

بررسی اثر انگشت سلول ها با استفاده از تکنیک طیف سنجی پراکندگی رامان

هانیه رضایی^۱، ساره ارجمند^۲، آرام برزگر^۱، عباس صاحبقدم لطفی^۲، رسول ملک فر^۱، حوری قانع‌الوار^۲، ناصر جعفرزاده^۲، عالمه محمد پور^۲

۱. ایران، تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پایه، گروه فیزیک
۲. ایران، تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه بیوشیمی بالینی
۳. ایران، تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه فیزیک پزشکی

در این تحقیق، طیف پراکندگی رامان خود به خودی حاصل از دو نمونه سلولی مورد مطالعه قرار گرفته است. نمونه اول سلول بنیادی مزانشیمی مشتق شده از بافت چربی به عنوان یک نمونه از سلول های بنیادی بالغ می باشد که از بافت چربی انسانی استخراج شده است. نمونه دوم سلول رده سرطانی HepG2 به عنوان سلول کنترل مورد استفاده قرار گرفت. جهت کاهش اثر فلورسانس حین طیف نگاری، نمونه ها بر روی بستر کوارتز رشد داده شدند. از هر نمونه ۱۵ طیف رامان ثبت گردید و پس از پردازش و میانگین گیری تفاوت های آنها مورد بررسی قرار گرفت و مشخص گردید که این تکنیک می تواند به عنوان یک روش انگشت نگاری سلولی قوی به کار گرفته شود.

کلید واژه- طیف سنجی، پراکندگی رامان، سلول بنیادی مزانشیمی، سلول HepG2

Cell Fingerprinting Investigation by Raman Scattering Spectroscopy Technique

Hanieh Rezaei¹, Sareh Arjmand², Aram Barzegar¹, Abbas Sahebghadam Lotfi², Rasool Malekfar¹, Hori Ghaneialvar², Naser Jafarzadeh³, Aleme Mohamadpoor²

- 1- Department of Physics, Faculty of Basic Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, I.R. Iran
- 2- Department of Clinical Biochemistry, Faculty of Medicine, Tarbiat Modares University, Tehran, I.R. Iran
- 3- Department of Medical Physics, Faculty of Medicine, Tarbiat Modares University, Tehran, I.R. Iran

In the present study, spontaneous Raman scattering of two cells was examined. The first cell sample belongs to adipose derived mesenchymal stem cell as an adult stem cell with high potential in clinical studies and cell therapy. The second sample was HepG2 cell line. The cells were cultured on quartz disc to decrease the effects of fluorescence during spectroscopy. 15 different spectra were recorded for each sample and the differences were investigated after spectra average processing. The results revealed that Raman scattering spectra have considerable differences for two cell samples and the technique can be used as a powerful method for the cell fingerprinting purposes.

Keywords: Spectroscopy, Raman scattering, mesenchymal stem cell, HepG2 cell

۱- مقدمه

سلول‌های بنیادی، سلول‌های اولیه‌ای هستند که در تمام ارگانیسم‌ها وجود دارند و قادرند با تقسیم، هم سلول‌های بنیادی جدید شبیه خود تولید کنند و یا این‌که با طی روند تمایز به سلول‌های بسیار تخصصی‌تری مانند سلول‌های کبدی، مغز، قلب، ماهیچه، کلیه و... تبدیل شوند. علی‌رغم پتانسیل بالاتر سلول‌های بنیادی جنینی، امروزه بیشتر توجهات معطوف جداسازی و تمایز سلول‌های بنیادی بالغ برای درمان انواع بیماری‌ها است. همچنین امروزه نشان داده شده است که سلول‌های بنیادی بالغ ظرفیت تمایز بسیار بالایی نسبت به آنچه که قبلاً تصور می‌شد، دارند. شناسایی و تأیید سلول‌های بنیادی جدا شده از بافت‌های مختلف، یکی از مراحل ضروری جهت استفاده از این سلول‌ها در تحقیقات مختلف و نیز در درمان می‌باشد. این شناسایی به روش‌های مختلفی مانند استفاده از آنتی‌بادی‌های اختصاصی، تمایز به بافت‌های مختلف و ... صورت می‌گیرد که همگی روش‌های زمان‌بر و هزینه‌بری هستند و نیاز به انجام مراحل مختلفی دارند [۱].

طیف سنجی پراکندگی رامان یکی از پر قدرت‌ترین روش‌های طیف سنجی است که برای شناسایی مولکول‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد. این روش بر پایه‌ی پراکندگی رامان است. وقتی یک نمونه تحت تابش نور لیزر قرار می‌گیرد قسمت اعظم نوری که توسط نمونه جذب می‌شود با طول موج مشابه لیزر، و بخش جزئی آن بطور ناکشسان با طول موج‌هایی که بر گذارهای ارتعاشی مولکولی دلالت دارند، پراکنده می‌شود. از آنجا که هر مولکول مد ارتعاشی مخصوص به خود را دارد، طیف نور پراکنده شده ی ناکشسان می‌تواند به عنوان اثر انگشت پیوندهای مولکولی در شناسایی آن‌ها بکار گرفته شود. سیگنال حاصل از این پراکندگی بنا به اسم کاشف اثر رامان نام گرفته است [۲].

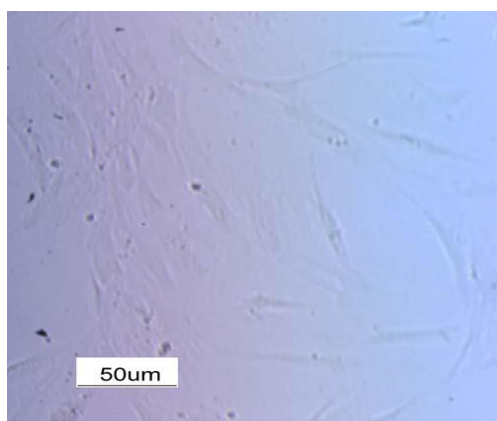
هدف از انجام این تحقیق استفاده از تکنیک طیف سنجی پراکندگی رامان برای تشخیص سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از بافت چربی به عنوان یک نمونه از سلول‌های بنیادی بالغ در مقایسه با یک سلول کنترل است. سلول کنترلی که در این تحقیق مورد استفاده قرار

گرفته سلول رده سرطانی HepG2 است که در تحقیقات استفاده گسترده دارد.

۲- روش انجام کار و نتایج

۲-۱ استخراج و شناسایی سلول‌های بنیادی مزانشیمی از بافت چربی انسانی

سلول‌های مورد استفاده در این تحقیق از بافت چربی انسانی که توسط جراح به‌صورت استریل و طی عمل جراحی لیپوساکشن جدا شده بود استخراج گردید. به این منظور پس از جدا کردن بافت همبند و خون، بافت چربی با اسکالپل (چاقوی جراحی) به قطعات بسیار ریز تکه‌تکه شد و سپس به مدت ۴۵ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد با تکان (شیک) ۱۵۰rpm در معرض آنزیم کلاژنازی (به منظور جدا شدن سلول‌ها از ماتریکس خارج سلولی) انکوبه شد، پس از این مدت زمان به محلول فوق هم حجم محیط کشت حاوی ۱۰٪ FBS به منظور خنثی کردن آنزیم کلاژنازی اضافه شد سپس به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۴۰۰۰rpm در دمای ۴°C سانتریفیوژ انجام شد و Pellet ته فالكون حاوی سلول‌های بنیادی به فلاسک کشت سلول منتقل شد و در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی-گراد، CO₂ ۵٪ و رطوبت ۹۰٪ انکوبه شد. پس از ۲۴ ساعت محیط تعویض شد و سلول‌های چسبیده زیر میکروسکوپ Invert مشاهده شد. سپس هر سه روز یک‌بار محیط کشت سلول‌ها تعویض شد و پس از دو هفته کف فلاسک از سلول پر شد (شکل ۱).



شکل ۱: ریخت شناسی (مورفولوژی) ظاهری سلول‌های بنیادی مزانشیمی چربی انسانی. این سلول‌ها ظاهری دوکی شکل و کشیده و شبیه فیبروبلاست دارند.

۲-۳ کشت سلول روی بستر کوارتز

جهت انجام طیف سنجی رامان نیاز به کشت سلول روی صفحه کوارتز بود. به این منظور صفحات دیسک شکل کوارتز به قطر ۱/۳ سانتی متر و ضخامت ۲ میلی متر تهیه شدند. این صفحات پس از استریل شدن در چاهک های ظرف (پلیت) ۴ خانه قرار داده شدند و سلول های بنیادی مزانشیمی و سلول های HepG2 روی آنها کشت داده شدند.

۲-۴ بررسی میکروسکوپی سلول ها

ریخت شناسی (مورفولوژی)، رشد و میزان تقریبی چسبندگی سلول های کشت داده شده در تمام مراحل رشد با میکروسکوپ هم کانونی (کونفوکال) مورد بررسی قرار گرفته و از آنها عکس تهیه گردید.

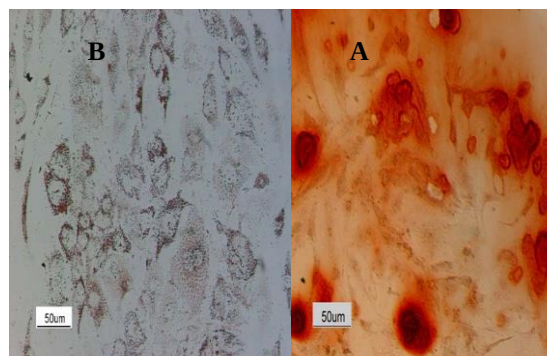
۲-۵ طیف سنجی

دستگاه طیف سنج رامان بکار رفته در این مطالعه، مدل Thermo Nicolette، ساخت شرکت Almega Dispersive Raman، دارای پرتو خروجی قطبی شده با طول موج ۵۳۲ nm، ناشی از هماهنگ دوم لیزر Nd:YLF می باشد. جهت حفظ کیفیت نمونه، شدت نور لیزر روی ۳۰ mW تنظیم و از عدسی ۶۰x با دریچه عددی ۰٫۹ استفاده شده است.

نمونه ها پس از قرارگیری در طیف سنج تحت تابش لیزر قرار گرفته و از هر نمونه ۱۵ طیف ثبت گردید و توسط نرم افزار OMNIC پردازش شده و میانگین آنها مورد مطالعه قرار گرفت (شکل ۴ و ۵).

۳- نتایج و تحلیل آنها

بر اساس نتایج به دست آمده تفاوت های قابل توجهی در طیف رامان مربوط به سلول های بنیادی مزانشیمی استخراج شده از بافت چربی و سلول های دودمان کبدی HepG2 وجود دارد. همان طور که مشخص است تعداد قله های موجود در طیف سلول دودمان کبدی HepG2 بیشتر از قله های طیف سلول بنیادی مزانشیمی است. این به این معناست که شدت بعضی پیوندها در سلول بنیادی کم بوده و توسط اثر فلورسانس پوشانیده شده است. قله ها برای سلول دودمان کبدی HepG2 در نوارهای 3441 cm^{-1} ، 3264 cm^{-1} ، 2953 cm^{-1} ، 2751 cm^{-1} ، 2415 cm^{-1} ، 2134 cm^{-1} ، 1814 cm^{-1} ، 1345 cm^{-1} ، 801 cm^{-1} و



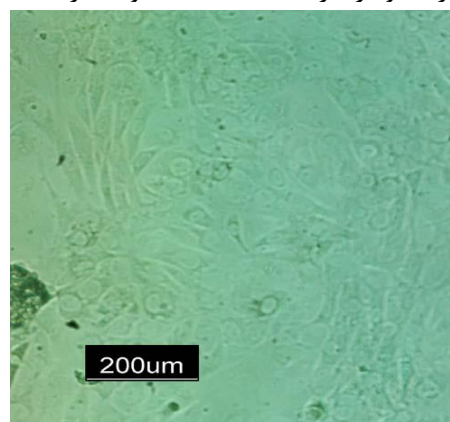
شکل ۲: تمایز سلول های بنیادی مزانشیمی استخراج شده از بافت چربی انسانی به سلول های استخوانی و چربی. (A) رنگ آمیزی Oil Red سلول های تمایز داده شده به سمت سلول چربی. (B) رنگ آمیزی Alizarin Red سلول های تمایز داده شده به سمت سلول استخوانی (میکروسکوپ Invert)

جهت شناسایی و تأیید سلول های بنیادی استخراج شده از دو روش استفاده شد: (۱) تأیید نشانگرهای (مارکرهای) سطحی سلول های بنیادی مزانشیمی به روش فلوسایتومتری با استفاده از آنتی بادی های مونوکلونال اختصاصی علیه نشانگرهای سطحی $CD44$ ، $CD34$ ، $CD105$ ، $CD45$ و $CD90$. (۲) تمایز سلول های بنیادی به سلول های چربی و اسلول های استخوانی و رنگ آمیزی این سلول ها به ترتیب با رنگ های Oil Red و Alizarin Red (شکل ۲).

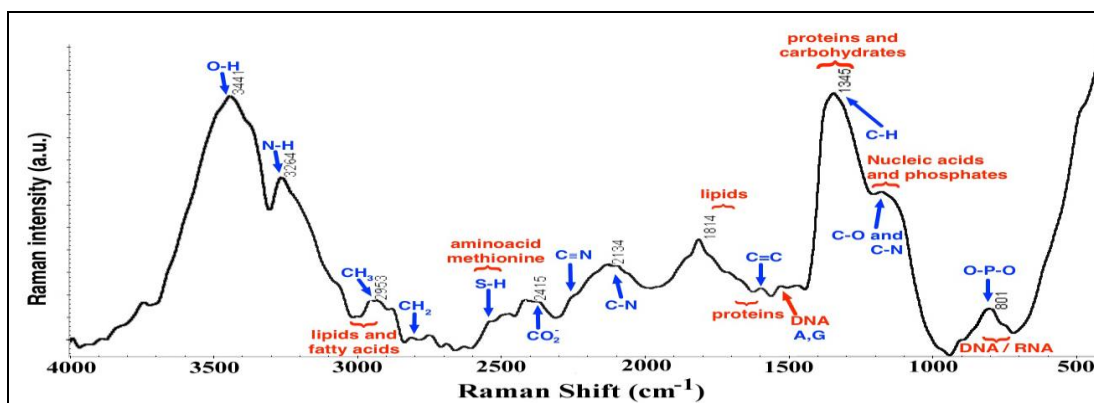
نتایج به دست آمده نشان دادند که هر دو بررسی انجام شده بنیادی بودن سلول های استخراج شده را تأیید کردند.

۲-۲ تهیه سلول های HepG2

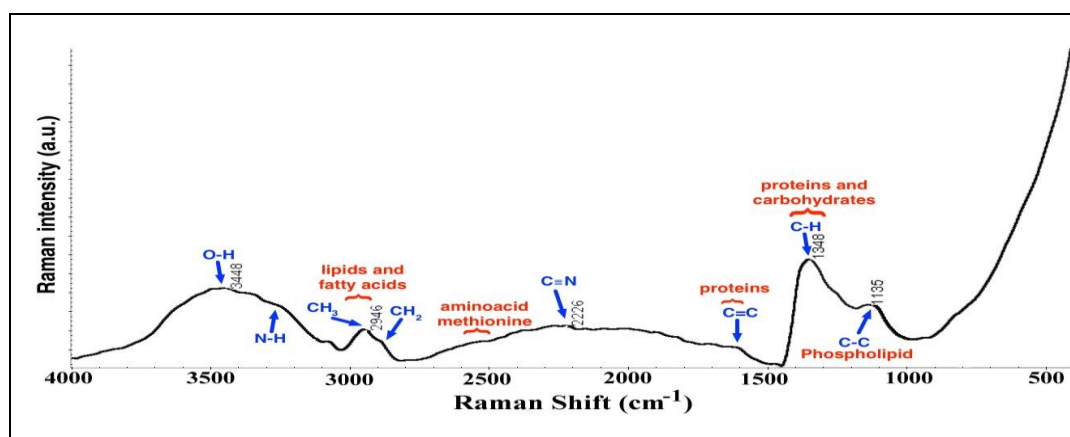
رده سلولی HepG2 از بانک سلولی انستیتو پاستور تهیه گردید و در شرایط مناسب کشت و تکثیر شد (شکل ۳).



شکل ۳: سلول های رده سلولی HepG2



شکل ۴: طیف میانگین سلول دودمان کبدی HepG2. پیوندهای مولکولی مربوط به هر قله با رنگ آبی و نوار مربوط به بخش های سلولی با رنگ قرمز نشان داده شده است [۳، ۴، ۵].



شکل ۵: طیف میانگین سلول بنیادی مزانشیمی. پیوندهای مولکولی مربوط به هر قله با رنگ آبی و نوار مربوط به بخش های سلولی با رنگ قرمز نشان داده شده است [۳، ۴، ۵].

برای سلول بنیادی مزانشیمی در نوارهای 3448 cm^{-1} ، 2946 cm^{-1} ، 2226 cm^{-1} ، 1348 cm^{-1} و 1135 cm^{-1} قرار گرفته است. نوار 2953 cm^{-1} و 2946 cm^{-1} در طیف سلول HepG2 به ترتیب نشان دهنده ی حضور پیوندهای مولکولی CH_2 و CH_3 می باشند، که هر دو حاکی از حضور لیپیدها هستند. این دو پیوند در سلول مزانشیمی با شدت کمتری ظاهر شده اند. پیوندهای C-H و $\text{C}=\text{C}$ بر حضور پروتئین ها دلالت دارند که نوارهای 1600 cm^{-1} و 1590 cm^{-1} متعلق به آنها می باشند. در طیف سلول مزانشیمی پیوند C-H با شدت کمتر بوده و پیوند $\text{C}=\text{C}$ ظاهر نشده است. نوری که نشان دهنده DNA و RNA است بازه $700-800 \text{ cm}^{-1}$ می باشد که طیف سلول مزانشیمی فاقد قله ای در این محدوده می باشد.

۴- مراجع

- [۱] Fossett E., Khan W.S., Optimising human mesenchymal stem cell numbers for clinical application: a literature review, *Stem Cells Int* (۲۰۱۲) ۴۶۵-۲۵۹.
- [۲] P.Chen, F. Zhang, L. Lin, H.Bai, L. Zhang, G. Q. Tang, H. Fang, G. G. Mu, W. Gong, Z. P. Liu, Z. B. Han, H. Zhao and Z. C. Han, "Raman Spectroscopy for Noninvasive Monitoring of Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells Viability Transitions" (۲۰۱۱) ۷۶۷-۷۶۹.
- [۳] Linda Harkness, Sergey M. Novikov, Jonas Beermann, Sergey I. Bozhevolnyi and Moustapha Kassem, "Identification of Abnormal Stem Cells Using Raman Spectroscopy" (۲۰۱۲) ۲۱۵۴-۲۱۵۵.
- [۴] Andrew Downes and Alistair Elfick, "Raman Spectroscopy and Related Techniques in Biomedicine" (۲۰۱۰) ۱۸۷۳-۱۸۷۴.
- [۵] Zanyar Movasaghi, Shazza Rehman and Ihtesham U. Rehman, "Raman Spectroscopy of Biological Tissues" (۲۰۰۷) ۴۹۶-۵۲۴.