مقاله مروری

مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی بابل
دوره شانزدهم، ویژه نامه شماره ۱، زمستان ۱۳۹۲، صفحه ۱۰۵-۹۵

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

حسن نیک نژاد(PhD)[۱و۲*]، فاطمه عاصی طهرانی(MSc)[۱]، حبیب اله پیروی(MD)[۱]، حسن ابوالقاسمی(MD)[۲]

۱- مرکز تحقیقات نانوتکنولوژی 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 سلول‌های بنیادی، به یکی از امیدهای بشر برای درمان بسیاری از بیماری‌ها تبدیل شده است. محققین به دنبال یافتن بهترین شرایط برای کشت سلول‌های بنیادی هستند تا بتوان از این سلول‌ها در درمان بیماری‌ها استفاده کرد. این سلول‌ها به دلیل ویژگی‌هایی مثل خودنوزایی و پرتوانی، توانایی تولید و تکثیر دودمان‌های سلولی تمایز نیافته و ترمیم بافت‌های اطراف خود را دارند. این ویژگی ها در داخل بدن توسط محیط اطراف سلول یا کنام سلول (niche) کنترل می‌شود. در نتیجه بازسازی کنام سلولی بصورت برون‌تن برای حفظ ویژگی‌های 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 Stem Cells، Microbial Contamination 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 مغذی، 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 مغذی، 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 می‌توانند باعث آلودگی سلول‌ها شوند. بنابراین، در صورت استفاده بالینی از این سلول‌ها، عوامل زنوژن، باکتری‌ها، ویروس‌ها و سایر عوامل بیماریزا به گیرنده سلول منتقل خواهند شد.

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

مقدمه

درمان با سلول‌های بنیادی یکی از روش‌های درمانی است که افق‌های جدیدی در بیماری‌های صعب‌العلاج بر پایه سلول درمانی باز نموده است. در تحقیقاتی که تاکنون انجام شده، محققان به‌دنبال یافتن بهترین شرایط کشت برای سلول‌های بنیادی بوده‌اند. اما از آنجاکه هدف از کشت این سلول‌ها استفاده بصورت بالینی می‌باشد، به بررسی‌های بیشتر و دقیق‌تری در مورد خطرات احتمالی آن نیاز است. روش‌های موجود برای کشت سلول‌های بنیادی عمدتا بر پایه استفاده از محصولات حیوانی و یا انسانی بنا شده‌اند. در نتیجه، استفاده از این فرآورده‌ها می‌تواند باعث انتقال عوامل زنوژن، باکتری‌ها، ویروس‌ها و سایر عوامل بیماریزا شود (۱). هر آلودگی میکروبی چه با منشاء دهنده سلول باشد و یا در حین کشت سلول ایجاد شده باشد، می‌تواند به گیرنده سلول و افرادی که بر روی آن کار می کنند، منتقل شود (۲). علاوه بر آلودگی‌ها، احتمال بروز پاسخ‌های ایمنی در برابر محصولات غیرانسانی نیز وجود دارد (۳). بنابراین شناسایی و حذف این خطرات در همه مراحل کار ضروری است. این مقاله به بررسی منابع آلودگی در کشت سلول‌های بنیادی و روش‌های جایگزین برای حذف یا کاهش آلودگی در کشت این سلول‌ها می‌پردازد. در این مقاله ابتدا ویژگی‌های سلول‌های بنیادی که حفظ آنها در محیط کشت ضروری است مورد بررسی قرار گرفته سپس منابع رایج آلودگی در کشت سلول بنیادی و همچنین، روش‌های جایگزین برای کاهش یا حذف این آلودگی‌ها ارائه می‌شود.

مواد و روشها

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

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

* مسئول مقاله: دکتر حسن نیک نژاد
آدرس: تهران، بیمارستان طالقانی، ولنجک، مرکز تحقیقات نانوتکنولوژی پزشکی و مهندسی بافت، تلفن: ۲۲۴۳۹۸۴۸-۰۲۱ e-mail:niknejad@sbmu.ac.ir

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

ویژگی‌های سلول‌های بنیادی: سلول‌های 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 می‌ماند. این سلول‌ها می‌توانند سلول‌های بنیادی دیگری با توانایی تکثیر مشابه به‌عنوان سلول والد تولید کنند (۴). علاوه بر این، اکثر سلول‌های بنیادی بصورت پرتوان (Pluripotent) یا چندتوان (Multipotent) بوده و توانایی تولید دودمان‌های تمایز یافته مثل سلول‌های قلبی، عصبی، انسولین‌ساز و سایر سلول‌ها را دارند. تکثیر سلول‌های بنیادی بوسیله گروهی از مکانیسم‌های تنظیمی داخل و خارج سلولی کنترل می‌شود که به این محیط، کنام (niche) سلول بنیادی گفته می‌شود (۵و۶). بر این اساس کنام می‌تواند 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 سلول‌های بنیادی جنینی، بخشی از کنام سلول بنیادی هستند (۸). از بین انواع مسیرهای سیگنالینگ موجود در سلول‌های بنیادی جنینی انسانی مسیرهای فاکتورهای رشد TGFβ (Transforming growth factor beta) ، FGF (Fibroblast growth factor) وWnt در ایجاد خودنوزایی اثر بیشتری دارند. bFGF (Basic fibroblast growth factor) یک لیگاند در مسیر علامت‌دهی فیبروبلاستی است؛ براین اساس bFGF اگزوژن برای ایجاد و ادامه این خاصیت در سلول‌های بنبادی جنینی انسانی ضروری است (۹). اخیرا مسیرهای دیگری که خودنوزایی سلول‌های بنیادی را تنظیم می‌کنند، شامل hedgehog و Notch نیز در حال بررسی هستند. این مسیرها در تنظیم خودنوزایی سلول‌های بنیادی هماتوپویتیک، نورونی و پستانی نقش دارند. نبود کنام مناسب می‌تواند موجب بی‌نظمی در این مسیرها شده و باعث تشکیل تومور شود (۱۰).

تحقیقات اولیه در زمینه سلول‌های بنیادی بر روی سلول‌های حیوانی بخصوص سلول‌های بنیادی جنینی موش صورت گرفت؛ از این‌رو اصول و معیارهای کشت سلول با توجه به این سلول‌ها پایه‌ریزی شده است. پس از جداسازی سلول‌های بنیادی جنینی انسان از توده سلولی داخل بلاستوسیست در سال ۱۹۹۸، مطالعات بیولوژیکی و کاربردی برای استفاده از آنها افزایش یافت (۱۱). در طی بررسی‌ها تفاوت‌های مورفولوژیکی و رفتاری زیادی بین سلول‌های بنیادی جنینی موشی (mESCs) و انسانی (hESCs) مشاهده شد. سلول‌های بنیادی جنینی انسانی نسبت به سلول‌های بنیادی جنینی موشی در محیط کشت کندتر رشد کرده و به‌جای کلونی‌های کروی، کلونی‌های مسطح تولید می‌کنند. همچنین در حضور LIF (Leukemia inhibitory factor) نمی‌توانند حالت بدون تمایز خود را حفظ کنند (۱۲). سلول‌های بنیادی انسانی در سطح خود تعدادی از مارکرهای پرتوانی کلاسیک مثل OCT4 و alkaline phosphatase را بیان می‌کنند و همچنین سطح بالایی از فعالیت تلومرازی را نشان می‌دهند. مسیر بیوشیمیایی LIF/gp130/stat3 جزء اولین مسیرهای شناخته شده‌ای بود که می‌توانست خاصیت خودنوزایی را در سلول‌های بنیادی جنینی موش حفظ کند (۱۳). در بررسی Mitsui و همکارانش مشخص گردید که حضور LIF برای ایجاد خاصیت خودنوزایی و پرتوانی سلول‌های بنیادی جنینی انسانی کافی نیست، زیرا هموپروتئین Nanog می‌تواند به‌صورت مستقل از مسیر LIF/Stat3، پرتوانی و عدم تمایز را در سلول‌های ICM (Inner cell mass)و سلول‌های بنیادی جنینی انسانی حفظ کند، به طوری‌که حذف ژن Nanog باعث از بین رفتن پرتوانی در این سلول‌ها می‌شود (۱۴).

نحوه کشت سلول‌های بنیادی: برای تکثیر بدون تمایز سلول‌های 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 می‌شود (۱۵).

لایه مغذی بوسیله اشعه گاما یا میتومایسین C (۱۶)، از نظر تقسیم سلولی غیرفعال شده و بستر مناسبی را برای اتصال سلول‌های بنیادی جنینی انسانی فراهم می‌کند (۱۵). این لایه با آزادسازی مواد غذایی و فاکتورهای رشد، موجب تشکیل کنام سلول شده که در نتیجه باعث رشد و تکثیر بدون تمایز سلول‌های بنیادی جنینی انسانی (۱۸و۱۷) و حفظ خاصیت خودنوزایی در محیط کشت می‌شود (۱۹). ارتباط بین این دو نوع سلول از طریق فاکتورهای ترشحی به محیط کشت، ماتریکس خارج سلولی و یا پروتئین‌های موجود در غشا است (۲۰). بنابراین اتصال سلول‌های لایه مغذی و سلول‌های بنیادی، از طریق ایجاد اتصال بین رسپتورها و لیگاندها به طور مستقیم و ترشح فاکتورهای فعال، به‌طور غیرمستقیم بر سلول‌های بنیادی تاثیر می‌گذارند. 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 سلول‌های بنیادی است که به‌عنوان منبع فاکتورهای رشد و عناصر کمیاب، به محیط اضافه می‌شود (۲۱). سرم حاوی فاکتورهای فعال زیستی (bioactive) با وزن مولکولی کم است. این فاکتورها نقش حیاتی در کاهش اثرات سمی ناشی از سیگنال‌های 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 دپولاریزه شدن غشا میتوکندریایی، فعالیت محافظتی برای سلول‌های عصبی (Neuroprotective) دارد. به‌علاوه این مولکول تشکیل ROS (Reactive oxygen species) و رادیکال‌های هیدروکسیل را هم مهار کرده (۲۲) و در نتیجه باعث حفاظت سلول در برابر استرس‌های اکسیداتیو می‌شود (۲۳).

منشاء آلودگی‌ها در کشت سلولی‌های بنیادی: در پروتوکل‌های رایج تحقیقاتی برای ایجاد کنام سلول از فرآورده‌های بافتی حیوانی یا انسانی استفاده می‌شود. این فرآورده‌ها می‌توانند باعث انتقال میکروارگانیسم‌های زنوژن یا برخی بیماری‌ها، در اثر آلودگی با باکتری‌ها، ویروس‌ها، پریون‌ها و سایر عوامل عفونی مثل بیماری آنسفالوپاتی Spongiform (Transmissible Encephalopathies (TSEs)، به گیرنده شوند (۱).

منابع اصلی آلودگی در سلول‌های بنیادی را می توان به صورت زیر تقسیم‌بندی نمود:

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 مغذی: لایه مغذی که به‌طور معمول در کشت سلول‌های بنیادی برای ایجاد کنام مناسب استفاده می‌شود، دارای منشا 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 مغذی، سیالوپروتئین غیر انسانی بیان می‌کنند که باعث تحریک سیستم ایمنی انسان می‌شود (۲۷).

هر عامل زنوژن می‌تواند باعث مرگ گیرنده شود و در صورت ورود به ژنوم انسان باعث ایجاد بیماری ناشناخته انسانی وسیعی در جامعه گردد (۱). ژنوم موش سکانس‌های 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 پنومونی، ویروس اکتروملیا و روتاویروس 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 مغذی 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 منشا غیرانسانی دارد. سرم گاوی که معمولا استفاده می‌شود، می‌تواند به‌صورت بارز یا نهفته، منبع آلودگی‌های زنوژن، ویروسی و پریونی باشد و حتی باعث تحریک پاسخ ایمنی به‌وسیله پروتئین‌های خارجی شود. برای مثال آپروتینین موجود در سرم گاوی، که خود به‌عنوان سوبسترایی 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) می باشند. این میکروارگانیسم‌ها کوچکترین باکتری‌های دارای دیواره هستند که به‌علت ویژگی‌های غیرطبیعی، با روش‌های معمول به‌سختی جدا می‌شوند. اندازه آنها حدود 0.05-0.5μm است و می‌توانند از فیلترهای 0.2 μm عبور کنند (۳۰) 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 نمی شوند. علاوه بر این باکتری‌ها و ویروس‌های دیگر بر آنها بی اثرند. 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 (بخصوص مایکوپلاسماها)، قارچ‌ها، مخمرها و ویروس‌ها، آلوده‌کننده‌های اصلی رده‌های سلولی هستند (۳۳). آلودگی باکتریایی (بجز مایکوپلاسما) و قارچی معمولا 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 می شود، با این حال مایکوپلاسماها هنوز بعنوان معضلی اساسی در کشت سلول‌های بنیادی مورد بحث می باشند.

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 (۰/۲-۰/۸μm) هستند؛ به بتالاکتام‌ها مقاوم بوده و می‌توانند از فیلترهای 0.45 μm عبورکنند (۳۵).

به‌طور معمول میزان آلودگی در کشت‌های اولیه سلول ۱٪ و در پاساژ های ابتدایی ۵٪ است. این مقدار در رده‌های سلولی با کشت پیوسته، ۳۵-۱۵٪ می باشد؛ اما مقادیر بیشتر نیز گزارش شده است. سطح آلودگی در کشت‌های سلول یوکاریوتی آلوده شده با مایکوپلاسما حدود 10^{-8}-10^{-6} 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 عموما از اعضای خانواده‌های Mycoplasmataceae و Acholeplasmataceae هستند. گرچه حداقل ۲۰ گونه از این خانواده‌ها از رده‌های سلولی جداشده است، اما رایج‌ترین گونه‌ها M. orale , M. fermentans , Mycoplasma arginini , Acholeplasma laidilawii هستند (۳۳). علاوه براین گونه‌ها، Brown و همکارانش M. hyorhinis را هم جزء آلوده‌کننده‌های

اصلی می‌دانند (۳۶). در نتایج ارائه شده دیگری حدود ۹۵-۹۰٪ آلودگی‌های ایجاد شده مربوط به ۶ گونه است که علاوه بر گونه‌های ذکر شده، گونه M. hominis هم وجود دارد. M. orale، M. fermentaus و M. Hominis گروه مایکوپلاسماهای انسانی را تشکیل می‌دهند. M. orale شایع‌ترین گونه مایکوپلاسما است، که در حفره دهانی انسان وجود دارد و حدود ۴۰-۲۰٪ آلودگی‌های کشت سلولی را ایجاد می‌کند. M. arginini و A. laidlawii منشا گاوی داشته و M. hyorhinis در حفره بینی خوک زندگی می‌کند (۳۵). منابع اصلی آلودگی مایکوپلاسما، نمونه بافتی مورد استفاده (ورود کشت سلولی یا لاین سلولی)، سرم، محیط آزماشگاه و تماس انسانی است (۳۵و۳۳).

۵-عوامل محیطی و شرایط کار: منبع دیگر آلودگی، افرادی هستند که با کشت‌های سلولی در تماس هستند. در این نوع آلودگی منبع، میکروارگانیسم‌های ساپروفیت موجود در فلور پوست و دستگاه تنفس انسان است. این افراد می‌توانند یکی از منابع مایکوپلاسما هم باشند (۳۵). انسان‌ها صدها و گاهی هزاران باکتری را در هر دقیقه در هوا پخش می‌کنند که این آلودگی می‌تواند از طریق هوا، لباس، افراد و زمین منتقل شود. آلودگی ابزار و وسایل مورد استفاده مثل ظرف‌های کشت، پیپت‌ها و سایر وسایل مورد استفاده، منبع دیگری از آلودگی هستند. استفاده مجدد از وسایل استفاده شده و عدم انجام صحیح روش‌های مختلف استریلیزاسیون مثل اتوکلاو یا حرارت خشک، می‌تواند موجب افزایش آلودگی شود (۳۴).

۶-سایر منابع آلودگی: علاوه بر عوامل ذکر شده، مواد دیگری در کشت سلول استفاده می‌شود. مقدار این مواد بسیار کم بوده ولی از آنجا که اغلب منشا حیوانی دارند، می‌توانند خطرساز باشند. یکی از این مواد آنزیم‌هایی مانند پپسین، تریپسین و کلاژناز هستند که برای جداسازی سلول‌های بنیادی از بستر کشت استفاده می‌شوند. استفاده از این آنزیم‌ها خطر ایجاد ناهنجاری‌های ژنتیکی را در کشت برون تن نیز افزایش می‌دهد (۳۷).

فاکتورهای رشد مثل TGF (transforming growth factor), LIF, bFGF, BMP (bone morphogenic protein), EGF (epidermal growth factor), RA (retinoic acid) با فعالسازی مسیرهای مختلف علامت‌دهی در ایجاد انواع سلول‌های بنیادی نقش دارند (۳۹و۳۸). از آنجا که این مواد منشا غیرانسانی دارند می‌توانند منبعی برای ایجاد آلودگی باشند (۴۰). مواد زیستی (Biomatherials) مورد استفاده در کشت سلول هم می‌توانند در انتقال آلودگی نقش داشته باشند. این مواد دارای پروتئین‌های زنوژن هستند که می‌تواند باعث ایجاد پاسخ ایمنی فرد گیرنده شود (۴۱). برای مثال کلاژنی که به عنوان داربست در کشت سلول استفاده می‌شود، اغلب منشا حیوانی داشته و می‌تواند باعث تحریک سیستم ایمنی و آلودگی گیرنده شود (۴۲).

روش‌های مورد استفاده برای حذف آلودگی

۱-بررسی دهنده‌های سلول بنیادی: جلوگیری از انتقال عوامل بیماری‌زا از فرد دهنده بهترین راه برای آلوده نشدن گیرنده سلول بنیادی است. بنابراین بررسی دقیق فرد دهنده اهمیت زیادی دارد. بررسی بیماری‌های دوران کودکی، سطح بهداشت محیط، منطقه جغرافیایی محل سکونت و شیوه زندگی فرد دهنده، می‌تواند در شناسایی عفونت‌های بارز و نهفته فرد دهنده سلول موثر باشد (۲۹). بنابراین امروزه علاوه بر پاسخ‌های آنتی‌بادی، از روش‌های پیشرفته‌تری برای شناسایی اسید نوکلئیک آنها (مثل PCR)، استفاده می‌شود (۲۶). عوامل ایجاد کننده بیماری‌های انسانی که می‌توانند بوسیله خون و بافت منتقل شوند و تست‌های تشخیصی آنها، بیان شده است (جدول ۱). FDA پیشنهاد کرده است سلول‌ها و بافت‌های مربوط به سیستم تناسلی از نظر نایسریا گنوره و کلامیدیا تریکوماتیس و سایر بیماری‌هایی که از طریق جنسی منتقل می‌شوند، نیز بررسی شوند.

جدول ۱: نمونه‌هایی از آلودگی‌ها و تست‌های شناسایی آنها در بافت‌های مورد استفاده

آلودگی	تست های تشخیصی
اچ ای وی-۱	Anti-HIV-1 , [1]تست اسید نوکلئیک
اچ ای وی-۲	Anti-HIV-2 , تست اسید نوکلئیک
Bویروس هپاتیت	HB_SAg , anti-core HBc , تست اسید نوکلئیک
C ویروس هپاتیت	Anti-HCV , تست اسید نوکلئیک
HTLV-1	Anti-HTLV-1
HTLV-2	Anti-HTLV-2
سایتومگالوویروس	IgG anti-CMV
ابشتین بار ویروس	تست اسید نوکلئیک
تریپونما پالیدوم	TPHA
نایسریا گنوره[2]	کشت باکتری
کلامدیا تریکوماتیس[2]	IgG anti-chlamydia
Transmissible spongiform encephalopaties (TSEs)	وسترن بلات، تست اسید نوکلئیک

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

۲. برای دهنده‌های سلول‌های جنسی

ایجاد تغییر در بستر کشت: برای حذف خطرات لایه مغذی موشی روش‌های جایگزین زیادی پیشنهاد شده است. یکی از این روش‌ها استفاده از سلول‌های STO است. STO، رده سلولی نامیرایی از فیبروبلاست جنینی موش (mEFCs) است که به آسانی تکثیر می‌شود. علی‌رغم اینکه این سلول‌ها دارای منشا موشی هستند، اما آلودکنندگی آنها به‌شدت کاهش یافته است (۴۳). تهیه و نگهداری این سلول‌ها برای استفاده به‌عنوان لایه مغذی ساده تر از mEFs است (۴۴). به‌علاوه، این سلول‌ها می‌توانند LIF تولید کنند. سلول‌های بنیادی کشت شده بر روی STO، پرتوان، تمایز نیافته، دارای مارکرهای سطحی و فاقد ناهنجاری در کاریوتایپ هستند؛ اما در کشت بدون لایه مغذی و به‌صورت condition medium با STO تمایز سلولی افزایش می یابد (۴۵).

استفاده از condition medium یکی از روش‌هایی است که در آن توسعه سلولی در غیاب لایه مغذی انجام می گیرد. این محیط معمولا به‌وسیله

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 منشا موشی و حاوی ماتریکس خارج سلولی و فاکتور های رشد است (۴۶). ماتریژل یک اسم تجاری برای ماتریکس خارج سلولی با منشاء تومور Engelbreth–Holm–Swarm است. این ماتریکس حاوی مقدار زیادی لامینین و کلاژن است و می تواند رشد بدون تمایز سلول‌های بنیادی جنینی انسانی را حفظ کند (۲۶). علی‌رغم پیشرفت‌های صورت گرفته همچنان ماتریژل دارای منشا 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 منفذ دار، 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 کاملا مشخص حاوی جایگزین سرم (serum replacement)، TGFβ1, LIF, bFGF و فیبرونکتین انسانی استفاده می‌شود. سلول‌های بنیادی جنینی انسانی رشد کرده در این شرایط کاملا طبیعی و بدون تغییر در کاریوتایپ هستند. از ویژگی‌های این روش استفاده از یک سیستم کاملا 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، ترکیبی از noggin و bFGF و 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).

استفاده از میکروگراویتی بدون حضور LIF یکی دیگر از این روش‌ه 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 روش ها 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 SSEA3، SSEA4، Tra-1-60، Tra-1-81، Oct4 و Nanog را بیان کنند، اما بنظر می رسد 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 می‌توانند باعث ناهنجاری در کاریوتایپ 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. مثلا گاهی ترکیبی از انسولین، ترنسفرین و سلنیوم (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 دقیقا مشخص نشده است، اما تقریبا 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) کاریوتایپ طبیعی و مارکرهای پرتوانی حفظ می‌شوند. اما مطالعات دیگر نشان داده اند 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 (۵۲و۵۱)، پوست و عضلات جنینی، foreskin (۳۲)، سلول‌های عضلانی و لوله فالوپ، سلول‌های مغز استخوان و سلول‌هایی با منشا 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 کاریوتایپ 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

از ۹ ماه مارکرهای عدم تمایز را بیان و کاریوتایپ طبیعی خود را حفظ کند. در بررسی‌های دیگر انواع مختلفی از رده‌های سلولی انسانی مورد استفاده قرار گرفته اند که در همه این موارد کشت سلول‌های بنیادی جنینی انسانی تا ۲۰ پاساژ بدون تمایز صورت گرفته است (۴۴). مغز استخوان منبع دیگری است که می‌تواند به‌عنوان بستر کشت استفاده شود و رشد بدون تمایز با کاریوتایپ طبیعی را برای ۱۳-۹ پاساژ حفظ کند (۵۴). علاوه بر این، روش‌های دیگری نیز برای استفاده از محصولات انسانی وجود دارد. استفاده از سرم انسانی به همراه پروتئین‌های گیاهی یکی از این روش‌هاست. نتایج نشان داده که رشد و تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسانی در این محیط، قابل مقایسه با رشد این سلول‌ها در سرم گاوی است. (۳). پرده آمنیون به علت ویژگی‌های خاص خود می‌تواند جایگزین مناسبی برای لایه‌های مغذی باشد (۵۷-۵۵). از غشا آمنیونی (محیط کشت Epilife) به همراه سرم اتولوگ انسانی برای کشت سلول‌های بنیادی قرنیه استفاده شده است. اما استفاده از این نوع سرم در افراد دارای بیماری‌های زمینه ای، خطرناک است. در این روش هر چند امکان آلودگی بوسیله عوامل با منشا انسانی وجود دارد، اما خطر بیماری‌های نهفته قابل انتقال کاهش پیدا کرده است (۵۴).

لایه مغذی اتوژن (autogenic feeder) یکی از جایگزین‌های لایه مغذی موشی است. منشا این لایه سلول‌های بنیادی جنینی انسان است. در ابتدا این لایه به همراه سرم گاوی مورد استفاده قرار می‌گرفت، که در آن‌صورت شرایط xeno-free نبود. اما بعد از آن روشی ارائه شده که در آن کشت بدون عوامل خارجی یا با حداقل میزان آن انجام می‌شد. در این روش لایه مغذی اتوژن از سلول‌های بنیادی جنینی، در محیط حاوی سرم انسانی KFM (keratinocyte free medium) مشتق می‌شوند. این لایه مغذی توانایی نگهداری سلول‌های بنیادی جنینی انسان، در حالت بدون تمایز را دارد، اما در بعضی موارد خاصیت توانایی تکثیر را در سلول‌ها حفظ نمی‌کند. 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 سلول‌های بنیادی جنینی انسانی که به‌عنوان منشا لایه مغذی استفاده می‌شوند، از زمان جداسازی تا تولید لایه مغذی اتوژن، در معرض محصولات حیوانی قرار دارند. در نتیجه برای رفع این مشکلات به تحقیقات بیشتر و دقیق‌تری نیاز است (۵۳).

فیبروبلاست‌های نوزادی و بزرگسال انسان می‌تواند به‌عنوان لایه مغذی برای سلول‌های iPS (Induced Pluripoten Stem) انسانی استفاده شوند. سلول‌های iPS تهیه شده در این شرایط بعد از حداقل ۱۹ پاساژ، مارکرهای سطحی و کاریوتایپ طبیعی و پرتوانی خود را حفظ می کنند. در این روش از فیبروبلاست یک فرد به‌عنوان منبعی برای تهیه سلول‌های غذا دهنده و تهیه iPS استفاده می‌شود، که این موضوع برای استفاده‌های کلینیکی اهمیت دارد. اما نکته قابل توجه در این روش این است که هنوز بعضی مکمل‌های حیوانی مثل آلبومین، تریپسین و انسولین در این روش به‌کار می‌رود (۵۵).

تمام روش‌های ذکر شده دارای فوایدی هستند، اما هیچ کدام از این روش‌های کشت به طور کامل فاقد مواد حیوانی نیستند. در اغلب موارد از سرم گاوی برای استقرار سلول‌های لایه مغذی (۳۴) و یا به‌عنوان مکمل محیط کشت استفاده شده است (۳). مشکل اصلی لایه مغذی انسانی این است که جدا کردن سلول‌های بنیادی جنینی انسانی از آنها دشوار است (۴۷) و ممکن است به‌طور همزمان با سلول‌های بنیادی جنینی انسانی، سلول‌های لایه مغذی نیز رشد کنند (۴۶). مشکل دیگر این محصولات احتمال انتقال عوامل عفونت‌زا 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 می‌شود. این پلیمرها که با پیوندهای یونی به‌هم متصل اند، دارای سازگاری زیستی (biocompability) و تخریب‌پذیری زیستی (biodegradability) هستند. این پلیمرها ساختاری پایدار دارند و کمترین تحریک سیستم ایمنی را موجب می‌شوند. قرار دادن فاکتورهای رشد درون این داربست (encapsulation)، یک منبع قابل استفاده از این فاکتورها را، در شرایط درون‌تن و برون‌تن، فراهم می‌کند (۵۶).

یکی دیگر از روش های بکار گرفته شده، استفاده از سطح مصنوعی برای کشت سلول‌های بنیادی جنینی انسانی است. عملکرد اصلی این محیط‌ها فراهم کردن سطحی است که اتصالات ناشی از اتصالات اینتگرینی سلول را حمایت می‌کند. این اتصال قوی به بستر، سلول‌های بنیادی جنینی انسانی را در برابر آپوپتوز (در اثر اتصال کم سلول بنیادی با سوبسترای ماتریکس خارج سلولی) محافظت می‌کند. این محیط ها برخلاف سوبستراهای طبیعی و با منشا زیستی عوامل عفونت‌زا و بیماری‌ها را انتقال نمی‌دهند و سیستم ایمنی میزبان را تحریک نمی‌کنند. در بعضی مطالعات از پپتیدهایی با سکانس‌های لامینین استفاده شده است، اما این پپتیدها با اینتگرین پیوند تشکیل نمی‌دهند و برای کشت طولانی مدت مناسب نیستند. پپتیدهای سنتتیک حاوی RGD (arginine- glycine-aspartate) هم مورد مطالعه قرار گرفته اند که توانایی اتصال به ماتریکس خارج سلولی و اینتگرین را دارند. اخیرا محیط جدیدی معرفی شده که در آن تمایل پیوند دی سولفیدی پپتید RGD افزایش یافته و CRGDC (cysteine-arginine-glycine-aspartate- cysteine) حلقوی تولید شده است. نشان داده اند که سلول‌های بنیادی جنینی انسانی کشت شده بر روی آن خصوصیات پرتوانی و خودنوزایی و تمایز در شرایط برون تن را حفظ می‌کنند (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، می‌تواند به‌طور نهفته در حین فراوری تکثیر شده و به فرد گیرنده منتقل شود. به این دلیل ایمنی و صحت سلول‌ها باید در بانک‌های سلول‌های بنیادی تضمین شود و تمام مراحل تهیه، فراوری، آزمایش، نگهداری، ذخیره‌سازی 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، به‌طور مشخصی می‌تواند میزان آلودگی را کاهش دهد (۵۸). بنابراین بهتر است رده‌های سلولی ورودی به آزمایشگاه تا مشخص شدن نتیجه منفی تست (آلودگی با مایکوپلاسما) برای مدتی در قرنطینه نگهداری شوند (۳۳).

از آنجاییکه مهمترین آلودگی رده‌های سلولی مایکوپلاسماها هستند، شناسایی و حذف آنها می‌تواند در بالا بردن کیفیت سلول‌ها تاثیر زیادی داشته باشد. روش‌های زیادی برای شناسایی آلودگی با مایکوپلاسما وجود دارد. برخی از

این روش‌ها عبارت از، روش های ایمونولوژیکی، استفاده از میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) DNA staining techniques, , nucleic acid hybridization, polymerase chain reaction (PCR). 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 (۵۹و۶۰).

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 لزوما 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 (۶۰و۲۶). به هر حال استفاده مداوم از آنتی‌بیوتیک‌ها (مثل پنی‌سیلین/ استرپتومایسین، جنتامایسین و...) در کشت‌های سلولی باعث افزایش میزان آلودگی با مایکوپلاسما می‌شود؛ زیرا استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها می‌توانند آلودگی‌های نهفته و مخفی مایکوپلاسما را افزایش دهند (۶۱و۳۴). 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 مایکوپلاسما شد. همچنین در محیط های کشت حاوی آنتی بیوتیک در پاساژهای متوالی، توصیه می گردد تا بعد از ۳ هفته، آنتی بیوتیک به‌مدت 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 پروتوکل‌های استاندارد تعیین شده توسط فارماکوپه ها (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 برنامه‌های کنترل کیفیت باید مطابق با شرایط GMP (Good Manufacturing Practice) باشد (۶۳). بررسی ها نشان می‌دهد هر چه این شرایط با دقت بیشتری رعایت شود، میزان آلودگی کمتر خواهد شد (۳۴).

نتیجه گیری

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 کارآیی 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 پروتوکل‌های موجود برای کشت سلول‌های بنیادی انسان را کاهش داده و فراورده‌ای 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 می نمائیم. این تحقیق با حمایت ستاد توسعه سلول های بنیادی و مرکز تحقیقات نانوتکنولوژی پزشکی و مهندسی بافت دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی انجام شد.

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 partecles: 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.