). استفاده از یک لایه منفذدار بین سلول‌های بنیادی جنینی انسانی و سلول‌های لایه مغذی در هنگام کشت، باعث کاهش قابل توجه آلودگی‌های سلول‌های بنیادی جنینی انسانی از طریق تماس مستقیم با سلول‌های لایه مغذی می‌شود. همچنین، استفاده از لایه منفذدار، جدا کردن سلول‌های بنیادی جنینی انسانی از لایه مغذی را بدون نیاز به آنزیم تسهیل می‌کند. میزان رشد سلول‌های بنیادی جنینی انسانی بر روی این لایه به اندازه و تراکم منافذ بستگی دارد. اگر اندازه منافذ مساوی یا کمتر از ۱ میکرومتر باشد اجازه عبور مواد و رشد مناسب طی پاساژهای متوالی را نمی‌دهد؛ و چنانچه اندازه منافذ از ۳ میکرومتر بیشتر باشد، سلول‌های لایه مغذی می‌توانند به لایه بالایی مهاجرت کرده و سلول‌ها را آلوده کنند (۴۷).

حذف لایه مغذی و استفاده از LIF روش دیگری برای کشت است. در این روش از یک محیط کشت کاملاً مشخص حاوی جایگزین سرم (serum replacement)، LIF، bFGF، TGFβ1 و فیبرونکتین انسانی استفاده می‌شود. سلول‌های بنیادی جنینی انسانی رشد کرده در این شرایط کاملاً طبیعی و بدون تغییر در کاربوتایپ هستند. از ویژگی‌های این روش استفاده از یک سیستم کاملاً مشخص برای کشت سلول‌های بنیادی جنینی انسانی و کاهش اثر پاتوژن‌های حیوانی بر روی سلول‌های بنیادی جنینی انسانی است (۴۶). اما همانطور که ذکر شد، LIF انسانی، علی‌رغم فعال کردن مسیر طبیعی علامت‌دهی stat3/gp130، نمی‌تواند خاصیت خود نوزایی را بدون ایجاد تمایز در سلول‌های بنیادی جنینی انسانی حفظ کند (۴۸). از این‌رو مطالعات بیشتر و دقیق‌تری در این زمینه مورد نیاز است. یکی دیگر از روش‌های کشت، استفاده از فاکتورهای رشد در نبود لایه مغذی است. در این روش از ترکیبی از فاکتورهای رشد مثل LIF، TGF-β1، noggin و bFGF یا سطح بالایی از bFGF به‌تنهایی استفاده می‌شود. بعضی از این مکمل‌ها می‌توانند مسیر Wnt را فعال کنند (۱۹)، که ممکن است برای نگهداری سلول‌های بنیادی جنینی انسانی به‌صورت تمایز نیافته در نبود لایه مغذی کافی باشد (۳۷). Noggin و bFGF به‌عنوان دو فاکتور رشد مهم، برای حفظ پرتوانی سلول‌های بنیادی جنینی انسانی در نبود لایه مغذی و Condition Medium کافی بوده و در خاصیت self-renewal نقش دارند (۹).

سلول های بنیادی جنینی انسانی از آنها دشوار است (۴۷) و ممکن است به طور همزمان با سلول های بنیادی جنینی انسانی، سلول های لایه مغذی نیز رشد کنند (۴۶). مشکل دیگر این محصولات احتمال انتقال عوامل عفونت زا از فرد دهنده لایه مغذی انسانی به فرد گیرنده سلول است (۵۳). با توجه به موارد ذکر شده، تحقیقات در این زمینه تا پیدا کردن یک روش مناسب، همچنان مورد نیاز است.

۴- استفاده از محیط فاقد لایه مغذی و سرم: استفاده از داربست

منفذدار سه بعدی روشی برای کشت سلول است که در آن از پلیمرهای طبیعی کیتوزان و آلژینات استفاده می شود. این پلیمرها که با پیوندهای یونی به هم متصل اند، دارای سازگاری زیستی (biocompatibility) و تخریب پذیری زیستی (biodegradability) هستند. این پلیمرها ساختاری پایدار دارند و کمترین تحریک سیستم ایمنی را موجب می شوند. قرار دادن فاکتورهای رشد درون این داربست (encapsulation)، یک منبع قابل استفاده از این فاکتورها را، در شرایط درون تن و برون تن، فراهم می کند (۵۶).

یکی دیگر از روش های بکار گرفته شده، استفاده از سطح مصنوعی برای کشت سلول های بنیادی جنینی انسانی است. عملکرد اصلی این محیط ها فراهم کردن سطحی است که اتصالات ناشی از اتصالات اینتگرینی سلول را حمایت می کند. این اتصال قوی به بستر، سلول های بنیادی جنینی انسانی را در برابر آپوپتوز (در اثر اتصال کم سلول بنیادی با سوبسترای ماتریکس خارج سلولی) محافظت می کند. این محیط ها برخلاف سوبستراهای طبیعی و با منشا زیستی عوامل عفونت زا و بیماری ها را انتقال نمی دهند و سیستم ایمنی میزبان را تحریک نمی کنند. در بعضی مطالعات از پیپتیدهایی با سکانس های لامینین استفاده شده است، اما این پیپتیدها با اینتگرین پیوند تشکیل نمی دهند و برای کشت طولانی مدت مناسب نیستند. پیپتیدهای سنتتیک حاوی (arginine- RGD) (glycine-aspartate) هم مورد مطالعه قرار گرفته اند که توانایی اتصال به ماتریکس خارج سلولی و اینتگرین را دارند. اخیراً محیط جدیدی معرفی شده که در آن تمایل پیوند دی سولفیدی پیپتید RGD افزایش یافته و CRGDC (cysteine-arginine-glycine-aspartate- cysteine) حلقوی تولید شده است. نشان داده اند که سلول های بنیادی جنینی انسانی کشت شده بر روی آن خصوصیات پرتوانی و خودنوزایی و تمایز در شرایط برون تن را حفظ می کنند (۵۷).

۵- شناسایی و حذف آلودگی در رده سلولی: آلودگی رده سلولی چه

با منشا دهنده باشد و چه در حین انجام کار ایجاد شود، می تواند به طور نهفته در حین فراوری تکثیر شده و به فرد گیرنده منتقل شود. به این دلیل ایمنی و صحت سلول ها باید در بانک های سلول های بنیادی تضمین شود و تمام مراحل تهیه، فراوری، آزمایش، نگهداری، ذخیره سازی و توزیع آنها تحت کنترل باشد؛ تا از انتقال بیماری جلوگیری شود (۲۶). بکارگیری صحیح اصول کشت سلول، نحوه استریل کردن سرم، محیط کشت و سایر مواد مورد استفاده، به طور مشخصی می تواند میزان آلودگی را کاهش دهد (۵۸). بنابراین بهتر است رده های سلولی ورودی به آزمایشگاه تا مشخص شدن نتیجه منفی تست (آلودگی با مایکوپلازما) برای مدتی در قرنطینه نگهداری شوند (۳۳).

از آنجاییکه مهمترین آلودگی رده های سلولی مایکوپلازماها هستند، شناسایی و حذف آنها می تواند در بالا بردن کیفیت سلول ها تاثیر زیادی داشته باشد. روش های زیادی برای شناسایی آلودگی با مایکوپلازما وجود دارد. برخی از

از ۹ ماه مارکرهای عدم تمایز را بیان و کاربوتایپ طبیعی خود را حفظ کند. در بررسی های دیگر انواع مختلفی از رده های سلولی انسانی مورد استفاده قرار گرفته اند که در همه این موارد کشت سلول های بنیادی جنینی انسانی تا ۲۰ پاساژ بدون تمایز صورت گرفته است (۴۴). مغز استخوان منبع دیگری است که می تواند به عنوان بستر کشت استفاده شود و رشد بدون تمایز با کاربوتایپ طبیعی را برای ۹-۱۳ پاساژ حفظ کند (۵۴). علاوه بر این، روش های دیگری نیز برای استفاده از محصولات انسانی وجود دارد. استفاده از سرم انسانی به همراه پروتئین های گیاهی یکی از این روش ها است. نتایج نشان داده که رشد و تمایز سلول های بنیادی مزانشیمی انسانی در این محیط، قابل مقایسه با رشد این سلول ها در سرم گاوی است. (۳). پرده آمینون به علت ویژگی های خاص خود می تواند جایگزین مناسبی برای لایه های مغذی باشد (۵۷-۵۵). از غشا آمینونی (محیط کشت Epilife) به همراه سرم اتولوگ انسانی برای کشت سلول های بنیادی قرنیه استفاده شده است. اما استفاده از این نوع سرم در افراد دارای بیماری های زمینه ای، خطرناک است. در این روش هر چند امکان آلودگی بوسیله عوامل با منشا انسانی وجود دارد، اما خطر بیماری های نهفته قابل انتقال کاهش پیدا کرده است (۵۴).

لایه مغذی اتوژن (autogenic feeder) یکی از جایگزین های لایه مغذی موشی است. منشا این لایه سلول های بنیادی جنینی انسان است. در ابتدا این لایه به همراه سرم گاوی مورد استفاده قرار می گرفت، که در آن صورت شرایط xeno-free نبود. اما بعد از آن روشی ارائه شده که در آن کشت بدون عوامل خارجی یا با حداقل میزان آن انجام می شد. در این روش لایه مغذی اتوژن از سلول های بنیادی جنینی، در محیط حاوی سرم انسانی KFM (keratinocyte free medium) مشتق می شوند. این لایه مغذی توانایی نگهداری سلول های بنیادی جنینی انسان، در حالت بدون تمایز را دارد، اما در بعضی موارد خاصیت توانایی تکثیر را در سلول ها حفظ نمی کند. از مشکلات دیگر این روش آن است که جایگزین سرم استفاده شده در آن هنوز دارای اجزاء حیوانی است و ترکیب سرم انسانی مورد استفاده از گروهی به گروه دیگر متفاوت است؛ بنابراین به یک منبع ثابت و استاندارد برای سرم انسانی نیاز است. علاوه بر این سلول های بنیادی جنینی انسانی که به عنوان منشا لایه مغذی استفاده می شوند، از زمان جداسازی تا تولید لایه مغذی اتوژن، در معرض محصولات حیوانی قرار دارند. در نتیجه برای رفع این مشکلات به تحقیقات بیشتر و دقیق تری نیاز است (۵۳).

فیبروبلاست های نوزادی و بزرگسال انسان می تواند به عنوان لایه مغذی برای سلول های iPS (Induced Pluripoten Stem) انسانی استفاده شوند. سلول های iPS تهیه شده در این شرایط بعد از حداقل ۱۹ پاساژ، مارکرهای سطحی و کاربوتایپ طبیعی و پرتوانی خود را حفظ می کنند. در این روش از فیبروبلاست یک فرد به عنوان منبعی برای تهیه سلول های غذا دهنده و تهیه iPS استفاده می شود، که این موضوع برای استفاده های کلینیکی اهمیت دارد. اما نکته قابل توجه در این روش این است که هنوز بعضی مکمل های حیوانی مثل آلبومین، تریپسین و انسولین در این روش به کار می رود (۵۵).

تمام روش های ذکر شده دارای فوایدی هستند، اما هیچ کدام از این روش های کشت به طور کامل فاقد مواد حیوانی نیستند. در اغلب موارد از سرم گاوی برای استقرار سلول های لایه مغذی (۳۴) و یا به عنوان مکمل محیط کشت استفاده شده است (۳). مشکل اصلی لایه مغذی انسانی این است که جدا کردن

برنامه‌های کنترل کیفیت باید مطابق با شرایط (Good GMP Manufacturing Practice) باشد (۶۳). بررسی‌ها نشان می‌دهد هر چه این شرایط با دقت بیشتری رعایت شود، میزان آلودگی کمتر خواهد شد (۳۴).

نتیجه‌گیری

هر چند آلودگی کشت‌های سلولی در همه آزمایشگاه‌ها وجود دارد، اما این آلودگی‌ها در محصولات سلولی که در آزمایش‌های بالینی و سلول درمانی استفاده می‌شوند، غیرقابل قبول است. بانک‌های سلول‌های بنیادی برای فراهم کردن یک منبع قابل تکثیر و قابل اطمینان از رده‌های سلول‌های بنیادی تشکیل شده‌اند و وظیفه تامین مواد اولیه برای استفاده در درمان انسان و تضمین اعتبار، ثبات و کارایی آنها را بر عهده دارند. تمام فرآورده‌های رده‌های سلولی باید از نظر پاتوژن‌های انسانی و حیوانی بررسی شده و کیفیت آنها تضمین شود. بررسی منظم این سلول‌ها به کشف آلودگی در مراحل اولیه کمک می‌کند. بنابراین بجز انجام روش‌های رایج کنترل، انجام اقدامات مناسب برطبق برنامه‌های تضمین کیفیت میکروبی، محیطی و biosafety اجباری است.

در حال حاضر روش‌های کشت فراوانی توسط محققین ارائه و بررسی شده است. اما تاکنون روش کارآمدی که به‌طور کامل فاقد اجزاء حیوانی باشد و بتوان از آن برای کشت همه نوع سلول استفاده کرد، شناخته نشده است. بیشتر روش‌ها بر کشت نوع خاصی از سلول‌های بنیادی تاکید دارند. استفاده از لایه مغذی انسانی و محیط بدون سرم هم به‌عنوان یک راه حل موقتی برای تهیه سلول‌های بنیادی جنینی انسانی با کاربرد کلینیکی است. به‌نظر می‌رسد بهترین راه برای جلوگیری از انتقال آلودگی‌های انسانی یا حیوانی پیدا کردن جایگزین‌های مناسب برای استفاده در کشت سلول‌های بنیادی جنینی انسانی است. در نتیجه تلاش بر این است، که با ابداع روش‌های جدید، خطرات ناشی از پروتوکول‌های موجود برای کشت سلول‌های بنیادی انسان را کاهش داده و فرآورده‌ای مناسب جهت استفاده در سلول درمانی و درمان‌های ترمیمی فراهم گردد.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از آقای بهرام جامبر نوشین که این مقاله را بازخوانی نمودند تشکر و قدردانی می‌نمائیم. این تحقیق با حمایت ستاد توسعه سلول‌های بنیادی و مرکز تحقیقات نانوتکنولوژی پزشکی و مهندسی بافت دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی انجام شد.

این روش‌ها عبارت از: روش‌های ایمونولوژیکی، استفاده از میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM)، nucleic acid staining techniques, PCR (polymerase chain reaction, hybridization) است در گذشته از رنگ‌آمیزی با Hoescht 33258 و شمارش لاین‌های سلولی آلوده، و کشت میکروبی برای تشخیص آلودگی استفاده می‌کردند (۳۳). اما روش‌های معمول کشت حدود ۲۸ روز طول می‌کشد، از این‌رو از روش‌های سریع مثل NATs (۳۶) و PCR به عنوان جایگزین مناسبی برای آنها، در کنترل نمونه‌ها به‌خصوص بعد از تولید محصولات زیستی، استفاده می‌شود (۵۹ و ۶۰).

یکی از روش‌های رایج برای حذف و عدم ایجاد آلودگی در رده سلولی استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها در محیط کشت است. آنتی‌بیوتیک‌هایی مثل پنی‌سیلین و استرپتومایسین می‌توانند به میزان زیادی آلودگی‌ها را برطرف کنند. اما استفاده از آنتی‌بیوتیک لزوماً از رشد همه ارگانیسم‌ها جلوگیری نمی‌کند و فقط می‌تواند رشد ارگانیسم‌های مشخصی را مهار کند (نه اینکه آنها را حذف کند) در نتیجه این ارگانیسم‌ها زنده می‌مانند و در حین مراحل فرآوری به‌طور نهفته تکثیر شده و فرد گیرنده سلول را آلوده می‌کنند (۲۶۰). به هر حال استفاده مداوم از آنتی‌بیوتیک‌ها (مثل پنی‌سیلین / استرپتومایسین، جنتامایسین و...) در کشت‌های سلولی باعث افزایش میزان آلودگی با میکوپلاسما می‌شود؛ زیرا استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها می‌تواند آلودگی‌های نهفته و مخفی میکوپلاسما را افزایش دهند (۳۴۶۱). بنابراین توصیه می‌شود بر اساس برنامه‌های کنترل میکروبی و کنترل محیط در کشت سلول‌های بنیادی از محیط‌های کشت فاقد آنتی‌بیوتیک (۲) استفاده گردد تا از اثرات مخرب آنها در محیط کشت جلوگیری کرده و مانع مخفی شدن هرگونه آلودگی به خصوص میکوپلاسما شد. همچنین در محیط‌های کشت حاوی آنتی‌بیوتیک در پاساژهای متوالی، توصیه می‌گردد تا بعد از ۳ هفته، آنتی‌بیوتیک به مدت یک هفته از محیط کشت حذف شود تا آلودگی احتمالی بصورت نهفته مشخص گردد.

۶- از بین بردن آلودگی‌های محیطی: یکی از روش‌های بسیار موثر در کاهش آلودگی، جلوگیری از تماس محیط کشت و سلول‌ها با محیط آلوده است. وجود یک برنامه منظم و دقیق برای کنترل محیط می‌تواند به مقدار قابل توجهی از میزان آلودگی کم کند. استفاده از پروتوکول‌های استاندارد تعیین شده توسط فارماکوپه‌ها (مثل European pharmacopeia) می‌تواند تضمین کننده کیفیت محصولات سلولی باشد. محصولات سلولی باید در اتاق تمیز (clean room) تولید شوند (۶۲) و روند استانداردسازی و روش‌های اجرای

The Sources of Microbial Contamination of Stem Cells for Application in Cell Therapy

H. Niknejad (PhD)^{1, 2*}, F. Asi Tehrani (MSc)¹, H. Peirovi (MD)¹, H. Abolghasemi (MD)²

1. Nanomedicine and Tissue Engineering Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, I.R. Iran

2. Department of Tissue Engineering, School of Advanced Technologies in Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, I.R. Iran

J Babol Univ Med Sci; 16(Suppl 1); Winter 2014; PP: 95-105

Received: Jan 28th 2013, Revised: May 1st 2013, Accepted: Jul 10th 2013.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: Progress in medical sciences and technologies has made stem cells as a promising source of cell therapy of diseases. Many of researchers have focused on finding the optimum conditions for stem cell culture, to employ stem cells in cell therapy. Due to the capability of self-renewal and pluripotency, stem cells can give rise to progeny that either proliferate in an undifferentiated state or commit to a broad range of differentiated lineages, important for reconstruction of surrounding tissues. The adjacent microenvironment known as niche provides a complex molecular milieu that regulates the properties of stem cells in vivo. The main sources of stem cells contaminations will be discussed in this review.

METHODS: The present study is a literature search in PubMed, Science direct and Google scholar with the use of stem cells, microbial contamination and cell therapy as keywords. The results of animal and human studies published until 2012 in this field were considered.

FINDINGS: The main sources of stem cells contaminations include stem cell donor, feeder layer, animal sera, cell lines and environmental elements. Stem cells donors screening test, omission of feeder layer, application of serum replacements such as human serum albumin and optimization of cell culture conditions are some solutions to prevent stem cells contamination.

CONCLUSION: To maintain stem cells properties in vitro, it is necessary to simulate the niche in the cell culture; which contains inevitably animal and human products, might be resulted in contamination of stem cells. These cells can carry the potential to induce xenogenic microchimerism in recipients or disease transmission through contamination with bacteria, viruses and other infectious agents.

KEY WORDS: Stem cells, Microbial contamination, Cell therapy.

Please cite this article as follows:

Niknejad H, A. Tehrani F, Peirovi H, Abolghasemi H. The sources of microbial contamination of stem cells for application in cell therapy. J Babol Univ Med Sci 2014;16(Suppl 1):95-105.

*Corresponding Author; H. Niknejad (PhD)

Address: Nanomedicine and Tissue Engineering Research Center, Talghani Hospital, Velenjak St., Tehran, I.R. Iran

Tel: +98 21 22439847

E-mail: niknejad@sbmu.ac.ir

References

- 1.Schwab RI, Johnson TN, Harkin GD. Inherent risks associated with manufacture of bioengineered ocular surface tissue. *Arch Ophthalmol* 2006;124(12):1734-40.
- 2.Cobo F, Cortes JL, Cabrera C, Nieto A, Concha A. Microbiological contamination in stem cell cultures. *Cell Biol Int* 2007; 31(9):991-5.
- 3.Mannello F, Tonti G A. Concise review: No breakthroughs for human mesenchymal and embryonic stem cell culture: conditioned medium, feeder layer, or feeder-free; medium with fetal calf serum, human serum, or enriched plasma; serum-free, serum replacement nonconditioned medium, or ad hoc formula? All that glitters is not gold! *Stem Cells*. 2007;25(7):1603-9.
- 4.Tysnes BB, Bjerkvig R. Cancer initiation and progression: involvement of stem cells and the microenvironment. *Biochim Biophys Acta* 2007;1775(2):283-97.
- 5.Can A. Haematopoietic stem cells niches: Interrelations between structure and function. *Transfus Apher Sci* 2008; 38(3):261-8.
- 6.Grueterich M, Espana EM, Tseng SCG. Ex vivo expansion of limbal epithelial stem cells: amniotic membrane serving as a stem cell niche. *Surv Ophthalmol* 2003;48(6):631-46.
- 7.Dellatore SM, Garcia AS, Miller WM. Mimicking stem cell niches to increase stem cell expansion. *Curr Opin Biotechnol* 2008;19(5):534-40.
- 8.Dovey OM, Foster CT, Cowley SM. Histone deacetylase1 (HDAC1), but not HDAC2, controls embryonic stem cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107(18):8242-7.
- 9.Wang G, Zhang H, Zhao Y, et al. Noggin and bFGF cooperate to maintain the pluripotency of human embryonic stem cells in the absence of feeder layers. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;330(3):934-942.
- 10.Wicha M, Liu S, Dontu G. Cancer stem cells: an old idea--a paradigm shift. *Cancer Res* 2006;66(4):1883-90.
- 11.Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998;282(5391):1145-7.
- 12.Stojkovic M, Lako M, Strachan T, Murdoch A. Derivation, growth and applications of human embryonic stem cells. *Reproduction* 2004;128(3):259-67.
- 13.Burdon T, Smith A, Savatier P. Signalling, cell cycle and pluripotency in embryonic stem cells. *Trends Cell Biol* 2002;12(9):432-8.
- 14.Mitsui K, Tokuzawa Y, Itoh H, et al. The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell* 2003;113(5):631-42.
- 15.Xie CQ, Lin G, Yuan D, Wang J, Liu TC, Lu GX. Proliferative feeder cells support prolonged expansion of human embryonic stem cells. *Cell Biol Int* 2005;29(8):623-8.
- 16.Nieto A, Cabrera CM, Catalina P, et al. Effect of mitomycin-C on human foreskin fibroblasts used as feeders in human embryonic stem cells: Immunocytochemistry MIB1 score and DNA ploidy and apoptosis evaluated by flow cytometry. *Cell Biol Int* 2007;31(3):269-278.
- 17.McDevitt TC, Palecek SP. Innovation in the culture and derivation of pluripotent human stem cells. *Curr Opin Biotechnol* 2008;19(5):527-33.
- 18.Richards M, Tan S, Fong CY, Biswas A, Chan WK, Bongso A. Comparative evaluation of various human feeders for prolonged undifferentiated growth of human embryonic stem cells. *Stem Cells* 2003;21(5):546-56.
- 19.Xie CQ, Lin G, Luo K, Luo SW, Lu GX. Newly expressed proteins of mouse embryonic fibroblasts irradiated to be inactive. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;315(3):581-8.
- 20.Lim JW, Bodnar A. Proteome analysis of conditioned medium from mouse embryonic fibroblast feeder layers which support the growth of human embryonic stem cells. *Proteomics* 2002;2(9):1187-203.

- 21.Horii T, Nagoa Y, Tokunaga T, Imai H. Serum-free culture of murine primordial germ cells and embryonic germ cells. *Theriogenology* 2003;59(5-6):1257-64.
- 22.Kume T, Taguchi R, Katsuki H, et al. Serofendic acid, a neuroprotective substance derived from fetal calf serum, inhibits mitochondrial membrane depolarization and caspase-3 activation. *Eur J Pharmacol* 2006;542(1-3):69-76.
- 23.Takeda T, Akao M, Matsumoto-Ida M, et al. Serofendic Acid, a novel substance extracted from fetal calf serum, protects against oxidative stress in neonatal rat cardiac myocytes. *J Am Coll Cardiol* 2006;47(9):1882-90.
- 24.Gruen L, Grabel L. Concise review: Scientific and ethical roadblocks to human embryonic stem cell therapy. *Stem Cells* 2006;24(10):2162-9.
- 25.Cobo F, Stacey GN, Hunt C, et al. Microbiological control in stem cell banks: approaches to standardization. *Appl Microbiol Biotechnol* 2005;68(4):456-66.
- 26.Chase LG, Firpo MT. Development of serum-free culture systems for human embryonic stem cells. *Curr Opin Chem Biol* 2007;11(4):367-72.
- 27.Stewart R, Stojkovic M, Lako M. Mechanisms of self-renewal in human embryonic stem cells. *Eur J Cancer* 2006; 42(9):1257-1272.
- 28.Skottman H, Dilber MS, Hovatta O. The derivation of clinical-grade human embryonic stem cell lines. *FEBS Lett* 2006;580(12):2875-8.
- 29.Stacey GN, Cobo F, Nieto A, Talavera P, Healy L, Concha A. The development of feeder cells for the preparation of clinical grade hES cell lines: Challenges and solutions. *J Biotechnol* 2006;125(4):583-8.
- 30.Kajander EO, Ciftcioglu N. Nanobacteria: An alternative mechanism for pathogenic intra-and extra cellular calcification and stone formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95(5):8274-9.
- 31.Simonetti AB, Englert GE, Campos K, et al. Nanobacteria-like particles: A threat to cell cultures. *Braz J Microbiol* 2007;38(1):153-8.
- 32.Demir T. Is there any relation of nanobacteria with periodontal diseases? *Med Hypotheses* 2007;70(1):36-9.
- 33.Langdon SP. Cell culture contamination: an overview. *Methods Mol Med* 2004;88:309-17.
- 34.Mirjalili A, Parmoor E, Moradi Bidhendi S, Sarkari B. Microbial contamination of cell cultures: A 2 years study. *Biologicals* 2005;33(2):81-5.
- 35.Drexler HD, Uphoff CC. Mycoplasma contamination of cell cultures: Incidence, sources, effects, detection, elimination, prevention. *Cytotechnology* 2002;39(2):75-90.
- 36.Brown DB, Newman JA, Gutekunst JM, et al. Assay validation for rapid detection of mycoplasma contamination. *Bio Process Int* 2009;7(4):30-40.
- 37.Améen C, Strehl R, Björquist P, Lindahl A, Hyllner J, Sartipy P. Human embryonic stem cells: Current technologies and emerging industrial applications. *Crit Rev Oncol Hematol* 2008;65(1):54-80.
- 38.Schuldiner M, Yanuka O, Itskovitz-eldor J, Melton DA, Benvenisty N. Effects of eight growth factors on the differentiation of cells derived from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97(21):11307-12.
- 39.Niknejad H, Peirovi H, Ahmadiani A, Ghanavi J, Jorjani M. Differentiation factors that influence neuronal markers expression in vitro human amniotic epithelial cells. *Eur cell Mater* 2010;19:22-9.
- 40.Hwang NS, Varghese S, Elisseeff J. Controlled differentiation of stem cells. *Adv Drug Deliv Rev* 2008;60(2):199-214.
- 41.Saha K, Pollock JF, Schaffer DV, Healy KE. Designing synthetic materials to control stem cell phenotype. *Curr Opin Chem Biol* 2007;11(4):381-7.
- 42.Huang S, Fu X. Naturally derived materials-based cell and drug delivery systems in skin regeneration. *J Control Release* 2010;142(2):149-59.
- 43.Park JH, Kim SJ, Oh EJ, et al. Establishment and maintenance of human embryonic stem cells on STO, a permanently growing cell line. *Biol Reprod* 2003;69(6):2007-14.
- 44.Mallon BS, Park KY, Chen KG, Hamilton RS, McKay RD. Toward xeno-free culture of human embryonic stem cells. *Int J Biochem Cell Biol* 2006;38(7):1063-75.

45. Park SP, Lee YJ, Lee KS, et al. Establishment of human embryonic stem cell lines from frozen-thawed blastocysts using STO cell feeder layers. *Hum Reprod* 2004;19(3):676-84.
46. Amit M, Shariki C, Margulets V, Itskovitz-Eldor J. Feeder layer-and serum-free culture of human embryonic stem cells. *Biol Reprod* 2004;70(3):837-45.
47. Kim S, Ahn SE, Lee JH, et al. A novel culture technique for human embryonic stem cells using porous membranes. *Stem Cells* 2007;25(10):2601-9.
48. Dahéron L, Opitz SL, Zaehres H, et al. LIF/STAT3 Signaling fails to maintain self-renewal of human embryonic stem cells. *Stem Cells* 2004;22(5):770-8.
49. Kawahara Y, Manabe T, Matsumoto M, Kajiume T, Matsumoto M, Yuge L. LIF-free embryonic stem cell culture in simulated microgravity. *Plos One* 2009;4(7):e6343.
50. Niknejad H, Deihim T, Ahmadiani A, Jorjani M, Peirovi H. Permanent expression of midbrain dopaminergic neurons traits in differentiated amniotic epithelial cells. *Neurosci Lett* 2012;506(1):22-7.
51. Niknejad H, Deihim T, Solati-Hashjin M, Peirovi H. The effects of preservation procedures on amniotic membrane's ability to serve as a substrate for cultivation of endothelial cells. *Cryobiology* 2011;63(3):145-51.
52. Niknejad H, Peirovi H, Jorjani M, Ahmadiani A, Ghanavi J, Seifalian AM. Properties of the amniotic membrane for potential use in tissue engineering. *Eur Cell Mater* 2008;15:88-99.
53. Chen HF, Chuang CY, Shieh YK, Chang HW, Ho HN, Kuo HC. Novel autogenic feeders derived from human embryonic stem cells (hESCs) support an undifferentiated status of hESCs in xeno-free culture conditions. *Hum Reprod* 2009;24(5):1114-25.
54. Lekhanont K, Choubtum L, Chuck RS, Sa-ngiampornpanit T, Chuckpaiwong V, Vongthongsri A. A serum and feeder free technique of culturing human corneal epithelial stem cells on amniotic membrane. *Mol Vis* 2009;15:1294-302.
55. Niknejad H, Khayat-Khoei M, Peirovi H. Inhibition of MMPs might increase anticancer properties of amniotic epithelial cells. *Med Hypotheses* 2012;78(5):690-1.
56. Niknejad H, Paeini-Vayghan G, Tehrani FA, Khayat-Khoei M, Peirovi H. Side dependent effects of the human amnion on angiogenesis. *Placenta* 2013;34 (4):340-45.
57. Paeini-Vayghan G, Peirovi H, Niknejad H. Inducing of angiogenesis is the net effect of the amniotic membrane without epithelial cells. *Iran J Med Hypotheses Ideas* 2011;5:16.
58. Takahashi K, Narita M, Yokura M, Ichisaka T, Yamanaka S. Human induced pluripotent stem cells on autologous feeders. *Plos One* 2009;4(12):e8067.
59. Li Z, Leung M, Hopper R, Ellenbogen R, Zhang M. Feeder-free self-renewal of human embryonic stem cells in 3D porous natural polymer scaffolds. *Biomaterials* 2010;31(3):404-12.
60. Kolhar P, Kotamraju VR, Hikita ST, Clegg DO, Ruoslahti E. Synthetic surfaces for human embryonic stem cell culture. *J Biotechnol* 2010;146(3):143-6.
61. Armstrong SE, Mariano JA, Lundin DJ. The scope of mycoplasma contamination within the biopharmaceutical industry. *Biologicals* 2010;38(2):211-3.
62. Cobo F, Stacey GN, Cortés JL, Concha Á. Environmental monitoring in stem cell banks. *Appl Microbiol Biotechnol* 2006;70(6):651-62.
63. Unger C, Skottman H, Blomberg P, Dilber MS, Hovatta O. Good manufacturing practice and clinical-grade human embryonic stem cell lines. *Hum Mol Genet* 2008;17(R1):R48-53.