مقاله پژوهشی

کرایوپرزرویشن سلول های اپی تلیال آمنیون انسانی در محیط فاقد سرم

دکتر حسن نیک نژاد*، دکتر حبیب الله پیروی**، بهرام جامبر نوشین***

دریافت : ۹۱/۴/۲۷ ، پذیرش : ۹۱/۱۰/۱۲

چکیده:

مقدمه و هدف: از مباحث مطرح در نگهداری طولانی مدت سلول ها، حذف سرم حیوانی از محیط های نگهـداری اسـت. در ایـن مطالعه از مایع آمنیون که سرشار از فاکتور های رشد و مواد غذایی است به عنوان جایگزین سرم حیوانی اسـتفاده شـد و اثـرات استفاده از آن در تعداد سلول های زنده و پرتوانی سلول ها پس از کرایوپرزرویشن (نگهداری به روش انجماد) بررسی گردید.

روش کار: در این مطالعه تجربی پس از تهیه پرده آمنیون و کنترل میکروبی آن، سلول های اپی تلیال آمنیـون انـسانی جداسـازی گردید. سلول ها در ۲٤ حالت مختلف در دمای ۱۹۶°C- در نیتروژن مایع به مدت ۱۲ ماه نگهداری شدند و درصد سـلول هـای زنده قبل و پس از نگهداری به روش انجماد با روش های تریپان بلو و MTT ارزیـابی و بیـان مـارکر Oct-4 بـه منظـور بررسـی پرتوانی سلول ها قبل و بعد از نگهداری به روش انجماد با روش ایمونوسیتوشیمی بررسی شدند. نتایج حاصل در بین گروه ها بـا روش ANOVA مقایسه شد (Tukey Post-Test)، تفاوت بین نمونه ها در دوسطح $P<0.05$ و $P<0.01$ بررسی گردید.

نتایج: یافته های حاصل نشان داد که وجود DMEM، FBS و یا مایع آمنیوتیک (بجای FBS) برای نگهـداری بهینـه سـلولها بـه روش انجماد ضروری است. تعداد سلول های زنده و درصد بیان Oct-4 در مواردی که مایع آمنیون به جای سـرم اسـتفاده شـده بـود تغییر معنی داری نداشت. همچنین یافته ها نشان داد که DMSO نسبت به گلیسرول ، ماده محافظ بهتری بـرای نگهـداری سـلول های اپی تلیال آمنیونی می باشد.

نتیجه نهایی: نتایج این مطالعه نشان می دهد که مایع آمنیون می تواند به عنوان جایگزین مناسب برای سرم حیـوانی در نگهـداری به روش انجماد سلول های اپی تلیال آمنیون انسانی استفاده شود.

کلید واژه ها: سلول های اپی تلیال / گلیسرول / مایع آمنیونیک / نگهداری به روش انجماد

مقدمه :

پرده آمنیـون از رشـد و نمـو بافتهـای خـارج جنینـی جنین بوجـود مـی‌آیـد، آمنیـون شـامل یـک لایـه سـلول اپی تلیال با نام سلول های اپـی تلیـال آمنیـونی (AECs) است که بطور یکنواخت و منظم بر روی غشاء پایه ضـخیم و یک لایه استرومایی بدون عروق قرار دارد. آمنیـون مـواد غذایی و سایر مایحتاج لازم را مستقیما با مکانیسم انتـشار از مایع آمنیونی و یا از لایه زیرین یعنی جفت و اجـزاء آن بدست مـی‌آورد (۱). خـصوصیات ویـژه ایـن بافـت ماننـد جلوگیری از رشد میکروب ها (۲) مهارکنندگی واکنشهای ایمونولوژیک(۳) و جلـوگیری از ایجـاد زخـم و کمـک بـه ترمیم آن(۴) باعث شده است که آمنیون بـه عنـوان یـک ماده زیستی کاربردهای مختلـف درمـانی داشـته باشـد. از جمله این کاربردها می توان به استفاده از پرده آمینون بـه عنوان یک پوشش مناسب در سوختگی های پوسـتی (۵)، ترمیم زخمها (۶) و بسیاری دیگر از بیماری هـای پوسـتی اشاره کرد. از سوی دیگر در حال حاضر پرده آمنیون بـرای درمان ناهنجاری ها و بیماری های قرنیه و ملتحمـه (۷،۸) و ترمیم آسیب های چشمی دیگـر (۹،۱۰) بطـور وسـیعی اسـتفاده مـی شـود. اخیـرا مطالعـات جدیـدی در زمینـه اسـتفاده از آمنیـون بـه عنـوان یـک داربـست مناسـب و همچنین منبع سلولی ایـده آل در کاربردهـای مهندسـی

* استادیار فارماکولوژی مرکز تحقیقات نانوتکنولوژی پزشکی و مهندسی بافت دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی (niknejad@sbmu.ac.ir)

** استاد جراحی مرکز تحقیقات نانوتکنولوژی پزشکی و مهندسی بافت دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

*** دانشجوی کارشناسی ارشد نانوتکنولوژی مرکز تحقیقات نانوتکنولوژی پزشکی و مهندسی بافت دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

Archive of SID

www.SID.ir

بافت صورت گرفته است (۱).

سلولهای اپی تلیال آمنیون مارکرهای سطحی سلولهای بنیادی جنینی مثل SSEA-3 , SSEA-4 , TRA-1-60 , TRA-1-80 را بیان می‌کنند. این سلولها همچنین فاکتورهای مرتبط با پرتوانی سلولهای بنیادی نظیر Oct-4 و Nanog را نیز بیان می‌نمایند (۱۱،۱۲) و توانایی تمایز به سه رده مزودرمی، اکتودرمی و اندودرمی را نشان می دهند (۱۳). این سلول ها توانایی تمایز به میوسیت، کاردیومیوسیت، استئوسیت و آدیپوسیت (۱۴) از رده مزودرمی؛ هپاتوسیت (۱۵) و سلول های پانکراس (۱۶) از رده اندودرمی و سلولهای عصبی (۱۷،۱۸) از رده اکتودرمی را از خود نشان داده اند. هم چنین این سلولهاخاصیت کلونی‌زایی نیز دارند (۱۴). نشان داده شده است که با وجود اینکه این سلول ها پرتوان هستند اما در پیوند به موشهایی با سیستم ایمنی سرکوب شده (SCID)، تراتوما ایجاد نمی کنند (۱۴،۱۹). این سلول ها ایمونوژن نیستند و پس از پیوند ریسک رد پیوند بسیار اندک می باشد (۲۰،۲۱). از خصوصیات دیگر این سلول ها عدم نیاز آنها به سلولهای لایه مغذی (Feeder layer) برای رشد و تکثیر است (۱۱). با توجه به خصوصیات ویژه فوق، سلول های اپی تلیال آمنیون به عنوان یک جایگزین مناسب برای سلول های بنیادی جنینی در زمینه های تحقیقاتی و درمانی مطرح می باشد.

با توجه به افزایش روز افزون درمان های نوین از جمله سلول درمانی (cell therapy) در ترمیم ضایعات مختلف و درمان بیماری های پیشرونده و همچنین پتانسیل بالقوه سلولهای اپی تلیال آمنیونی در این راستا، لازم است روشهای مناسبی برای نگهداری طولانی مدت سلول های اپی تلیال آمنیون انسانی تهیه نمود تا بتوان از این سلولها در مواقع نیاز برای کاربردهای تحقیقاتی و درمانی استفاده کرد.

یکی از روشهای رایج کرایوپرزرویشن (نگهداری به روش انجماد) استفاده از سرم حیوانی (FBS) به عنوان نگهدارنده میباشد. سرم حیوانی سرشار از فاکتور های رشد، هورمونها، مواد غذایی و مواد ناشناخته دیگری است که در حضور آن سلول ها قدرت حیات و تکثیر بسیار بیشتری پیدا می کنند و در شرایطی که سرم حیوانی در محیط نگهداری سلول حضور نداشته باشد میزان زنده ماندن (viability) بطور چشمگیری کاهش می یابد (۲۲).

مطالعات بسیاری در زمینه اثرات سرم بر روی نگهداری به روش انجماد سلول های مختلف صورت گرفته است که نشان می دهد کاربرد سرم حیوانی با مشکلات بسیاری روبروست و سلول هایی که در محیط های حاوی سرم حیوانی کشت و نگهداری می شوند را نمی توان به راحتی مورد استفاده قرار داد. سرم با منشاء حیوانی به عنوان یک ماده آنتی ژنیک قدرتمند (Xenogenic antigen) برای سیستم ایمنی انسان می باشد و منجر به ایجاد واکنشهای شدید ایمونولوژیک می گردد (۲۳). از سوی دیگر حضور سرم در محیط سلول ها باعث ایجاد اسید سیالیک غیر انسانی (Neu5Gc) در سطح سلول ها می شود و این ماده به عنوان آنتی ژن منجر به تولید آنتی بادی هایی می گردد که می توانند منجر به تحریک سیستم کمپلمان شوند (۲۴). از محدودیت های دیگر استفاده از سرم با منشاء حیوانی، انتقال عوامل میکروبی می باشد (۲۵). بنابراین، حذف سرم از محیط های نگهداری سلول و جایگزین کردن آن با عوامل مشابه یکی از اهداف موجود در کشت و نگهداری سلول ها می باشد. مطالعاتی در زمینه حذف سرم (Serum-free) و ترکیبات زنوژن (Xeno-free) از محیط های انجماد سلول های مختلف صورت گرفته است که می توان به مطالعه مولر و همکارانش در سال ۲۰۰۴ برای حذف سرم از محیط نگهداری هپاتوسیت ها اشاره کرد (۲۳). در همان سال مطالعه دیگری توسط کورسینی انجام شد که در این مطالعه اثرات حذف سرم بر روی پنج رده سلولی شامل Crandell Feline Kidney، MCF7، A72، WI38 و NB324K مورد بررسی قرار گرفت و محیط های کشت سلولی اصلاح شده به عنوان جایگزین سرم معرفی گردید (۲۶). در مطالعه دیگری که بر روی سلول های بنیادی جنینی صورت گرفت سرم آلبومین انسانی به عنوان جایگزین سرم حیوانی در این سلول ها مورد استفاده قرار گرفت (۲۷). مطالعات دیگری نیز در راستای حذف سرم از محیط های نگهداری سلول های پیش ساز عصبی (۲۸)، سلول های بنیادی جداشده از مغز استخوان (۲۹) و سایر سلول های بنیادی بطور وسیعی صورت گرفته است. بر اساس این مطالعات استفاده از سرم آلبومین انسانی بجای FBS باعث می شود تا سلول ها پس از دوره انجماد و آب شدن یخ ها دارای قابلیت زیست پذیری بیشتر بوده و تمایز حین انجماد کمتر رخ دهد. همچنین استفاده از ساکاروز ۴۰ درصد در

Archive of SID
www.SID.ir

محیط نگهداری سلول ها می تواند علاوه بـر جلـوگیری از تشکیل کریستال های یخ و صدمه به پیش ساز ها و سلول هـای عـصبی، شـرایط بـدون نیـاز بـه سـرم را در پروسـه نگهداری به روش انجماد ایجاد نماید (۲۸، ۲۷).

مـایع آمنیـون (Amniotic fluid = AF) یـک مـایع سرشار از فاکتورهای رشد، مواد غذایی و سایر موادی است که در رشد و نمو جنین نقش بـسیار مهمـی دارنـد (۳۰). مایع آمنیون به عنوان یک ماده انسانی و مغذی می توانـد به عنوان جایگزین مناسبی برای سرم حیـوانی درکـشت و نگهداری سلول های مختلف مطرح باشد. در همین راسـتا در ایـن مطالعـه از مـایع آمنیـون انـسانی بـه عنـوان جـایگزین سـرم حیـوانی در نگهـداری بـه روش انجمـاد سلول های اپی تلیال آمنیون انسانی به منظور حذف سـرم و اثرات جانبی استفاده از آن در نگهـداری طـولانی مـدت این سلول ها استفاده شد. بدین منظور اثرات وجـود مـایع آمنیون بـه تنهـایی و بـه همـراه سـایر مـواد در نگهـداری طولانی مدت سلول های اپی تلیال انـسانی از نظـر تعـداد سـلول هـای زنـده پـس از نگهـداری بـه روش انجمـاد و همچنین حفظ قـدرت پرتـوانی آنهـا مـورد بررسـی قـرار دادیم.

از سوی دیگر موادی که به عنوان مواد محافظت کننده از انجمـاد (Cryoprotectant) در نگهـداری سـلول هـا استفاده می شوند بسیار متنوع می باشند. همه ایـن مـواد یـک وجـه اشـتراک عمـده دارنـد و آن اینکـه از تـشکیل کریستال های یخ در حین انجماد جلوگیری می کننـد تـا این کریستال ها به غشاء سلول و سایر ارگانل های داخـل سلولی آسیب وارد نکنند. از رایج ترین و قدیمی ترین مواد محافظ انجماد می توان به گلیسرول اشاره کـرد کـه یـک الکل با سه عامل هیدروکسیل اسـت کـه بـا ایجـاد پیونـد هیدروژنی با آب می تواند عملکرد محـافظتی خـود را ایفـا کند. ماده DMSO نیز یک ماده آلی است که می تواند بـا آب داخل سلول واکنش داده و بـدین ترتیـب از تـشکیل کریستال های یخ در دماهای زیـر صـفر جلـوگیری نمایـد (۳۱). با توجه به مطالعات انجام گرفته در مورد سلول های اپی تلیال آمنیون (۳۲) و سایر سـلول هـا ی بنیـادی کـه خواص و ویژگی های مشابهی دارند (۲۲)، هدف دیگر ایـن مطالعه اسـتفاده از DMSO و گلیـسرول بـه عنـوان مـواد محافظ انجماد (۳۳) و بررسی اثرات استفاده از این مواد بر روی پرتوانی و تعداد سلول های زنده می باشد.

روش کار:

جمع آوری بافت ها و مایع آمنیون : در این مطالعه تجربـی نمونه هـای جفـت و اجـزاء آن از سـزارین هـای انتخـابی (Elective) که در هفته ۳۶ و ۳۷ بارداری قـرار داشـتند از بیمارستانهای عرفان و آیت الله طالقانی تهران تهیه گردید. مادران اهـدا کننـده از نظـر عوامـل عفـونی ماننـد HIV ، HCV ، HBV و سیفلیس با انجام تستهای سرولوژی کنتـرل می شدند. با اینکه جفت یک عـضو دور انـداختنی و زائـد پس از زایمان است ولی اطلاعات لازم برای استفاده از جفت به والدین ارائه شد و فرم رضایتنامه کتبی از آنها اخذ گردید.

بافت ها به محض انجام جراحی در شرایط آسپتیک در بافر فسفات سالین (PBS) اسـتریل کـه حـاوی ۵۰µg/ml پنـی سـیلین و ۵۰µg/ml استرپتومایـسین بـود در دمـای ۴° C سریعاً به آزمایـشگاه منتقـل شـد. کلیـه مراحـل در محیط آزمایـشگاه در زیـر هـود کـشت سـلولی و بـصورت استریل انجام گردید، سپس پرده آمنیون با روش مکانیکی (Peeling) از کوریون جفت جداسازی شده و چنـدین بـار توسـط بـافر فـسفات سـالین سـرد (۴°C) شستـشو داده می شد تا لکه های خونی کاملاً از روی آن شسته شوند.

مایع آمنیون توسط پزشک جراح در حین سـزارین در سرنگ استریل جمـع آوری مـی شـد. در دمـای ۴°C بـه سرعت به آزمایشگاه منتقل می گردید و بمدت ۱۰ دقیقـه در ۲۰۰۰×g سانتریفیوژ شده و سپس مایع رویی از فیلتـر ۲۲ میکرومتری عبور داده می شد. مرحله غیرفعال سـازی (inactivation) مایع آمنیون مانند سرم حیوانی (مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۵۶ °C) صورت می گرفت.

جداسازی سلول: برای جداسـازی سـلول هـای اپـی تلیـال آمنیونی، پرده آمنیون به چنـد تکـه کوچـک تـر تقـسیم می شد و برای هضم آنزیمی در محلول Trypsin-EDTA با غلظت ۰/۱۵٪ قرار می گرفت. از ایـن مرحلـه بـه بعـد، کلیه مراحل در دمای ۳۷° C انجام می شد. هضم آنزیمـی در سه مرحله صورت گرفت. مواد حاصل از ۱۰ دقیقـه اول هضم آنزیمی که بیشتر زوائد بافتی بودند، دور ریخته شـد و سپس بافت طی دو مرحله که هرکدام ۴۰ دقیقـه طـول می کشید در محلول آنزیمی جدیـد قـرار گرفـت. محلـول حاصل از هضم آنزیمی دوم و سوم به مـدت ۱۰ دقیقـه بـا سرعت ۲۵۰۰×g سانتریفیوژ می‌شد و سلول‌های حاصل در ته فالکون جمع‌آوری می‌گردید، سپس سـلول هـا در PBS به شکل سوسپانسیون مورد استفاده قرار می گرفت. تعداد

Archive of SID

www.SID.ir

سلول ها در سوسپانسیون فوق طوری تنظیم مـی گردیـد که تعداد نهایی سلول ها در هر ویال کرایو ۲×۱۰^{۷} سـلول در هر میلی لیتر باشد.

گروه های مطالعه : گروههـای مـورد بررسـی در ایـن طـرح شامل سه گروه اصلی بود که با توجه به نوع مـاده محـافظ انجماد تقسیم بندی شدند:

۱- گروه DMSO: ماده محافظ انجماد در این گـروه DMSO با غلظت ٪۱۰ انتخـاب شـد. هـدف از انتخـاب ایـن گـروه بررسی مواد مختلف ماننـد FBS، AF (Amniotic Fluid) و DMEM در نگهداری به روش انجماد سلولهای اپی تلیال آمنیون انسانی بود. با توجه به ترکیب این مـواد، ۸ حالـت مختلف برای نگهداری بـه روش انجمـاد سـلول هـا ایجـاد گردید که جزئیات در جدول ۱ نشان داده شده است.

جدول ۱ : محتویات ویال های نگهداری به روش انجماد سلولهای اپی تلیال آمنیون انسانی علاوه بر ماده محافظ انجماد و سوسپانسیون سلولی در گروه های مورد مطالعه

ردیف	FBS(10%)	A.F(10%)	DMEM(10%)
۱	○	○	○
۲	●	○	○
۳	○	●	○
۴	○	○	●
۵	●	●	○
۶	●	○	●
۷	○	●	●
۸	●	●	●

(●) ماده مورد نظر در نمونه موجود است.
(○) ماده مورد نظر در نمونه موجود نیست.
(A.F) مایع آمنیوتیک.

۲- گروه Glycerol: این گروه نیز شامل ۸ نمونه مختلف بـود که ترکیبات آنها شامل FBS ، AF و DMEM مـی باشـد. ماده محافظ انجماد در این گروه گلیسرول با غلظـت ٪۵۰ بود. تعداد سلول و سایر شرایط تهیه و نگهداری ویـال هـا در این گروه دقیقاً مانند گروه DMSO می باشد.

۳- گروه DMSO+Glycerol: تعداد سلول ها در این گروه نیـز مانند دو گروه قبلی می باشد. ماده محافظ انجماد استفاده شده در این گروه شامل ترکیبی از DMSO با غلظت ٪۱۰ و گلیسرول با غلظت ٪۵۰ بود.

به منظور رساندن ویال ها به حجـم یـک میلـی لیتـر (غیر از ترکیبات مورد مقایسه و سلول ها) به ویال ها PBS اضافه گردید. پس از اینکه ویال هـا بـه مـدت ۳دقیقـه در دمای محیط نگهداری شدند، به مدت ۲۴ ساعت در فریزر $-۸۰^{\circ}C$ قرار گرفتند و پس از ۲۴ ساعت سریعاً بـه تانـک نیتروژن مایع انتقال داده شدند. پس از ۱۲ ماه ویال هـای کرایو از نیتروژن مایع خارج و در دمای محیط ذوب شدند. درصد viability و بیان مارکر Oct-4 در همه نمونه ها قبل و بعد از نگهداری به روش انجماد بررسـی شـدند و نتـایج حاصل با روش آمـاری ANOVA مقایسه گردیـد . بـرای بدست آوردن نتایج آماری قابل قبول از هر نمونه ۱۰ عـدد تهیه شد و مورد بررسی گرفت.

بررسی Viability : برای بررسی میزان زنده بـودن سـلولها از دو روش استفاده گردید:

۱- روش رنگ آمیزی Trypan blue : در ایـن روش از محلـول تریپان بلو استفاده می شد. این روش فقط برای غربـالگری اولیه مورد استفاده قرار گرفت و سوسپانسیون های سلولی که درصد سلول های زنده در آنها کمتـر از ٪۸۵ بودنـد از مطالعه حذف می شدند و در غیر این صورت تعداد سلولها با روش MTT مورد بررسی دقیق تری قرار می گرفت.

۲- روش MTT : اساس این روش احیاء تترازول زرد رنگ بنام [3-(4,5-Dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromibe]، توسـط آنـزیم هـای میتوکنـدری سـلول هـای زنـده، بـه Formazan با رنگ بنفش اسـت کـه در طـول مـوج ۵۷۰ نانومتر حداکثر جذب را دارد. درصد سلول های زنده قبـل و پـس از نگهـداری بـه روش انجمـاد بـا ایـن روش مـورد بررسی قرار گرفتند.

ایمونوسیتوشیمی : در این روش با استفاده از آنتی بادیهـای اختصاصی بر علیه مارکر های سلولهای اپی تلیال آمنیـون انسانی بیان پروتئینهای Pancytokeratin و Oct-4 ارزیابی شدند. برای بررسی مارکر Pancytokeratin از آنتـی بـادی اولیه Monoclonal Anti-Pan Cytokeratin (Abcam,1:100) به همراه آنتی بادی ثانویـه Goat anti-mouse IgG کونژوگـه شده با رودامین استفاده شد. برای بررسی پرتوانی سـلولها از آنتی بادی اولیه Anti - POU5F1 (Sigma-Aldrich,1:100) بـه همـراه آنتـی بـادی ثانویـه Goat anti-rabbit IgG (Chemicon, 1:50) کونژوگه شده با FITC اسـتفاده شـد. به منظور محاسبه درصد سلول های بیان کننده پـروتئین، رنگ آمیزی هسته سلولها توسط DAPI (Sigma-Aldrich) صورت گرفت. همچنین از گروه های کنترل مثبت و منفی برای کنترل مراحل ایمونوسیتوشیمی استفاده می شد.

کنترل میکروبی بانک سلولی : با اینکه کلیه شرایط تهیـه و آماده سازی بافت و جداسازی سلـــول ها در شرایـــط

Archive of SID
www.SID.ir

استریل انجام گردیـد، امـا احتمـال وجـود آلـودگی هـای ناخواسته میکروبی بخصوص هنگام تهیه بافت و انتقال آن به آزمایشگاه وجود داشت و ایـن آلـودگی هـای میکروبـی می تواند درصد viability سلول ها را به میزان چشمگیری کاهش دهد، بدین جهت همه بافت ها و سلول هـا قبـل و بعـد از نگهـداری بـه روش انجمـاد از نظـر وجـود عوامـل میکروبی (باکتری ها و قارچ ها) با استفاده از محیط هـای کشت مختلف بررسی می شدند. بدین منظـور بافـت هـا و سوسپانسیون های سلولی با استفاده از محیط های کـشت مختلـف، در دماهـای C ۳۷° و C ۱۵° بـه مـدت ۱۴ روز انکوبه می شدند. محـیط هـای کـشت بـه ترتیـب پـس از گذشـت ۲۴ سـاعت، ۷۲ سـاعت و ۱۴ روز از نظـر رشـد میکروبی بررسی می گردید و در صورت مثبت بودن نتایج کشت از مطالعه حذف می شدند. محیط های کشت شامل:

الف) محـیط کـشت Trypticase soy broth بـرای فـراهم کردن شرایط رشد هوازی برای گونـه هـای گـرم مثبـت و گرم منفی هوازی و بی هوازی اختیاری.

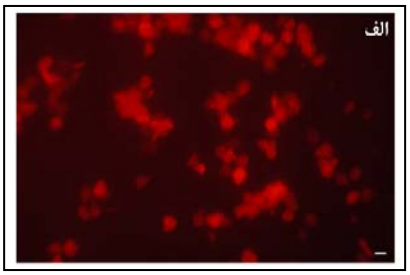
ب) محیط کشت Blood agar برای فراهم کردن شرایط رشد مغذی برای گونه های گرم مثبت هوازی و بی هوازی اختیاری.

ج) محیط کشت Thioglycollate broth برای فراهم کردن شرایط رشد برای گونه های بی هوازی اجباری.

د) محیط کشت Sabouraud's dextrose agar برای فراهم کردن شرایط رشد مغذی برای قارچ ها.

نتایج:

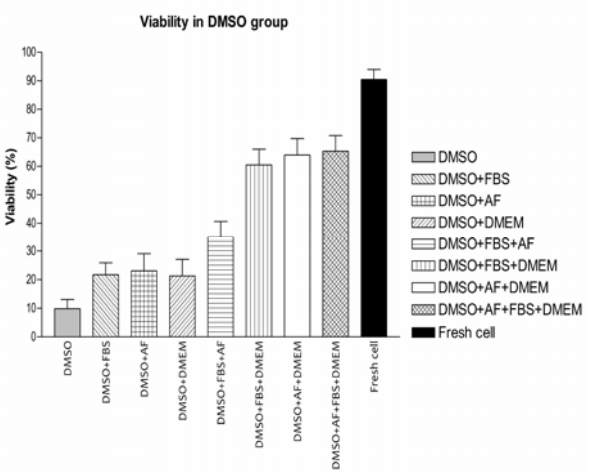
نتایج حاصل از بررسی مـارکر Pancytokeratin نـشان داد که همه سلول های اپی تلیال آمنیون انـسانی پـس از جداسازی Pancytokeratin را بیان مـی کننـد کـه بیـانگر جداسازی صحیح این سلول ها و عدم آلودگی به سلولهای مزانشیمال می باشد (شکل۱- الف).



شکل ۱- الف: تصویر میکروسکوپ فلورسنت از سلولهای اپی تلیال آمنیون انسانی قبل از نگهداری به روش انجماد
واکنش آنتی بادی ثانویه کونژوگه شده با رودامین با آنتی بـادی اولیـه بر علیه مارکر Pancytokeratin

نتایج حاصل از بررسی ها نشان داد که بیش از ۹۴٪ از سلول های اپی تلیال آمنیون انسانی جدا شده از آمنیـون، قبل از نگهداری به روش انجماد قدرت حیات دارند.

درصد سـلول هـای زنـده پـس از نگهـداری بـه روش انجماد در گروه DMSO بررسی گردید و نتایج حاصـل بـه همـــراه درصـــد ســـلول هـــای زنـــده قبـــل از کرایـــو پرزرویـشن(Fresh cell) در نمـودار ۱ نـشان داده شـده است.



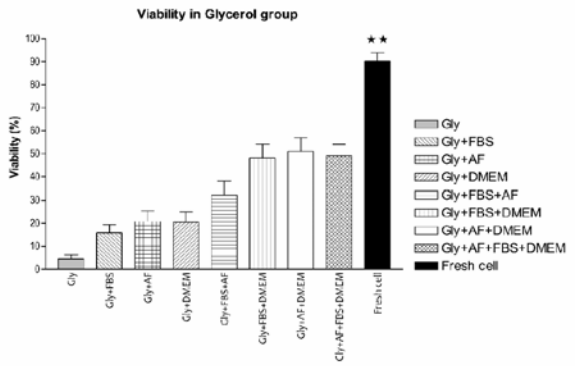
نمودار ۱: مقایسه درصد سلول های اپی تلیال آمنیون انسانی زنده قبل و پس از نگهداری به روش انجماد در گروه DMSO

در این گروه ۸ حالت مختلـف بـا تغییـر مـواد موجـود در محیط سلول ها فراهم گردید. کمترین میزان سـلول هـای زنده (۲/۹±۹/۸٪) در حـالتی اسـت کـه فقـط DMSO در محیط وجـود دارد و بیـشترین درصـد سـلول هـای زنـده (۵/۱±۶۵/۳٪) در نمونـــه هـــایی کـــه ترکیـــب DMEM+FBS+AF حضور دارند.

در گروهی که گلیسرول بعنوان ماده محـافظ اسـتفاده شـد، کمتـرین درصـد سـلولهای زنـده (۱/۸±۴/۵٪) در شرایطی حاصل شد که فقط گلیـسرول در محـیط وجـود دارد، از سوی دیگر در نمونه هایی که به همـراه گلیـسرول DMEM+AF نیز وجود دارند بیـشترین تعـداد سـلول هـا (۶/۳±۵۴/۲٪) پـس از نگهـداری بـه روش انجمـاد قـدرت حیات دارند. نتایج حاصل نشان می دهد در این گروه نیـز بیشترین بازده سلول های زنده پس از نگهـداری بـه روش انجماد در حالتهـایی کـه ترکیبـی از سـه مـاده DMEM، FBS و AF به همراه گلیسرول استفاده شده اسـت، دیـده می شود (نمودار ۲).

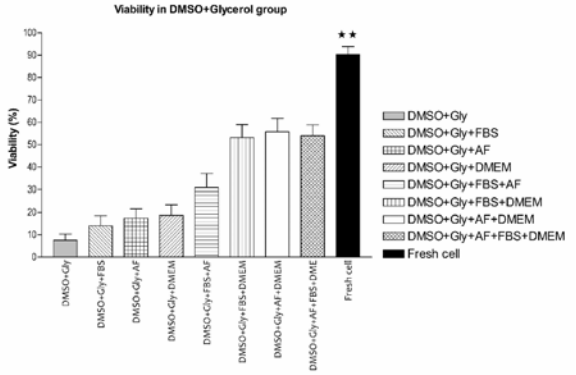
Archive of SID

www.SID.ir



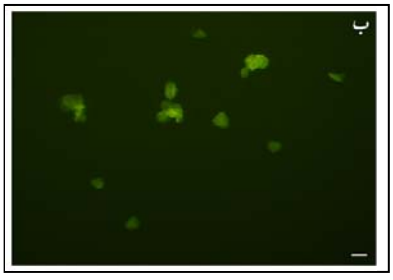
نمودار ۲: مقایسه درصد سلول های اپی تلیال آمنیون انسانی زنده قبل و پس از نگهداری به روش انجماد در گروه Glycerol
**P<0.05

در گروه DMSO+Glycerol نتایج نشان می دهد که الگوی کلی سلول های زنده در این گروه نیز از دو گروه پیش پیروی می کند، با این تفاوت که میانگین درصد سلول های زنده بطور کلی در این گروه، بیشتر از گروه گلیسرول و کمتر از گروه DMSO می باشد (نمودار ۳).



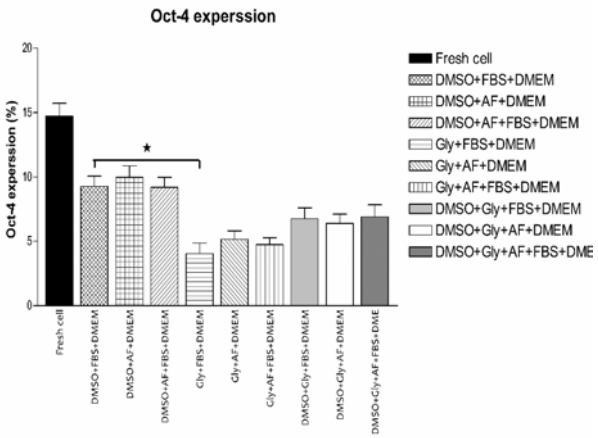
نمودار ۳: مقایسه درصدسلولهای اپی تلیال آمنیون انسانی زنده قبل و پس از نگهداری به روش انجماد در گروه DMSO+Glycerol
**P<0.05

نتایج حاصل از بررسی میزان پرتوانی در سلول های جداشده از پرده آمنیون، نشان داد که ۳/۱ ± ۱۴/۷٪ این سلول ها مارکر Oct-4 را قبل از نگهداری به روش انجماد بیان می کنند (شکل ۱- ب).



شکل ۱- ب: تصویر میکروسکوپ فلورسنت از سلولهای اپی تلیال آمنیون انسانی قبل از نگهداری به روش انجماد
واکنش آنتی بادی ثانویه کونژوگه شده با FITC با آنتی بادی اولیه با بر علیه مارکر Oct-4؛ (Scale bar=30µm)

به منظور بررسی تمایزهای ناخواسته در طول نگهداری طولانی مدت، پرتوانی سلول ها پس از نگهداری به روش انجماد نیز بررسی گردید. از آنجائیکه در هر سه گروه مورد مطالعه، در حالت هایی که ترکیبی از مواد FBS، AF و DMEM به همراه ماده محافظ انجماد، بیشترین میزان سلولهای زنده را داشتند، درصد بیان Oct-4 در نمونه هایی که این مواد حضور داشتند، ارزیابی گردید (نمودار۴).



نمودار ۴: مقایسه درصد بیان مارکر پرتوانیOct-4 قبل و پس از نگهداری به روش انجماد در سلولهای اپی تلیال آمنیون انسانی
* P<0.01

نتایج حاصل از بررسی ها نشان داد که بیان Oct-4 در سلول هایی که محیط اطرافشان حاوی گلیسرول، FBS و DMEM بود در کمترین حالت به ۴٪ رسید، در حالی که سلول های کرایوپرزرو شده در محیط حاوی DMSO، AF و DMEM بالاترین میزان پرتوانی (۲/۶ ±۱۰/۹٪) را نشان می دهند.

برای بررسی اثر مایع آمنیون در نگهداری به روش انجماد سلول های اپی تلیال آمنیون به عنوان جایگزین سرم حیوانی، درصد سلول های زنده و بیان مارکر Oct-4 قبل و پس از نگهداری به روش انجماد سلول ها بررسی گردید. بدین منظور ابتدا در سه گروه حاوی DMSO و Glycerol و DMSO+Glycerol نمونه هایی که در ترکیبات آنها بجای FBS از مایع آمنیوتیک استفاده شده بود مقایسه شدند و نتایج حاصل از بررسی ها نشان داد که تفاوت معنی داری بین درصد سلول های زنده در نمونه های حاوی FBS و ماده محافظ انجماد با نمونه های AF و محافظ انجماد که مواد محافظ انجماد در هر دو از یک نوع بودند، وجود ندارد. همچنین در نمونه هایی که ترکیب آنها

Archive of SID
www.SID.ir

شـامل FBS+DMEM + مـاده محـافظ انجمـاد بـود بـا نمونه های حاوی AF+DMEM + مـاده محـافظ انجمـاد ، تفاوت معنی داری در میزان سلول های زنـده و همچنـین بیان Oct-4 وجود نداشت.

بررسی اثر مواد محافظ انجماد در نگهداری به روش انجماد سلول های اپی تلیالی آمنیون انسانی نشان داد که تفـاوت معنی داری در تعداد سلول هـای زنـده بـین نمونـه هـای DMSO+FBS+DMEM و Glycerol+FBS+DMEM و DMSO+Glycerol+FBS+DMEM وجود ندارد. در حالی کـه میـزان بیـان Oct-4 در نمونـه هـای حـاوی DMSO+FBS+DMEM بیـشتر از نمونـه هـای حـاوی Glycerol+FBS+DMEM بود ($P<0.01$). این یافته نشان می دهد که در نمونه هایی که در ترکیـب آنهـا گلیـسرول وجود ندارد تمایز های ناخواسته در طی نگهداری به روش انجماد سلول های اپی تلیال آمنیون انسانی کمتر است.

بحث:

با توجه به نتایج بدست آمده در این مطالعه، استفاده از مایع آمنیون در میزان سلول های زنده و پرتوانی سلولهای اپی تلیال آمنیون انسانی پس از نگهداری به روش انجمـاد تفاوتی با سرم حیوانی ندارد. سرم حیوانی سرشار از فاکتور های رشد، هورمونها، مواد غذایی و مواد ناشناخته دیگـری است که در حضور آن سـلول هـا قـدرت حیـات و تکثیـر بیشتری دارنـد و در محـیط فاقـد سـرم میـزان viability کاهش می یابد (۲۲). همانطور که قبلاً ذکر شـد یکـی از مشکلات کشت و نگهداری سلول های بنیـادی اسـتفاده از سرم حیوانی است. سلول هایی که در محیط هـای حـاوی سرم حیوانی نگهداری می شوند بـرای اسـتفاده در سـلول درمانی مناسب نیستند زیـرا پـروتئین هـا و سـایر عوامـل سرم حیوانی به عنوان یک مـاده آنتـی ژنیـک قـوی عمـل کـرده و کمتـرین مقـدار باقیمانـده از آن حتـی پـس از شستشوهای متوالی سلول هـا پـس از کـشت و نگهـداری می تواند تحریک سیستم ایمنی گیرنده سلول ها را منجـر شود (۲۴). از سوی دیگـر حـضور سـرم در محـیط باعـث انتقال احتمالی عوامل عفـونی مـی گـردد (۲۵). مطالعـات بسیار گسترده ای در راستای حذف سرم حیوانی از بانـک های سلولی انجام شده است و با اینکه در برخی از کـاربرد های خاص جایگزین هایی برای سرم معرفـی شـده اسـت (۲۹-۲۷) اما تاکنون جایگزین مناسبی که بتـوان در همـه موارد از آن استفاده کرد وجود ندارد.

بر اساس یافته های این مطالعه، مایع آمنیـون انـسانی می تواند جایگزین مناسبی برای سرم حیوانی در نگهداری به روش انجماد سلول های اپی تلیال آمنیون انسانی باشد. مشابه بودن ترکیبات مایع آمنیون انسانی با سـرم حیـوانی می تواند توجیه کننده نتایج حاصـل باشـد (۳۰). بـه هـر روی، در حال حاضر، مطالعات محدودی در زمینه استفاده از مایع آمنیون در نگهداری طولانی مدت سلول ها وجـود دارد (۳۴)، بنـابراین بررسـی هـای بیـشتر در ایـن زمینـه ضروری بنظر می رسد.

طبق نتایج حاصل از این مطالعه، استفاده از گلیـسرول می تواند بازده نگهداری به روش انجماد سلول های مزبـور را کاهش دهـد و میـزان تمـایز هـای ناخواسـته در حـین نگهـداری بـه روش انجمـاد را افـزایش دهـد. گلیـسرول و DMSO دو ماده محافظت کننده از انجماد می باشند کـه استفاده وسیعی در نگهداری به روش انجمـاد سـلول هـا و بافتهـای مختلـف دارنـد (۳۱). در مـورد مزایـا و معایـب استفاده از این مواد مطالعات مختلفی صورت گرفته است و به نظر می رسد علاوه بر نوع ماده محافظ انجمـاد، عوامـل مختلف دیگری مانند نوع سـلول، غلظـت مـواد محـافظ و مقاومت و نفوذپذیری دیواره سلولی و غیره از عوامل تـاثیر گذار در نگهداری بـه روش انجمـاد سـلول هـا مـی باشـد، بنابراین نتایج متناقضی در مورد اسـتفاده از ایـن مـواد در نگهداری به روش انجماد سلول ها وجود دارد. با توجـه بـه نتایج مطالعه حاضر بنظر می رسد که اسـتفاده از DMSO در نگهداری سلول های اپی تلیال آمنیونی ارجح می باشد که این یافته با مطالعات قبلی که توسط راما و هنربکلر در سال های ۲۰۰۱ و ۲۰۰۶ بر روی رده های سـلولی دیگـر صورت گرفته (۳۲،۳۳) در زمینه کاربرد DMSO همخوانی دارد.

نتیجه نهایی:

نتایج حاصل از این مطالعه نشان مـی دهـد مـی تـوان نگهداری به روش انجماد سلول هـای اپـی تلیـال آمنیـون انسانی را با استفاده از مایع آمنیون در محیط فاقد عوامـل حیوانی (Xeno-free) انجام داد. استفاده از مایع آمنیون بر روی بازده نگهداری به روش انجماد تفاوتی با سرم حیوانی ندارد و منجر به حفظ پرتوانی سلول ها پس از نگهداری به روش انجماد می گردد. همچنـین DMSO در مقایـسه بـا گلیسرول یک مـاده محـافظ انجمـاد مناسـب تـری بـرای نگهداری طولانی مدت این سلول ها می باشد.

Archive of SID

www.SID.ir

سپاسگزاری:

بدینوسیله از پرسنل محترم اتاق عمل بیمارستان های عرفان و آیت الله طالقانی بخصوص سرکار خانم دکتر نیرومنش و سرکار خانم یوسفی کمال قدردانی و تشکر بعمل می آید. این مطالعه با حمایت مالی مرکز تحقیقات نانوتکنولوژی پزشکی و مهندسی بافت دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی انجام گردید.

منابع :

1. Niknejad H, Peirovi H, Jorjani M, Ahmadiani A , Ghanavi J, Seifalian AM. Properties of the amniotic membrane for potential use in tissue engineering. Eur Cell Mater 2008; 15:88-99.
2. Ganatra MA. Amniotic membrane in surgery. J Pak Med Assoc 2003; 53(1):29-32.
3. Gomes JA, Romano A, Santos MS, Dua HS. Amniotic membrane use in ophthalmology. Curr Opin Ophthalmol 2005; 16(4):233-40.
4. Hao Y, Ma DH, Hwang DG, Kim WS, Zhang F. Identification of antiangiogenic and antiinflammatory proteins in human amniotic membrane. Cornea 2000; 19(3):348-52.
5. Rao TV, Chandrasekharam V. Use of dry human and bovine amnion as a biological dressing. Arch Surg 1981; 116: 891–896.
6. Bennett JP, Matthews R, Faulk WP. Treatment of chronic ulceration of the legs with human amnion. Lancet 1980; 1: 1153–1156.
7. Kim JC, Tseng SCG. Transplantation of preserved human amniotic membrane for surface reconstruction in severely damaged rabbit corneas. Cornea 1995; 14: 473–484.
8. Gomes JA, Romano A, Santos MS, Dua HS. Amniotic membrane use in ophthalmology. Curr Opin Ophthalmol 2005; 16:233–240.
9. Andonovska D, Dzokic G, Spasevska L, Trajkovska T, Popovska K, Todorov I, et al. The advantages of the application of amniotic membrane in the treatment of burns. Prilozi 2008; 29(1):183-98.
10. Gomes JAP, Dos Santos MS, Cunha MC, Mascaro VL, Barros JDN, De Sousa LB. Amniotic membrane transplantation for partial and total limbal stem cell deficiency secondary to chemical burn. Ophthalmology 2003; 110: 466–473.
11. Miki T, Lehmann T, Cai H, Stolz DB, Strom SC. Stem cell characteristics of amniotic epithelial cells. Stem Cells 2005; 23 (10):1549-59.
12. Miki T, Mitamura K, Ross MA, Stolz DB, Strom SC. Identification of stem cell marker-positive cells by immunofluorescence in term human amnion. J Reprod Immunol 2007; 75 (2): 91-6.
13. Miki T. Amnion-derived stem cells: in quest of clinical applications. Stem Cell Res Ther 2011; 2(3): 25.
14. Ilancheran S, Michalska A, Peh G, Wallace EM, Pera M, Manuelpillai U. Stem cells derived from human fetal membranes display multilineage differentiation potential. Biol Reprod 2007; 77 (3):577-88.
15. Takashima S, Ise H, Zhao P, Akaike T, Nikaido T. Human amniotic epithelial cells possess hepatocyte-like characteristics and functions. Cell Struct Funct 2004;29 (3):73-84.
16. Wei JP, Zhang TS, Kawa S, Aizawa T, Ota M, Akaike T, et al. Human amnion-isolated cells normalize blood glucose in streptozotocin-induced diabetic mice. Cell Transplant 2003; 12(5):545-52.
17. Niknejad H, Deihim T, Ahmadiani A, Jorjani M, Peirovi H. Permanent expression of midbrain dopaminergic neurons traits in differentiated amniotic epithelial cells. Neurosci Lett 2012; 506(1):22-7.
18. Niknejad H, Peirovi H, Ahmadiani A, Ghanavi J, Jorjani M: Differentiation factors that influence neuronal markers expression in vitro from human amniotic epithelial cells. Eur Cell Mater. 2010; 19: 22-9.
19. Miyamoto K, Hayashi K, Suzuki T, Ichihara S, Yamada T, Kano Y, et al. Human placenta feeder layers support undifferentiated growth of primate embryonic stem cells. Stem Cells 2004; 22 (4):433-40.
20. Sakuragawa N, Tohyama J, Yamamoto H. Immunostaining of human amniotic epithelial cells: possible use as a transgene carrier in gene therapy for inborn errors of metabolism. Cell Transplant 1995; 4 (3):343-6.
21. Lefebvre S, Adrian F, Moreau P, Gourand L, Dausset J, Berrih-Aknin S, Carosella ED, Paul P. Modulation of HLA-G expression in human thymic and amniotic epithelial cells. Hum Immunol 2000; 61 (11):1095-101.
22. Zeisberger SM, Schulz JC, Mairhofer M, Ponsaerts P, Wouters G, Doerr D, et al. Biological and physicochemical characterization of a serum- and xeno-free chemically defined cryopreservation procedure for adult human progenitor cells. Cell Transplant 2011; 20(8):1241-57.
23. Müller P, Aurich H, Wenkel R, Schäffner I, Wolff I, Walldorf J, et al. Serum-free cryopreservation of porcine hepatocytes. Cell Tissue Res 2004;317(1):45-56.
24. Martin M.J, Muotri A, Gage F, Varki A. Human embryonic stem cells express an immunogenic nonhuman sialic acid. Nat Med 200; 11(2):228-232.
25. Bradley, R. Bovine spongiform encephalopathy and its relationship to the variant form of Creutzfeldt-Jakob disease. Contrib Microbiol 2004; 11:146-185.
26. Corsini JC, Hacker C, Bare C. Serum-Free Cryopreservation of Five Mammalian Cell Lines in Either a Pelleted or Suspended State. Biological Procedures Online 2004;6(1): 61-66.

Archive of SID

www.SID.ir

27. Richards M, Fong CY, Tan S, Chan WK, Bongso A. An efficient and safe xeno-free cryopreservation method for the storage of human embryonic stem cells. Stem Cells 2004; 22(5): 779-89.
28. Kuleshova LL, Tan FC, Magalhães R, Gouk SS, Lee KH, Dawe GS. Effective cryopreservation of neural stem or progenitor cells without serum or proteins by vitrification. Cell Transplant 2009; 18(2):135-44.
29. Holm F, Ström S, Inzunza J, Baker D, Strömberg AM, Rozell B, et al. An effective serum- and xeno-free chemically defined freezing procedure for human embryonic and induced pluripotent stem cells. Hum Reprod 2010; 25(5): 1271-1279.
30. Michel PE, Crettaz D, Morier P, Heller M, Gallot D, Tissot JD, et al. Proteome analysis of human plasma and amniotic fluid by Off-Gel isoelectric focusing followed by nano-LC-MS/MS. Electrophoresis 2006;27(5-6):1169-81.
31. Jomha NM, Weiss ADH, Forbes JF, Law GK, Elliott JAW, McGann LE. Cryoprotectant agent toxicity in porcine articular chondrocytes. Cryobiology 2010; 61: 297-302.
32. Rama P, Giannini R , Bruni A , Gatto C , Tiso R ,Ponzin D. Further evaluation of amniotic membrane banking for transplantation in ocular surface diseases. Cell Tissue Bank 2001; 2: 155–163.
33. Hennerbichler S, Reichl B, Pleiner D, Gabriel C, Eibl J, Redl H. The influence of various storage conditions on cell viability in amniotic membrane. Cell Tissue Banking 2006;8:1–8.
34. Ng SC, Sathananthan H, Bongso A, Lee MN, Mok H, Wong PC, et al. The use of amniotic fluid and serum with propanediol in freezing of murine 2-cell embryos. Fertil Steril 1988; 50(3): 510-3.

Archive of SID

www.SID.ir

Original Article

Serum-Free Cryopreservation of Human Amniotic Epithelial Cells

H. Niknejad, Ph.D.*; H. Peirovi, M.D.**; B. Jambar Noushin, M.Sc.***

Received: 17.7.2012 Accepted: 1.1.2013

Abstract

Introduction & Objective: One of the important issues in long term storage of cells is removal of animal serum from cell culture environments. The aim of this study was to evaluate amniotic fluid (AF), which is full of growth factors, as substitute for fetal bovine serum (FBS) in the cryopreservation protocol.

Materials & Methods: In this experimental study human amniotic epithelial cells were isolated from placentas which were seronegative for microbial infections. The cells were preserved in 24 different patterns for 12 months in -196 ºC (liquid nitrogen) and viability of cells were determined before and after cryopreservation by trypan blue and MTT assay. Moreover, Oct-4 expression was studied to determine pluripotency before and after cryopreservation with immunocytochemistry. Results were compared between groups with ANOVA (Tukey Post-Test). P.value under 0.01 and 0.05 was considered statistically significant.

Results: The presence of DMEM, FBS or AF is necessary for amniotic cell cryopreservation. Trypan-blue, MTT and immunocytochemistry showed that there isn't significant difference between using AF and FBS in viability and pluripotency of cells. Moreover, results showed that DMSO is a better cryoprotectant compared to glycerol.

Conclusion : Results showed that amniotic fluid can be a proper substitute for FBS in amniotic epithelial cells cryopreservation.

(Sci J Hamadan Univ Med Sci 2013; 20 (1):15-24)

Keywords: Amniotic Fluid / Cryopreservation / Epithelial Cells/ Glycerol

---

* Assistant Professor of Pharmacology, Nanomedicine and Tissue Engineering Research Center
Shahid Beheshti University of Medical Sciences & Health Services, Tehran Iran. (niknejad@sbmu.ac.ir)
** Professor of Surgery, Nanomedicine and Tissue Engineering Research Center
Shahid Beheshti University of Medical Sciences & Health Services, Tehran Iran.
*** M.Sc student in Nanotechnology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences & Health Services, Tehran, Iran

www.SID.ir