تأثیر کرایوپرزرویشن و انجماد خشک در کشت سلول‌های اندوتلیال بر روی پرده آمنیون انسانی

حسن نیک‌نژاد*[۱]، قاسم یزدان‌پناه[۲]، تینا دیهیم[۳]

تاریخ دریافت 1392/05/21 تاریخ پذیرش 1392/08/04

چکیده

پیش زمینه و هدف: پرده آمنیون انسانی دارای ویژگی‌هایی است که آن را بیومتریال مناسبی جهت استفاده در مهندسی بافت عروق می‌سازد. در این مطالعه پرده آمنیون با روش‌های مختلف نگهداری شد و اثرات روش‌های نگهداری بر روی ترکیبات ماتریکس خارج سلولی آمنیون و چسبندگی سلول‌های اندو تلیال کشت داده شده بر روی آن با نمونه‌های تازه تهیه شده بررسی گردید.

روش بررسی: پرده آمنیون انسانی پس از تهیه با روش‌های کرایوپرزرویشن (در دمای C°۸۰- به مدت ۱۲ ماه) و انجماد خشک (لیوفلیزاسیون) نگهداری شد و ترکیبات ماتریکس خارج سلولی توسط رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی ارزیابی و میزان چسبندگی سلول‌های اندوتلیال کشت داده شده بر روی آن با روش MTT بررسی گردید. مقایسه نتایج توسط آنالیز آماری ANOVA صورت پذیرفت.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که ساختمان بافتی از نظر ترکیبات ماتریکس خارج سلولی در نمونه‌های کرایوپرزرو شده با نمونه‌های تازه تهیه شده یکسان است ولی تغییراتی در ساختار نمونه‌های لیوفلیزه شامل آسیب و بهم ریختگی لایه رتیکولار وجود دارد. میزان چسبندگی سلول‌های اندوتلیال در نمونه‌های لیوفلیزه بیشتر از نمونه‌های کرایوپرزرو شده و تازه تهیه شده می‌باشد ($P<0.05$).

نتیجه گیری: کرایوپرزرویشن و لیوفلیزاسیون پرده آمنیون انسانی، می‌توانند تأثیراتی در ماتریکس خارج سلولی آن داشته باشد و این امر چسبندگی سلول‌های اندوتلیال به آمنیون را تحت تأثیر قرار می‌دهد. پرده آمنیون لیوفلیزه بستر مناسب تری برای کشت سلول‌های اندوتلیال در مهندسی بافت عروق می‌باشد.

کلمات کلیدی: آمنیون، کرایوپرزرویشن، انجماد خشک، سلول‌های اندوتلیال، چسبندگی، ماتریکس خارج سلولی

مجله پزشکی ارومیه، دوره بیست و چهارم، شماره دهم، ص ۷۶۲-۷۵۳، دی ۱۳۹۲

آدرس مکاتبه: مرکز تحقیقات نانوتکنولوژی پزشکی و مهندسی بافت، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران، تلفن: ۲۲۴۳۹۸۴۸

Email: niknejad@sbmu.ac.ir

مقدمه

پرده آمنیون داخلی‌ترین لایه جفت است و با داشتن ساختمان بافتی و ترکیبات ماتریکس خارج سلولی ویژه (۲،۱) می‌تواند خواص منحصر به فردی مانند جلوگیری از رشد میکروب‌ها (۳)، مهار واکنش‌های التهابی سیستم ایمنی (۴)، جلوگیری از ایجاد زخم و کمک به ترمیم آن و تسریع اپیتلیالی شدن (۵) از خود نشان دهد و به عنوان یک بافت ایده ال برای مهندسی بافت عروق مطرح باشد (۶). پرده آمنیون حاوی یک غشاء پایه[۴] است که برای کشت برخی رده‌های سلولی (۹-۷) بستر مناسبی به حساب می‌آید.

از پرده آمنیون به اشکال تازه تهیه شده و نگهداری شده[۵] برای مصارف درمانی و تحقیقاتی استفاده می‌شود. از روش‌های رایج نگهداری پرده آمنیون که بیشتر مورد توجه قرار گرفته، می‌توان به روش کرایوپرزرویشن و روش انجماد خشک (لیوفلیزاسیون) اشاره کرد (۸،۷). پرده آمنیون تازه تهیه شده (fresh) یک نوع بیومتریال آماده برای مصرف بر ای کار بردهای مختلف می‌باشد (۶).

---

[۱] استادیار فارماکولوژی، مرکز تحقیقات نانوتکنولوژی پزشکی و مهندسی بافت، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران (نویسنده مسئول)

[۲] دانشجوی پزشکی، مرکز تحقیقات نانوتکنولوژی پزشکی و مهندسی بافت، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

[۳] دانشجوی پزشکی، مرکز تحقیقات نانوتکنولوژی پزشکی و مهندسی بافت، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

۴ basement membrane

۵ preserved

www.SID.ir

علی‌رغم کنترل عوامل عفونی در مادران اهدا کننده بافت و شرایط ایجاد استریل برای تهیه، انتقال و نگهداری آن، خطر انتقال عوامل عفونی همچنان وجود دارند. بنابراین ایجاد شرایط نگهداری آمنیون قبل از مصارف درمانی و تحقیقاتی به منظور کنترل مجدد عوامل عفونی پس از گذشت زمان برای عوامل عفونی که دوره نهفته[1] طولانی تری دارند، ضرورت پیدا می‌کند (۱۱،۱۰). کرایوپرزرویشن پرده آمنیون یک روش نگهداری طولانی مدت است که در این روش پرده آمنیون در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد یا پایین‌تر در محیط حاوی مواد محافظ انجماد مانند گلیسرول و DMSO، محیط کشت و غیره نگهداری می‌شود (۱۳،۱۲). انجماد خشک یا لیوفلیزاسیون یک روش نگهداری دیگر است که در این روش آب موجود در بافت با مکانیسم تصعید از آن خارج می‌شود. از مزیت‌های پرده آمنیون لیوفلیزه می‌توان به توانایی نگهداری در دمای اتاق به مدت طولانی و نقل و انتقال آسان اشاره کرد (۱۴).به هر حال، ممکن است این روش‌های نگهداری در ساختمان ماتریکس خارج سلولی(ECM) تأثیر گذار باشد. ترکیب ECM تأثیر زیادی در چسبندگی سلول‌ها به آن دارد (۱۵). نشان داده شده است که روش‌های نگهداری می‌توانند بر روی ماتریکس خارج سلولی غشاء پایه اثرگذار باشد (۱۴،۱۲). آمنیون دارای ماتریکس بسیار غنی از پروتئین‌های اصلی ماتریکس خارج سلولی از قبیل کلاژن، لامینین، فیبرونکتین و پرلکان می‌باشد که این ترکیبات به همراه سلول‌های اپی تلیالی، ۵ لایه مجزا از نظر بافت شناسی را ایجاد می‌کنند که شامل لایه اپی تلیوم، غشاء پایه، لایه متراکم، لایه فیبروبلاستی و لایه اسفنجی می‌باشد (۱۶). با توجه به این ساختار و ترکیبات آن، آمنیون می‌تواند به عنوان یک بستر مناسب برای انتقال برخی از سلول‌ها به بدن، مانند انتقال کندروسیت‌ها در مهندسی بافت غضروف(۱۷) و یا به عنوان جایگزین عروق (۱۸)، مورد استفاده قرار گیرد. با توجه به موارد فوق و اهمیت استفاده از پرده آمنیون در مصارف درون تن، هدف اصلی در این مطالعه، بررسی اثرات روش‌های نگهداری بر روی ترکیبات ماتریکس خارج سلولی و متعاقب آن کشت سلول‌های اندوتلیال بر روی پرده آمنیون و بررسی چسبندگی سلول‌های کشت داده شده بر روی آن می‌باشد.

مواد و روش‌ها

تهیه و نگهداری پرده آمنیون:

نمونه‌های جفت (تعداد ۱۲ عدد) و اجزای آن از سزارین‌های انتخابی[2] که در هفته ۳۶ و ۳۷ بارداری قرار دارند از بیمارستان‌های عرفان و آیت الله طالقانی تهران تهیه گردید. با اینکه جفت یک عضو زائد و دور انداختنی پس از زایمان است ولی اطلاعات لازم برای استفاده از جفت به والدین ارائه شد و فرم رضایت کتبی نیز از آن‌ها اخذ گردید. نتایج آزمون‌های سرولوژیکی برای تشخیص HIV I، HIV II، HBV، HCV و سیفلیس در همه مادران اهدا کننده بافت منفی بود. بافت‌ها در شرایط آسپتیک در ظروف استریل بافر فسفات سالین (PBS) که حاوی ۵۰µg/ml پنی‌سیلین و ۵۰µg/ml استرپتومایسین بود در دمای ۴°C سریعاً به آزمایشگاه منتقل گردید. کلیه مراحل در محیط آزمایشگاه در زیر هود کشت سلولی و به صورت استریل انجام گردید. سپس پرده آمنیون با روش مکانیکی (Peeling) از کوریون جفت جداسازی شده و چندین بار توسط بافر فسفات سالین سرد (۴°C) شستشو داده شد تا لکه‌های خونی کاملاً از روی آن شسته شوند. بافت‌ها به قطعات کوچک‌تر تقسیم شد و روی غشاء نیتروسلولزی طوری قرار گرفت که سطح اپی تلیال به سمت بالا قرار بگیرد. در این مطالعه بافت‌هایی که با این روش تهیه شدند به عنوان آمنیون تازه تهیه شده[3] مورد بررسی قرار گرفتند.

به منظور تهیه نمونه‌های کرایوپرزرو شده[4]، نمونه‌های تازه تهیه شده در محیط حاوی ۴۰درصد محیط کشت سلولی DMEM/F12 به همراه ۱۰درصد بافر فسفات سالین و ۵۰درصد گلیسرول در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۲ ماه نگهداری شدند. برای استفاده مجدد، پرده آمنیون کرایوپرزرو شده در دمای اتاق ذوب شد و چندین بار با بافر فسفات سالین شستشو گردید.

برای لیوفلیزاسیون آمنیون و تهیه نمونه‌های لیوفلیزه[5]، پرده آمنیون تازه تهیه شده به مدت ۳۰ دقیقه در فریزر با دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد انجماد اولیه[6] گردید و سپس توسط دستگاه فریز درایر (Modulyo D, Thermo Electron Corporation, USA) لیوفلیزه شد. قبل از مصرف، پرده آمنیون لیوفلیزه به مدت ۳۰ دقیقه در بافر فسفات سالین قرار می‌گرفت تا کاملاً آبگیری نماید.

[1] window period

[2] Elective
[3] Fresh Amniotic Membrane = FAM
[4] Cryopreserved Amniotic Membrane = CAM
[5] Lyophilized Amniotic Membrane = LAM
[6] pre-freeze

Archive of SID

www.SID.ir

برای بررسی میزان زنده بودن سلول‌های اپی تلیال نمونه‌های تهیه شده از پرده آمنیون، از تریپان بلو[7] استفاده شد. بدین گونه که محلول تریپان بلو به سطح اپی تلیال نمونه‌ها اضافه شد و پس از ۳ دقیقه انکوباسیون میزان زنده بودن سلول‌ها با استفاده از میکروسکوپ نوری مورد ارزیابی قرار گرفت.

ایمونوهیستوشیمی:

نمونه‌ها با پارافرمالدئید ۴درصد فیکس شدند، برای بلوکه کردن آنتی ژن‌های غیراختصاصی و افزایش نفوذپذیری نمونه‌ها محلول سرم آلبومین گاوی (BSA) ۰/۱درصد و Goat serum ۱۰درصد به همراه Triton X-100 با غلظت ۰/۳درصد استفاده شد. نمونه‌ها با آنتی‌بادی اولیه به مدت یک شبانه روز انکوبه شدند. آنتی‌بادی‌های اولیه استفاده شده در این مطالعه شامل: آنتی‌بادی Collagen type I (10 µg/ml, Sigam-Aldrich; C2456)، آنتی‌بادی Collagen thype III (1:500, Sigam-Aldrich; C7805)، آنتی‌بادی Collagen type IV (1:100, Chemicon; AB769)، آنتی‌بادی Laminin 5 (1:100, Chemicon; MAB19562)، آنتی‌بادی Fibronectin (10 µg/ml, R&D Systems; AF1918)، آنتی‌بادی Perlecan (1:300, Chemicon; MABT12) و آنتی‌بادی von-wilbrand factor (1:250, Sigma-Aldrich; F3520) می‌باشند. در همه موارد، گروه کنترل که در آن بجای آنتی‌بادی اولیه اختصاصی از آنتی‌بادی غیر اختصاصی IgG موش و خرگوش (با توجه به اینکه آنتی‌بادی اولیه در چه حیوانی تولید شده است) با غلظت مشابه استفاده گردید. برای تایید گروه کنترل، حذف آنتی‌بادی اولیه نیز مورد بررسی قرار گرفت. بافت‌ها پس از چندین بار شستشو با بافر فسفات سالین در دمای اتاق با آنتی‌بادی ثانویه مواجه شدند. آنتی‌بادی‌های ثانویه مورد استفاده شامل Goat anti-mouse IgG کونژوگه شده با Rhodamin (1:200, Chemicon; AP132R) و یا Goat anti-rabbit IgG کونژوگه شده با FITC (1:100, Chemicon; AP308F) بودند. در نهایت هسته سلول‌ها با استفاده از 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Sigma-Aldrich; D9564) رنگ آمیزی گردید و نمونه‌ها با میکروسکوپ فلورسنت بررسی شدند. برای بررسی ضخامت لایه‌های مختلف با استفاده از میکروسکوپ کالیبره شده با دوربین دیجیتال (Zeiss, Jena, Germany; Axioskop 2) استفاده شد و از نرم افزار (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland) Image J برای آنالیز تصاویری که توسط میکروسکوپ گرفته شد، استفاده شد.

[7] Trypan Blue

جداسازی و کشت سلول‌های اندوتلیال:

آئورت موش صحرایی بالغ و نرمال از نوع Sprague-Dawley پس از جدا شدن از بدن حیوان، با استفاده از بافر فسفات سالین حاوی ۵۰µg/ml پنی‌سیلین و ۵۰µg/ml استرپتومایسین شستشو داده شد و به قطعات کوچک‌تر تقسیم گردید. سلول‌های اندوتلیال (ECs) از سطح داخلی آئورت پس از تیمار با trypsin-EDTA با غلظت ۰/۱۵درصد به مدت ۳۰ دقیقه، توسط scraper جداسازی می‌شدند. سلول‌های اندوتلیال در محیط کشت DMEM/F12 حاوی U/ml ۱۰۰penicillin/streptomycin، ۱۰درصد FBS، ۲mM ال-گلوتامین، ۱درصد اسیدهای آمینه غیر ضروری، ۲- مرکاپتواتانول با غلظت ۲µM و ۱mM پیروات سدیم در انکوباتور (۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ % CO_2) کشت داده شدند. محیط کشت سلول‌ها هر ۲-۳ روز تعویض می‌شد و پاساژ مجدد سلول‌ها توسط trypsin ۰/۰۵درصد انجام می‌گرفت. جهت تائید سلول‌های اندوتلیال از بیان مارکر اندوتلیالی (vWf) استفاده می‌شد.

چسبندگی سلول‌های اندوتلیال:

پرده آمنیون به شکل دایره برش داده می‌شد به طوری که اندازه آن منطبق با پلیت ۲۴ خانه کشت سلول باشد. پرده آمنیون در ته پلیت کشت طوری قرار می‌گرفت که سطح اپی تلیال آن به سمت بالا باشد. با استفاده از رینگ‌های دایره‌ای شیشه‌ای که کناره‌های پرده آمنیون را محصور کرده باشد، پرده آمنیون در ته پلیت ثابت نگه داشته می‌شد. سلول‌های اندوتلیال با تعداد ۱۰۰۰۰ سلول در هر میلی لیتر محیط کشت، در قسمت داخلی حلقه شیشه‌ای اضافه می‌شد و سلول‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ % CO_2 به مدت یک شب انکوبه می‌شدند. پس از انکوباسیون، سلول‌هایی که به آمنیون نچسبیده بودند طی شستشو از محیط خارج شدند و سلول‌هایی که به پرده آمنیون چسبیده بودند به سرعت تحت تیمار تریپسین قرار گرفتند و تعداد آن‌ها شمارش شد. با استفاده از بررسی‌های میکروسکوپی و رنگ آمیزی همزمان با مارکر vWf و DAPI تائید شد که همه سلول‌های چسبیده اندوتلیالی می‌باشند و سلول‌هایی که نچسبیده بودند در مرحله شستشو از آمنیون جدا شده‌اند.

بررسی سمیت سلولی:

برای ارزیابی اثرات روش‌های مختلف نگهداری پرده آمنیون بر روی viability سلول‌های اندوتلیال بدین شکل اقدام شد که بر روی نمونه‌های پرده آمنیون که در ته پلیت‌های کشت سلول فیکس شده بودند، سلول‌های اندوتلیال با تعداد $۱/۵\times ۱۰^{۵}$ اضافه گردید و به مدت یک شبانه روز انکوباسیون صورت گرفت. برای بررسی سمیت سلولی ۲۵۰ میکرولیتر از محلول MTT (با غلظت

Archive of SID

www.SID.ir

۵ میلی گرم در هر میلی لیتر) به هر خانه اضافه گردید و پلیت‌ها مجدداً به مدت ۴ ساعت انکوبه شدند. سپس کریستال‌های formazan تشکیل شده در ۱ میلی لیتر DMSO حل گردید و میزان جذب آن در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (CE7500, Cecil, UK) ارزیابی شد. در هر آزمایش یک نمونه شامل پرده آمنیون که سلول‌های اندوتلیال روی آن کشت داده نشده بود، استفاده می‌شد و اختلاف جذب نمونه‌های مورد بررسی با آن، معیاری از جذب سلول‌های اندوتلیال در نظر گرفته می‌شد. نمونه کنترل شامل تعداد مشابه ای از سلول اندوتلیال بدون پرده آمنیون بود و درصد سلول‌های زنده با استفاده از رابطه $OD_{sample}/OD_{control} \times 100\%$ محاسبه می‌گردید.

میکروسکوپ الکترونی:

برای مطالعه سطوح نمونه‌ها از میکروسکوپ الکترونی SEM استفاده شد. نمونه‌ها با استفاده از گلوتارآلدئید ۲/۵درصد به مدت یک شبانه روز در یخچال ۴ درجه سانتی فیکس می‌شدند. سپس در دمای اتاق و به مدت ۲ ساعت با محلول ۱درصد از (Osmium tetraoxide, Sigma-Aldrich) مجاور می‌شدند. آبگیری نمونه‌ها توسط سری الکل‌های صعودی به ترتیب ۲۵درصد، ۵۰ درصد، ۷۵درصد، ۹۵درصد و ۱۰۰درصد، هر کدام به مدت ۱۰ دقیقه انجام گرفت. پس از خشک کردن با دستگاه critical point dryer و قرار گیری نمونه‌ها در محفظه مربوطه، سطح نمونه‌ها توسط یک لایه نازک طلا پوشانده شد و در نهایت نمونه‌ها با استفاده از میکروسکوپ SEM (JSM-5600; JEOL, Tokyo, Japan) بررسی شدند.

آنالیز آماری:

همه داده‌های کمی به شکل Mean±SD بدست آمد و آنالیز آماری با ANOVA یک‌طرفه با Tukey post-test انجام گرفت و نتایج در دو سطح $P<0.05$ و $P<0.01$ بررسی شدند.

یافته‌ها

بررسی‌های انجام شده با تریپان بلو نشان می‌دهد که میزان سلول‌های زنده در اپی تلیوم آمنیون انسانی تازه تهیه شده بیشتر از ۹۷درصد می‌باشد در حالی که این میزان در نمونه‌های CAM کاهش می‌یابد و به کمتر از ۵۰ درصد می‌رسد و در نمونه‌های LAM سلول اپی تلیال زنده‌ای وجود نداشت.

جهت بررسی اثرات روش‌های نگهداری مختلف بر روی ساختار بافتی پرده آمنیون از روش رنگ آمیزی ایمونوهسیتوشیمی بر روی اجزاء ماتریکس خارج سلولی استفاده گردید. ماتریکس خارج سلولی در همه نمونه‌ها، به شکل یک نوار متوالی که زیر لایه اپیتلیوم قرار دارد تشخیص داده شد. بررسی‌ها مشخص کرد که روش‌های مختلف نگهداری در ترکیب ماتریکس خارج سلولی که حاوی کلاژن تیپ‌های I، III و IV، فیبرونکتین، لامینین و پرلکان است، اثری ندارد. اما میزان این ترکیبات در انواع نمونه‌ها در قسمت‌های مختلف بافت متفاوت می‌باشد. نشان داده شد که فقط در ناحیه غشاء پایه که لایه نازکی زیر سلول‌های اپیتلیوم است کلاژن تیپ IV و پرلکان وجود دارد. ماتریکس خارج سلولی لایه‌های زیر غشاء پایه در FAM حاوی کلاژن‌های تیپ I و III، فیبرونکتین و لامینین است. نتایج حاصل از بررسی ضخامت بافت‌ها نشان داد که ضخامت لایه‌های زیر غشاء پایه در نمونه‌های CAM نازک‌تر از نمونه‌های FAM است و به نظر می‌رسد که ساختار شبکه رتیکولار در نمونه‌های LAM آسیب‌های جدی دیده است (شکل- ۱).

چسبندگی سلول‌های اندوتلیال:

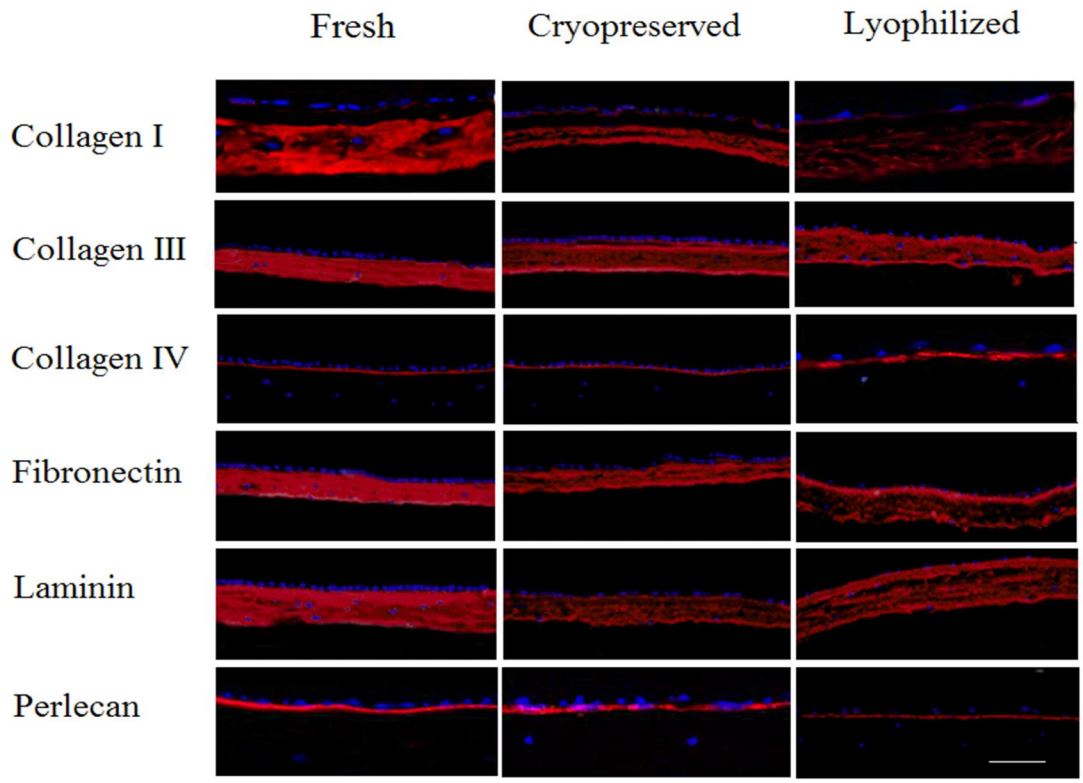
جهت ارزیابی چسبندگی سلول‌ها بر روی پرده آمنیون، سلول‌های اندوتلیال بر روی آن کشت داده شدند. چسبندگی سلول‌ها بر روی نمونه‌های LAM به شکل معنی‌داری از نمونه‌های FAM و CAM بیشتر می‌باشد ($P<0.05$) (نمودار- ۱ الف). تفاوت معنی‌داری در چسبندگی سلول‌های اندوتلیال در نمونه‌های CAM و FAM دیده نشد. چسبندگی سلولی بر روی LAM به طور معنی‌داری از چسبندگی سلول‌ها بر روی پلیت کشت سلول نیز بیشتر می‌باشد ($P<0.05$). این یافته‌ها نشان می‌دهد که LAM پتانسیل مناسبی برای چسبیدن سلول‌ها در قیاس با FAM و CAM و حتی پلیت‌های کشت سلول دارد. بررسی مارکر داخل سیتوپلاسمی vWf با روش رنگ آمیزی ایمونوسیتوشیمی پس از کشت سلولی نشان داد که همه سلول‌های اندوتلیالی که بر روی LAM کشت داده شده بودند ماهیت اندوتلیالی خود را حفظ کرده‌اند (شکل- ۲). همان‌طور که در تصاویر SEM دیده می‌شود سلول‌های اپی تلیوم در پرده آمنیون تازه تهیه شده به شکل موزائیک‌های شش وجهی در کنار هم قرار گرفته‌اند (شکل۳- الف) و مورفولوژی سلول‌های اندوتلیال پس از یک هفته کشت بر روی LAM همچنان حفظ شده است (شکل۳- ب).

سمیت سلولی:

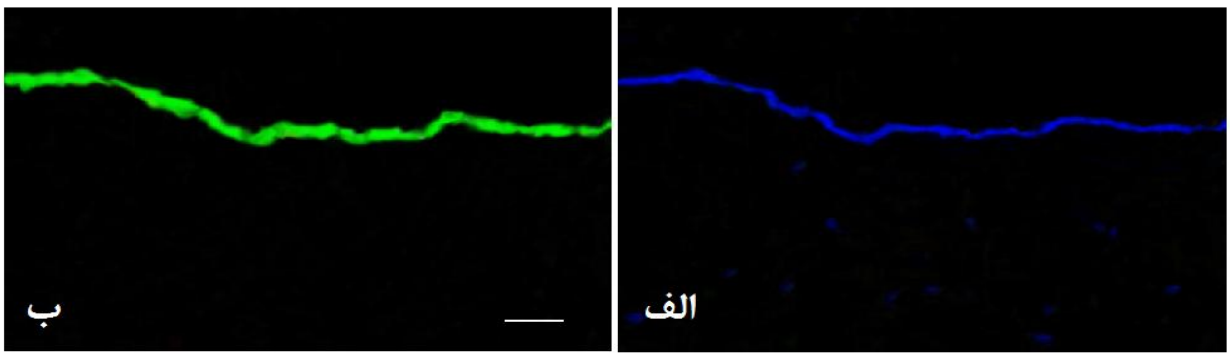
بررسی‌های سمیت سلولی با روش MTT نشان داد که هیچ تفاوت معنی‌داری در میزان سلول‌های زنده که بر روی نمونه‌های FAM و CAM کشت داده شده بودند دیده نشد (نمودار- ۱ ب). همچنین درصد سلول‌های اندوتلیال زنده که بر روی LAM کشت داده شده بودند در قیاس با FAM و CAM به طور معنی‌داری بیشتر است ($P<0.05$).

Archive of SID

www.SID.ir

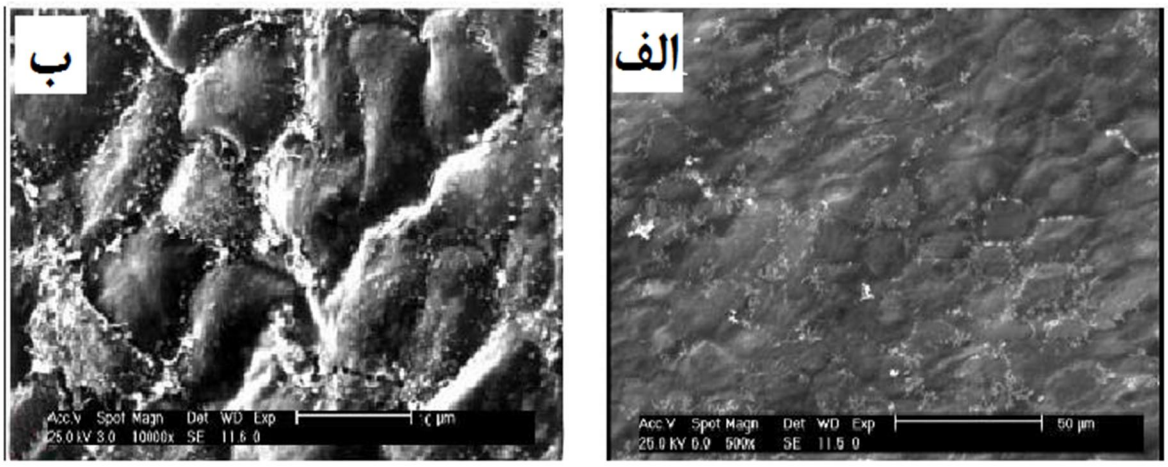


شکل شماره (۱): تصاویر میکروسکوپ فلورسنت از رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی ترکیبات ماتریکس خارج سلولی شامل کلاژن تیپ I، کلاژن تیپ III، کلاژن تیپ IV، فیبرونکتین، لامینین و پرلکان در پرده آمنیون تازه تهیه شده (Fresh)، کرایوپرزرو شده (Cryopreserved) و لیوفلیزه (Lyophilized). نتایج نشان می‌دهد که کلاژن تیپ‌های III و IV، فیبرونکتین، لامینین و پرلکان در همه اشکال آمنیون به شکل یک لایه پیوسته در طول غشاء پایه قرار دارند. کلاژن تیپ‌های I، III و IV، فیبرونکتین و لامینین در پرده آمنیون تازه تهیه شده به شکل یک لایه متراکم دیده می‌شوند، در حالی که در آمنیون کرایوپرزرو شده و لیوفلیزه این لایه آسیب دیده و نازک‌تر دیده می‌شود. هسته سلول‌های پرده آمنیون با رنگ آمیزی DAPI به شکل نقاط آبی رنگ دیده می‌شوند. رنگ‌آمیزی‌ها بر روی ۵ بافت مختلف با سه بار تکرار انجام شده است (خط نشانه = ۱۰۰ میکرومتر).

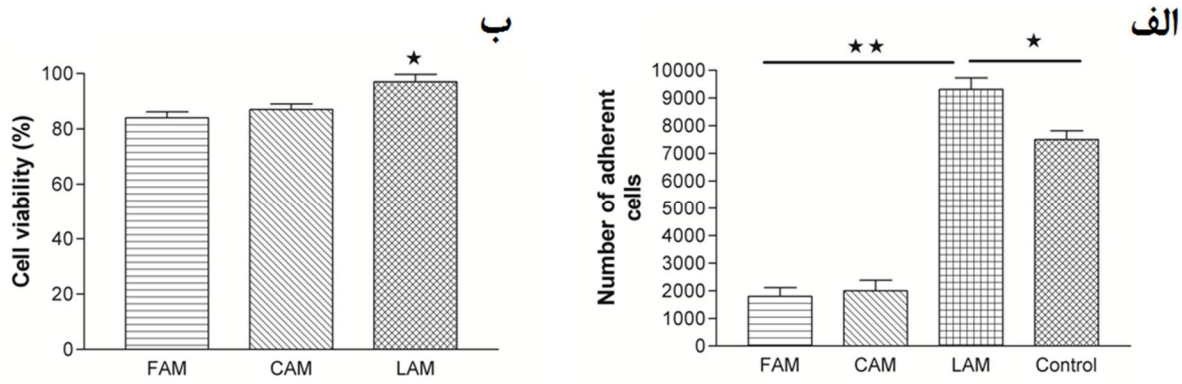


شکل شماره (۲): تصویر میکروسکوپ فلورسنت از رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی بر علیه مارکر اندوتلیالی vWf. الف) واکنش مثبت آنتی‌بادی اولیه بر علیه این مارکر در سلول‌های اندو تلیال کشت داده شده بر روی آمنیون لیوفلیزه نشان می‌دهد که پس از یک هفته سلول‌های کشت داده شده بر روی آمنیون خصلت اندوتلیالی خود را حفظ کرده‌اند؛ ب) نمایی از رنگ آمیزی DAPI از همان فیلد میکروسکوپی (خط نشانه = ۱۰۰ میکرومتر).

www.SID.ir



شکل شماره (۳): تصاویر میکروسکوپ الکترونی SEM از سطح پرده آمنیون. الف) سلول‌های اپی تلیوم در پرده آمنیون تازه تهیه شده به شکل موزائیک‌های شش وجهی در کنار هم قرار گرفته‌اند؛ ب) نمایی از سلول‌های اندوتلیال کشت داده شده بر روی پرده آمنیون لیوفلیزه پس از یک هفته.



نمودار - ۱ الف) مقایسه چسبندگی سلول‌های اندوتلیال پس از یک شبانه روز بر روی پرده آمنیون تازه تهیه شده (Fresh)، کرایوپرزرو (CAM) و لیوفلیزه (LAM). در گروه کنترل چسبندگی تعداد مشابه سلول‌های اندوتلیال بر روی پلیت کشت سلول نشان داده شده است. میزان چسبندگی سلول‌های اندو تلیال بر روی پرده آمنیون لیوفلیزه بیشتر از سایر گروه‌ها است. ب) درصد سلول‌های زنده اندوتلیالی کشت داده شده بر روی اشکال مختلف پرده آمنیون. نتایج نشان می‌دهد که کرایوپرزرویشن و لیوفلیزاسیون تأثیری بر روی زیست سازگاری پرده آمنیون ندارد (★P<0.05 , ★★P<0.01).

بحث

پرده آمنیون انسانی به عنوان یک بیومتریال استفاده وسیعی در مهندسی بافت دارد (۶). یکی از مسائل مهمی که در ارتباط با استفاده از پرده آمنیون به عنوان جایگزین عروق مطرح می‌باشد قدرت چسبندگی سلول‌های اندوتلیال بر روی آن می‌باشد. با توجه به روش‌های نگهداری مختلفی که برای استفاده از آمنیون مطرح است و همچنین داشتن پتانسیل‌های بالقوه و بالفعل پرده آمنیون در انتقال سلول‌های مختلف به بدن (۱۹)، هدف اصلی ما در این مطالعه بررسی تأثیر روش‌های نگهداری مختلف در میزان چسبندگی سلول‌های اندوتلیال کشت داده شده بر روی پرده آمنیون و بررسی تغییرات احتمالی در ترکیبات ماتریکس خارج سلولی آن می‌باشد. بدین منظور پرده آمنیون با

www.SID.ir

روش‌های کرایوپرزرویشن و لیوفلیزاسیون به مدت ۱۲ ماه نگهداری شد و میزان چسبندگی سلول‌های اندوتلیال با نمونه‌های تازه تهیه شده آن مقایسه شد.

به طور کلی استفاده از پرده آمنیون در دو شکل شامل پرده آمنیون حاوی اپی تلیوم (پرده آمنیون بدون جدا سازی سلول‌های اپی تلیال) و پرده آمنیون فاقد اپی تلیوم (پرده آمنیون بدون سلول‌های اپی تلیال) رایج است. نشان داده شده است که سلول‌های بنیادی لایه بازال لیمبوس که بر روی پرده آمنیون حاوی اپی تلیوم کشت داده شده بودند فنوتیپ سلول‌های اپی‌تلیال لیمبال (limbal epithelial) را نشان می‌دهند در حالی که سلول‌های کشت داده شده بر روی پرده آمنیون فاقد اپی تلیوم فنوتیپ سلول‌های اپی‌تلیال قرنیه (corneal epithelil) را بیان می‌نمایند (۲۰). همچنین حضور لایه اپی‌تلیوم در پرده آمنیون می‌تواند چسبندگی سلول‌های کشت داده شده بر روی آن را کاهش دهد و لایه سلولی کشت داده شده بر روی آن به شکل لایه‌ای ناهموار و ناصاف باشد (۲۱). بنابراین تعیین اینکه کدام شکل از پرده آمنیون (حاوی اپی تلیوم و فاقد اپی تلیوم) در کاربردهای مهندسی بافت مناسب است، علاوه بر بحث فوق، به سایر عوامل مانند نوع سلول و نوع بافت و غیره نیز وابسته است.

حفظ غشاء پایه برای کشت و چسبندگی سلول‌ها ضروری است (۱۸و۲۲). در این مطالعه با توجه مشاهدات میکروسکوپی و رنگ‌آمیزی‌های ایمونوهیستوشیمی بر روی کلاژن تیپ IV، مشخص شد که غشاء پایه در هر سه گروه مورد آزمایش دست نخورده باقی مانده است، به طوری که در همه نمونه‌ها غشاء پایه به شکل یک لایه نازک و کاملاً پیوسته در زیر لایه اپی تلیوم دیده می‌شود. مشاهدات میکروسکوپی حاصل از ایمونوهسیتوشیمی بر روی لامینین و فیبرونکتین که از اجزاء غشاء پایه محسوب می‌شوند نیز نتایج مشابهی را نشان می‌دهند. سازماندهی ماکرو مولکول‌های ماتریکس خارج سلولی، مانند کلاژن، لامینین و فیبرونکتین نقش بسیار مهمی در خواص بیولوژیکی و بیوفیزیکی آمنیون دارد.

هدف اصلی ما در این مطالعه ارزیابی پرده آمنیون به عنوان یک بستر برای کشت سلول‌های اندوتلیال و مقایسه نتایج حاصل از نمونه‌های تازه تهیه شده با نمونه‌های نگهداری شده بود. بررسی‌های انجام شده با تریپان بلو نشان می‌دهد که میزان سلول‌های زنده در اپی تلیوم آمنیون انسانی تازه تهیه شده بیشتر از ۹۷% می‌باشد در حالی که این میزان در نمونه‌های CAM کاهش می‌یابد. همچنین در نمونه‌های LAM سلول‌های اپی تلیالی از بین رفته بود و برخی از نقاط غشاء پایه عاری از سلول بود. نتایج این مطالعه نشان داد که علیرغم کاهش تعداد سلول‌های اپی تلیال پرده آمنیون کرایوپرزرو شده، هیچ تفاوتی در میزان چسبندگی سلول‌های اندوتلیال بر روی پرده آمنیون تازه تهیه شده و پرده آمنیون کرایوپرزرو شده وجود ندارد. بنابراین می‌توان گفت که زنده بودن سلول‌های اپی تلیال پرده آمنیون نقشی در چسبندگی سلول‌های اندوتلیال ندارند. در مطالعات قبلی نشان داده شده بود که میزان سلول‌های اپی تلیال زنده در پرده آمنیون در طول کرایوپرزرویشن با گلیسرول کاهش می‌یابد (۲۳) و نتایج حاصل از مطالعه ما نیز این مسئله را تائید می‌کند. همچنین گزارش شده بود که زنده بودن سلول‌های اپی تلیالی آمنیون فاکتور مهمی در استفاده موفقیت آمیز از پرده آمنیون نیست (۲۴). نتایج حاصل از مطالعات ما نشان داد که سلول‌های اندوتلیال بر روی نمونه‌های لیوفلیزه پرده آمنیون با حفظ خصوصیات اندوتلیالی (بیان مارکر vWF)، بهتر رشد می‌کنند. فاکتور ون- ویلبراند (vWF) گلیکوپروتئین اختصاصی سلول‌های اندوتلیال است که توسط اندامک‌های درون سیتوپلاسمی این سلول‌ها بنام Weibel-Palade boby تولید می‌شوند. به نظر می‌رسد چسبندگی و رشد بالای سلول‌های اندوتلیال بر روی نمونه‌های LAM به دلیل اتصال مستقیم آن‌ها به غشاء پایه است. به نظر می‌رسد، لیوفلیزاسیون پرده آمنیون باعث حذف سلول‌های اپی تلیوم آن شده و منجر به آشکار شدن غشاء پایه می‌شود. همان‌طور که ذکر شد، غشاء پایه پرده آمنیون حاوی اجزاء ماتریکس خارج سلولی مانند تیپ‌های I، III و IV کلاژن، لامینین، فیبرونکتین و پرلکان می‌باشد که می‌تواند چسبندگی و پرولیفراسیون سلول‌های اندوتلیال را القاء کند (۲۵). مطالعات قبلی نشان داده بود که جهت استفاده از غشاء پایه پرده آمنیون برای کشت سلول‌ها، ضروری است که سلول‌های اپی تلیال آن جدا شوند. در سال‌های اخیر تکنیک‌های مختلفی برای جداسازی و حذف سلول‌های اپی تلیال پرده آمنیون مورد توجه قرار گرفته است (۲۷،۲۶،۱۸). اگرچه در این تکنیک‌ها، حفظ ساختمان غشاء پایه پرده آمنیون مدنظر بوده است تا سلول‌های کشت داده شده بر روی غشاء پایه بتوانند اندرکنش‌های مناسبی با اجزاء ماتریکس خارج سلولی آن داشته باشند، ولی در حال حاضر تکنیکی که به طور کامل و بدون آسیب به غشای پایه موجب جداسازی سلول گردد گزارش نشده است.

نتیجه گیری

کرایوپرزرویشن و لیوفلیزاسیون دو روش رایج برای نگهداری پرده آمنیون هستند که می‌توانند ساختمان بافتی پرده آمنیون را تغییر دهند. از آنجائی‌که لیوفلیزاسیون منجر به در معرض قرارگیری غشاء پایه آمنیون می‌شود، به نظر می‌رسد پرده آمنیون

Archive of SID

www.SID.ir

لیوفلیزه نسبت به پرده آمنیون تازه تهیه شده و کرایوپرزرو شده جهت کشت سلول‌های اندوتلیال ارجحیت دارد. با این حال برای استفاده از پرده آمنیون در مهندسی بافت عروق، مطالعات بیشتری لازم به نظر می‌رسد.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از آقای بهرام جامبر نوشین و پرسنل محترم اتاق عمل بیمارستان‌های عرفان و آیت‌الله طالقانی به خصوص سرکار خانم دکتر نیرومنش و سرکار خانم یوسفی کمال قدردانی و تشکر به عمل می‌آید. این مطالعه با حمایت مالی مرکز تحقیقات نانوتکنولوژی پزشکی و مهندسی بافت دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی انجام گردید. نتایج این مقاله برگرفته از پایان نامه پزشکی می‌باشد.

References:

1. Niknejad H, Deihim T, Ahmadiani A ,Jorjani M, Peirovi H. Permanent expression of midbrain dopaminergic neurons traits in differentiated amniotic epithelial cells. Neuroscience letters 2012; 506(1): 22-7.
2. Von Versen-Hoeynck F, Steinfeld AP, Becker J, Hermel M, Rath W, Hesselbarth U. Sterilization and preservation influence the biophysical properties of human amnion grafts. Biologicals 2008;36(4):248–55.
3. Ganatra, M.A., Amniotic membrane in surgery. J Pak Med Assoc 2003; 53(1):29-32.
4. Peirovi H, Rezvani N, Hajinasrollah M, Mohammadi SS, Niknejad H. Implantation of amniotic membrane as a vascular substitute in the external jugular vein of juvenile sheep. J Vasc Surg 2012;56(4):1098–104.
5. Gomes JA, Romano A, Santos MS, Dua HS. Amniotic membrane use in ophthalmology. Curr Opin Ophthalmol 2005; 16(4):233-40.
6. 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.
7. Koizumi N, Inatomi T, Suzuki T, Sotozono C, Kinoshita S. Cultivated corneal epithelial stem cell transplantation in ocular surface disorders. Ophthalmology 2001;108(9):1569–74.
8. K. Endo, T. Nakamura, S. Kawasaki, S. Kinoshita, Human amniotic membrane, like corneal epithelial basement membrane, manifests the alpha5 chain of type IV collagen. Invest Ophthalmol Vis Sci 2004: 45(6):771-4.
9. Cooper LJ, Kinoshita S, German M, Koizumi N, Nakamura T, Fullwood NJ. An investigation into the composition of amniotic membrane used for ocular surface reconstruction. Cornea 2005;24(6):722–9.
10. Von Versen-Hoeynck F, Steinfeld AP, Becker J, Hermel M, Rath W, Hesselbarth U. Sterilization and preservation influence the biophysical properties of human amnion grafts. Biologicals 2008;36(4):248–55.
11. Simonds RJ, Holmberg SD, Hurwitz RL, Coleman TR, Bottenfield S, Conley LJ, et al. Transmission of human immunodeficiency virus type 1 from a seronegative organ and tissue donor. N Engl J Med 1992;326(11):726–32.
12. Ahn JI, Jang IK, Lee DH, Seo YK, Yoon HH, Shin YH, et al. A comparison of lyophilized amniotic membrane with cryopreserved amniotic membrane for the reconstruction of rabbit corneal epithelium. Biotechnol Bioproc E 2005; 10:262-9.
13. Nakamura T, Yoshitani M, Rigby H, Fullwood NJ, Ito W, Inatomi T, et al. Sterilized, freeze-dried amniotic membrane: a useful substrate for ocular surface reconstruction. Invest Ophthalmol Vis Sci 2004;45(1):93–9.
14. Rodríguez-Ares MT, López-Valladares MJ, Touriño R, Vieites B, Gude F, Silva MT, et al. Effects of lyophilization on human amniotic membrane. Acta Ophthalmol 2009;87(4):396–403.

Archive of SID

www.SID.ir

15. Shortt AJ, Secker GA, Lomas RJ, Wilshaw SP, Kearney JN, Tuft SJ, et al. The effect of amniotic membrane preparation method on its ability to serve as a substrate for the ex-vivo expansion of limbal epithelial cells. Biomaterials 2009;30(6):1056–65.
16. Parry S, Strauss JF 3rd. Premature rupture of the fetal membranes. N Engl J Med 1998;338(10):663–70.
17. Jin CZ, Park SR, Choi BH, Lee K-Y, Kang CK, Min B-H. Human amniotic membrane as a delivery matrix for articular cartilage repair. Tissue Eng 2007;13(4):693–702.
18. Niknejad H, Deihim T, Solati-Hashjin M, Peirovi H. The effects of preservation procedures on amniotic membrane's ability to serve as a substrate for cultivation of endothelial cells. Cryobiology 2011;63(3):145–51.
19. Wilshaw SP, Kearney J, Fisher J, Ingham E. Biocompatibility and potential of acellular human amniotic membrane to support the attachment and proliferation of allogeneic cells. Tissue Eng Part A 2008; 14(4):463-72.
20. Grueterich M, Espana EM, Tseng SC. Ex vivo expansion of limbal epithelial stem cells: amniotic membrane serving as a stem cell niche. Surv Ophthalmo 2003; 48:631-46.
21. Burman S, Tejwani S, Vemuganti GK, Gopinathan U, Sangwan VS. Ophthalmic applications of preserved human amniotic membrane: a review of current indications. Cell Tissue Bank 2004;5(3):161–75.
22. Azuara-Blanco A, Pillai CT, Dua HS. Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction. Br J Ophthalmol 1999;83(4):399–402.
23. 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 Bank 2007;8(1):1–8.
24. Kruse FE, Joussen AM, Rohrschneider K, You L, Sinn B, Baumann J, et al. Cryopreserved human amniotic membrane for ocular surface reconstruction. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 2000;238(1):68–75.
25. Lee EJ, Vunjak-Novakovic G, Wang Y, Niklason LE. A biocompatible endothelial cell delivery system for in vitro tissue engineering. Cell Transplant 2009;18(7):731–43.
26. Hopkinson A, Shanmuganathan VA, Gray T, Yeung AM, Lowe J, James DK, et al. Optimization of amniotic membrane (AM) denuding for tissue engineering. Tissue Eng Part C Methods 2008;14(4):371–81.
27. Wilshaw S-P, Kearney JN, Fisher J, Ingham E. Production of an acellular amniotic membrane matrix for use in tissue engineering. Tissue Eng 2006;12(8):2117–29.

Archive of SID

www.SID.ir

Original Article

THE EFFECTS OF CRYOPRESERVATION AND LYOPHILIZATION ON ENDOTHELIAL CELLS ADHESION TO HUMAN AMNIOTIC MEMBRANE

*Hassan Niknejad *[1], Ghasem Yazdanpanah[2], Tina Deihim[3]*

Received: 12 Aug , 2013; Accepted: 26 Oct , 2013

Abstract

Background & Aims: Human amniotic membrane has some specific properties making it an appropriate biomaterial for using in vascular tissue engineering. In this study, amniotic membrane was preserved with different methods. Effects of preservation on amniotic extracellular matrix and adhesion of cultured endothelial cells to membrane were compared with fresh samples of amniotic membrane.

Materials & Methods: Human amniotic membrane was preserved with cryopreservation (-80˚C for 12 month) or lyophilization methods. Extracellular matrix components were assayed with immunohistochemistry method. The adhesion of cultured endothelial cells was studied with MTT assay. Results between groups were compared with ANOVA (Post-test Tukey).

Results: Results demonstrated that extracellular matrix components were same in cryopreserved samples in comparison to fresh ones but there are some differences in lyophilized samples. Adhesion of endothelial cells to lyophilized samples was significantly more than cryopreserved or fresh samples (P Value < 0.05).

Conclusion: Both cryopreservation and lyophilization affect extracellular matrix of human amniotic membrane which can determine the rate of the adhesion of endothelial cells to amniotic membrane. Lyophilized amniotic membrane is a better choice for culture of endothelial cells in vascular tissue engineering.

Keywords: Amnion, Cryopreservation, Lyophilization, Endothelial cells, Adhesion, Extracellular matrix.

Address: Nanomedicine and Tissue Engineering Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Velenjak, Tehran, Iran. ***Tel***: +98-21 22439847

Email: niknejad@sbmu.ac.ir

SOURCE: URMIA MED J 2013: 24(10): 762 ISSN: 1027-3727

Archive of SID

[1] *Assistant Professor, Nanomedicine and Tissue Engineering Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran (Corresponding Author)*

[2] *Student of Medicine, Nanomedicine and Tissue Engineering Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran*

[3] *Student of Medicine, Nanomedicine and Tissue Engineering Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran*

www.SID.ir