Downloaded from binajournal.org at 10:13 +0430 on Wednesday August 15th 2018

Effect of Platelet Growth Factors on Restoration of Amniotic Membrane Cells after Freezing Process

Karami S, MS[1]; Balagholi S, PhD[2]; Rezaei Kanavi M, MD[2]; Alizadeh S, PhD[1]*; Dabbaghi R, MS[3]; Kheiri B, MS[2]; Nikogoftar M, PhD[4]; Nakhlestani M, MD[4]

[1]Department of Hematology, faculty of Allied Medicine, Tarbiat Modares University of Medical Sciences, Tehran, Iran; [2]Ocular Tissue Engineering Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran; [3]Department of Hematology, School of Allied Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran; [4]Blood Transfunsion Reasearch Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine, Tehran, Iran
** Corresponding author: alizadeh1982@gmail.com*

Purpose: Dormant corneal ulcers do not respond to common treatments. Today, several therapies are used to treat epithelial corneal ulcers, including artificial tear, ocular droplets derived from platelet-rich plasma, amniotic membrane transplantation, and limbal stem cell transplantation. The aim of this study was to evaluate the effect of platelet growth factors on the recovery of amniotic membrane epithelial cells and limbal stem cells grown on amniotic membrane.
Methods: In this experimental study, 5 amniotic membranes were prepared and after freezing and treatment with platelet lysate, the viability of the cells was evaluated. The limbal stem cells obtained from the human cornea were immune characterized for P63 and vimentin markers. The limbal stem cells seeded on the surface of amniotic membrane and after treatment with platelet lysates, the viability of the cells was evaluated.
Results: The viability rate was significantly increased at 24 hours, 72 hours, and 1 week intervals in the amniotic membrane treated with platelet lysate after the freezing process. The results of viability in Limbal stem cells indicated a significant increase at 24 hours and 72 hours after culture on the amniotic membrane fortified by platelet lysate. However, this increase was not significant during one week.
Conclusion: The results of this study showed that platelet lysates could increase the viability amniotic membrane cells and limbal stem cells; thus, using the cultured limbal cell on amniotic membrane fortified by platelet lysates will be helpful to limbal cell defects cases.

Keywords: Amniotic Membrane, Limbal Stem Cell, Platelet Lysate

- Bina J Ophthalmol 2017; 23 (1): 32-40.

Archive of SID

اثر فاکتورهای رشد پلاکتی بر احیای سلول‌های غشای آمنیوتیک بعد از فرآیند انجماد غشا آمنیوتیک و بر سلول‌های بنیادی لیمبال کشت داده شده روی غشا

سمیرا کرمی[۱]، دکتر سحر بالاقلی[۲]. دکتر مژگان رضایی کنوی[۳]، دکتر شعبان علیزاده[۴]، رسول دباغی[۵]، بهاره خیری[۶]، دکتر مهین نیکوگفتار[۷] و دکتر مژده نخلستانی[۸]

هدف: زخم‌های مقاوم به درمان قرنیه، زخم‌هایی هستند که به درمان‌های رایج پاسخ نمی‌دهند. امروزه روش‌های درمانی متعددی برای درمان زخم‌های اپی‌تلیال قرنیه به کار می‌رود از جمله قطره اشک مصنوعی، قطره‌های چشمی حاصل از پلاسمای غنی از پلاکت، پیوند غشای آمنیوتیک و پیوند سلول‌های بنیادی لیمبال. هدف از این مطالعه، بررسی تاثیر عوامل رشد پلاکتی بر احیای سلول‌های اپی‌تلیال غشای آمنیوتیک و غنی‌سازی سلول‌های بنیادی لیمبال کشت داده شده بر روی غشای آمنیوتیک توسط لیزات پلاکتی انسانی غنی از عوامل رشد می‌باشد.
روش پژوهش: در این مطالعه تجربی، تعداد ۵ غشای آمنیوتیک تهیه شد و پس از فرآیند انجماد و تیمار با لیزات پلاکتی، میزان Viability (زنده بودن) سلول‌های آن ارزیابی گردید. به علاوه سلول‌های بنیادی لیمبال به دست آمده از قرنیه انسان پس

www.SID.ir

Downloaded from binajournal.org at 10:13 +0430 on Wednesday August 15th 2018

از تایید ماهیت، با بررسی مارکرهای اختصاصی سلول‌های بنیادی لیمبال، P۶۳ و Vimentin، توسط روش ایمونوسایتوشیمی، بر سطح غشای آمنیوتیک کشت داده شدند و بعد از تیمار با لیزات پلاکتی، از نظر میزان Viability (زنده بودن سلول‌ها) بررسی گردیدند.

یافته‌ها: بررسی میزان Viability (زنده بودن) سلول‌ها افزایش معناداری در فواصل زمانی ۲۴ ساعت، ۷۲ ساعت و یک هفته در غشای آمنیوتیک تیمار شده با لیزات پلاکتی پس از فرآیند انجماد (فریز) میان گروه‌های مورد آزمایش و شاهد، آزمایش و Fresh و شاهد و Fresh نشان داد. بررسی مارکرهای اختصاصی سلول‌های بنیادی لیمبال، P۶۳ و P۷۵، تاییدکننده ماهیت سلول‌های بنیادی لیمبال است. نتایج ارزیابی زنده بودن سلول‌های بنیادی لیمبال نشان‌دهنده افزایش معنی‌دار در زمان‌های ۲۴ ساعت و۷۲ ساعت پس از کشت روی غشای امنیوتیک و تیمار با لیزات پلاکتی می‌باشد، اما این افزایش در مدت زمان یک هفته معنی‌دار نیست.

نتیجه‌گیری: لیزات پلاکتی غنی از عوامل رشد قادر است میزان زنده بودن سلول‌های اپی‌تلیال غشای آمنیوتیک و سلول‌های بنیادی لیمبال را افزایش دهد. به این ترتیب استفاده از سلول لیمبال کشت داده شده روی غشای آمنیوتیک و تیمار آن با لیزات پلاکتی در پیوند اتولوگ و آلوژن سلول لیمبال به چشم‌های مبتلا به نقص لیمبال سلول‌های بنیادی بسیار کمک‌کننده خواهد بود.

کلمات کلیدی: لیزات پلاکتی- غشای آمنیوتیک- سلول‌های بنیادی لیمبال

• مجله چشم‌پزشکی بینا ۱۳۹۶؛ دوره ۲۳، شماره ۱: ۴۰-۳۲.

• **پاسخ‌گو:** دکتر شعبان علیزاده (e-mail: alizadeh1982@gmail.com)

۱- کارشناس ارشد خون‌شناسی آزمایشگاهی و بانک خون- گروه هماتولوژی- دانشکده پیراپزشکی- دانشگاه علوم پزشکی تهران- تهران- ایران

۲- دکترای خون‌شناسی آزمایشگاهی و بانک خون- گروه هماتولوژی- دانشکده پیراپزشکی- دانشگاه علوم پزشکی تهران- تهران- ایران

۳- دانشیار- چشم‌پزشک- مرکز تحقیقات مهندسی بافت چشم- دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی- تهران- ایران

۴- دانشیار- دکترای خون‌شناسی آزمایشگاهی و بانک خون- گروه هماتولوژی- دانشکده پیراپزشکی- دانشگاه علوم پزشکی تهران- تهران- ایران

۵- کارشناس ارشد خون‌شناسی آزمایشگاهی و بانک خون- گروه هماتولوژی- دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس- تهران- ایران

۶- کارشناس ارشد آمار- مرکز تحقیقات چشم- دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی- تهران- ایران

۷- دانشیار- دکترای خون‌شناسی آزمایشگاهی و بانک خون- مرکز تحقیقات انتقال خون- موسسه عالی آموزشی و پژوهشی علوم انتقال خون- تهران- ایران

۸- پزشک- مرکز تحقیقات انتقال خون- موسسه عالی آموزشی و پژوهشی علوم انتقال خون- تهران- ایران

تهران- پاسداران- بوستان نهم- خیابان پایدارفرد (خیابان امیر ابراهیمی)- پلاک ۲۳- مرکز تحقیقات مهندسی بافت چشم

مقدمه

استفاده از غشای آمنیوتیک در درمان‌های احیاکننده رو به افزایش است. غشای آمنیوتیک شامل پروتئین‌های ماتریکس خارج‌سلولی نظیر کلاژن، لامینین و فیبرونکتین می‌باشد که اینترلوکین‌های ضدالتهابی آزاد می‌کند[۱]. با توجه به ترکیب کلاژنی غشای پایه، این غشا شباهت زیادی به قرنیه و ملتحمه چشم دارد. بنابراین غشای آمنیوتیک به عنوان یک داربست برای رشد سلول‌های اپی‌تلیال قرنیه عمل می‌کند و در موارد خاص برسطح قرنیه بخیه می‌شود. از غشای آمنیوتیک به دو صورت تازه و انجماد یافته استفاده می‌شود که هر دو حالت هنگام پیوند بر سطح چشم موثر هستند[۲]. انجماد و دیگر روش‌های تهیه و نگه‌داری غشای آمنیوتیک با گذشت زمان باعث کاهش و یا از بین رفتن کامل بسیاری از خواص بیولوژیک و کارایی سلول‌های غشای آمنیوتیک شده و در نتیجه استفاده بالینی از آن را محدود می‌کند[۳].

پلاکت‌ها دارای بیش از ۳۰ نوع پروتئین هستند که نقش اساسی در هموستاز و ترمیم زخم به عهده دارند[۴]. طی ترمیم زخم، پلاکت‌ها، سایتوکاین‌ها و واسطه‌های (مدیاتورهای) درون سلولی را ترشح کرده و محتوای گرانول‌های α آن‌ها هم بعد از تجمع (اگریگاسیون) آزاد می‌شوند[۵]. اجزا حیاتی آن که باعث عملکرد بازسازی و ترمیم می‌شوند شامل: عامل رشد مشتق از پلاکت (PDGF)، transformation growth factor-beta (TGF-BETA)، عامل رشد شبه انسولین (IGF)، عامل رشد فیبروبلاستی (FGF)، عامل رشد اندوتلیال عروقی (VEGF) و عامل رشد اپیدرمال (EGF) می‌باشند[۶]. عوامل رشد آزاد شده مسئول افزایش میزان مهاجرت سلولی، میتوز، تشکیل ماتریکس خارج سلولی و آنژیوژنز بوده و باعث تقویت تکثیر و تمایز سلول‌های قرنیه می‌شوند. استفاده از

www.SID.ir

Downloaded from binajournal.org at 10:13 +0430 on Wednesday August 15th 2018

قطره چشمی پلاسمای غنی از پلاکت انسانی (PRP) باعث کاهش اندازه و عمق زخم‌های قرنیه، کاهش درد، ترس از نور و ناراحتی بیماران می‌شود[۷].

ویژگی بارز اپی‌تلیال قرنیه، توانایی بالای بازسازی و قدرت ترمیم سریع سطح چشم از طریق تکثیر و مهاجرت جمعیت‌های سلولی پیش‌سازی است که در حاشیه قرنیه و صلبیه حضور دارند و لیمبوس خوانده می‌شوند. سلول‌های بنیادی لیمبال، جمعیت سلولی ساکن و خاموش (quiescent) با قدرت تکثیر بالا می‌باشند که ترمیم و بازسازی موثر قرنیه را امکان‌پذیر می‌سازند[۸].

در این مطالعه غشای آمنیوتیک بعد از فرآیند انجماد با لیزات پلاکتی تیمار شد و میزان زنده بودن سلول‌های موجود بر آن ارزیابی شد. سپس سلول‌های بنیادی لیمبال بدست آمده از چشم انسان، بر روی غشا آمنیوتیک کاشته شد و تحت تیمار با لیزات پلاکتی قرار گرفت. این سلول‌ها نیز از نظر میزان زنده بودن بررسی شدند.

روش پژوهش

تهیه غشای آمنیوتیک و آزمایش‌های تاییدی

غشای آمنیوتیک از مادرانی که خون بندناف را اهدا کرده و برای انجام پژوهش، رضایت داده بودند، تهیه شد. آزمایش‌های تاییدی از نظر عفونت‌های ویروس نقص ایمنی انسانی نوع ۱ و ۲ (HIV)، ویروس هپاتیت B، ویروس هپاتیت C و تریپونما پالیدوم انجام شد. غشای آمنیوتیک به قطعات کوچک برش خورده و تقسیم شدند، درون پلیت‌های حاوی محلول PBS قرار گرفتند و با محلول PBS حاوی آنتی‌بیوتیک‌های آمفوتریسین B، پنی‌سیلین و استرپتومایسین شستشو داده شدند.

منجمد (فریز) کردن غشاهای آمنیوتیک

غشاهای آمنیوتیک برش خورده درون کرایو ویال‌های ۲ میلی‌لیتری، در DMEM/F۱۲ حاوی DMSO ۱۰ درصد غوطه‌ور شدند. کرایو ویال‌ها درون ظرف مخصوص انجماد (فریز)، Mr. Frosty. قرار گرفتند تا تحت شرایط کنترل شده، دمای آن در هر دقیقه یک درجه کاهش یابد. سپس به مدت یک ماه در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند[۹-۱۱].

تهیه پلاسمای غنی از پلاکت

برای تهیه پلاسمای غنی از پلاکت، ابتدا میزان ۲۴cc خون از پنج فرد طبیعی تهیه و با دور ۱۲۰g سانتریفیوژ شد. محلول رویی که پلاسمای غنی از پلاکت نام دارد، جمع‌آوری شد و نمونه‌های هر ۵ فرد داوطلب با هم مخلوط گردید.

تهیه ترومبین از فرآورده خونی پلاسما

ترومبین با اضافه کردن کلسیم گلوکونات (Sina darou, Iran) با غلظت g/ml ۱ به پلاسما با نسبت ۴:۱ (یک حجم کلسیم گلوکونات به ۴ حجم پلاسما) بعد از ۱ ساعت انکوبه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد حاصل شد[۱۲].

تهیه لیزات پلاکتی

پس از بدست آمدن ترومبین و پلاسمای غنی از پلاکت، این دو فراورده با نسبت ۱:۵ (یک حجم ترومبین به ۵ حجم پلاسمای غنی از پلاکت) به هم اضافه شدند و به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. بعد از این مدت، لخته حاصل جدا شده و لیزات باقی مانده بعد از سانتریفیوژ شدن با دور g ۴۰۰ (به منظور رسوب لاشه‌های پلاکتی) و عبور از فیلتر um ۰/۲۲ تقسیم‌بندی و در دمای ۲۰- ذخیره گردید.

تیمار غشای آمنیوتیک با لیزات پلاکتی

پس از دفریز و شستشو قطعات کوچک‌تر، غشای آمنیوتیک برای ارزیابی زنده بودن سلول‌ها (Viability) به پلیت‌های ۲۴ منتقل شدند. به نمونه‌های تست محیط کشت، DMEM و لیزات پلاکتی با نسبت ۱/۱ و به نمونه‌های گروه شاهد، DMEM و FBS ۱۰ درصد اضافه شدند و پلیت‌ها و فلاسک‌ها درون انکوباتور قرار گرفتند. نمونه‌ها در فواصل زمانی ۱و۳و۷ روز از نظر میزان زنده بودن سلول‌ها ارزیابی شدند.

تهیه سلول‌های بنیادی لیمبال

قرنیه انسان از بانک چشم جمهوری اسلامی ایران تهیه و قسمت لیمبوس آن با ابزار تشریح استریل شده جدا گردید. سطح شفاف لیمبوس درون پلیت حاوی DMEM و FBS ۱۰ درصد قرار داده شد و پلیت حاوی لیمبوس درون انکوباتور گذاشته شد تا سلول‌های لیمبال رشد کنند.

کاشت سلول بر غشای آمنیوتیک و تیمار با لیزات پلاکتی:

غشای آمنیوتیک و لیزات پلاکتی درون بن ماری ۳۷ درجه سانتی‌گراد ذوب شدند. سپس قطعات غشا درون پلیت با PBS ۳ بار شستشو داده شد و درون پلیت ۲۴ خانه و فلاسک T۲۵ قرار گرفتند. پلیت‌های گروه‌های مورد آزمایش و شاهد به ترتیب با

www.SID.ir

Downloaded from binajournal.org at 10:13 +0430 on Wednesday August 15th 2018

لیزات پلاکتی و FBS به مدت یک شب coat شدند. سلول‌های بنیادی لیمبال با Trypsin (Invitrogen,USA) از کف فلاسک جدا شد و پس از شمارش، تعداد ۵۰۰۰۰ سلول به هر فلاسک و تعداد ۵۰۰۰ سلول به هر خانه پلیت اضافه گردید. تمام فلاسک‌ها و پلیت‌ها در انکوباتور قرار گرفتند تا در فواصل زمانی ۲۴ ساعت، ۷۲ ساعت و ۱ هفته مورد ارزیابی قرار گیرند.

تست ایمنوسایتوشیمی Immunocytochemistry (ICC)

سلول‌های لیمبال به دست آمده از چشم انسان به منظور تایید ماهیت از نظر بیان پروتیین‌های P۶۳ و Vimentin مورد ارزیابی قرار گرفتند. برای این کار ابتدا هر چاهک با ۵۰۰ میکرولیتر PBS شستشو و با استفاده از متانول ۱۰- به مدت ۵ دقیقه ثابت (fix) شد. سپس هر چاهک ۳ بار با PBS شستشو داده شد. میزان ۳۰۰ میکرولیتر از محلول بلاکینگ در هر چاهک ریخته شد و به مدت ۲۰ دقیقه انکوبه گردید. محلول بلاکینگ تخلیه شده و یک بار با PBS شستشو داده شد.

آنتی‌بادی اولیه (Santa Cruz Biothecnology,Texas , USA) به مدت یک شب در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با سلول‌ها انکوبه شد. بعد از این زمان هر چاهک سه بار و هر بار به مدت ۳ دقیقه با محلول PBS شستشو داده شد. آنتی‌بادی ثانویه (Santa Cruz Biothecnology, Texas , USA) به مدت ۴۵ دقیقه با سلول‌ها مجاور گردید. بعد از این زمان، چاهک‌ها سه بار با PBS شستشو داده شدند و از DAPI(Santa Cruz Biothecnology, Texas , USA) برای رنگ کردن هسته‌ها استفاده شد. در انتها، میکروسکوپ Olympus IX۷۱ برای مشاهده سلول‌ها مورد استفاده قرار گرفت.

آزمایش Viability

برای انجام این آزمایش، ابتدا غلظت g/cc ۰/۵ نمک MTT(Sigma-Aldrich, Munich, Germany) تهیه شد. ۱۰ درصد حجم اولیه از محلول MTT به هر چاهک اضافه گردید و به مدت چهار ساعت انکوبه شد. بعد از این زمان محیط کشت و MTT تخلیه و به هر چاهک میزان ۱۰۰ میکرولیتر DMSO (Merck, Germany) اضافه شد. در انتها، جذب‌ها با دستگاه الایزا در طول موج ۵۴۰ نانومتر خوانده شد.

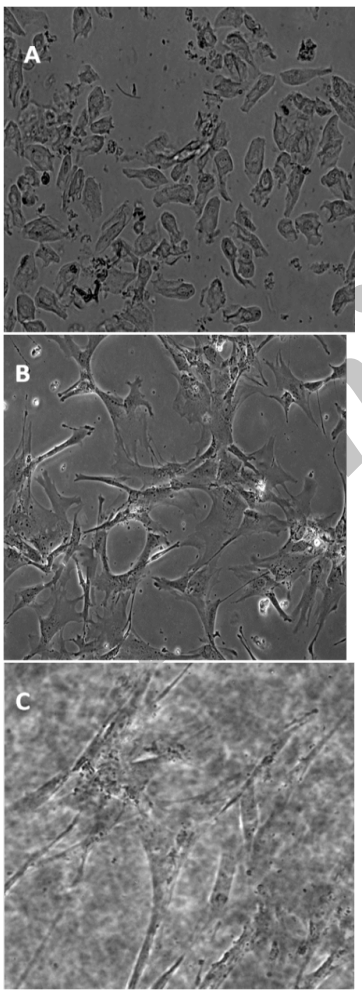
تحلیل آماری

به منظور بررسی میزان زنده بودن سلول‌ها (Viability) با توجه به پیروی از توزیع طبیعی از آزمون T-test استفاده شد. کلیه آزمون‌ها به صورت سه‌تایی انجام شد و تمامی آنالیزها توسط نرم‌افزار آماری SPSS ویرایش ۲۲ صورت گرفت. P کوچکتر از ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

کشت سلول‌های لیمبال

نتایج حاصل از کشت سلول‌های لیمبال نشان داد این سلول‌ها ۲۴ ساعت پس از قرار دادن ناحیه لیمبوس در محیط کشت، از ناحیه لیمبوس خارج شده و به کف پلیت می‌چسبند. در این زمان سلول‌ها شکل مکعبی دارند، اندازه سلول‌ها کوچک است و نسبت هسته به سیتوپلاسم بالاست. این سلول‌ها پس از گذشت یک هفته، شکل شبه‌اپی‌تلیوییدی به دست می‌آورند که بر سطح غشای آمنیوتیک نیز این شکل اپی‌تلیوییدی حفظ می‌شود (تصویر ۱).



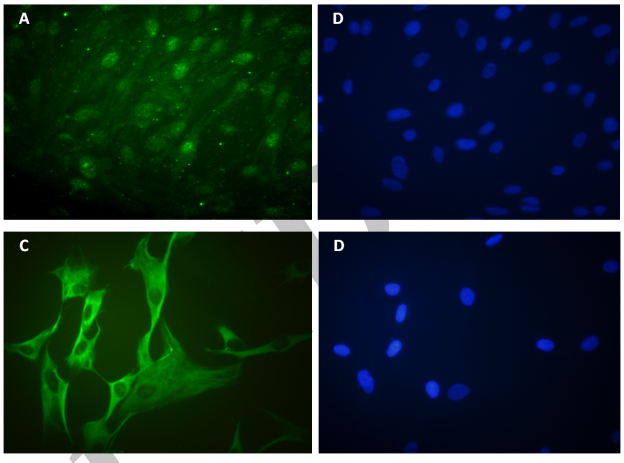
تصویر ۱- تصاویر میکروسکوپ معکوس. (a) تصویر سلول لیمبال ۲۴ ساعت پس از کاشت ناحیه لیمبوس قرنیه در فلاسک. (b) تصویر سلول لیمبال یک هفته پس از کاشت ناحیه لیمبوس قرنیه در فلاسک. (c) تصویر سلول لیمبال رشد کرده بر سطح غشای آمنیوتیک.

www.SID.ir

Downloaded from binajournal.org at 10:13 +0430 on Wednesday August 15th 2018

تایید ماهیت سلول‌های لیمبال

نتایج حاصل از آزمایش ایمونوسایتوشیمی نشان‌دهنده بیان مارکر P۶۳ و Vimentin و تایید ماهیت این سلول‌ها می‌باشد (تصویر ۲).



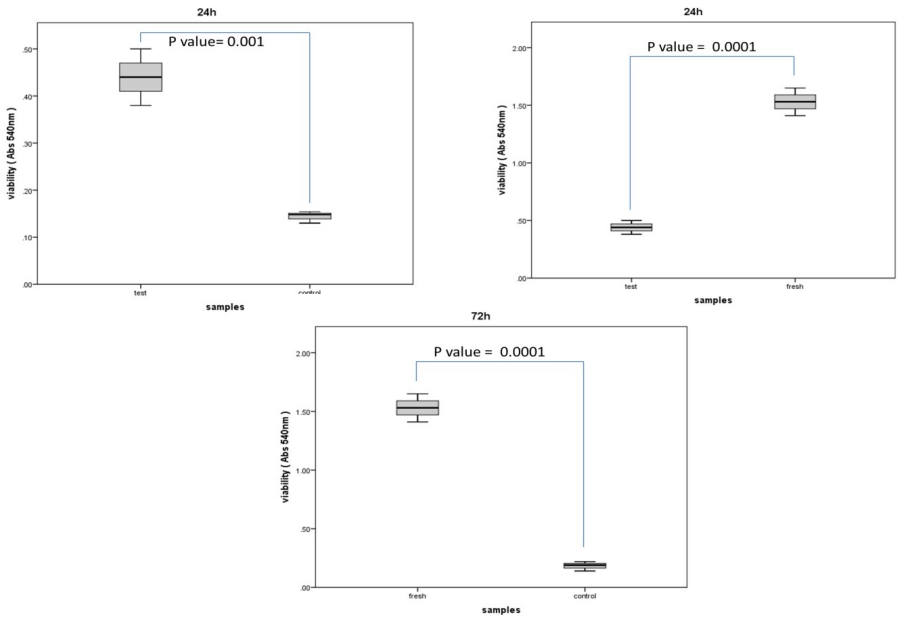
تصویر ۲- تایید ماهیت سلول لیمبال با استفاده از تست ایمونوسایتوشیمی. سلول‌های لیمبال مارکر P۶۳ را به صورت هسته‌ای بیان می‌کنند. ((A= FITC) و (B= DAPI)). سلول‌های لیمبال مارکر Vimentin را به صورت سیتوپلاسمی بیان می‌کنند (C= FITC) و (D= DAPI)). (بزرگ‌نمایی x۲۰۰).

نتایج آزمایش MTT غشای آمنیوتیک تیمار شده پس از انجماد (فریز)

نتایج آزمایش MTT نشان‌دهنده افزایش میزان Viability در فواصل زمانی ۲۴ ساعت، ۷۲ ساعت و یک هفته در غشای آمنیوتیک تیمار شده با لیزات پلاکتی (گروه تیمار) پس از انجماد در مقایسه با غشای آمنیوتیک گروه شاهد می‌باشد. این افزایش در Viability در مدت ۲۴ ساعت اختلاف معنی‌داری در مقایسه نمونه تیمار و شاهد (P=۰/۰۰۱)، نمونه غشای آمنیوتیک Fresh و شاهد (P=۰/۰۰۰۱) و نمونه غشای آمنیوتیک Fresh و نمونه تیمار (P=۰/۰۰۰۱) نشان داد (تصویر ۳).

افزایش در Viability در مدت ۷۲ ساعت اختلاف معناداری در مقایسه نمونه بیمار و شاهد (P=۰/۰۰۲)، شاهد و Fresh (P=۰/۰۰۰۱) و نیز تیمار و Fresh (P=۰/۰۰۲) نشان داد (تصویر ۴).

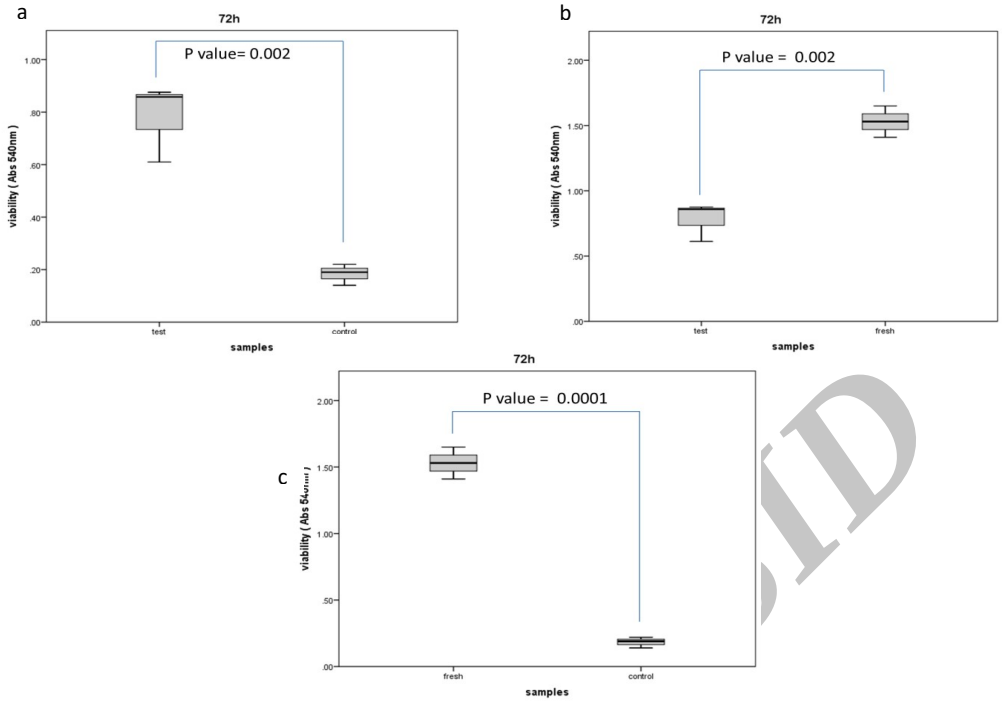
افزایش در Viability در مدت یک هفته اختلاف معناداری در مقایسه نمونه آزمایش و شاهد (P=۰/۰۵) نشان نداد. در صورتی که مقایسه نمونه شاهد و Fresh (P=۰/۰۰۰۱) و آزمایش و Fresh (P=۰/۰۰۵) اختلاف معناداری نشان دادند (تصویر ۵).



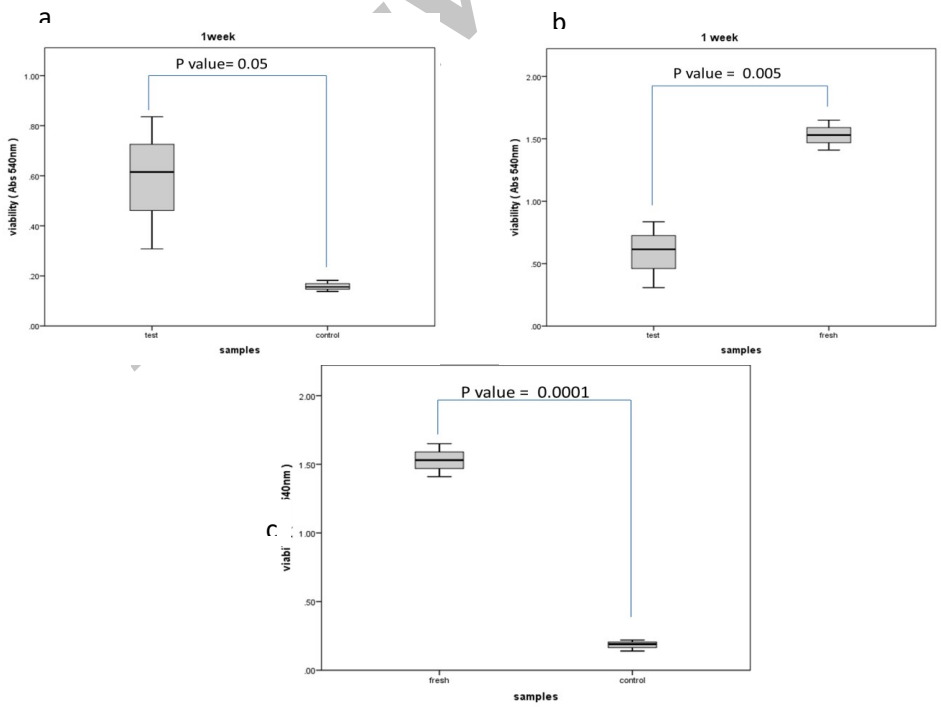
تصویر ۳- نتایج آزمایش MTT به مدت ۲۴ ساعت در نمونه‌های تیمار و شاهد غشای آمنیوتیک تیمار شده با لیزات پلاکتی پس از انجماد و مقایسه با نتیجه MTT نمونه Fresh غشای آمنیوتیک. a) مقایسه نمونه‌های تیمار و شاهد اختلاف معناداری نشان دادند (P=۰/۰۰۱). b) مقایسه نمونه‌های تیمارشده و Fresh اختلاف معناداری نشان دادند (P=۰/۰۰۰۱). c) مقایسه نمونه‌های شاهد و Fresh اختلاف معناداری نشان دادند (P=۰/۰۰۰۱).

www.SID.ir

Downloaded from binajournal.org at 10:13 +0430 on Wednesday August 15th 2018



تصویر ۴- نتایج آزمایش MTT به مدت ۷۲ ساعت در نمونه‌های آزمایش و شاهد غشای آمنیوتیک تیمار شده با لیزات پلاکتی پس از انجماد و مقایسه با نتیجه MTT نمونه Fresh غشای آمنیوتیک. a) مقایسه نمونه‌های آزمایش و شاهد اختلاف معناداری نشان دادند (P=۰/۰۰۲). b) مقایسه نمونه‌های آزمایش و Fresh اختلاف معناداری نشان دادند (P=۰/۰۰۲). c) مقایسه نمونه‌های شاهد و Fresh اختلاف معناداری نشان دادند (P=۰/۰۰۰۱).



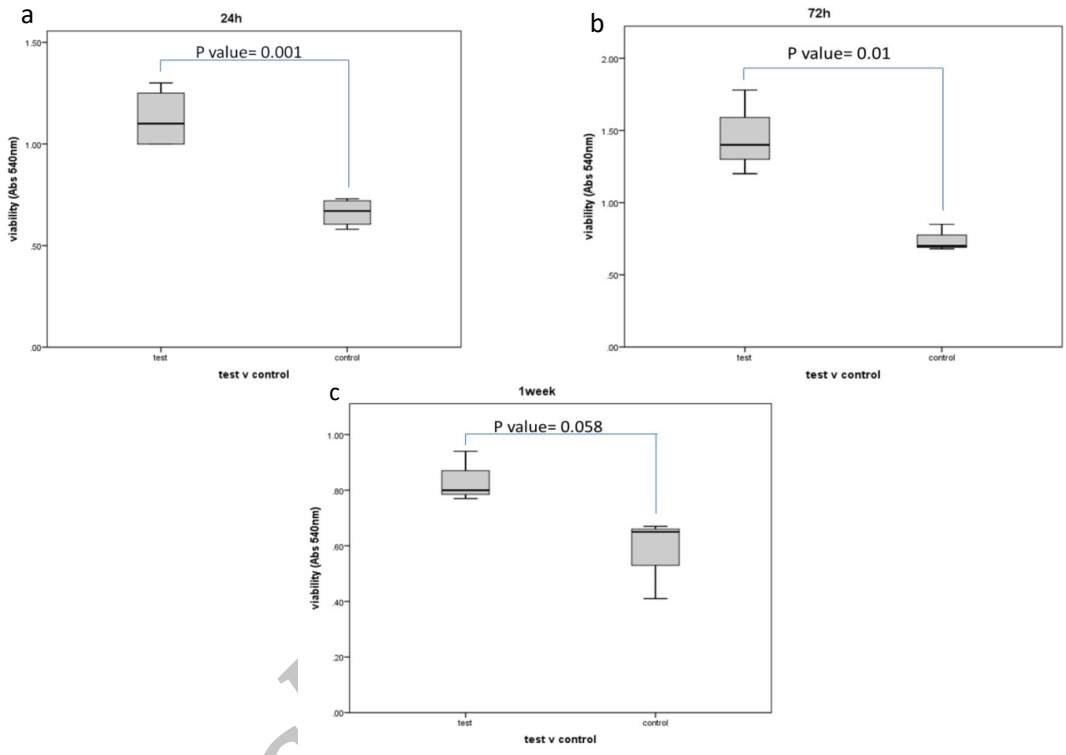
تصویر ۵- نتایج آزمایش MTT به مدت یک هفته در نمونه‌های آزمایش و شاهد غشای آمنیوتیک تیمار شده با لیزات پلاکتی پس از انجماد و مقایسه با نتیجه MTT نمونه Fresh غشای آمنیوتیک. a) مقایسه نمونه‌های مورد آزمایش و گروه شاهد و کنترل اختلاف معناداری نشان ندادند (P=۰/۰۵). b) مقایسه نمونه‌های آزمایش و Fresh اختلاف معناداری نشان دادند (P=۰/۰۰۵). c) مقایسه نمونه‌های شاهد و Fresh اختلاف معناداری نشان دادند (P=۰/۰۰۰۱).

www.SID.ir

Downloaded from binajournal.org at 10:13 +0430 on Wednesday August 15th 2018

نتایج آزمایش MTT سلول لیمبال کشت داده شده روی غشای آمنیوتیک و تیمار شده با لیزات پلاکتی

نتایج آزمایش MTT در نمونه‌های سلول لیمبال کشت داده شده روی غشای آمنیوتیک و تیمار شده با لیزات پلاکتی، نشان‌دهنده افزایش Viability در نمونه‌های تیمار شده (تست) در مقایسه با نمونه‌های شاهد می‌باشد. به این صورت که افزایش در مدت زمان ۲۴ ساعت (P=۰/۰۰۱) و ۷۲ ساعت (P=۰۱/۰۱) از نظر آماری معنادار و در مدت زمان یک هفته (P=۰/۰۵۸) بی‌معنی بود (تصویر ۶).



تصویر ۶- نتایج آزمایش MTT سلول لیمبال کشت داده شده روی غشای آمنیوتیک و تیمار شده با لیزات پلاکتی و مقایسه دو نمونه تیمارشده و شاهد در سه فاصله زمانی ۲۴ ساعت، ۷۲ ساعت و یک هفته. a) مقایسه نمونه تیمارشده و شاهد در ۲۴ ساعت تفاوت معناداری نشان داد (P=۰/۰۰۱). b) مقایسه نمونه تیمارشده و شاهد در ۷۲ ساعت تفاوت معناداری نشان داد (P=۰/۰۱). c) مقایسه نمونه تیمارشده و شاهد در یک هفته تفاوت معناداری نشان نداد (P=۰/۰۵۸).

بحث

پلاسمای غنی از پلاکت انسانی (PRP) و لیزات پلاکتی به دلیل داشتن منبع اتولوگ و مشخصات غیرایمونوژنیکی، جایگزین‌های مناسبی برای FBS هستند و به همین منظور به عنوان یک مکمل در کشت سلول‌های بنیادی چون مزانشیم، سلول‌های بنیادی مغز استخوان و سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی استفاده شده‌اند[۱۳-۱۵]. در کشت‌های مزانشیم عوامل رشد پلاکتی موجب کاهش زمان رسیدن به تراکم، افزایش تکثیر و اندازه واحد تشکیل کلنی می‌شوند[۱۶].

Freira و همکاران[۱۷] در مطالعه‌ای نشان دادند پلاکت‌ها، غنی از عوامل رشدی هستند که می‌توانند فرآیندهای بیولوژیکی مورد نیاز برای ساخت اپی‌تلیال قرنیه را تقویت کنند، مانند تکثیر و تمایز رده‌های سلولی اپی‌تلیال قرنیه در In vitro.

پلاسمای غنی از پلاکت و لیزات پلاکتی تاکنون به صورت موفقیت‌آمیزی برای ترمیم سطح چشم و ساخت اپی‌تلیال پس از بیماری پیوند علیه میزبان[۱۸]، کراتکتومی فتورفرکتیو[۱۹]، چشم خشک[۲۰] و آسیب‌های شیمیایی[۲۱] مورد استفاده قرار گرفته‌اند.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که Viability سلول‌های موجود بر غشای آمنیوتیک بعد از فرآیند انجماد کاهش معنی‌داری نسبت به غشای آمنیوتیک Fresh نشان می‌دهد که این مساله نشان‌دهنده

www.SID.ir

Downloaded from binajournal.org at 10:13 +0430 on Wednesday August 15th 2018

مرگ سلول‌ها طی فرایند انجماد می‌باشد. پس از تیمار غشای آمنیوتیک با غلظت ۵۰ درصد لیزات پلاکتی، افزایش معنی‌داری در رشد سلول‌های غشای آمنیوتیک در زمان‌های ۲۴ ساعته، ۷۲ ساعته و یک هفته در مقایسه با گروه نمونه شاهد FBS ۱۰ درصد مشاهده شد که نشان‌دهنده احیا سلول‌ها تحت تاثیر لیزات پلاکتی می‌باشد. گرچه این میزان در مقایسه با غشای Fresh کاهش معنی‌داری را در میزان زنده بودن سلول‌ها نشان داد، در ادامه، سلول‌های بنیادی لیمبال کاشته شده بر غشای آمنیوتیک با غلظت ۵۰ درصد لیزات پلاکتی مجاور شده و ارزیابی‌ها در زمان‌های ۲۴ ساعته، ۷۲ ساعته و یک هفته نشان‌دهنده افزایش رشد این سلول‌ها در مقایسه با شاهد FBS ۱۰ درصد بود. این افزایش در زمان‌های ۲۴ ساعته، ۷۲ ساعته معنی‌دار ولی در زمان یک هفته بی‌معنی بودند.

در مطالعه‌ای که توسط A. C. Riestra و همکاران[۲۲] صورت گرفت، ۹ روز پس از کشت سلول‌های بنیادی لیمبال در محیط‌های حاوی PRGF ۱۰ درصد و FBS ۱۰ درصد، اختلاف معنی‌داری از لحاظ آماری ($P<0/05$) در تعداد کلی سلول‌های بنیادی لیمبال کشت داده شده مشاهده شد. هم‌چنین واحدهای تشکیل‌دهنده کلنی (Colony-forming units) نیز درصد بالاتری از کلنی سلولی در محیط کشت حاوی PRGF در مقایسه با محیط‌های حاوی FBS را نشان داد. این اختلاف از لحاظ آماری هم معنی‌دار بود ($P<0/01$). این نتایج با نتیجه بررسی میزان Viability در مطالعه حاضر همخوانی دارد. به این صورت که میزان Viability در گروه تیمار شده با لیزات پلاکتی در مقایسه با گروه شاهد در زمان‌های ۲۴ ساعت ($P=0/001$) و ۷۲ ساعت ($P=0/01$) اختلاف معنی‌داری نشان داد[۲۲]. از طرفی در مطالعه Kunal Suri و همکاران[۲۳] غلظت ۱۰ درصد لیزات پلاکت و پلاکت مخلوط‌شده به عنوان مکمل جایگزین برای کشت سلول‌های بنیادی لیمبال، تفاوت معنی‌داری در رشد سلول‌ها در مقایسه با کنترل FBS بعد از گذشت مدت زمان یک هفته نشان نداد ($P= 0/25$) که از این نظر با نتایج به دست آمده در این مطالعه هم‌خوانی دارد. با این تفاوت که در این مطالعه سنجش میزان زنده بودن سلول‌ها در روزهای ابتدایی تیمار با لیزات پلاکتی نیز سنجیده شد و در زمان‌های ۲۴ ساعته و ۷۲ ساعته افزایش معنی‌داری در رشد این سلول‌ها مشاهده گردید. عوامل رشد پلاکتی از نظر احیا و القای حالت میتوژنی در روزهای نخست کشت سلول‌های لیمبال بر غشای آمنیوتیک از FBS موفق‌تر عمل نمودند.

نتیجه‌گیری

لیزات پلاکتی غنی از عوامل رشد قادر است میزان زنده بودن (Viability) سلول‌های اپی‌تلیال غشای آمنیوتیک و سلول‌های بنیادی لیمبال را افزایش دهد. به این ترتیب استفاده از سلول لیمبال کشت داده شده روی غشای آمنیوتیک و تیمار آن با لیزات پلاکتی در پیوند اتولوگ و آلوژن سلول لیمبال به چشم‌های مبتلا به نقص لیمبال سلول‌های بنیادی بسیار کمک‌کننده خواهد بود.

منابع

1. Paolin A, Cogliati E, Trojan D, et al. Amniotic membranes in ophthalmology: long term data on transplantation outcomes. *Cell and tissue banking* 2015:1-8.
2. Malhotra C, Jain AK. Human amniotic membrane transplantation: different modalities of its use in ophthalmology. *World J Transplantation* 2014;4:111.
3. Meller D, Pauklin M, Thomasen H, et al. Amniotic membrane transplantation in the human eye. *Dtsch Arztebl Int* 2011;108:243-248.
4. Dhurat R, Sukesh M. Principles and methods of preparation of platelet-rich plasma: A review and author's perspective. *Journal of Cutaneous and Aesthetic Surgery* 2014;7:189.
5. Jakubowski HV, Owen WG. Macromolecular specificity determinants on thrombin for fibrinogen and thrombomodulin. *J Biol Chem* 1989;264:11117-11121.
6. Acosta L, Castro M, Fernandez M, et al. Treatment of corneal ulcers with platelet rich plasma. Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología (English Edition). 2014;89:48-52.
7. Alio JL, Rodriguez AE, Wróbel Dudzinska D. Eye platelet-rich plasma in the treatment of ocular surface disorders. *Current Opinion in Ophthalmology* 2015;26:325-332.
8. Gonzalez G, Sasamoto Y, Ksander BR, et al. Limbal stem cells: identity, developmental origin, and therapeutic potential. Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology. 2017 Nov 3.
9. Pereira MG, Gomes JA, Rizzo LV, et al. Cytokine dosage in fresh and preserved human amniotic membrane. *Cornea* 2016;35:89-94.
10. Ilic D, Vicovac L, Nikolic M, et al. Human amniotic membrane grafts in therapy of chronic non-healing wounds. *British Medical Bulletin* 2016;117:59-67.
11. Thomasen H, Pauklin M, Noelle B, et al. The effect of long-term storage on the biological and histological properties of cryopreserved amniotic membrane.

www.SID.ir

Downloaded from binajournal.org at 10:13 +0430 on Wednesday August 15th 2018

Current Eye Research 2011;36:247-255.

12. Greppi N, Mazzucco L, Galetti G, et al. Treatment of recalcitrant ulcers with allogeneic platelet gel from pooled platelets in aged hypomobile patients. *Biologicals* 2011;39:73-80.
13. Hemeda H, Giebel B, Wagner W. Evaluation of human platelet lysate versus fetal bovine serum for culture of mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy* 2014;16:170-180.
14. Warnke PH, Humpe A, Strunk D, et al. A clinically-feasible protocol for using human platelet lysate and mesenchymal stem cells in regenerative therapies. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery* 2013;41:153-161.
15. Siciliano C, Ibrahim M, Scafetta G, et al. Optimization of the isolation and expansion method of human mediastinal–adipose tissue derived mesenchymal stem cells with virally inactivated GMP-grade platelet lysate. *Cytotechnology* 2015;67:165-174.
16. Doucet C, Ernou I, Zhang Y, et al. Platelet lysates promote mesenchymal stem cell expansion: A safety substitute for animal serum in cell-based therapy applications. Journal of cellular physiology. 2005;205:228-236.
17. Freire V, Andollo N, Etxebarria J, et al. In Vitro Effects of Three Blood Derivatives on Human Corneal Epithelial Cells Blood Derivatives in Human Corneal Epithelial Cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 201;53:5571-5578.
18. Pezzotta S, Del Fante C, Scudeller L, et al. Autologous platelet lysate for treatment of refractory ocular GVHD. *Bone Marrow Transplant* 2012;47:1558–1563.
19. Anitua E, Muruzabal F, Alcalde I, et al. Plasma rich in growth factors (PRGF-Endoret) stimulates corneal wound healing and reduces haze formation after PRK surgery. *Exp Eye Res* 2013;115:153- 161.
20. Alio JL, Colecha JR, Pastor S, et al. Symptomatic dry eye treatment with autologous platelet-rich plasma. *Ophthalmic Res* 2007;39:124–129.
21. Panda A, Jain M, Vanathi M, et al. Topical autologous platelet-rich plasma eyedrops for acute corneal chemical injury. *Cornea* 2012;31:989–993.
22. Riestra AC, Vázquez N, Chacón M, et al. Autologous method for ex vivo expansion of human limbal epithelial progenitor cells based on plasma rich in growth factors technology. *Ocular Surface* 2017 Jan 20.
23. Suri K, Gong HK, Yuan C, et al. Human platelet lysate as a replacement for fetal bovine serum in limbal stem cell therapy. *Current Eye Research* 2016;41:1266-1273.

Archive of SID

www.SID.ir