بیست و یکمین کنفرانس اپتیک و فوتونیک ایران
و هفتمین کنفرانس مهندسی و فناوری فوتونیک ایران
۲۳ تا ۲۵ دی ماه ۱۳۹۳، دانشگاه شهید بهشتی

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 قانعی‌الوار[۲]، ناصر جعفرزاده[۳]، 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 ی 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 HepG۲ 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 HepG۲

Cell Fingerprinting Investigation by Raman Scattering Spectroscopy Technique

Hanieh Rezaei[۱], Sareh Arjmand[۲], Aram Barzegar[۱], Abbas Sahebghadam Lotfi[۲], Rasool Malekfar[۱], Hori Ghaneialvar[۲], Naser Jafarzadeh[۳], Aleme Mohamadpoor[۲]

۱- Department of Physics, Faculty of Basic Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, I.R. Iran

۲- Department of Clinical Biochemistry, Faculty of Medicine, Tarbiat Modares University, Tehran, I.R. Iran

۳- 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 HepG۲ cell line. The cells were cultured on quartz disc to decrease the effects of fluorescence during spectroscopy. ۱۵ 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, HepG۲ cell

این مقاله در صورتی دارای اعتبار است که در سایت www.opsi.ir قابل دسترسی باشد.

[Downloaded from opsi.ir on 2025-07-14]

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 سلول-های کبدی، مغز، قلب، ماهیچه،کلیه و... تبدیل شوند. علی‌رغم پتانسیل بالاتر سلول های بنیادی جنینی، امروزه بیشتر توجهات معطوف جداسازی و تمایز سلول های بنیادی بالغ برای درمان انواع بیماری‌ها است. همچنین امروزه نشان داده شده است که سلول های 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].

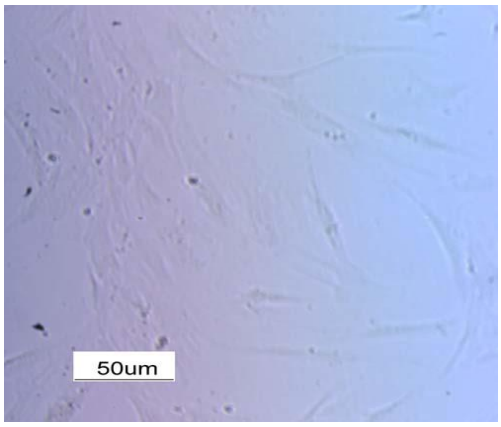
طیف سنجی پراکندگی رامان یکی از پر قدرت‌ترین روش-های طیف سنجی است که برای شناسایی مولکول‌ها مورد استفاده قرار می گیرد. این روش بر پایه‌ی پراکندگی رامان است. وقتی یک نمونه تحت تابش نور لیزر قرار می گیرد قسمت اعظم نوری که توسط نمونه جذب می شود با طول موج مشابه لیزر، و بخش جزئی آن بطور ناکشسان با طول موج هایی 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 می تواند به عنوان اثر انگشت پیوندهای مولکولی در شناسایی آن‌ها بکار گرفته شود. سیگنال حاصل از این پراکندگی بنا به اسم کاشفش 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 HepG۲ است که در تحقیقات استفاده گسترده دارد.

۲- روش انجام کار و نتایج

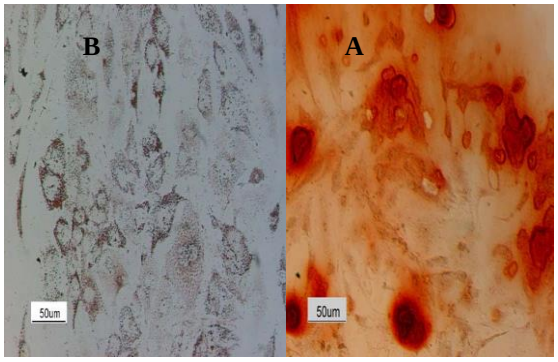
۲-۱ استخراج و شناسایی سلول‌های بنیادی مزانشیمی از بافت چربی انسانی

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 کلاژنازI (به منظور جدا شدن سلول‌ها از ماتریکس خارج سلولی) انکوبه شد، پس از این مدت زمان به محلول فوق هم حجم محیط کشت حاوی ٪FBS۱۰ به منظور خنثی کردن آنزیم کلاژنازI اضافه شد سپس به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۴۰۰۰rpm در دمای $۴^{\circ}C$ سانتریفیوژ انجام شد و Pellet ته فالکون حاوی سلول‌های بنیادی به فلاسک کشت سلول منتقل شد و در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی-گراد، $CO_۲$ ٪۵ و رطوبت ٪۹۰ انکوبه شد. پس از ۲۴ ساعت محیط تعویض شد و سلول‌های چسبیده زیر میکروسکوپInvert 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).



شکل۱: ریخت شناسی(مورفولوژی) ظاهری سلول های بنیادی مزانشیمی چربی انسانی. این سلول ها ظاهری دوکی شکل و کشیده و شبیه فیبروبلاست دارند.

[Downloaded from opsi.ir on 2025-07-14]



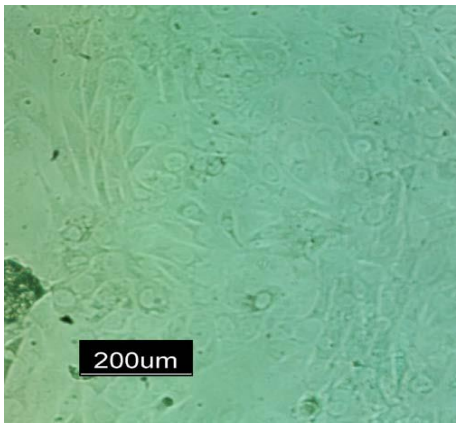
شکل ۲: تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی استخراج شده از بافت چربی انسانی به سلول‌های استخوانی و چربی. A) رنگ آمیزی Oil Red سلول‌های تمایز داده شده به سمت سلول چربی. B) رنگ آمیزیAlizarin Red سلول‌های تمایز داده شده به سمت سلول استخوانی (میکروسکوپ Invert)

جهت شناسایی و تأیید سلول‌های بنیادی استخراج شده از دو روش استفاده شد: ۱) تأیید نشانگرهای (مارکرهای) سطحی سلول‌های بنیادی مزانشیمی به روش فلوسایتومتری با استفاده از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال اختصاصی علیه نشانگرهای سطحی CD۳۴، CD۴۴، CD۱۰۵، CD۴۵، و CD۹۰. ۲) تمایز سلول‌های بنیادی به سلول‌های چربی و اسلول‌های استخوانی و رنگ آمیزی این سلول‌ها به ترتیب با رنگ‌های Oil Red و Alizarin Red (شکل ۲).

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

۲-۲ تهیه سلول های HepG۲

رده سلولی HepG۲ از بانک سلولی انستیتوپاستور تهیه گردید و در شرایط مناسب کشت و تکثیر شد (شکل ۳).



شکل۳: سلول های رده سلولی HepG۲

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 سانتی‌متر و ضخامت ۲ میلی‌متر تهیه شدند. این صفحات پس از استریل شدن در چاهک های ظرف (پلیت) ۴ خانه قرار داده شدند و سلول های بنیادی مزانشیمی و سلول‌های HepG۲ روی آنها کشت داده شدند.

۲-۴ بررسی میکروسکوپی سلول ها

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

۲-۵ طیف سنجی

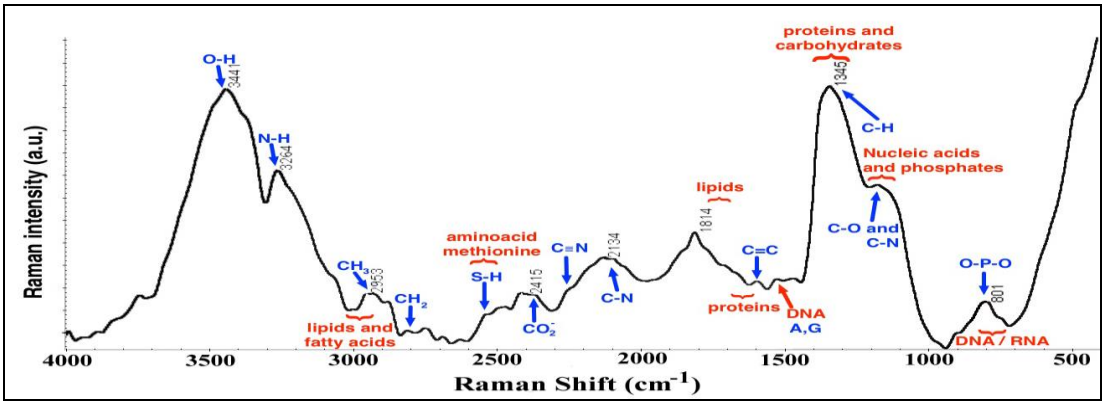
دستگاه طیف سنج رامان بکار رفته در این مطالعه، مدل Almeaga Dispersive Raman، ساخت شرکت Thermo Nicolete، دارای پرتو خروجی قطبی شده با طول موج ۵۳۲ nm، ناشی از هماهنگ دوم لیزر Nd:YLF می باشد. جهت حفظ کیفیت نمونه، شدت نور لیزر روی ۳۰ mW تنظیم و از عدسی ۶۰x با دریچه عددی ۰,۹ استفاده شده است.

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).

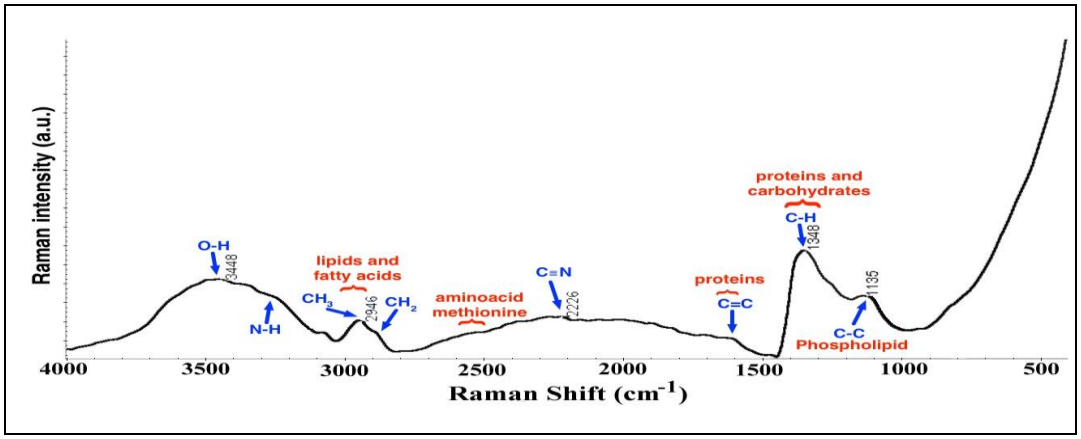
۳- نتایج و تحلیل آنها

بر اساس نتایج به دست آمده تفاوت‌های قابل توجهی در طیف رامان مربوط به سلول‌های بنیادی مزانشیمی استخراج شده از بافت چربی و سلول‌های دودمان کبدی HepG۲ وجود دارد. همان‌طور که مشخص است تعداد قله‌های موجود در طیف سلول دودمان کبدی HepG۲ بیشتر از قله‌های 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. قله‌ها برای سلول دودمان کبدی HepG۲ در نوارهای ۳۴۴۱ cm^{-1}، ۳۲۶۴ cm^{-1}، ۲۹۵۳ cm^{-1}، ۲۷۵۱ cm^{-1}، ۲۴۱۵ cm^{-1}، ۲۱۳۴ cm^{-1}، ۱۸۱۴ cm^{-1}، ۱۳۴۵ cm^{-1}، ۸۰۱ cm^{-1} و

[Downloaded from opsi.ir on 2025-07-14]



شکل ۴: طیف میانگین سلول دودمان کبدی HepG۲. 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 $۳۴۴۸\ cm^{-۱}$، $۲۹۴۶\ cm^{-۱}$، $۲۲۲۶\ cm^{-۱}$، $۱۳۴۸\ cm^{-۱}$ و $۱۱۳۵\ cm^{-۱}$ قرار گرفته است. نوار $۲۹۵۳\ cm^{-۱}$ و $۲۷۵۱\ cm^{-۱}$ در طیف سلول HepG۲ به ترتیب نشان دهنده ی حضور پیوندهای مولکولی CH۳ و CH۲ 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 وC=C بر حضور پروتئین ها دلالت دارندکه نوارهای $۱۳۴۵\ cm^{-۱}$ و $۱۵۹۰\ cm^{-۱}$ متعلق به آنها می باشند. در طیف سلول مزانشیمی پیوند C-H با شدت کمتر بوده و پیوند C=C ظاهر نشده است. نواری که نشان دهنده DNA و RNA است بازه $۷۸۰-۸۱۴\ cm^{-۱}$ 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) ٤٦٥-۲٥۹.

[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)۷٦۷-۷٦۹.

[۳] Linda Harkness, Sergey M. Novikov, Jonas Beermann, Sergey I. Bozhevolnyi and Moustapha Kassem, "Identification of Abnormal Stem Cells Using Raman Spectroscopy" (۲۰۱۲) ۲۱٥٤-۲۱٥٥.

[٤] Andrew Downes and Alistair Elfick, "Raman Spectroscopy and Related Techniques in Biomedicine" (۲۰۱۰) ۱۸۷۳-۱۸۷٤.

[٥] Zanyar Movasaghi, Shazza Rehman and Ihtesham U. Rehman, "Raman Spectroscopy of Biological Tissues" (۲۰۰۷) ٤۹٦-٥۲٤.

[Downloaded from opsi.ir on 2025-07-14]