مقاله پژوهشی

عواقب ژنتیکی پاساژ های متوالی در سلول های بنیادی مزانشیمال انسانی

دکتر حمید پورجعفری*، دکتر بهاره پورجعفری**، فهمیه طالب زاده***، دکتر علیرضا زمانی****
دکتر سیدمحمد حسینی پناه*****، حسین فضلی******

دریافت : ۹۱/۵/۲ ، پذیرش : ۹۱/۱۰/۱۲

چکیده:

مقدمه و هدف: سلول های بنیادی بوسیله دو ویژگی منحصر بفرد خود مشخص می شـوند. یکـی از آن هـا قـدرت تکثیـر بـالا و دیگری توانایی تمایز به بافت های مختلف است. هر روز در سراسر دنیا از جمله در ایران نتایج کار های جدید منتشر می شود که نشان دهنده رشد فزاینده کار روی موضوع درمان بکمک سلول های بنیادی است. کار با سلول های بنیادی با منشا های گوناگون، از جمله سلول هایی با منشا جنینی و بالغ (مانند مغز استخوان، ریشه دندان، بند ناف و غیره) در حال انجام و پیشرفت است. هدف از انجام این مطالعه روشن نمودن ابقا و پایداری مواد ژنتیکی سلول های بنیادی مزانشیمال انسانی در طی کشت هـای متـوالی در شرایط آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی همدان بود.

روش کار: در یک مطالعه تجربی، بند ناف به عنوان یک منبع غنی از سلول های بنیادی انسانی به کار گرفته شد. سلول های بنیادی استخراج شده پس از رشد و تکثیر، تعدادشان زیاد شده و کف ظرف های کشت را در کشت های متوالی پـر نمودنـد. در نتیجـه انجام کشت های متوالی موفقیت آمیز، سلول ها پیر شدند و این موضوع که احتمالا موجب آسیب های ژنتیکی می شـود بوسـیله تکنیک کامت قابل شناسایی است. با استفاده از این تکنیک، کشت های اولیه یا جوان (کشت های شماره ۱ تا ۵)، کشت های بـا عمـر متوسط (کشت های شماره ۸ تا ۱۲) و کشت های پیر (کشت های شماره ۱۵ تا ۱۸) با یکدیگر مقایسه شـدند، همچنـین کاریوتیـپ سه گروه فوق الذکر، به کمک تکنیک های رنگ آمیزی ساده و نواری تهیه و با هم مقایـسه گردیدنـد. اسـلاید هـای میکروسـکپی متعددی از هر پاساژ تهیه گردید و سپس ۲۰ سلول به طور اتفاقی از اسلاید های مربوط به هـر گـروه انتخـاب شـدند. در همـه سلول های انتخاب شده، آسیب های ژنتیکی بررسی شدند و شدت آسیب ها به کمک روش استاندارد از صـفر تـا چهـار شـماره گذاری گردیدند. میانگین شماره های داده شده در سه گروه با استفاده از روش غیر پارامتریـک کروسـکال- والـیس مقایـسه و مورد بحث قرار گرفتند.

نتایج: میانگین سه گروه جوان، میانی و پیر به ترتیب ۰/٤ ، ۲/۸ و ۳/۶ بود. کاریوتیپ های آماده شده مربوط به کشت های اولیـه از نظر ساختمانی و تعداد نرمال و کشت های مسن تر غیر طبیعی بودند. نتایج نشان دادند که پدیده پیری و عواقب آن از جملـه آسیب مواد ژنتیکی باید در کار با سلول های بنیادی در کشت های متوالی در نظر گرفته شوند.

نتیجه نهایی : از سلول های بنیادی مزانشیمال گرفته شده از خون بند ناف انسان در شرایط آزمایشگاهی همـدان ، تنهـا آن هـایی قابل استفاده برای کارهای پژوهشی هستند که مربوط به کشت های جوان (زیر کشت شماره پنج)بودند. توصیه می شود کـشت های بالاتر از شماره پنج تنها برای اهداف آموزشی بکار روند و بهتر است کاری مشابه با این طرح در این گونـه آزمایـشگاه هـای تحقیقاتی انجام شود.

کلید واژه ها: آسیب ژنتیکی / بند ناف / پیری / سلول های بنیادی

---

* استاد گروه پزشکی مولکولی و ژنتیک دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی همدان (h_pourjafari@yahoo.com)
** دکتری حرفه ای پزشکی دانشگاه علوم پزشکی همدان
*** کارشناس آزمایشگاه پزشکی مولکولی دانشگاه علوم پزشکی همدان
**** دانشیار گروه ایمونولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی همدان
***** استادیار گروه آناتومی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی همدان
****** کارشناس آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه علوم پزشکی همدان

مقدمه :

سلول های بنیادی بوسیله ویژگی های منحصر به فردشان مشخص می گردند (۱). یکی از ویژگی های آنها توانایی تکثیر بالا و دیگری قدرت تمایز منحصر بفردشان به بافت های گوناگون است (۲). امروزه سعی بر آن است تا از سلول های بنیادی گرفته شده از انسان که توانایی تمایز بالایی داشته و در آزمایشگاه قابلیت نگهداری و پاساژ دارند برای اهداف درمانی استفاده شوند. در زمان شروع طرح حاضر تکنولوژی تهیه، نگهداری، تمایز و استفاده از سلول های بنیادی از خون بند ناف در همدان وجود نداشت. محققین بر آن بودند تا با انجام این طرح قدمی در راه شروع چنین پروژه هایی بردارند.

اصولا کار با سلول های بنیادی با منشا های گوناگون در حال انجام است، از جمله سلول هایی با منشای جنینی و بالغ، مغز استخوان، خون، ریشه دندان،بند ناف و غیره که به عنوان مخازن سلول های بنیادی بالغ مورد استفاده قرار می گیرد (۶-۳).

سلول های تهیه شده بایستی مورد آزمون های راستی سنجی قرار گیرند. به عبارت دیگر گروه باید اثبات می نمود که سلول های نهایی سلول های بنیادی است و در نتیجه قابل تمایز می باشند. در کار حاضر برای این منظور از ویژگی های مورفولوژیکی (۷) سیتوژنتیکی (۸) و ایمونوهیستوشیمی(۹) استفاده گردید. از سوی دیگر از آنجایی که در نتیجه کشت های متوالی سلول های بنیادی دچار پدیده پیری می شوند (۱۰،۱۱)، این امر موجب آسیب ماده ژنتیکی آن می شود (۱۰). یکی از روش های بررسی آسیب های ژنتیکی comet assay است که برای اولین بار بوسیله سینگ و همکارانش (۱۲) بکار گرفته شد. البته روش مذکور تاکنون بارها مورد اصلاح قرار گرفته است و ما از یکی از این روش های اصلاح شده استفاده نمودیم (۱۳).

هدف از این مطالعه عبارت است از تعیین پاساژی که بهترین شرایط ژنتیکی سلولهای بنیادی استخراج شده از خون بند ناف در شرایط آزمایشگاهی همدان در آن حاصل می شود.

روش کار:

الف. جدا سازی سلول های مزانشیمی از خون بند ناف: در این مطالعه تجربی که در سال ۱۳۸۹ انجام شده است ، جداسازی و اثبات ماهیت سلول های مزانشیمی، با استفاده از روشهای معمول و تغییرات جزیی قابل اجرا در آزمایشگاه مرکز تحقیقات پزشکی مولکولی همدان، انجام شد (۱۴). جهت جلوگیری از چسبیدن مونوسیتها ابتدا بلافاصله بعد از خروج جفت آنرا به محل دیگری انتقال داده و سپس با قرار دادن سوزن در ورید نافی خونگیری از جفت صورت گرفت که این عمل قبل از لخته شدن و جدا شدن بند ناف بود. گرفتن خون ورید نافی در کیسه های مخصوص گرفتن خون سازمان انتقال خون انجام شد که از قبل نیز در کیسه ها مادهٔ ضد انعقاد اضافه شده بود. کیسه ها بلافاصله در فلاسکهای مخصوص به آزمایشگاه انتقال داده شدند. ۳۰ میلی لیتر از خون همراه با ۱۰ میلی لیتر محلول فایکول در لوله های ۵۰ میلی لیتری پلی پروپیلن ریخته و بمدت ۳۰ دقیقه در حرارت اتاق با سرعت ۲۵۰۰ دور سانتریفوژ گردید بعد از برداشتن سرم رویی، سلولهای روی بخش فایکول جمع آوری شد. بعد با فسفات بافر سالین سلول ها شسته شد و بمدت پنج دقیقه در حرارت اتاق با دور ۱۵۰۰ بار سانتریفوژ گردید سپس مایع رویی بر داشته شده و مجددا شسته شدند. در نهایت محلول رویی را دور ریخته و رسوب حاوی سلولهای مورد نظر به ظرفهای شش خانه ای انتقال داده شدند. این بخش با ۲۰ میلی لیتر بافر مخلوط شده و بمدت نیم تا یک ساعت در سرم جنین گاو(FBS) قرار گرفتند. سپس در محیط کشت مخصوص قرار داده شدند.

محیط کشت بعد از ۱۲ تا ۱۸ ساعت جهت جداکردن سلولهای نچسبیده به ظرف جدا شده و سپس هر سه روز یکبار تعویض گردیدند تا مجموعهٔ سلولهای مزانشیمی شکل گرفتند.آنگاه جهت اثبات سلولهای مزانشیمی مارکرهای CD73 و CD105 که بطور اختصاصی در سلولهای بنیادی مزانشیمی بیان می شوند، با روش ایمینو هسیتوشیمی (۹) مورد بررسی قرار گرفتند.

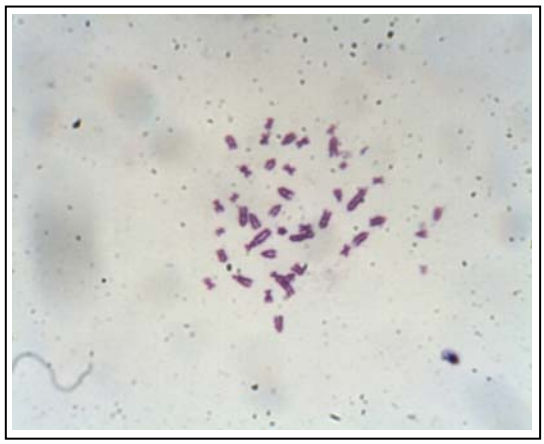
ب. بررسی کاریوتایپ سلول های بنیادی: از آن جایی که تا این زمان کاریوتیپ سلول های مزانشیمی در آزمایشگاه تحقیقاتی دانشکده پزشکی همدان راه اندازی نشده بود، پروتکل مشخصی که با شرایط این آزمایشگاه جواب دهد، در دست نبود. لذا پروتکل های مختلف بررسی و در نهایت یکی (۱۵) پس از انجام تغییرات جزئی انتخاب شد و مطابق آن کاریوتیپ سلول های مزانشیمی تهیه و وضعیت کروموزومی آن ها گزارش گردید.

ج. بررسی آسیب های DNA در سلول های بنیادی مربوط به پاساژ های اول، پنجم و دهم: برای بررسی آسیب های DNA در سلول هـای بنیـادی طـی پاسـاژهای مختلـف از روش استاندارد comet استفاده گردید (۱۷-۱۶). ایـن روش بـر اساس یک مرحله لیز سلولی با هدف جدا سـازی پـروتئین های وابسـته بـه DNA اسـتوار بـوده و سـپس بـا انجـام الکتروفـورز امکـان رنـگ امیـزی و مـشاهده رشـته هـای شکسته شده DNA فراهم می شود. اندازه دنبالـه هـسته بیانگر میزان آسیبی است که بـه رشـته DNA وارد شـده است، زیرا DNA سالم به صورت دو رشته ای و متصل به پروتئین ها بوده و بـه سـادگی بـر اثـر شـرایط الکترولیـز، برخلاف DNA شکسته شده، به طرف قطب آنـد حرکـت نمی کند. اندازه دنباله بر اساس گلد استاندارد رایـج مـورد ارزیابی قرار می گیرد. این استاندارد اندازه نسبی دنبالـه را از صفر (سلول سالم و بدون دنباله) تا عـدد چهـار (سـلول کاملا درهم ریخته و دنباله بلنـد) شـماره گـذاری کـرده و امکـان مقایـسه عـددی آسـیب وارد آمـده بـه DNA را فراهم می آورد (۱۴). دنباله در حقیقـت قطعـات شکـسته شـده DNA مـی باشـند کـه طـی حرکـت از سـلول لیـز شده در طی الکتروفورز به دنبال سلول کشیده می شـوند. هـر چـه آسـیب شـدید تـر باشـد، مقـدار DNA شکـسته شـده بیـشتر و در نتیجـه طـول دنبالـه سـلول بلنـد تـر می شود.

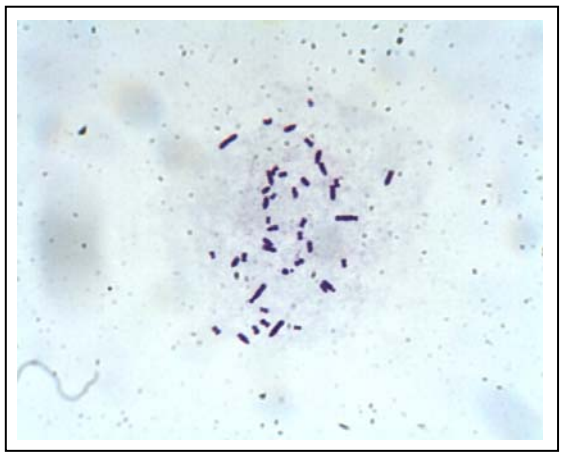
از لام های مربوط به هر گروه پاساژ، تعداد ۲۰ سلول را به طور اتفاقی انتخاب و وضـعیت دنبالـه را در آن هـا زیـر میکروسکپ فلوروسانت بررسی نمـوده و بـر طبـق الگـوی استاندارد موجود به آن ها شـماره داده شـد. سـپس از آن شماره ها میانگین گرفته و به عنوان اندازه دنباله ثبت و بـا سایر پاساژ ها مقایسه گردید. برای مقایـسه سـه میـانگین بدست آمده از روش غیـر پارامتریـک کروسـکال-والـیس استفاده شد.

نتایج:

کاریوتایپ سلول های بنیادی: گسترش های کرومـوزومی (chromosome spread) تهیـه شـده مـورد مطالعـه قـرار گرفت. تعداد، ساختمان و نیز الگـوی بانـدینگ کرومـوزوم های مربوط به پاساژ های اولیه (اول تا پنجم) کاملا نرمـال و در وضعیت خـوب رنـگ پـذیری بودنـد (شـکل ۱). امـا کیفیت گستره های کروموزومی مربوط به پاساژ های ده به بالا قابل قبول و آنالیز نبود (شکل ۲).

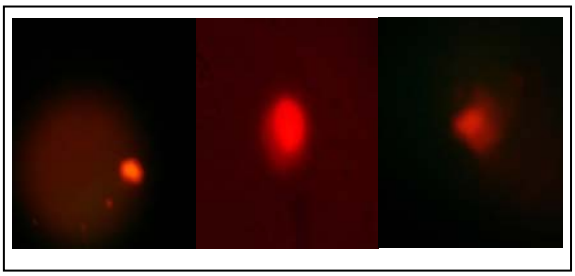


شکل ۱: گستره کروموزومی از سلول های مزانشیمال پاساژ ۵.



شکل ۲: گستره کروموزومی از سلول های مزانشیمال پاساژ ۱۰

بررسی آسیب ژنتیکی در کشت های متوالی: شـکل ۳ نمونـه هایی از هریک از گروه ها را نشان می دهد.



شکل ۳: سمت راست، نمونه ای مربوط به کشت های اولیه، وسط، نمونه ای مربوط به کشت های میانی و بالاخره شکل سمت چپ مربوط به کشت های پیر می باشد.

جـدول ۱ میـانگین هـا را در سـه گـروه پاسـاژ نـشان مـی دهـد. تفـاوت بـین نتـایج گـروه هـا معنـی دار بـود ($P< 0.001$) .

جدول ۱: درجات مربوط به ۲۰ سلول انتخاب و بررسی شده در سه گروه پاساژ و میانگین مربوطه

شماره سلول	درجات آسیب در پاساژ های اولیه (۱-۵)	درجات آسیب در پاساژ های میانی (۸-۱۲)	درجات آسیب در پاساژ های پیر (۱۵-۱۸)
۱	۰	۳	۴
۲	۱	۳	۴
۳	۱	۲	۴
۴	۰	۳	۳
۵	۰	۳	۴
۶	۰	۳	۴
۷	۰	۲	۲
۸	۱	۴	۴
۹	۱	۳	۴
۱۰	۰	۳	۴
۱۱	۱	۳	۳
۱۲	۱	۳	۴
۱۳	۰	۲	۴
۱۴	۰	۲	۴
۱۵	۱	۲	۴
۱۶	۰	۳	۳
۱۷	۰	۳	۴
۱۸	۱	۳	۲
۱۹	۰	۳	۳
۲۰	۰	۳	۴
جمع	۸	۵۶	۷۲
میانگین	۰/۴	۲/۸	۳/۶

بحث:

براساس گزارشات متعدد، همه کشت های سلولی پس از مدتی دچار مشکلات کروموزومی می شوند، از جمله کشت سلول های بنیادی جنینی. رایج ترین تغییرات کروموزومی در این گونه کشت ها تریزومی ۱۲ و تریزومی ۱۷ می باشند (۱۵) به خصوص هنگامی که کشت ها طولانی تر شوند(۱۶). وجود کاریوتایپ نرمال نشانه سلامت سلولهای بنیادی و داشتن توانایی لازم در آزمایشات مربوطه است(۱۷). کاریوتایپ های تهیه شده از سلول های پاساژهای اولیه(تا پاساژ ۵) دارای وضعیت نرمال بیشتری بودند. به عبارت دیگر در شرایط آزمایشگاه ما سلول های مزانشیمال استخراج شده از خون بند ناف انسان برای استفاده های تحقیقاتی، که لازمه آن وجود سلول های سالم و دارای کلیه ویژگی های سلولهای بنیادی می باشد، تنها طی پاساژهای اولیه بدست می آید. البته این نتیجه با گزارشات دیگر از این نظر که پاساژهای پایین دارای پتانسیل های بالاتری هستند انطباق دارد(۱۶).

روش کامت(Single Cell Gel Electrophoresis assay comet assay) روش نسبتا ساده و حساسی برای تشخیص آسیب های DNA در سطح سلول های یوکاریوتیک است. به عنوان مثال کورتس و همکارانش (۱۸) در سال ۲۰۱۰ میزان آسیب DNA در زنان مکزیکی مبتلا به سرطان دهانه رحم را با کمک روش کامت مورد سنجش قرار دادند. همچنین ایبارا کاستیلا و همکاران (۱۹) نیز از همین متد برای سنجش میزان آسیب های DNA در بیماران دیابتی استفاده نمودند. آن ها در یک کار مورد- شاهدی نشان دادند که از نظر میزان آسیب DNA در بین دو گروه بیمار مبتلا به تحلیل ماهیچه ای نوع دوم (DM2) و گروه سالم (کنترل) تفاوت معنی داری وجود نداشت. مولر در سال ۲۰۰۵ نیز از روش کامت قلیایی (alkaline comet) برای تعیین سمیت برخی ترکیبات شیمیایی در محیط زندگی انسان استفاده نمود و در پایان اعلام کردکه روش کامت وسیله ارزشمندی برای تعیین تاثیر ژنوتوکسیک مواد مختلف بر انسان است(۲۰).

در مطالعه حاضر از این روش برای ارزیابی و مقایسه میزان آسیب DNA در سلول های مزانشیمی در پاساژهای مختلف استفاده گردید و همان طور که در بخش نتایج اعلام گردید در پاساژ های بالا آسیب ها ی ایجاد شده بیشتر بودند. بنابراین سلول های بنیادی حاصل از پاساژ های بالا (اصطلاحا سلول های پیر)، همان طور که نشان داده شد دچار آسیب های ژنتیکی هستند و نباید در کارهای پژوهشی به کار روند و تنها می توان از آن ها در امور آموزشی و یا در کار های که به این مهم (آسیب DNA) توجه دارند استفاده شوند. این نکته نیز باید تاکید شود که شماره پاساژ های ذکر شده و مشخصات آن ها مربوط به نتایج این پروژه در زمان و مکان خاص است که می تواند در آزمایشگاه های دیگر متفاوت باشد، اما نکته اصلی که مد نظر این مطالعه است توجه به آسیب ژنتیکی سلول های بنیادی طی پاساژهای متوالی است که این امر می تواند روی نتایج گرفته شده در کار های تحقیقاتی که در آن ها از این سلول ها استفاده می شود تاثیر معنی داری بگذارد.

نتیجه نهایی:

نتایج به طور مشخص نشان دادند که در شرایط فعلی آزمایشگاه دانشگاه علوم پزشکی همدان، می بایست تنها از سلولهای مزانشیمی استخراج شده از خون بند ناف انسان

در پاساژهای اولیه (اول تا پنجم) برای کار های تحقیقـاتی استفاده نمود. همچنین توصیه می شود کاری مشابه با این طرح در اینگونه آزمایشگاه های تحقیقاتی انجام شود تـا از هدر رفتن مواد و نیز اتلاف وقت پرسنل جلوگیری شود.

منابع :

1. Hwang WS, Ryu YJ, Park JH. Evidence of a pluripotent embryonic stem cell line derived from a cloned blasticyst. Science 2004: 303: 1669-1674.
2. Rusnak AJ, Chudley AE. Stem cell research: cloning, therapy and scientific fraud. Clin Genet 2006: 70: 302-305.
3. Broxmeyer HE, Douglas GW, Hangoc G. Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/ progenitor cells. Proc Natl Acad Sci USA 1989;86:3828–3832.
4. Mareschi K, Biasin E, Piacibello W. Isolation of human mesenchymal stem cells: bone marrow versus umbilical cord blood. Haematologica 2001;86:1099–1100.
5. Wexler SA, Donaldson C, Denning-Kendall P et al. Adult bone marrow is a rich source of human mesenchymal "stem" cells but umbilical cord and mobilized adult blood are not. Br J Haematol 2003;121:368–374.
6. Jaiswal N, Haynesworth SE, Caplan AI. Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. J Cell Biochem 1997;64:295–312.
7. Skoric D, Balint B, Petakov M, Sindjic M, Rodic P. Collection strategies and cryopreservation of umbilical cord blood.Transfus Med 2007; 17(2): 107-13.
8. Plaia TW, Josephson R, Liu Y, Zeng X, Ording C, Toumadje A, et al. Characterization of a new NIH-registered variant human embryonic stem cell line, BG01V: a tool for human embryonic stem cell research. Stem Cells 2006;24(3):531-46.
9. Koch TG, Heerkens T, Thomsen PD, Betts DH. Isolation of mesenchymal stem cells from equine umbilical cord blood.BMC Biotechnol 2007; 7:26.
10. Rattan SI, Ali RE. Hormetic prevention of molecular damage during cellular aging of human skin fibroblasts and keratinocytes. Ann N Y Acad Sci 2007;1100:424-30.
11. Nijnik A, Woodbine L, Marchetti C, Dawson S, Lambe T, Liu C, et al. DNA repair is limiting for haematopoietic stem cells during ageing. Nature 2007;447(7145):686-90.
12. Singh NP, McCopy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low level of DNA damage in individual cells. Exp Cell Res 1988; 175: 184-191.
13. Ivanov SD, Yashmanov VA, Kovanko EG, Vorobtsova IE, Poroshina TE, Bershtein LM. Comparative study of postradiation genotoxic changes in Mammalian cells by biochemical and cytogenetic methods. Bull Exp Biol Med 2006;142(6):679-82.
14. Pour-Jafari H. [Isolation of the mesenchymal stem cells from human umbilical cord blood and study of their DNA damage after different passages]. Final report of research work. Hamadan University of Medical Sciences, 2010. (Persian)
15. Meisner LF, Johnson JA. Protocols for cytogenetic studies of human embryonic stem cells. Methods 2008;45(2):133-41.
16. Buzzard JJ, Gough NM, Crook JM, Colman A. Karyotype of human ES cells during extended culture. Nat Biotechnol 2004;22(4):381-2.
17. Catalina P, Montes R, Ligero G, Sanchez L, de la Cueva T, Bueno C, et al. Human ESCs predisposition to karyotypic instability: Is a matter of culture adaptation or differential vulnerability among hESC lines due to inherent properties? Mol Cancer 2008;7:76.
18. Cortés-Gutiérrez EI, Dávila-Rodríguez MI, Zamudio-González EA, Aguado-Barrera ME, Vargas-Villarreal J, Cerda-Flores RM. DNA damage in Mexican women with cervical dysplasia evaluated by comet assay. Anal Quant Cytol Histol 2010;32(4):207-13.
19. Ibarra-Costilla E, Cerda-Flores RM, Dávila-Rodríguez MI, Samayo-Reyes A, Calzado-Flores C, Cortés-Gutiérrez EI. DNA damage evaluated by comet assay in Mexican patients with type 2 diabetes mellitus. Acta Diabetol 2010 ;47(Suppl 1):111-6.
20. Møller P. Genotoxicity of environmental agents assessed by the alkaline comet assay. Basic Clin Pharmacol Toxicol 2005;96 (Suppl 1):1-42.

Original Article

The Genetic Effects of Aging on Human Mesenchymal Stem Cells through Consecutive Subcultures

H. Pourjafari, Ph.D.[*]; B. Pourjafari, G.P.[**]; F. Talebzadeh, B.Sc.[***]; A.R. Zamani, Ph.D.[****]
S.M. Hoseinipanah, Ph.D.[*****]; H. Fazli, B.Sc.[******]

Received: 23.7.2012 Accepted: 1.1.2013

Abstract

Introduction & Objective: Stem cells are determined by their unique features. One of them is high proliferation ability and the other is potency of differentiation to various tissues. The results of new works in various countries around the world including Iran show the growing momentum of works on stem cell therapy. Working with stem cells from different origins including the cells originated from fetal and adult origin (such as bone marrow, dental root, cord , etc)is in progress. The goal of this work was to clear the maintenance and stability of genetic materials of human mesenchymal stem cells through consecutive subcultures in our lab conditions in Hamadan University of Medical Sciences.

Materials & Methods: In an experimental work, human umbilical cord was used as a rich source of stem cells. Isolated stem cells, after proliferation phase, increased and filled the bottom of the flasks in consecutive passages. After some successive consecutive subcultures, stem cells aged and this may cause damages to genetic material that is evaluated in primary passages (passages number 1-5), middle passages (passages number 8-12) and late passages (passages number 15-18) by the single cell gel electrophoresis assay (comet assay). Also their karyotypes were examined; Solid technique and G-banding staining for chromosome analysis in the stem cells were employed. Several microscopic slides from each passage were prepared. Then 20 cells were randomly selected from the slides related to each group. In all selected cells, damages were examined and their degree of damages were scored based on the standard patterns, from 0 to 4. The averages were compared by Kruskal–Wallis test in different groups.

Results: Average scores related to three studied cell groups, primary, middle and late passages, were 0.4, 2.8 and 3.6, respectively. Prepared karyotypes from the cells belonging to passages 1-5 were normal but in the aged passages they were abnormal numerically and structurally. Our results showed that the aging phenomenon and its consequences such as DNA damages should be considered in the work with consecutive passages of stem cells.

Conclusion : We concluded that in our laboratory conditions, the stem cells taken from human umbilical cord blood are only usable for research purposes in early passages (below passage five).We recommend using passages more than five only for educational purposes in our laboratory; and it is better to do the same work in such research centers.

(Sci J Hamadan Univ Med Sci 2013; 20 (1):32-37)

Keywords: Aging / Genetic Damage / Stem Cells / Umbilical Cord

---

* Professor, Department of Molecular Medicine & Genetics, School of Medicine
Hamadan University of Medical Sciences & Health Services, Hamadan, Iran. (h_pourjafari@yahoo.com)
** General Practitioner
*** Molecular Medicine Lab, Hamadan University of Medical Sciences & Health Services, Hamadan, Iran
**** Associate Professor, Department of Immunology, School of Medicine
Hamadan University of Medical Sciences & Health Services, Hamadan, Iran.
***** Assistant Professor, Department of Anatomy, School of Medicine
Hamadan University of Medical Sciences & Health Services, Hamadan, Iran.
****** Microbiology Lab, Hamadan University of Medical Sciences & Health Services, Hamadan, Iran