**2.5 شناسایی (مشخص سازی) MSCها- سنجش واحد تشکیل کلونی و جداسازی**

دو مشخصه ی اصلی MSCها توانایی آن ها برای تشکیل کلونی ها از تک سلولی ها (35) و تفکیک به چندین رده ی سلولی است، مانند استئوسیت ها (سلول های استخوانی) (37-39)، آدیپوسیت ها (سلول های چربی) (37، 40، 41) و کندروسیت ها (سلول های تشکیل دهنده ی غضروف) (37، 42). سلول ها می توانند هنگامی که تحت شرایط تعریف شده کشت شدند موجب تفکیک به انواع بسیاری از سلول های دیگر شوند. هرچند، اگر کشت hMSCها مجاز به یکپارچگی بیش از حد در CCM باشد، برخی سلول ها در مسیر پیش فرض خود رو به سرازیری خواهند رفت و مشخصه های استئوسیت ها و آدیپوسیت ها را نشان می دهند، همانطور که به ترتیب توسط تولید مواد معدنی یا حضور واکوئل های حاوی لیپید مشاهده شد. پروتوکل های ارائه شده در اینجا برای سنجش واحد تشکیل کلونی (CFU) و روش های پایه ی تفکیک سازی برای ایجاد استخوان سازی، تشکیل بافت چربی و غضروف سازی در کشت hMSC ها می باشد.

**2.5.1 روش سنجش واحد تشکیل کلونی (CFU)**

سینی های کشت با چگالی پایین را هنگامیکه سلول ها بین 60 تا 80 درصد یکپارچه (به هم ملحق) شدند برداشت کنید. تعداد و زیست پذیری سلول را با استفاده از هموسیتومتر و تریپان آبی یا با استفاده از یک سیتومتر جریان با رنگ Annexin V و PI سوسپانسیون سلول تعیین کنید.

به طور جزء به جزء سوسپانسیون سلولی را رقیق کنید تا 100 سلول زیست پذیر در حدود 500μl بدست آوردید. 12 ml از CCM ضد عفونی شده به هر یک از سه ظرف با قطر 10 سانتیمتر (مساحت کشت حدود 60 سانتی متر مربع است) اضافه کنید. 100 سلول زیست پذیر را به هر یک از ظرف ها با چکاندن سوسپانسیون سلولی به صورت مارپیچی بر روی سطح ظرف اضافه کنید تا سلول ها به طور یکنواخت توزیع شوند. سلول ها را در یک محفظه ی رشد 37 درجه ی سانتیگرادی با کربن دی اکسید 5 درصد رطوبت دهی شده برای 14 روز بدون تغذیه قرار دهید. بعد از 14 روز محیط کشت را خارج کنید، سلول ها را با 10 میلی لیتر 1X PBS بشوئید و PBS را دور بیندازید. 5 میلی لیتر بنفش بلورین 3 درصد در متانول 100 درصد به هر یک از ظرف ها اضافه کنید. محلول را دوران دهید تا کف ظرف را بپوشاند. برای 5 تا 10 دقیقه در دمای اتاق نگه داری کنید. به آرامی ظرف را با آب شیر بشوئید تا زمینه پاک شود. ظرف را زیر میکروسکوپ معکوس بررسی کنید تا تغییر رنگ سلول را تایید کنید، با استفاده از چشم غیر مسلح، تعداد کلونی هایی که قطر 2 میلیمتر یا بیشتر دارند را در هر ظرف شمارش کنید. درصد CFU برای هر سینی را به صورت زیر محاسبه کنید:

برای تعیین میانگین درصد CFU برای آماده سازی، %CFU را برای هر یک از سه ظرف جمع کنید و بر 3 تقسیم کنید.

%CFU یک مشخصه ی مهم این سلول هاست و باید در هر عبور سلول ثبت شود. %CFU ها برای گذر زود هنگام hMSC های انبساط یافته در چگالی پایین باید بیشتر از 40 درصد باشد. هرچند، آنچنانکه کشت ها از کشت های غنی شده با چگالی پایین برای RS-MSC ها به کشت های غنی شده با چگالی بالا برای RS-MSC ها انبساط می یابند تعداد CFU ها کاهش می یابد (43). اندود کردن تنها 100 سلول در هر ظرف در این سنجش سلول های کافی برای آنالیز را فراهم می کند و احتمال اینکه کلونی های تشکیل شده از تک سلولی ها بدست آیند را افزایش می دهد.

**2.5.2 روش جدا سازی تشکیل بافت چربی و تشکیل استخوان**

ما سنجش های تشکیل استخوان و تشکیل بافت چربی را در سینی کشت بافت دارای 6 چاه انجام دادیم. ظرف دارای 6 چاه به این صورت که 2 چاه برای کشت های کنترل، تشکیل بافت چربی و استخوان سازی در نظر گرفته می شود. شکل 2.3 را برای طرح بندی ظرف ببینید.

ظرف ها را با شماره ی نمونه، بافت، تاریخ و هر اطلاعات مناسب دیگری برچسب گذاری کنید. 2 میلی لیتر CCM به هر چاه اضافه کنید. 100،000 سلول در حجم تقریبی 100 تا 200 میکرو لیتر (تقریبا 10،000 سلول بر سانتی متر مربع) اضافه کنید. اگر تعداد ناکافی از سلول ها دارید، چگالی پایینی می تواند جایگزین شود تا زمانیکه هر چاه تعداد سلول مشابهی دریافت کند. سلول ها را در نگهدارنده ی مرطوب در 37 درجه ی سانتیگراد با 5 درصد کربن دی اکسید نگهداری کنید. هر 3 تا 4 روز قبل از اینکه سلول ها به یکپارچگی 100% برسند، کشت را از هر چاه خالی کنید، با 2 میلی لیتر PBS آبکشی کنید و 2 میلی لیتر از CCM تازه اضافه کنید. به محفظه نگهداری برگردید. بعد از اینکه سلول ها بین 70-80 درصد یکپارچگی در 2 تا 8 روز رسیدند، کشت را از هر چاه خالی کنید و هر چاه را با 2 میلی لیتر PBS آبکشی کنید. قبل از اینکه سلول ها به 70% یکپارچگی دست یابند کشت را برای جداسازی تغییر ندهید یا آن ها تفکیک نخواهند شد و اجازه ندهید که کشت ها به یکپارچگی بیش از 85% دست یابند.

2 میلی لیتر CCM به 2 چاه کنترل برای عدم جداسازی اضافه کنید. برای 2 چاه جداسازی تشکیل چربی، 2 میلی لیتر کشت جداسازی تشکیل بافت چربی (ODM ) اضافه کنید، که

**شکل 2.3** طرح پیشنهادی 6 ظرف چاه برای جداسازی MSCها. بعد از اینکه MSC ها در CCM 60 تا 80 درصد یکپارچه شدند، جداسازی را با کشت خاصی ایجاد کنید. اولین ستون چاه ها (1 و 4) MSC به علاوه ی ODM (کشت استخوان)، دومین ستون چاه ها (2 و 5) MSC به علاوه ی ADM (کشت چربی) و سومین ستون چاه ها (3 و 6) MSC به علاوه ی CCM (کنترل) را دریافت می کنند. اولین ردیف چاه ها (1، 2 و 3) با آب DI شستشو داده می شوند و سپس با الزارین قرمز S رنگ زده می شوند. دومین ردیف چاه ها (4، 5 و 6) با PBS شسته می شوند سپس با روغن قرمز O رنگ زده می شوند. تغییر رنگ با الیزارین قرمز برای تشکیل بافت چربی باید در چاه 1 قوی باشد و برای چاه 2 و 3 ضعیف باشد یا وجود نداشته باشد. تغییر رنگ با روغن قرمز O برای تشکیل استخوان باید برای چاه 5 قوی باشد و برای چاه های 4 و 6 ضعیف باشد یا وجود نداشته باشد. این دسته بندی برای کنترل کشت و ویژگی تغییر رنگ مجاز است (36).