مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد
دوره سی و چهار، شماره سه، خرداد ۱۴۰۵
تاریخ دریافت:۱۴۰۴/۰۹/۲۹
تاریخ پذیرش:۱۴۰۴/۱۲/۰۴

استخراج، تعیین هویت و فریز کردن سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی انسان به روش آنزیمی

راضیه تقی‌زاده قوام‌آبادی[۱]، حسن مروتی*[۲]، زهرا تقی‌پور[۳]

مقاله پژوهشی

مقدمه: سلول‌های بنیادی مزانشیمی به دلیل توانایی بالا در تمایز به رده‌های مختلف سلولی و ترشح فاکتورهای ترمیمی در مطالعات بازسازی بافت دارای اهمیت زیادی می‌باشند. در میان منابع مختلف این سلول‌ها، بافت چربی به دلیل دسترسی آسان، بازدهی بالا و تهاجم کم منبع مهمی به‌شمار می‌رود. این مطالعه با هدف جداسازی سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی با استفاده از آنزیم کلاژناز I و بررسی ویژگی‌های سلول‌های به‌دست آمده جهت ایجاد بانک سلولی برای مرکز کشت سلول گروه علوم تشریح انجام گردید.

روش بررسی: در این مطالعه سلول‌های چربی حاصل از لیپوساکشن تهیه گردید و با استفاده از آنزیم کلاژناز سلول‌ها استخراج و جداسازی شدند. سلول‌های جدا شده در محیط کشت مناسب کشت داده شد و سپس مارکرهای سطحی سلول‌های مزانشیمی با استفاده از آزمون فلوسیتومتری ارزیابی گردید. هم‌چنین توانایی تمایز سلول‌ها به رده‌های چربی و استخوان از طریق القا تمایز اختصاصی و انجام رنگ‌آمیزی‌های مربوطه مورد سنجش قرار گرفتند. در نهایت سلول‌ها فریز شده و برای نگهداری در تانک ازت قرار گرفتند.

نتایج: ماهیت سلول‌های مزانشیمی با بیان بالای مارکرهای سطحی CD۹۰ و CD۷۳ و بیان پایین مارکرهای خونی مانند CD۳۴ و CD۴۵ مورد تایید قرار گرفت. هم‌چنین رنگ‌آمیزی اویل رد و آلیزارین رد به ترتیب تایید کننده تمایز سلول‌ها به سمت چربی و استخوان بود.

نتیجه‌گیری: نتایج مطالعه نشان داد که سلول‌های استخراج شده با روش آنزیمی کلاژناز، ویژگی‌های مورفولوژیکی، ایمنوفنوتیپی و عملکردی منطبق با معیارهای سلول‌های بنیادی مزانشیمی را دارا بوده و قابلیت بالایی برای کاربردهای مهندسی بافت و طب بازساختی دارند.

واژه‌های کلیدی: سلول بنیادی، جداسازی سلولی، آنزیم کلاژناز، تمایز سلولی

ارجاع: تقی‌زاده قوام‌آبادی راضیه، مروتی حسن، تقی‌پور زهرا. **استخراج، تعیین هویت و فریز کردن سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی انسان به روش آنزیمی**. مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد ۱۴۰۵؛ ۳۴ (۳): ۵۰-۱۰۰۳۹.

۱- دانشجوی Phd بافت شناسی، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.
۲- گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.
۳- گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، رفسنجان، ایران.
*(نویسنده مسئول)؛ تلفن: ۰۹۱۶۶۱۸۲۳۸۴، پست الکترونیکی: hmorovvati@ut.ac.ir ، صندوق پستی: ۶۴۵۳-۱۴۱۵۵

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-06-16]

[DOI: 10.18502/ssu.v34i3.21723]

مقدمه

سلول‌های بنیادی مزانشیمی از مزودرم اولیه مشتق می‌شوند و پتانسل بالایی برای خود تجدیدپذیری و تمایز به رده‌های مختلف سلولی را دارا می‌باشند (۱). این سلول‌ها می‌توانند به سلول‌های مختلف از جمله سلول‌های استخوان‌ساز و غضروف ساز تمایز یابند (۲). سلول‌های بنیادی مزانشیمی قادر به تولید میزان زیادی سیتوکین، کموکین و فاکتورهای رشد می‌باشند که از این طریق می‌توانند به بهبود بافت‌های آسیب دیده کمک کنند (۳). در مطالعات اخیر نشان داده شده است که این سلول‌ها می‌توانند در درمان بیماری‌های مختلف خونی، قلبی عروقی و عصبی نقش داشته باشند. برخی از مطالعات نشان داد که سلول‌های بنیادی مزانشیمی قادر به درمان نقص‌های پوستی و ترمیم نوروپاتی دیابتی در موش‌های مبتلا به دیابت نوع اول و نوع دوم می‌باشند (۴). هم‌چنین می‌توانند باعث بهبود فرایند غضروف‌زایی شوند. سلول‌های بنیادی مزانشیمی را تقریباً می‌توان از تمام بافت‌های بدن از جمله مغز استخوان، پوست، بافت چربی، بند ناف، خون و پالپ دندانی استخراج نمود (۵). اگرچه در منابع استخراج سلول‌ها تنوع زیادی وجود دارد اما مقدار بافت قابل برداشت کم می‌باشد در نتیجه تعداد سلول‌های قابل جداسازی نیز کم خواهد بود (۶،۷). در بین سلول‌های بنیادی بالغ، سلول بنیادی مشتق از بافت چربی به علت قدرت تکثیر بالای این سلول‌ها و دسترسی آسان و هم‌چنین استخراج تعداد زیاد بدون ایجاد آسیب، مورد توجه بسیاری از محققان قرار گرفتند (۸،۹). امروزه به وفور شاهد عمل جراحی لیپوساکشن می‌باشیم که حجم زیاد این چربی‌های خارج شده از طریق لیپوساکشن می‌تواند مورد استفاده محققین در حوزه تحقیقات سلول‌های بنیادی مزانشیمی قرار گیرد (۱۰،۱۱). سلول‌های بنیادی مشتق از چربی قابلیت تمایز به رده‌های مخلف سلولی در شرایط بدن و آزمایشگاه را دارند. محققین نشان داده‌اند این سلول‌ها تحت شرایط خاص قابلیت تمایز به انواع سلول‌ها مانند سلول‌های عضله صاف عروقی، هپاتوسیت‌ها و سلول‌های بتای جزایر لانگرهانس دارا می‌باشند (۱۲،۱۳). حتی توانایی تمایز سلول‌های بنیادی مشتق از چربی به سلول‌های مشتق از لایه اکتودرمی مانند سلول‌های عصبی را نیز گزارش شده است (۱۴،۱۵). از دیگر مزایای سلول‌های بنیادی مشتق از چربی می‌توان به ترشح به میزان زیاد سیتوکین‌ها و فاکتورهای رشد اشاره نمود که این ترشحات می‌تواند به ترمیم بافت‌های آسیب دیده و بهبود رگ‌زایی منجر گردد. هم‌چنین می‌توانند به سلول‌های غضروف‌ساز و استخوان‌ساز نیز تمایز یابند (۱۷،۱۶). با توجه به کاربرد بسیار زیاد سلول‌های بنیادی مشتق از چربی و از آنجایی‌که این سلول‌ها دارای اهمیت درمانی و تحقیقاتی می‌باشند جداسازی این سلول‌ها بسیار مهم و حیاتی می‌باشد. برای جداسازی سلول‌های بنیادی روش‌های مختلفی مانند روش‌های آنزیمی، مکانیکی و ترکیبی شامل آنزیمی‌مکانیکی وجود دارد. مطالعات زیادی اثربخشی روش‌های آنزیمی به‌ویژه آنزیم کلاژناز I را در جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی با بازدهی بالا و حفظ قابلیت تمایز آن‌ها مورد بررسی و تایید قرار داده‌اند و این روش‌ها امکان جداسازی سلولی موثری را فراهم نموده‌اند (۲۰-۱۸) اما انتخاب یک روش جداسازی موثر و دقیق به عوامل مختلفی مانند تجهیزات موجود، بودجه و اهداف تحقیقاتی وابسته است. روش ترکیبی به‌عنوان موثرترین روش از نظر بازدهی، بقا و قابلیت تمایز سلول‌ها ذکر گردیده، اما برخی از محققان روش آنزیمی را روش مناسب با بازدهی بالا بیان نمودند (۲۱). بنابراین یافتن بهترین روش برای جداسازی سلول‌ها مهم می باشد. علاوه بر جداسازی، حفظ پتانسیل و زیست‌پذیری سلول‌های بنیادی مزانشیمی پس از فرایندهای ذخیره‌سازی مانند فریزکردن، برای کاربردهای درمانی و تحقیقاتی مهم و حیاتی می‌باشد. پروتکل‌های استاندارد شده فریز کردن، شامل استفاده از مواد محافظ سرما مانند DMSO، به حفظ ساختار و عملکرد سلول‌ها کمک شایانی می‌کند (۲۴-۲۲). اگرچه مطالعات متعددی در سطح بین المللی به جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی پرداخته‌اند، اما توسعه و اعتبارسنجی منابع سلولی استاندارد و بومی که بتوانند به‌طور مشخص نیازهای مرکز تحقیقاتی را برآورده نماید، می‌تواند یک گام مهم در جهت ارتقا تحقیقات علمی کشور محسوب گردد. در این راستا و با توجه به نیاز اساسی به زیرساخت‌های تحقیقاتی مورد اعتماد و قابل اتکا در مراکز دانشگاهی، این پژوهش بر ایجاد و اعتبارسنجی یک لاین

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-06-16]

[DOI: 10.18502/ssu.v34i3.21723]

CC BY-NC 4.0

سلولی معتبر از سلول‌های بنیادی مزانشیمی تمرکز دارد. لذا هدف این مطالعه ارائه یک پروتکل عملیاتی بسیار دقیق و شفاف برای جداسازی و حفظ سلول‌های بنیادی مشتق از چربی، و مهم‌تر از آن ایجاد و اعتبارسنجی یک لاین سلولی استاندارد و معتبر جهت ایجاد بانک سلولی برای مرکز کشت سلول گروه علوم تشریح بود. این پژوهش در جهت فراهم نمودن یک منبع سلولی پایدار و بومی برای گروه علوم تشریح دانشگاه و افزایش قابلیت اطمینان نتایج تحقیقات داخلی و پیشرفت در حوزه سلول درمانی صورت گرفت.

روش بررسی

تهیه نمونه‌های بافت چربی: با هماهنگی با پزشک جراح و بعد از کسب رضایت آگاهانه، بافت چربی تعدادی از بیماران جوان با سن ۴۰-۳۰ سال که به بیمارستان علی‌ابن‌ابیطالب رفسنجان جهت انجام عمل لیپوساکشن مراجعه نموده بودند استخراج گردید. پزشک جراح بافت چربی را در شرایط استریل، در داخل فالکون‌های ۵۰ میلی‌لیتری حاوی محیط کشت DMEM (Gibco) و آنتی‌بیوتیک پنی‌سلین/استرپتومایسین (Sigma Aldrich) جمع‌آوری نموده و سپس بافت‌های چربی در کمترین زمان به آزمایشگاه منتقل گردید.

جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی از بافت چربی: ابتدا قطعات چربی با استفاده از تیغ بیستوری و قیچی جراحی استریل به قطعات کوچک تبدیل شدند سپس جهت حذف کامل خون و سلول‌های خونی و آلودگی‌های بافتی دیگر با استفاده از PBS (Gibco) به خوبی شستشو شدند و قطعات چربی سفید و تمیز باقی ماندند. محلول کلاژناز I (Bio Idea) با غلظت نهایی ۱۰٪ حجمی با رقیق‌سازی محلول استوک کلاژناز I در محیط کشت DMEM به نسبت ۱:۹ تهیه شد. سپس این محلول به بافت چربی به نسبت حجمی ۱:۱ اضافه گردید و به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفتند و هر ده دقیقه یک بار فالکون حاوی چربی‌ها به خوبی تکان داده شد تا بافت چربی کاملا هموژن و یک دست گردد. پس از گذشت این زمان برای خنثی نمودن آنزیم کلاژناز I از FBS (Gibco) (۵۰ میکرولیتر/ یک میلی‌لیتر) استفاده نمودیم. سپس فالکون در داخل سانتریفیوژ قرار گرفت و روغن و محلول رویی به‌طور کامل برداشته و دور ریخته شد و سلول‌های ته‌نشین شده در ته فالکون به فلاسک فیلتردار مخصوص کشت سلول که حاوی محیط کشت DMEM غنی شده با آنتی‌بیوتیک پنیسیلین/استرپتومایسین ۱٪ و FBS ۱۰٪ بود، منتقل گردیدند. فلاسک در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و میزان CO_2 ۵ درصد قرار گرفت. بعد از ۲۴ ساعت محیط کشت فلاسک کاملا تخلیه گردید تا تمام سلول‌هایی که به کف فلاسک نچسبیده‌اند به همراه چربی‌ها و خونابه‌های اضافه از محیط کاملا خارج شوند و مجدد محیط کشت تازه به سلول‌ها اضافه گردید. سلول‌ها در این مرحله هنوز حالت کروی شکل داشتند. بعد از آن محیط کشت سلول‌ها هر سه یا چهار روز یک بار تعویض گردید و سلول‌ها مرتب با استفاده از میکروسکوپ نوری معکوس مورد بررسی قرار گرفتند. تقریبا پس از ۲۴ ساعت شکل سلول‌ها دوکی و مشابه فیبروبلاست گردیدند. بعد از رسیدن تراکم سلول‌ها به ۸۰ درصد با استفاده از تریپسین ۰/۲۵٪ (Sigma) پاساژ سلولی انجام شد. سلول‌ها پس از پاساژ دوم و تریپسینه شدن، جهت تایید هویت و ماهیت مزانشیمی از طریق آزمون فلوسایتومتری مورد ارزیابی قرار گرفتند و هم‌چنین جهت ارزیابی توان تمایز به استخوان . چربی در دیش‌های ۱۲ خانه کشت داده شد.

فلوسیتومتری: برای انجام روش فلوسایتومتری، بعد از تخلیه محیط کشت و شستشو با PBS، سلول‌ها با استفاده از تریپسین از کف فلاسک جداسازی شدند محیط کشت حاوی سرم به آن‌ها اضافه گردید که اثر تریپسین خنثی گردد. سپس سلول‌ها به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۸۰۰rpm سانتریفیوژ شدند و به مدت ۳۰ دقیقه با استفاده از پارافرمالدئید در دمای اتاق فیکس شده و به وسیله محلول شستشوی مخصوص فلوسایتومتری شستشو شدند. سپس سلول‌ها با goat serum و bovine serum albumin به مدت یک ساعت انکوبه گردیدند. بعد از آن سلول‌ها با آنتی‌بادی کونژوگه به مدت دو ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردیدند در (جدول ۱) آنتی‌بادی‌های مورد استفاده در آورده شده‌اند. بعد از شستشو با PBS و سانتریفیوژ به مدت ۵ دقیقه در سرعت ۲۰۰۰rpm، سلول‌ها توسط دستگاه

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-06-16]

[DOI: 10.18502/ssu.v34i3.21723]

CC BY-NC 4.0

(Becton Dickinson, Germany) FACS Calibur cytometer ارزیابی و داده‌ها با استفاده از نرم افزار WinMDI 2.8 آنالیز گردید.

تمایز سلول‌های بنیادی مشتق از چربی به استخوان: جهت انجام تمایز سلول‌ها به استخوان از پروتوکل نوربخش و همکاران استفاده گردید (۲۵). ابتدا سلول‌ها با تراکم ۳×۱۰^{۴} سلول در هر خانه از پلیت‌های ۱۲خانه کشت گردیدند و با محیط کشت DMEM غنی شده در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و میزان CO_2 ۵ درصد انکوبه شدند. بعد از گذشت ۲۴ ساعت که سلول‌ها کاملا به کف پلیت چسبیدند، محیط کشت کاملا خارج شد و محیط کشت تمایز استخوان اضافه گردید. محیط القایی حاوی ۱۰ نانومولار دگزامتازون، ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر اسید آسکوربیک دو فسفات و ۱۰ میلی‌مولار β-گلیسروفسفات بود. محیط کشت تمایز استخوان هر سه روز یکبار تعویض گردید و بعد از گذشت ۲۱ روز، آزمون رنگ‌آمیزی آلیزارین رد جهت بررسی میزان تجمع کلسیم انجام گرفت.

جدول ۱: لیست آنتی بادی‌های استفاده شده در فلوسیتومتری

آنتی‌بادی سلول های مزانشیمی	شماره کاتالوگ	آنتی‌بادی سلول‌های خونی	شماره کاتالوگ
Anti-Human-CD73-FITC	ab239246-abcam	Anti-Human-CD34-RPE	ab23830-abcam
Anti-Human-CD90-FITC	ab124527-abcam	Anti-Human-CD45-RPE	ab214501-abcam

رنگ‌آمیزی آلیزارین رد: در ابتدا محیط کشت سلول‌ها به‌طور کامل خارج گردید و سلول‌ها با PBS شستشو شدند و سپس با استفاده از پارافرمالدئید ۴٪ به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق فیکس شدند. سپس پارافرمالدئید از خانه‌های پلیت خارج گردید و بعد از شستشو با PBS، سلول‌ها با محلول آلیزارین رد به مدت ۱۵ دقیقه، در دمای ۳۷ درجه و محیط تاریک انکوبه شدند. بعد از گذشت این زمان سلول‌ها با PBS شستشو و بعد از خشک شدن، سلول‌ها با میکروسکوپ نوری معکوس مورد بررسی قرار گرفتند و عکس تهیه گردید.

تمایز سلول‌های بنیادی مشتق از چربی به چربی: جهت انجام تمایز سلول‌ها به چربی از پروتوکل نوربخش و همکاران استفاده گردید (۲۵). در ابتدا سلول‌ها با تراکم ۳×۱۰^{۴} در پلیت‌های ۶ خانه کشت شدند و با محیط کشت DMEM غنی شده در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و میزان CO_2 ۵ درصد انکوبه گردیدند. بعد از گذشت ۲۴ ساعت و چسبیدن سلول‌ها به کف پلیت محیط کشت هر خانه به‌طور کامل خارج گردید و محیط کشت تمایز چربی که حاوی محیط کشت DMEM غنی شده بود و با ۱۰۰nM/ml دگزامتازون و ۵۰µg/ml ایندومتاسین تکمیل شده بود، برای ۱۴ روز انکوبه گردیدند. محیط کشت تمایزی هر سه روز یک بار تعویض گردید. بعد از گذشت این زمان رنگ‌آمیزی اویل رد جهت بررسی میزان قطرات چربی انجام گرفت.

رنگ‌آمیزی اویل رد: در ابتدا محیط کشت سلول‌ها به‌طور کامل خارج گردید و سلول‌ها با PBS شستشو شدند و سپس با استفاده از پارافرمالدئید ۴٪ به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق فیکس شدند. سپس پارافرمالدئید از خانه‌های پلیت خارج گردید و بعد از شستشو با PBS، سلول‌ها با محلول اویل رد به مدت ۱۵ دقیقه، در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و محیط تاریک رنگ‌آمیزی شدند. سپس با PBS شسته شده و بعد از خشک شدن با استفاده از میکروسکوپ نوری معکوس بررسی شدند و عکس تهیه گردید.

فریزکردن سلول‌ها: سلول‌های بنیادی مزانشیمی که در فلاسک‌های T۷۵ کشت داده شده بودند بعد از رسیدن به تراکم بالای ۸۰ درصد، تریپسینه شدند. به این ترتیب که ابتدا محیط کشت سلول‌ها به طور کامل تخلیه گردید، سپس ۳ میلی لیتر تریپسین ۰/۲۵٪ به سلول‌ها اضافه گردید و بعد از یک دقیقه و مشاهده سلول‌ها در زیر میکروسکوپ از جداشدن کامل آن‌ها از کف فلاسک اطمینان حاصل نموده و جهت خنثی نمودن

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-06-16]

[DOI: 10.18502/ssu.v34i3.21723]

CC BY-NC 4.0

تریپسین، ۹ میلی‌لیتر محیط کشت حاوی FBS ۱۰٪ به سلول‌ها اضافه گردید. محتوای فلاسک به‌طور کامل به یک فالکون ۱۵ منتقل شد و به مدت ۵ دقیقه با سرعت rpm۱۵۰۰ سانتریفیوژ گردید. محلول رویی به‌طور کامل خارج گردید و سلول‌ها شمارش گردید. تعداد یک میلیون سلول به یک تیوب ۲ میلی لیتری منتقل و ۹۰۰ میکرولیتر از FBS و ۱۰۰ میکرولیتر DMSO به تیوب اضافه گردید. سپس سلول‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در فریزر منفی ۲۰، سپس به مدت ۲۴ ساعت در فریزر منفی ۷۰ قرار گرفتند و در نهایت به تانک ازت منتقل گردیدند.

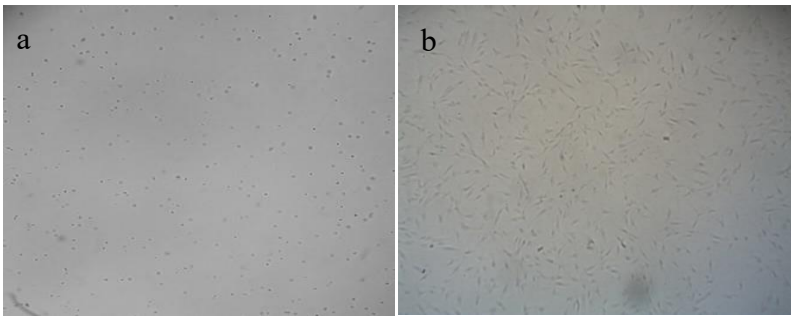
نتایج

مورفولوژی سلول‌ها: سلول‌های استخراج شده و کشت داده شده در محیط DMEM حاوی FBS ۱۰٪ و پنی‌سیلین/استرپتومایسین ۱٪ در روزهای مختلف با میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفتند. یک روز پس از استخراج و شستشوی با PBS و آنتی‌بیوتیک ۱٪ سلول‌ها چسبیده به کف فلاسک تقریبا ظاهری کروی شکل داشتند (تصویر 1a). سلول‌ها سه روز پس از کشت مورفولوژی دوکی و شبه فیبروبلاستی با قدرت تکثیر بالا را نشان دادند (تصویر 1b).

نتایج فلوسیتومتری: نتایج آزمون فلوسایتومتری اولیه نشان داد که سلول‌ها، به خوبی بیان کننده مارکرهای اختصاصی سلول‌های مزانشیمی مانند *CD*۷۳ و *CD*۹۰ بودند و میزان بیان این مارکرها به ترتیب ۸۳/۰۶٪ و ۹۰/۸۵٪ بود. میزان بیان مارکرهای رده خونی مانند مارکرهای *CD*۳۴ و *CD*۴۵ به ترتیب مقدارهای ۰/۱۸٪ و ۰/۲۳٪ بود. این نتایج نشان دهنده ماهیت مزانشیمی سلول‌های استخراج شده می‌باشد (تصویر۲).

نتایج تمایز به استخوان: برای ارزیابی توان تمایز استخوانی سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی، از رنگ‌آمیزی آلیزارین رد استفاده شد. پس از ۲۱ روز القای تمایز در محیط کشت تمایز استخوان، تجمع واضح رسوبات کلسیمی در سلول‌های تمایز یافته مشاهده شد که با رنگ‌آمیزی شدید آلیزارین رد تأیید گردید. این تجمع مواد معدنی بیانگر ترشح ماتریکس خارج سلولی اختصاصی استئوبلاست‌ها بود. وجود گره‌های رنگ‌پذیر قرمز نشان دهنده تمایز موفق و معدنی شدن سلول‌ها بود (تصویر۳).

نتایج تمایز به چربی: برای ارزیابی توان تمایز چربی سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی، از رنگ‌آمیزی اویل رد استفاده گردید. پس از گذشت ۲۱ روز از القای تمایز در محیط کشت القای چربی، حضور قطرات لیپیدی درون سلولی با رنگ‌پذیری قرمز مشخص گردید. این نتایج نشان‌دهنده تجمع چربی و فعالیت آدیپوژنی سلول‌ها بود. رنگ‌آمیزی مشخص لیپیدها تأییدی بر تمایز موفق و ذخیره چربی در سلول‌های تمایز یافته محسوب می‌شود (تصویر).

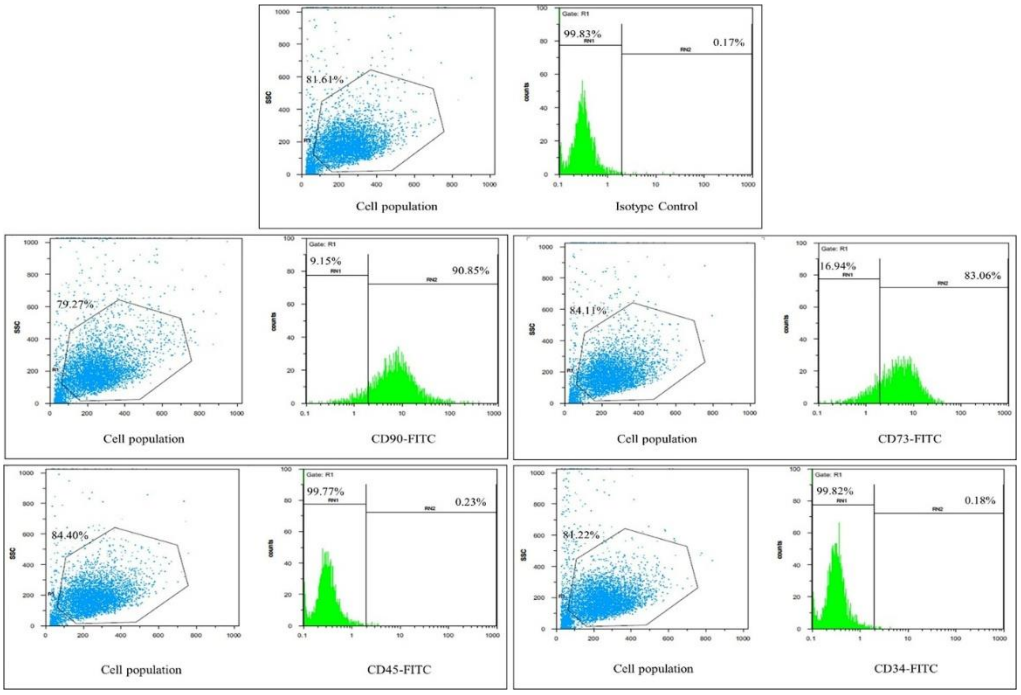


تصویر ۱: a: سلول‌های جدا شده از بافت چربی در مراحل اولیه کشت که به‌صورت کروی شکل می‌باشند b: سلول های جدا شده بعد از سه روز کشت تقریبا دوکی شکل می‌باشند

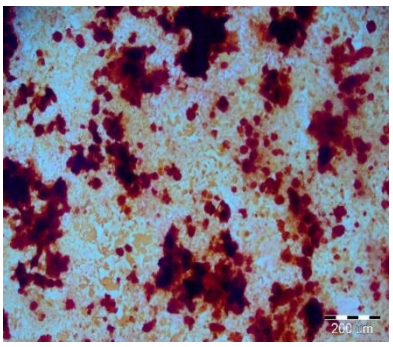
[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-06-16]

[DOI: 10.18502/ssu.v34i3.21723]

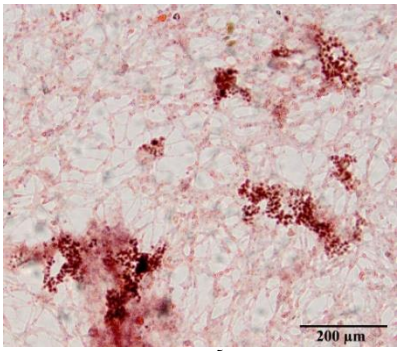
CC BY-NC 4.0



تصویر ۲: نتایج فلوسایتومتری مارکرهای اختصاصی سلول‌های مزانشیمی (*CD*۹۰ ، *CD*۷۳) و مارکرهای رده اریتروئیدی (*CD*۴۵ ، *CD*۳۴) برای سلول‌های مزانشیمی مشتق از چربی



تصویر ۳: رسوبات هیدروکسی آپاتیت قرمز بعد از رنگ آمیزی با آلیزارین رد مشاهده می‌گردد



تصویر ۴: قطرات قرمز چربی با رنگ‌آمیزی اویل رد قابل مشاهده می‌باشند

CC BY-NC 4.0

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-06-16]
[DOI: 10.18502/ssu.v34i3.21723]

بحث

سلول‌های بنیادی مزانشیمی اولین بار از مغز استخوان استخراج و شناسایی گردیدند. این سلول‌ها توانایی تمایز به چندین نوع سلول از جمله سلول‌های استخوانی، غضروفی و چربی را دارا می‌باشند. در سال‌های اخیر منابع مختلفی برای جداسازی این سلول‌ها معرفی گردیده است. از جمله این منابع می‌توان به بافت چربی، بندناف و پالپ دندان اشاره نمود. سلول‌های مشتق از بافت چربی به دلیل فراوانی، استخراج آسان تر و توان تکثیر بالا از بهترین منابع به حساب می‌آیند. سلول‌های بنیادی مزانشیمی معمولا در محیط کشت مزانشیمی، ظاهری دوکی و شبه فیبروبلاستی دارند. مارکرهای سطح سلولی خاصی از قبیل *CD73*، *CD90* و *CD105* در این سلول‌ها بیان می‌گردد و این سلول‌ها توانایی تمایز به سه رده سلولی اصلی (استخوان، غضروف و چربی) را دارند. این سلول‌ها احتمال کمتر تومورزایی و سهل‌الوصول بودن با مسائل اخلاقی کمتر نسبت به سلول‌های بنیادی جنینی مورد توجه بیشتر در سلول درمانی و مهندسی بافت قرار گرفته‌اند (۲۶,۲۷). از سال ۱۹۷۰ استخراج سلول‌های مزانشیمی و ایجاد بانک سلولی در خیلی از مراکز امکان‌پذیر گردیده است. خریداری سلول‌های بنیادی مزانشیمی از مراکز دیگر و هم‌چنین تایید بنیادی بودن این سلول‌های خریداری شده از طریق تکنیک‌های فلوسیتومتری و بررسی‌های توان تمایزی آن‌ها به رده‌های چربی و استخوان، امری هزینه‌بر است. از سوی دیگر، با توجه به توسعه روزافزون مطالعات سلولی و نیاز به دسترسی به یک منبع سلولی ویژه، ایجاد یک بانک سلولی اختصاصی در گروه علوم تشریح ضروری به‌نظر می‌رسید. لذا در این مطالعه تصمیم گرفته شد که سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی انسان استخراج و یک بانک سلول بنیادی مزانشیمی برای استفاده در تحقیقات آتی تهیه و نگهداری گردد. در مطالعه حاضر، سلول بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی با استفاده از روش آنزیمی مبتنی بر کلاژناز نوع I استخراج گردیدند. بررسی مورفولوژیکی سلول‌ها در روز اول پس از استخراج نشان داد که سلول‌ها به کف فلاسک چسبیده و ظاهر کروی داشتند، اما پس از سه روز از کشت به تدریج به فرم دوکی و شبه فیبروبلاستی تغییر یافتند. این تغییر مورفولوژی، نشانگر آغاز تکثیر فعال سلول‌ها و ورود به فاز رشد لگاریتمی می‌باشد و با یافته‌های مطالعات پیشین در مورد سلول بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی کاملا مطابقت دارد (۲۸,۲۹). مارکرهای سطحی *CD*۷۳ و *CD*۹۰ در سلول‌های استرومایی مزانشیمی بیان می‌گردند. در این مطالعه نتایج فلوسیتومتری نشان داد که سلول‌های به دست آمده بیان بالایی از مارکرهای *CD*۷۳ و *CD*۹۰ را داشتند و مقادیر آن‌ها به ترتیب ۸۳/۰۶٪ و ۹۰/۸۵٪ بود از طرف دیگر مارکرهای سطحی *CD*۳۴ و *CD*۴۵ که مربوط به رده‌های خون‌ساز می‌باشند در مطالعه ما بیان کمی داشتند (به ترتیب ۰/۱۸٪ و ۰/۲۳٪). این نتایج نشان دهنده مزانشیمی بودن سلول‌های استخراج شده می‌باشد. سلول بنیادی مزانشیمی مطابق با معیارهای انجمن بین‌المللی درمان سلولی (ISCT) به سلول‌هایی گفته می‌شود که این الگوی ایمونوفنوتیپی شامل بیان مثبت *CD*۷۳، *CD*۹۰ و *CD*۱۰۵ و عدم بیان *CD*۳۴ و *CD*۴۵ را نشان دهند (۳۰). در مقایسه با مطالعات مشابه، میزان بیان مارکرهای مزانشیمی در پژوهش حاضر در محدوده گزارش شده در منابع معتبر قرار دارد. در مطالعه Mohamed-Ahmad و همکاران در سال ۲۰۱۸ بیان دو مارکر *CD*۷۳ و *CD*۹۰ بیش از ۹۰٪ گزارش گردید و *CD*۴۵ کمتر از ۲٪ گزارش شد (۳۱). بنابراین نتایج حاضر نشان دهنده خلوص بالا و ماهیت مزانشیمی قابل قبول سلول‌های استخراج شده می‌باشد. یکی از مزیت‌های مهم روش آنزیمی به کار رفته در این مطالعه، توان بالای آن در جدا نمودن موثر بخش استرومایی بافت چربی که حاوی سلول‌های بنیادی مزانشیمی است، می‌باشد. آنزیم کلاژناز با تجزیه کردن رشته‌های کلاژن در بافت، باعث آزادسازی سریع سلول‌ها از ماتریکس خارج سلولی و افزایش بازده کلی استخراج می‌گردد. در این روش، شکل طبیعی و زنده‌مانی سلول‌ها به نحو خوبی حفظ می‌شود (۳۲). مطالعه Lee و همکاران در سال ۲۰۲۰ نشان داد که استفاده از محلول ۰/۱٪ کلاژناز نوع I به مدت محدود ۴۰ دقیقه‌ای در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، بهترین نتیجه را از نظر تعداد و کیفیت سلول‌های به‌دست آمده ایجاد می‌نماید (۳۳). هم‌چنین پژوهش‌های جدیدتر نیز گزارش کرده‌اند که روش آنزیمی در مقایسه با روش‌های مکانیکی، سلول‌هایی با زنده مانی

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-06-16]

[DOI: 10.18502/ssu.v34i3.21723]

CC BY-NC 4.0

بیشتر و توان کلون زایی بالاتر فراهم می‌کنند (۳۲). آزمایش‌های تمایزی نیز ماهیت چند توان سلول‌های استخراج شده را تایید کرد. در شرایط القای استخوانی با استفاده از محیط القایی حاوی دگزامتازون، اسید آسکوربیک دو فسفات و β-گلیسروفسفات، سلول‌ها پس از ۲۱ روز، رنگ‌پذیری واضحی با آلیزارین رد نشان دادند که بیانگر تجمع رسوبات کلسیمی و ترشح ماتریکس معدنی استئوبلاستی بود. در محیط القای چربی حاوی دگزامتازون و ایندومتاسین نیز، بعد از ۲۱ روز رنگ‌آمیزی با اویل رد نشان دهنده تجمع قطرات چربی درون سلولی و تمایز موفق آدیپوژنی بود. نتایج حاضر با یافته‌های مطالعات متعدد از جمله Zuk و همکاران در سال ۲۰۰۱ و Mohamed-Ahmed و همکاران در سال ۲۰۱۸ هم‌خوانی دارد که در آن‌ها نیز پس از ۲۱ روز القا، رسوبات معدنی و تجمع چربی با همین روش‌ها مشاهده گردید (۳۱,۳۴). هم‌چنین در مطالعه‌ای در سال ۲۰۲۳ نشان داده شد که سلول‌های مزانشیمی مشتق از بافت چربی، ظرفیت تمایز استخوانی (تجمع رسوبات کلسیمی) بالاتری نسبت به منابع دیگر داشتند (۳۵) و هم‌چنین در مطالعه Huang و همکاران در سال ۲۰۲۲، با بررسی مسیرهای مولکولی مرتبط با تمایز به استخوان و چربی در سلول‌های مزانشیمی نشان داد که این مسیرهای مولکولی در سلول‌های مزانشیمی به‌طور مشخص فعال می‌شوند (۳۶). پیشنهاد می شود در مطالعات آینده برای تقویت نتایج تمایز، ارزیابی بیان ژن‌های اختصاصی استخوان‌زایی و آدیپوژنز به روش Real-time PCR انجام گردد تا تمایز در سطح مولکولی نیز تایید گردد. هم‌چنین، اندازه‌گیری کمی میزان رنگ‌پذیری آلیزارین رد و اویل رد از طریق استخراج رنگ و سنجش جذب نوری می‌تواند تایید بیشتری بر توان تمایزی این سلول‌ها به رده‌های غضروفی و استخوانی باشد.

نتیجه‌گیری

به طور کلی، در این مطالعه پروتکل استاندارد شده‌ای برای جداسازی و حفظ سلول‌های بنیادی مزانشیمی با استفاده از آنزیم کلاژناز I ارائه گردید. نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که سلول‌های استخراج شده با روش آنزیمی کلاژناز، ویژگی‌های مورفولوژیکی، ایمنوفنوتیپی و عملکردی منطبق با معیارهای سلول‌های بنیادی مزانشیمی را دارا بوده و قابلیت بالایی برای کاربردهای مهندسی بافت و طب بازساختی دارند و این پژوهش موفق به ایجاد و اعتبار سنجی یک لاین سلولی استاندارد بومی از سلول‌های بنیادی مزانشیمی برای گروه علوم تشریح گردید که می‌تواند پروتکلی قابل اتکا و پایدار برای تحقیقات پیش بالینی و سلول درمانی گردد و گامی موثر در جهت افزایش قابلیت تکرارپذیری نتایج و خودکفایی علمی در حوزه سلول درمانی محسوب گردد. مطالعات آینده می‌تواند بر ارزیابی دقیق‌تر و کمی پتانسیل تمایز این لاین سلولی در شرایط آزمایشگاهی و درون‌تنی، هم‌چنین بررسی امکان‌سنجی کاربردهای درمانی آن و توانایی تمایز سلول‌ها بعد از فریز شدن متمرکز گردد.

سپاس‌گزاری

نویسندگان این مطالعه تشکر و قدردانی خود را از دانشکده پزشکی رفسنجان، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران و بنیاد ملی ایران اعلام می‌دارند. این اثر تحت حمایت مادی بنیاد ملی ایران (INSF) و ستاد علوم و فناوری‌های پزشکی بازساختی و سلول‌های بنیادی برگرفته شده از طرح شماره "۴۰۳۸۷۹۴" انجام شده است.

حامی مالی: بنیاد ملی ایران (INSF) و ستاد علوم و فناوری‌های پزشکی بازساختی و سلول‌های بنیادی

تعارض در منافع: وجود ندارد.

ملاحظات اخلاقی

پروپوزال این مطالعه، توسط کمیته اخلاق دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران مورد تایید قرار گرفته است. (کد اخلاق: IR.UT.VETMED.REC.1403.044).

مشارکت نویسندگان

زهرا تقی‌پور در ارائه ایده، حسن مروتی در طراحی مطالعه، راضیه تقی‌زاده قوام‌آبادی در جمع‌آوری داده‌ها و تحلیل داده‌ها مشارکت داشته و همه نویسندگان در تدوین، ویرایش اولیه و نهایی مقاله و پاسخگویی به سوالات مرتبط با مقاله سهیم هستند.

CC BY-NC 4.0

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-06-16]
[DOI: 10.18502/ssu.v34i3.21723]

References:

*1-*Li J, Wu Z, Zhao L, Liu Y, Su Y, Gong X, et al. ***The Heterogeneity of Mesenchymal Stem Cells: An Important Issue to be Addressed in Cell Therapy.*** Stem Cell Research & Therapy 2023; 14(1): 381.

*2-*Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. ***Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells***. Science 1999; 284(5411): 143-7.

*3-*Caplan AI, Dennis JE. ***Mesenchymal Stem Cells as Trophic Mediators***. J Cell Biochem 2006; 98(5): 1076-84.

*4-*Nagaishi K, Mizue Y, Chikenji T, Otani M, Nakano M, Konari N, et al. ***Mesenchymal Stem Cell Therapy Ameliorates Diabetic Nephropathy Via the Paracrine Effect of Renal Trophic Factors Including Exosomes***. Sci Rep 2016; 6: 34842.

*5-*Rodríguez-Fuentes DE, Fernández-Garza LE, Samia-Meza JA, Barrera-Barrera SA, et al. ***Mesenchymal Stem Cells Current Clinical Applications: A Systematic Review.*** Arch Med Res 2021; 52(1): 93-101.

*6-*Si Z, Wang X, Sun C, Kang Y, Xu J, Wang X, et al. ***Adipose-Derived Stem Cells: Sources, Potency, and Implications for Regenerative Therapies***. Biomedicine & Pharmacotherapy 2019; 114 :108765.

*7-*Mushahary D, Spittler A, Kasper C, Weber V, Charwat V. ***Isolation, Cultivation, And Characterization of Human Mesenchymal Stem Cells.*** Cytometry Part A 2018; 93(1): 19-31.

*8-*Bacakova L, Zarubova J, Travnickova M, Musilkova J, Pajorova J, Slepicka P, et al. ***Stem Cells: Their Source, Potency and Use in Regenerative Therapies with Focus on Adipose-Derived Stem Cells – A Review***. Biotechnol Adv 2018; 36(4): 1111-26.

*9-*Louwen F, Ritter A, Kreis N, Yuan J. ***Insight Into the Development of Obesity: Functional Alterations of Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells***. Obes Rev 2018; 19(7): 888-904.

*10-*Choi JH, Gimble JM, Lee K, Marra KG, Rubin JP, Yoo JJ, et al. ***Adipose Tissue Engineering for Soft Tissue Regeneration***. Tissue Eng Part B Rev 2010; 16(4): 413-26.

*11-*Dubois SG, Floyd EZ, Zvonic S, Kilroy G, Wu X, Carling S, et al. ***Isolation of Human Adipose-Derived Stem Cells from Biopsies and Liposuction Specimens.*** Methods Mol Biol 2008; 449: 69-79.

*12-*Saito Y, Ikemoto T, Tokuda K, Miyazaki K, Yamada S, Imura S, et al. ***Effective Three-Dimensional Culture of Hepatocyte-Like Cells Generated from Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells***. J Hepatobiliary Pancreat Sci 2021; 28(9): 705-15.

*13-*Yogi A, Rukhlova M, Charlebois C, Tian G, Stanimirovic DB, Moreno MJ. ***Differentiation of Adipose-Derived Stem Cells into Vascular Smooth Muscle Cells for Tissue Engineering Applications***. Biomedicines 2021; 9(7): 797.

*14-*Wu SH, Liao YT, Hsueh KK, Huang HK, Chen TM, Chiang ER, et al. ***Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells from a Hypoxic Culture Improve Neuronal Differentiation and Nerve Repair.*** Front Cell Dev Biol 2021; 9: 658099.

15- Zavan B, Vindigni V, Gardin C, D'Avella D, Della Puppa A, Abatangelo G, et al. ***Neural Potential of Adipose Stem Cells***. Discov Med 2010; 10(50): 37-43.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-06-16]

[DOI: 10.18502/ssu.v34i3.21723]

CC BY-NC 4.0

16-Han Y, Ren J, Bai Y, Pei X, Han Y. ***Exosomes from Hypoxia-Treated Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Enhance Angiogenesis Through VEGF/VEGF-R.*** Int J Biochem Cell Biol 2019; 109: 59-68.

17-Yang Y, Cai Y, Zhang Y, Liu J, Xu Z. ***Exosomes Secreted by Adipose-Derived Stem Cells Contribute to Angiogenesis of Brain Microvascular Endothelial Cells Following Oxygen-Glucose Deprivation in Vitro Through MicroRNA-181b/TRPM7 Axis***. J Mol Neurosci 2018; 65(1): 74-83.

18-Hu Z, Chen Y, Gao M, Chi X, et al. ***Novel Strategy for Primary Epithelial Cell Isolation: Combination of Hyaluronidase and Collagenase I***. Cell Prolif 2023; 56(1): e13320.

19-Wang JM, Gu Y, Pan CJ, Yin LR. ***Isolation, Culture and Identification of Human Adipose-Derived Stem Cells***. Exp Ther Med 2017; 13(3): 1039-43.

20-Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, et al. ***Human Adipose Tissue: A Source of Multipotent Mesenchymal Stem Cells.*** Mol Biol the Cell 2002; 13(12): 4279-95.

21-Khazaei S, Keshavarz G, Bozorgi A, Nazari H, Khazaei M. ***Adipose Tissue-Derived Stem Cells: A Comparative Review on Isolation, Culture, And Differentiation Methods.*** Cell Tissue Bank 2022; 23(1): 1-16.

22-Bahsoun S, Coopman K, Akam EC. ***The Impact of Cryopreservation on Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells: A Systematic Review***. J Transl Med 2019; 17(1): 397.

23-Ock SA, Rho GJ. ***Effect of Dimethyl Sulfoxide (DMSO) on Cryopreservation of Porcine Mesenchymal Stem Cells (Pmscs).*** Cell Transplant 2011; 20(8): 1231-9.

24-Pavón A, Beloqui I, Salcedo JM, Martin AG. ***Cryobanking Mesenchymal Stem Cells.*** Methods Mol Biol 2017; 1590: 191-6.

25-Nourbakhsh N, Soleimani M, Taghipour Z, Karbalaie K, Mousavi SB, Talebi A, et al. ***Induced in Vitro Differentiation of Neural-Like Cells from Human Exfoliated Deciduous Teeth-Derived Stem Cells.*** Int J Dev Biol 2011; 55(2): 189-95.

26-Finocchio L, Zeppieri M, Gabai A, Spadea L, Salati C. ***Recent Advances of Adipose-Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cell-Based Therapy for Retinal Diseases***. J Clin Med 2023; 12(22): 7015.

27-Mei R, Wan Z, Yang C, Shen X, Wang R, Zhang H, et al. ***Advances and Clinical Challenges of Mesenchymal Stem Cell Therapy***. Front Immunol 2024; 15: 1421854.

28-Bunnell BA. ***Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells***. Cells 2021; 10(12): 3433.

29-Yuan C, Song W, Jiang X, Wang Y, Li C, Yu W, et al. ***Adipose-Derived Stem Cell-Based Optimization Strategies for Musculoskeletal Regeneration: Recent Advances and Perspectives***. Stem Cell Res Ther 2024; 15(1): 91.

30-Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. ***Minimal Criteria for Defining Multipotent Mesenchymal Stromal Cells. The International Society for Cellular Therapy Position Statement***. Cytotherapy 2006; 8(4): 315-7.

31-Mohamed-Ahmed S, Fristad I, Lie SA, Suliman S, Mustafa K, Vindenes H, et al. ***Adipose-Derived and***

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-06-16]

[DOI: 10.18502/ssu.v34i3.21723]

CC BY-NC 4.0

Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells: A Donor-Matched Comparison. Stem Cell Res Ther 2018; 9(1): 168.

32-Uguten M, van der Sluis N, Vriend L, Coert JH, Harmsen MC, van der Lei B, et al. ***Comparing Mechanical and Enzymatic Isolation Procedures to Isolate Adipose-Derived Stromal Vascular Fraction: A Systematic Review***. Wound Repair Regen 2024; 32(6): 1008-21.

33-Lee SJ, Lee CR, Kim KJ, Ryu YH, Kim E, Han YN, et al. ***Optimal Condition of Isolation from an Adipose Tissue-Derived Stromal Vascular Fraction for the Development of Automated Systems***. Tissue Eng Regen Med 2020; 17(2): 203-8.

34- Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, et al. ***Multilineage Cells from Human Adipose Tissue: Implications for Cell-Based Therapies***. Tissue Eng 2001; 7(2): 211-28.

35- Gou Y, Huang Y, Luo W, Li Y, Zhao P, Zhong J, et al. ***Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells (Mscs) Are a Superior Cell Source for Bone Tissue Engineering***. Bioact Mater 2024; 34: 51-63.

36- Huang HB, Luo HT, Wei NN, Liu ML, He F, Yang W, et al. ***Integrative Analysis Reveals a Lineage-Specific Circular RNA Landscape for Adipo-Osteogenesis of Human Mesenchymal Stem Cells***. Stem Cell Res Ther 2022; 13(1): 106.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-06-16]

[DOI: 10.18502/ssu.v34i3.21723]

CC BY-NC 4.0

Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences
Vol 34| NO 3 | June 2026

Received: 50 Dec 2025
Accepted: 23 Feb 2026

Isolation, Characterization, and Cryopreservation of Human Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells Using the Enzymatic Method

Raziyeh Taghizadeh Ghavamabadi[1], Hassan Morovvati[*1], Zahra Taghipour[2]

Original Article

Introduction: Mesenchymal stem cells (MSCs) play a significant role in regenerative research due to their strong self-renewal capacity, their ability to differentiate into various cell lineages, and their secretion of trophic and regenerative factors. Among different cell sources, adipose tissue is considered particularly valuable because of its easy accessibility and high yield. The aim of this study was to isolate adipose-derived mesenchymal stem cell using collagenase type I and to characterize the isolated cells for establishing a cell bank at the Cell Culture Center of the Department of Anatomy

Methods: In this study, adipose tissue samples obtained through liposuction were enzymatically digested using collagenase type I to isolate the cells. The isolated cells were cultured in an appropriate culture medium, and the expression of mesenchymal surface markers was then analyzed by flow cytometry. In addition, the differentiation potential of the cultured cells toward adipogenic and osteogenic lineages was also evaluated through lineage-specific induction followed by appropriate staining procedures. Finally, the cultured cells were cryopreserved and stored in a liquid nitrogen for long-term preservation.

Results: The mesenchymal phenotype of the isolated cells was confirmed by the high expression of CD90 and CD73 and the low expression of hematopoietic markers CD34 and CD45. Oil Red O and Alizarin Red staining further verified the adipogenic and osteogenic differentiation of the cells, respectively.

Conclusion: The results of this study demonstrated that the cells isolated using the collagenase enzymatic method exhibited morphological, immunophenotypic, and functional characteristics consistent with the standard criteria for mesenchymal stem cells, indicating their strong potential for applications in tissue engineering and regenerative medicine.

Keywords: Stem cell, Cell isolation, Collagenase enzyme, Cell differentiation.

Citation: Taghizadeh Ghavamabadi R, Morovvati H, Taghipour Z. **Isolation, characterization, and cryopreservation of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells using the enzymatic method.** J Shahid Sadoughi Uni Med Sci 2026; 34(3): 10039-50.

[1]Department of Basic Science, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Iran.
[2]Department of Anatomical Sciences, Faculty of Medicine, Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, Iran.
***Corresponding author: Tel:** 09166182384**, email:** hmorovvati@ut.ac.ir

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-06-16]

[DOI: 10.18502/ssu.v34i3.21723]

CC BY-NC 4.0