Archive of SID.ir

ORIGINAL ARTICLE

The Utilization of Autologous Serum as a Substitute of Fetal Bovine Serum in the Expansion of Mesenchymal Stem Cells Derived from Menstrual Blood

Zeinab Rezaei Kiasari[1]
Amirali Khodashenas[2]
Marzieh Zamaniyan[3]
Pedram Ebrahimnejad[4]
Fatemeh Zare Taji[1]

[1] MSc Student in Medical Biotechnology, Faculty of Advanced Technologies in Medicine, Mazandaran University of Medical Science, Sari, Iran
[2] Assistant Professor, Department of Medical Biotechnology, Faculty of Advanced Technologies in Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[3] Associate Professor, Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[4] Associate Professor, Department of Pharmaceutics, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received December 12, 2023 ; Accepted March 2, 2024)

Abstract

Background and purpose: Menstrual blood-derived mesenchymal stem cells (MB-MSCs) expressing CD44, CD90, and CD105 markers were recently introduced. These cells are a good source of stem cells for research and use in regenerative medicine due to uncomplicated collection without invasive surgical intervention or ethical issues. Cell culture is one of the most essential techniques in molecular cell biology, and the culture medium is the most critical component. Serum is one of the crucial components of the culture medium and a protective solution. One of the most common serums used in cell culture is fetal bovine serum (FBS). This serum is an unknown mixture and can contain unfavorable factors such as endotoxin, mycoplasma, viral contaminants, or prion proteins. Therefore, there is a need for a human substitute for FBS that can be utilized for clinical applications. In this study, a humanized protocol utilizing autologous serum (AS) instead of FBS is tested to investigate the expansion of MB-MSCs and exosomes released from these cells.

Materials and methods: A menstrual blood sample was collected from the donor on the second day of menstruation. Autologous serum samples were also collected to prepare the culture medium. First, mesenchymal stem cells were extracted from menstrual blood and then cultured in an environment enriched with autologous serum at different concentrations of 10%, 15%, and 20%. The investigation was done on the cells obtained in the third passage. Cultured cells in autologous serum were analyzed regarding expansion and expression of mesenchymal surface markers (CD73 and CD105). An inverted microscope was used to study the expansion, and flow cytometry was used to investigate the expression of mesenchymal markers. Also, in the next step, the culture medium of cultured cells in autologous serum was collected for exosome isolation. Exosome isolation was done by a three-step combination method of sedimentation, size exclusion chromatography with CL-2B sepharose resin, and making it concentrated. Finally, the purified exosomes were analyzed regarding morphology, size, and expression of CD9, CD63, and CD81 markers. Transmission electron microscope (TEM), dynamic light scattering (DLS), and flow cytometry analysis were operated, respectively.

Results: According to the observations, cell expansion was observed in all three concentrations of autologous serum, and the most favorable results were marked in the concentration of 15%. In addition, flow cytometry results indicated the expression of mesenchymal markers CD73 and CD105 in cells cultured with 15% autologous serum. Exosomes were isolated from the culture medium of mesenchymal stem cells cultured with autologous serum, and their characteristics were investigated using dynamic light scattering, transmission electron microscope, and flow cytometry techniques. The size of the exosomes ranged from 30-150 nm, and their morphology was cup-shaped. The expression of exosome markers such as CD9, CD63, and CD81 was also confirmed.

Conclusion: As a result, with the increase of using mesenchymal stem cells in regenerative medicine, it is imperative to ensure the safety of the process and materials used in this field. Therefore, autologous serum can be a suitable option for the culture of mesenchymal stem cells derived from menstrual blood.

Keywords: Menstrual blood mesenchymal stem cells, fetal bovine serum, autologous serum, exosome, regenerative medicine

J Mazandaran Univ Med Sci 2024; 34 (231): 11-21 (Persian).

Corresponding Author: Amirali Khodashenas - Faculty of Advanced Technologies in Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran. (E-mail: s.khodashenas@mazums.ac.ir)

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-05-12]

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره سی و چهارم شماره ۲۳۱ فروردین سال ۱۴۰۳ (۲۱-۱۱)

استفاده از سرم اتولوگ به عنوان جایگزین سرم جنین گاوی در گسترش سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از خون قاعدگی

زینب رضایی کیاسری[۱]
امیرعلی خداشناس[۲]
مرضیه زمانیان[۳]
پدرام ابراهیم نژاد[۴]
فاطمه زارع تاجی[۱]

چکیده

سابقه و هدف: سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از خون قاعدگی (MB-MSCs)، اخیرا معرفی شده و بیان‌کننده مارکرهای CD44، CD90 و CD105 هستند. این سلول‌ها به علت جمع‌آوری آسان و بدون هیچ‌گونه مداخله جراحی تهاجمی و نداشتن هیچ گونه مسئله اخلاقی منبع خوبی از سلول‌های بنیادی برای تحقیقات و استفاده در پزشکی بازساختی هستند. کشت سلولی یکی از مهم‌ترین تکنیک‌ها در زیست شناسی سلولی مولکولی است و محیط کشت مهم‌ترین جزء است. سرم یکی از اجزای مهم محیط کشت و یک محلول محافظت‌کننده است. یکی از رایج‌ترین سرم‌های مورد استفاده در کشت سلول، سرم جنین گاوی(FBS) است. این سرم مخلوطی نامشخص است و می‌تواند حاوی فاکتورهای نامطلوبی مانند اندوتوکسین، مایکوپلاسما، آلاینده‌های ویروسی یا پروتئین‌های پریون باشد. بنابراین، نیاز به جایگزینی انسانی برای FBS وجود دارد که بتوان از آن برای کاربردهای بالینی استفاده کرد. در این مطالعه، یک پروتکل انسانی با استفاده از سرم اتولوگ (AS) به جای FBS برای بررسی رشد MB-MSCs و اگزوزوم‌های آزاد شده از این سلول‌ها آزمایش می‌شود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، در روز دوم قاعدگی، نمونه خون قاعدگی از اهداکننده جمع‌آوری شد. نمونه سرم اتولوگ نیز برای تهیه محیط کشت جمع‌آوری شد. ابتدا، سلول‌های بنیادی مزانشیمی از خون قاعدگی استخراج و سپس در محیطی غنی شده با سرم اتولوگ در غلظت‌های مختلف ۱۰، ۱۵ و ۲۰ درصد کشت داده شدند. بررسی بر روی سلول‌های حاصل شده در پاساژ سوم صورت گرفت. سلول‌های کشت داده شده در سرم اتولوگ از لحاظ رشد و بیان مارکرهای سطحی مزانشیمی (CD73 و CD105) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. برای بررسی رشد از میکروسکوپ اینورت و از فلوسایتومتری برای بررسی بیان مارکرهای مزانشیمی استفاده شد. هم‌چنین در گام بعدی محیط کشت سلول‌های کشت داده شده در سرم اتولوگ برای جداسازی اگزوزوم جمع‌آوری شد. جداسازی اگزوزوم از یک روش ترکیبی سه مرحله‌ای رسوب‌دهی، سایز اکسکلوژن کروماتوگرافی با رزین سفارز CL-2B و تغلیظ صورت گرفت. در نهایت اگزوزوم‌های خالص‌سازی شده از نظر مورفولوژی، اندازه و بیان مارکرهای CD9، CD63 و CD81 بررسی شدند. به ترتیب از آنالیز میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM)، تفرق نور دینامیکی (DLS) و فلوسایتومتری استفاده شد.

یافته‌ها: با توجه به مشاهدات در هر سه غلظت سرم اتولوگ، گسترش سلولی مشاهده شد که مطلوب‌ترین نتایج در غلظت ۱۵ درصد مشاهده شد. علاوه بر این، نتایج فلوسایتومتری حاکی از بیان مارکرهای مزانشیمی CD73 و CD105 در سلول‌های کشت شده با ۱۵ درصد سرم اتولوگ بودند. هم‌چنین در بررسی‌های انجام شده به وسیله DLS، TEM و فلوسایتومتری اگزوزوم‌های جداسازی شده از محیط کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی کشت داده شده با سرم اتولوگ اندازه ۳۰-۱۵۰ نانومتری داشتند، مورفولوژی آنان فنجانی شکل بود و بیان مارکرهای اگزوزومی (CD9، CD63 و CD81) نیز در آن‌ها تایید شد.

استنتاج: در نتیجه، با افزایش استفاده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی در پزشکی بازساختی، اطمینان از ایمنی فرآیند و مواد مورد استفاده در این حیطه بسیار حائز اهمیت می‌باشد. بنابراین می‌توان گفت، سرم اتولوگ می‌تواند گزینه مناسبی برای کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از خون قاعدگی باشد.

واژه‌های کلیدی: سلول‌های بنیادی مزانشیمی خون قاعدگی، سرم جنین گاوی، سرم اتولوگ، اگزوزوم، پزشکی بازساختی

مولف مسئول: امیرعلی خداشناس– ساری: کیلومتر ۱۷ جاده فرح آباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم، دانشکده فناوری‌های نوین پزشکی E-mail: s.khodashenas@mazums.ac.ir
۱. دانشجوی کارشناسی ارشد زیست فناوری پزشکی، دانشکده فناوری‌های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۲. استادیار، گروه زیست فناوری پزشکی، دانشکده فناوری‌های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۳. دانشیار، گروه زنان و زایمان، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۴. دانشیار، گروه داروسازی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
تاریخ دریافت : ۱۴۰۲/۹/۲۱ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۴۰۲/۱۰/۲۷ تاریخ تصویب : ۱۴۰۲/۱۲/۱۲

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-05-12]

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

مقدمه

سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از خون قاعدگی (MB-MSCs)، سلول‌های بنیادی بالغی هستند که اخیرا معرفی شده است. این سلول‌ها بیان‌کننده مارکرهای CD44، CD90 و CD105 بوده که بخشی از مارکرهای اختصاصی سلول‌های بنیادی مزانشیمی هستند. از مزایای این سلول‌ها می‌توان به جمع‌آوری آسان و بدون هیچ‌گونه مداخله جراحی تهاجمی و نداشتن هیچ‌گونه مسئله اخلاقی اشاره کرد(۱). تحت شرایط osteogenic، adipogenic یا chondrogenic این سلول‌ها می‌توانند به‌ترتیب در شرایط آزمایشگاهی به استئوسیت، چربی یا غضروف تمایز پیدا کنند(۲). بنابراین می‌توان MB-MSCs ها را منبع خوبی از سلول‌های بنیادی برای تحقیقات و استفاده در پزشکی بازساختی دانست. کشت سلولی تکنیکی در نظرگرفته می‌شود که توسط آن سلول‌ها در خارج از یک موجود زنده تحت شرایط کنترل شده (مانند دما، pH، مواد مغذی و سطوح ضایعات) کشت می شوند(۳). یکی از مهم‌ترین تکنیک‌ها در زیست شناسی سلولی مولکولی است، زیرا بستری را برای بررسی بیولوژی، بیوشیمی، فیزیولوژی و متابولیسم سلول فراهم می‌کند(۴). محیط کشت مهم‌ترین جزء است، زیرا مواد مغذی، فاکتورهای رشد و هورمون‌هایی که برای رشد سلول لازم است را فراهم می‌کند و هم‌چنین باعث تنظیم pH و فشار اسمزی می‌شود(۵). هم‌چنین محیط کشت باعث بقا و تکثیر سلول‌های کشت داده شده می‌شود. این نکته باید ذکر شود که درصورت لزوم اگر پژوهشگر شرایط خاصی را برای مطالعه خود در نظر دارد می‌تواند محیط کشت را اصلاح و بهینه کند(۶). یکی از اجزای مهم محیط کشت، سرم است. سرم یک محلول محافظت کننده است که حاوی فاکتورهای رشد، هورمون‌ها و مولکول‌های سم‌زدایی‌کننده است. استفاده از آن باعث زنده مانی کشت سلول می‌شود، هم‌چنین در انجماد سلولی نیز کاربرد دارد. رایج‌ترین سرم مورد استفاده در کشت سلول FBS (Fetal Bovine Serum) است(۷). با مشخص شدن پتانسیل خوب سلول‌های بنیادی مزانشیمی در کاربردهای بالینی، چگونگی افزایش و گسترش کشت این سلول‌ها به‌صورت GMP گرید در مقیاس بزرگ مطرح می‌شود. بیش‌تر پروتکل‌های گسترش و کشت موجود از FBS به‌عنوان مکمل محیط کشت استفاده می‌کنند. استفاده از FBS برای کشت و گسترش این نوع سلول‌ها عملی است، زیرا مواد مغذی حیاتی، فاکتورهای چسبندگی و فاکتورهای رشد را برای سلول‌ها فراهم می‌کند(۸). با این حال، سرم زنوژنیک از دیدگاه علمی و بیولوژیکی، مخلوطی نامشخص است که می‌تواند یکسری مشکلات و پیچیدگی‌هایی رو به وجود آورد و از طرفی از نظر جنبه‌های ایمنی زیستی نیز نگرانی‌هایی در مورد استفاده از آن وجود دارد، زیرا FBS ممکن است حاوی فاکتورهای نامطلوب مانند اندوتوکسین، مایکوپلاسما، آلاینده‌های ویروسی یا پروتئین‌های پریون باشد(۹). کمیسیون اروپا "یادداشتی برای راهنمایی در مورد به حداقل رساندن خطر انتقال عوامل آنسفالوپاتی اسفنجی شکل حیوانی از طریق فرآورده‌های دارویی انسانی و دامپزشکی" (EMA/410/01) منتشر کرد که بیان می‌کند باید ابتدا استفاده از مواد با منشاء غیر حیوانی ترجیح داده شود(۱۰). در این مطالعه پروتکل انسانی شده‌ای مورد آزمایش قرار می‌گیرد و به‌جای FBS از سرم خون اتولوگ برای رشد دادن سلول‌های مزانشیمی مشتق از خون قاعدگی خود فرد استفاده می‌شود.

مواد و روش‌ها

جداسازی سرم و سلول‌های بنیادی مزانشیمی خون قاعدگی

در این مطالعه تجربی، با مجوز کمیته اخلاق (IR.MAZUMS.IMAMHOSPITAL.REC.1400.041) و کسب رضایت آگاهانه، از رگ وریدی دست راست بیمار خون گرفته شد و سرم اتولوگ از نمونه‌ی خون دست با سانتریفیوژ جداسازی و با فیلتر ۰/۲۲ فیلتر شد. سپس در دمای ۵۶ درجه به‌مدت ۳۰ دقیقه دکمپلمانه گردید. بعد از جداسازی سرم، از سرم اتولوگ حاصل شده

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-05-12]

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

جهت کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از خون قاعدگی فرد استفاده شد. نمونه خون قاعدگی با کاپ قاعدگی از یک خانم بیمار مبتلا به کاهش ذخایر تخمدانی در روز ۲ تا ۳ سیکل قاعدگی بعد از گذراندن تست‌های HIV و HCV و دریافت رضایت آگاهانه گرفته شد. این فرد براساس معیارهای ورود مطالعه از جمله، ساختار تخمدانی و رحمی نرمال بود و بین ۲۰ تا ۴۲ سال سن را دارا بود و معیارهای خروج از مطالعه مانند بدخیمی‌های لگنی و ناهنجاری‌های ژنتیکی را شامل نمی‌شد. خون قاعدگی به محلول حاوی آنتی‌بیوتیک و آمفوتریسین B و EDTA منتقل و سپس به آزمایشگاه جهت جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از خون قاعدگی انتقال داده شد. نمونه خون گرفته شده ابتدا به مدت ۱ دقیقه ورتکس شد. سپس در دمای اتاق با ۱۷۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شده و مایع رویی اوت و سلول های خونی به روش RBC Lysis Buffer حذف شدند. به طور خلاصه ابتدا ۱۵ میلی‌لیتر از RBC Lysis Buffer به فالکون اضافه و سپس خوب ورتکس شد. سپس به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. بعد از ۱۵ دقیقه فالکون در دمای اتاق با دور ۱۸۰۰ rpm به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ و محیط رویی خارج شد.

به رسوب انتهای فالکون PBS اضافه و با دور ۲۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس سوپرناتانت خارج شده و رسوب سلولی در ۱ میلی‌لیتر سرم اتولوگ حل شد و سپس با غلظت‌های ۱۰، ۱۵ و ۲۰ درصد به پلیت ۲۴ خونه حاوی محیط کشت کامل DMEM F12 (گیبکو، ایالات متحده آمریکا) به‌همراه ۱۰۰U/ml پنی‌سیلین و ۱۰۰mg/ml استرپتومایسین (گیبکو، ایالات متحده) و ۲/۵ µg/ml آمفوتریسین B (سیگما، ایالات متحده آمریکا) اضافه شد. پلیت حاوی سلول‌ها به‌مدت ۱ شبانه‌روز در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO2 و رطوبت ۹۰ درصد انکوبه شد و سپس محیط کشت آن تعویض شد. از این پس هر ۳ الی ۴ روز محیط کشت تعویض گردید. برای تکرارپذیری بررسی‌ها همزمان در سه چاهک دیگر با غلظت‌های سرم اتولوگ ذکر شده، سلول‌ها کشت داده شدند.

پاساژ سلول‌های کشت داده شده

زمانی که سلول‌ها به تراکم ۹۰ درصد رسیدند با تریپسین-EDTA (TrypLE، بیووست، فرانسه) سلول‌ها از کف پلیت جدا و در چندین چاهک تقسیم شدند. در ابتدا محیط کشت کاملا خارج و کف پلیت با ۵۰۰ میکرولیتر PBS سرد به‌طور کامل شسته شد تا باقیمانده‌ی محیط کشت حاوی سرم از سطح سلول‌ها خارج شود. به‌مدت ۳ دقیقه PBS در پلیت در دمای محیط باقی ماند و سپس خارج شد. به‌صورت قطره‌ای ۱۰۰ میکرولیتر آنزیم تریپسین در سراسر پلیت بر روی سلول‌ها ریخته شد و با تکان دادن آرام پلیت سعی شد که تمام سطح سلول‌ها به تریپسین آغشته شود. سپس برای فعالیت بهینه آنزیم، پلیت در انکوباتور ۳۷ درجه به میانگین مدت زمانی ۱ دقیقه قرار داده شد. بعد از زمان مورد نظر سلول‌ها در زیرمیکروسکوپ بررسی شدند. زمانی که سلول‌ها شروع به جدا شدن از کف چاهک‌ها کردند بسیار آرام به کناره‌های پلیت ضربه وارد شد. سلول‌ها دوباره با میکروسکوپ بررسی شده و در صورت جدا شدن تمام سلول‌ها جهت خنثی‌سازی آنزیم، حدود ۵۰۰ میکرولیتر محیط DMEM F12 حاوی سرم به چاهک‌های پلیت اضافه شد. سپس سوسپانسیون سلولی به میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل و به‌مدت ۱۰ دقیقه در دور ۳۵۰ g سانتریفوژ شد. سپس محیط رویی خارج و به رسوب سلولی ۱ میلی‌لیتر محیط کشت غنی شده با سرم اضافه شد. سپس سلول‌ها در دو چاهک با ۱ میلی‌لیتر محیط کشت غنی شده با درصد سرم‌های اتولوگ قبلی پاساژ و در انکوباتور CO2 دار با میزان رطوبت مطلوب قرار داده شدند. تعویض محیط کشت سلول‌ها هر ۳ الی ۴ روز انجام شد تا به تراکم ۹۰ درصد برسند.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-05-12]

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

فلوسایتومتری سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از خون قاعدگی

مارکرهای سطحی با استفاده از آنتی‌بادی‌های CD34، CD45، CD73 و CD105 با فلوسایتومتری مورد ارزیابی قرار گرفت. سلول‌های حاصل از پاساژ ۳ برای انجام فلوسایتومتری استفاده شد. بدین منظور ابتدا سلول‌ها بعد از شستشو با PBS تریپسینه و سپس سانتریفیوژ شدند. به سوسپانسیون سلولی مقدار کافی بافر رنگ‌آمیزی DPBS که حاوی ۵ درصد FBS بود، اضافه شد. سلول‌ها شمارش و ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون به هر لوله اضافه شد. ۵ میکرولیتر از آنتی‌بادی‌های ذکر شده با سلول‌ها مخلوط شد و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی انکوبه شد. به منظور حذف آنتی‌بادی‌های اضافی و سلول‌هایی که به آنتی‌بادی کونژوگه نشدن، سانتریفیوژ با دور ۲۵۰۰ به‌مدت ۵ دقیقه انجام شد و سه مرتبه سلول‌ها با بافر رنگ‌آمیزی شستشو داده شدند. آنالیز آنتی‌ژن‌های سطح سلولی و داده‌ها به‌ترتیب توسط دستگاه FACS Calibur (BD Biosciences, US) و نرم‌افزار FLowJo انجام شد.

جداسازی اگزوزوم‌های سلول‌های کشت داده شده در سرم اتولوگ ۱۵ درصد

زمانی که در پاساژ سوم سلول‌های بنیادی مزانشیمی کشت داده شده در سرم اتولوگ ۱۵ درصد به کانفلوئنسی ۹۰ درصد رسیدند، محیط کشت خارج گردید. سلول‌ها با PBS سه بار شستشو شد. سپس ۱ میلی‌لیتر محیط کشت خام به سلول اضافه و به‌مدت ۱۶ ساعت در شرایط انکوباسیون قبلی انکوبه شد. بعد از ۱۶ ساعت محیط کشت جمع‌آوری شد و سلول‌ها مجدد پاساژ و با سرم اتولوگ کشت داده شدند. جمع‌آوری محیط کشت از پاساژ ۳ تا ۷ انجام شد. ابتدا، محیط کشت‌های جمع‌آوری شده به مدت ۶۰ دقیقه با دور ۹۰۰۰ rpm در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ و محیط رویی با فیلتر ۰/۲۲ PES فیلتر شد. محیط کشت فیلتر شده با ۸ درصد پلی‌اتیلن گلیکول ترکیب و به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد بر روی شیکر قرار داده شد. سپس با دور ۹۰۰۰ rpm به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتریفیوژ شد. محیط رویی خارج و رسوب انتهایی با PBS به حجم ۱ میلی‌لیتر رسانده و در آن حل گردید. برای خالص‌سازی اگزوزوم‌های جداسازی شده از روش سایز اکسکلوژن کروماتوگرافی با رزین سفارز CL-2B (ارگ بیوتک، ایران) استفاده شد. نمونه تغلیظ شده با پلی اتیلن گلیکول (۱ میلی‌لیتر) بر روی ستون لود شد و سپس شستشو با PBS فیلتر شده انجام شد. ۳۰ فرکشن متوالی ۰/۵ میلی‌لیتر جمع‌آوری شد. فرکشن‌های ۶ تا ۹ جمع‌آوری و توسط آمیکون ۱۰۰ کیلو دالتون تغلیظ شدند. اگزوزوم‌های جدا شده تا استفاده بعدی در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

تعیین ویژگی اگزوزوم‌های خالص سازی شده

برای تعیین ویژگی اگزوزوم‌های خالص‌سازی شده باید اندازه، مورفولوژی و مارکرهای اگزوزومی سنجیده شود. در این مطالعه از روش پراکندگی نور دینامیکی (DLS) برای اندازه‌گیری ذرات، الکتروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) برای بررسی مورفولوژی و فلوسایتومتری برای بررسی CD9، CD63 و CD81 به‌عنوان مارکرهای اگزوزومی استفاده شد. برای اندازه‌گیری سایز ذرات، ۲ میلی‌لیتر از اگزوزوم تخلیص شده با استفاده از یک سرنگ به درون کووت شرکت HORIBA اضافه شد. سپس کووت به منظور خوانش درون دستگاه زتا سایزر HORIBA-SZ100 قرارگرفت و پراکندگی ذرات بررسی شد. پس از اتمام اندازه‌گیری جهت شستشو کووت، ابتدا با استفاده از فشار آب محلول حاوی اگزوزوم درون کووت خارج شد. سپس به کمک یک سرنگ به درون کووت الکل ۷۰ درصد اضافه شد و به‌مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. بعد از زمان گفته شد الکل از درون کووت خارج و ۳ مرتبه با آب مقطر

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-05-12]
Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

شتسشو داده شد. برای TEM، به‌طور خلاصه، یک قطره از اگزوزوم‌های جدا شده (۲۰ میکرولیتر) به‌مدت ۲ دقیقه روی گرید ۳۰۰ مش با پوشش کربن قرار داده شد و به‌مدت ۱ دقیقه با اورانیل استات آبی ۲ درصد رنگ‌آمیزی منفی شد. سپس، اجازه داده شد تا در هوا خشک شود و بر روی یک TEM(Zeiss, EM10C) که با ولتاژ شتاب‌دهنده ۱۰۰ کیلو ولت کار می‌کند، مورد بررسی قرار گرفت.

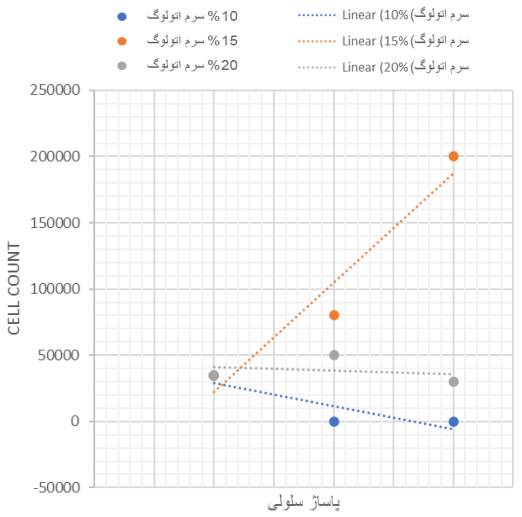
آنالیز آماری

برای آنالیز آماری از نرم‌افزار SPSS و از آزمون‌های t-test استفاده شده است. هم‌چنین P کم‌تر از ۰/۰۵ به‌صورت معنی‌دار در نظر گرفته شده است.

یافته‌ها

تعیین ویژگی سلول‌های کشت داده شده در غلظت‌های متفاوت سرم اتولوگ

سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از خون قاعدگی پس از جداسازی در محیط کشت DMEM F-12 غنی شده با غلظت‌های ۱۰، ۱۵ و ۲۰ درصد سرم اتولوگ کشت داده شدند. سلول‌های کشت داده شده در غلظت ۱۰ درصد پس از ۷ روز رشد کردند. اما سلول‌های کشت داده شده در غلظت‌های سرم اتولوگ ۱۵ و ۲۰ درصد در ۳ روز رشد کردند. سلول‌های کشت داده شده در سرم ۱۰ درصد رشد ضعیفی از خود نشان داده و به تراکم نرسیدند و در نهایت از بین رفتند. سلول‌های کشت داده شده در سرم ۱۵ درصد بهترین رشد را داشته و به‌صورت معناداری گسترش یافتند (P> ۰/۰۵) و پس از ۷ روز به تراکم ۸۰ درصد رسیدند. سلول‌های کشت داده در محیط کشت ۲۰ درصد پس از ۲ پاساژ از تعداد سلول‌های کشت داده شده اولیه، تعدادشان کاهش پیدا کرد (تصویر شماره ۱). پس از کشت، سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از خون قاعدگی که در سرم ۱۵ درصد رشد پیدا کردند، در پاساژ سوم مورفولوژی فیبروبلاست مانند، دوکی شکل و کشیده را در طول دوره کشت آزمایشگاهی نشان دادند (تصویر شماره ۲).



تصویر شماره ۱: نمودار شمارش سلولی، تعداد سلول‌های رشد داده شده در غلظت‌های مختلف سرم اتولوگ در پاساژهای اول تا سوم

سلول‌های بنیادی مزانشیمی جدا شده از خون قاعدگی در این مطالعه از استانداردهای سلول‌های بنیادی بالغ برخوردار بودند. جهت بررسی و تایید سلول‌های بنیادی مزانشیمی از بیان ۲ مارکر اختصاصی این سلول ها و عدم بیان ۲ مارکر خونساز استفاده شد. همچنین نتایج فلوسایتومتری نشان داد که سلول‌های کشت داده شده که برای CD73 و CD105 بیان مثبت و برای CD34 و CD45 منفی بودند (تصویر شماره ۳).

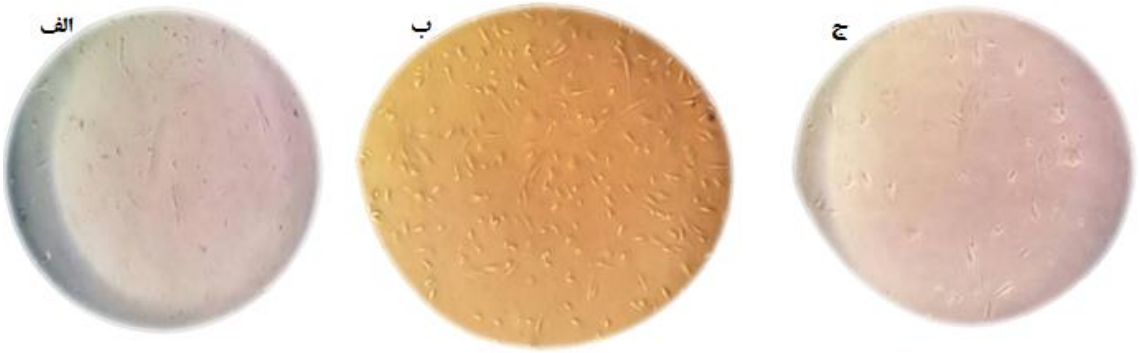
تعیین ویژگی اگزوزوم های خالص سازی شده

اگزوزوم‌ها نوعی وزیکول‌های کوچک با دو لایه فسفولیپیدی هستند که اندازه آن‌ها بین ۱۵۰- ۳۰ نانومتر است و دارای عملکردهای مختلف بیولوژیکی هستند. استفاده از DLS برای اندازه‌گیری توزیع اندازه اگزوزوم‌ها انجام شد. در شکل نشان داده شده است که قطر نانو ذرات جداسازی شده بین ۳۰-۱۵۰ نانومتر بود که با سایز اگزوزوم‌ها کاملاً مطابقت داشته و حاکی از صحت جداسازی اگزوزوم‌ها می‌باشد (تصویرشماره ۴).

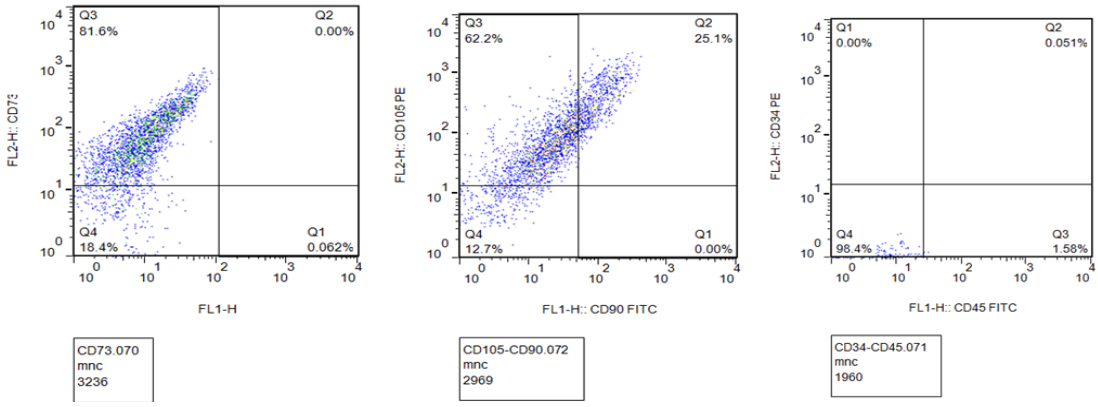
[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-05-12]

Archive of SID.ir

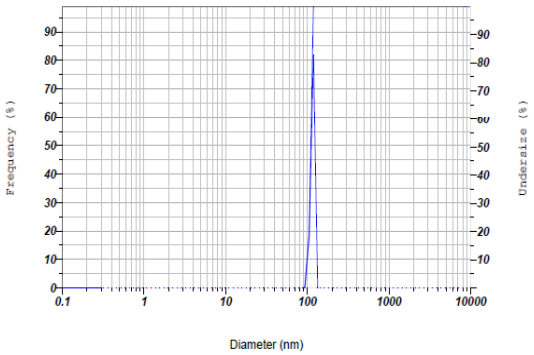
Archive of SID.ir



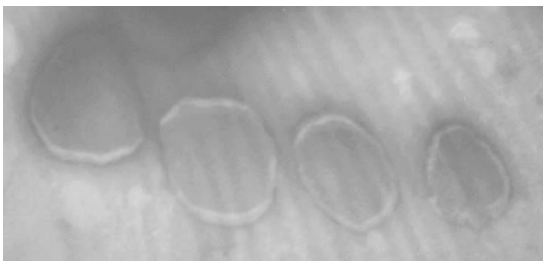
تصویر شماره ۲: سلول‌های کشت داده شده در غلظت‌های مختلف از سرم اتولوگ. الف) سلول‌های کشت داده شده در ۱۰ درصد سرم اتولوگ، ب) ۱۵ درصد سرم اتولوگ، ج) ۲۰ درصد سرم اتولوگ



تصویر شماره ۳: سلول‌های کشت داده شده در سرم ۱۵ درصد در پاساژ سوم بیان مثبتی برای مارکرهای مزانشیمی داشتند. در حالی که ماررهای خونساز بیانی نداشتند



تصویر شماره۴: اندازه اگزوزوم‌های جداشده درتجزیه وتحلیل DLS یک پیک تیز در ۱۰۹ نانومتر داشتند



تصویر شماره ۵: نتایج TEM مورفولوژی فنجانی شکل را برای اگزوزوم‌های جدا شده نشان داد

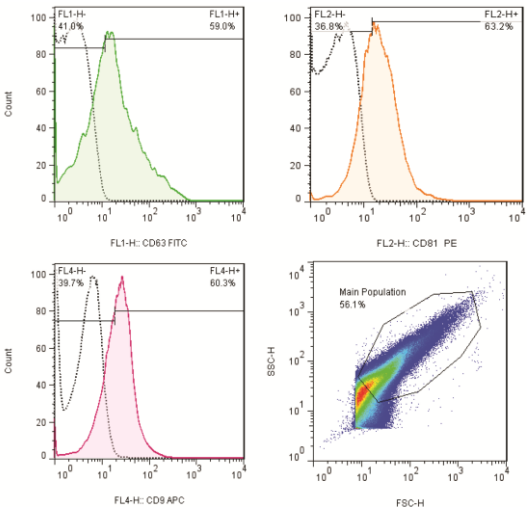
سپس، مورفولوژی اگزوزوم‌ها از طریق TEM تأیید شد. نتایج عکسبرداری TEM مورفولوژی وزیکول‌های فنجانی شکل با دو لایه را تأییدکرد که همان مورفولوژی شناخته شده برای اگزوزوم‌ها را می‌باشد(تصویرشماره ۵).

برای تایید بیان مارکرهای اگزوزومی از فلوسایتومتری استفاده شد و مارکرهای اگزوزومی CD63، CD9 و CD81 بررسی شدند. اگزوزوم‌های جداسازی و خالص شده برای هر سه مارکر اگزوزومی بیان مثبت داشتند (تصویر شماره ۶).

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-05-12]

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir



تصویر شماره ۶: تمام اگزوزوم‌های جدا شده مارکرهای اگزوزومی CD9، CD63 و CD81 را بیان کردند

بحث

از زمان معرفی تکنیک کشت سلولی، این روش به ابزاری ضروری در زمینه‌های مختلف از جمله تحقیقات بیولوژیکی (مانند مدل‌سازی بیماری‌ها، سلول‌های بنیادی و زیست‌شناسی سرطان)، فناوری تولید مثل (مانند لقاح آزمایشگاهی)، بیوتکنولوژی و واحدهای‌تولیدی داروسازی (مانند تولید آنتی‌بادی‌ها، داروهای احیاکننده و واکسن‌ها) تبدیل شده است. کشت سلولی جایگزین آزمایشاتی شده است که فقط در یک سیستم زنده قابل انجام است. محیط‌های کشت و مکمل‌های مورد استفاده در کشت سلولی برای موفقیت آن بسیار مهم هستند. مکمل اولیه در محیط‌های پایه FBS است که منبع هورمون‌ها، فاکتورهای رشد، اسیدهای آمینه، پروتئین‌ها، ویتامین‌ها، نمک‌های معدنی، عناصرکمیاب، کربوهیدرات‌ها و لیپیدهای مورد نیاز برای متابولیسم و رشد سلولی می‌باشد(۱۱).

در تحقیقات، FBS یک مکمل ضروری برای سیستم‌های کشت سلولی و بافتی است. با این حال، به دلیل محدودیت در دسترس بودن و افزایش تقاضا، هزینه FBS درسال‌های اخیر بیش از ۳۰۰ درصد افزایش یافته است. جمع‌آوری و استفاده از FBS در سیستم‌های کشت نیز چالش‌های اخلاقی و علمی را به همراه دارد.

در نتیجه، جایگزین‌های متعددی برای رفع کمبود FBS در نظر گرفته شدند(۱۲). در این مطالعه اثر استفاده از سرم اتولوگ به‌عنوان جایگزین FBS برای کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی خون قاعدگی خود فرد بررسی شد. بدین‌منظور، ابتدا سلول‌های بنیادی مزانشیمی را از خون قاعدگی جداسازی گردید. در مطالعه Chen (به نقل از Meng و همکارانش در سال ۲۰۰۷) برای اولین بار سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از خون قاعدگی را توصیف کردند. از آن زمان، این سلول‌ها به‌علت جمع‌آوری دوره‌ای، جداسازی غیر تهاجمی و بدون درد، نرخ تکثیر بالا، دفع کم ایمونولوژیک، و عدم وجود مسائل اخلاقی به یک استراتژی درمانی امیدوارکننده برای توسعه درمان های موثر تبدیل‌شده است(۱۳). سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از خون قاعدگی برای چندین مولکول سطحی مانند CD9، CD29، CD44، CD73، CD90، CD105، فاکتور رونویسی اتصال اکتامر۴ (Oct-4)، CD166 و کمپلکس اصلی سازگاری بافتی I (MHC I) مثبت بوده و درمیان این مولکول‌ها CD29، CD73، CD90 وCD105 معمولاً برای نشانگرهای سلول‌های بنیادی مزانشیمی استفاده می‌شوند. سلول‌های بنیادی مزانشیمی خون قاعدگی هم‌چنین برای نشانگرهای سلول‌های بنیادی خونساز مانند CD34، CD45 و CD133 و مارکرهای CD14، CD38 و ایزوتیپ آنتی‌ژن-DR لکوسیت انسانی (HLA-DR) بیان منفی دارند(۱۴). هم‌چنین این نوع سلول‌ها همانند سایر سلول‌های بنیادی مزانشیمی دوکی شکل هستند(۱۵).

در مطالعات مختلفی از سرم‌های انسانی برای رشد و تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی استفاده شده‌است. در مطالعه‌ای Shahdadfar و همکارانش از ۲۰ درصد سرم اتولوگ (AS) برای غنی‌سازی محیط کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان استفاده کردند و سلول‌ها رشد و تکثیر یافتند(۱۶). هم‌چنین LeBlanc و همکارانش سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان را در محیط کشت غنی شده با

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-05-12]

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

۱۰ درصد سرم AB کشت دادند و تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی در حضور سرم AB مشاهده شد. همچنین سلول‌های بنیادی مزانشیمی کشت داده شده در محیط غنی شده با سرم AB از نظر بیان مارکرهای CD90، CD105 و آنتی‌ژن لکوسیت انسانی (HLA) کلاس I در تمام پاساژهای سلولی بیش‌تر از ۹۵ درصد مثبت بود(۱۷). در این مطالعه نیز از سرم اتولوگ، برای حذف کردن FBS از محیط کشت استفاده شد. از سه غلظت مختلف سرم اتولوگ برای کشت استفاده شد. بعد از کشت، در هر سه غلظت از سرم، سلول‌های بنیادی مزانشیمی رشد کردند، اما بهترین رشد را MB-MSCs در محیط کشت غنی شده با ۱۵ درصد سرم اتولوگ مشاهده شد. MB-MSCs مورفولوژی دوکی شکل و فیبروبلاست مانند را نشان دادند. هم‌چنین در پاساژ سوم بیان مارکرهای مزانشیمی CD73 و CD105 برای MB-MSCs کشت داده شده با سرم اتولوگ ۱۵ درصد مثبت بوده است. این روش علاوه بر کارآمد بودن مقرون به صرفه نیز می‌باشد. هم‌چنین اگزوزوم‌های حاصله از سلول‌های کشت داده شده با سرم اتولوگ تمام ویژگی‌های مرتبط با اگزوزوم‌ها را دارند. اگزوزوم‌ها ۳۰ تا ۱۵۰ نانومتر اندازه دارند، شکل فنجانی شکل دارند و با انتقال mRNA، lncRNA، microRNA، پروتئین‌ها و لیپیدها ارتباط محلی سلول به سلول را واسطه می‌کنند. در مطالعه‌ای Jung و همکارانش ساختار فنجانی شکل اگزوزوم‌ها را نوعی مورفولوژی دانستند که می‌تواند به‌دلیل به‌دلیل فرآیند خشک کردن رخ دهد. نتایج Cryo-TEM آن‌ها نشان داده است که اگزوزوم‌ها ساختاری کاملا کروی در محلول آبی دارند(۱۸). مارکرهای CD9، CD63، Hsp70 و CD81 اغلب روی سطح اگزوزوم‌ها قرار دارند، در حالی که مارکر شبکه آندوپلاسمی calnexin و مارکر لیزوزوم Lamp1 معمولاً وجود ندارند(۲۰،۱۹). سلول‌های هدف می‌توانند اگزوزوم‌ها را به روش‌های مختلفی از جمله همجوشی غشایی، اندوسیتوز و اتصال گیرنده جذب کنند(۲۱). مطالعات نشان داده‌اند که اگزوزوم‌ها از طریق انتقال افقی پروتئین‌ها و microRNAs باعث ترمیم آسیب‌های بافتی می‌شوند(۲۳،۲۲). اگزوزوم‌های اتولوگ به‌دست آمده ازسلول‌های بنیادی مزانشیمی خون قاعدگی در این مطالعه ویژگی‌های یکسانی داشتند. به علت ارزیابی مورفولوژی از طریق رنگ‌آمیزی منفی، اگزوزوم‌ها مورفولوژی فنجانی شکل را در TEM نشان دادند و بررسی DLS اندازه‌های ۳۰ تا ۱۵۰ نانومتر را تأیید کرد. تجزیه و تحلیل ایمونوفنوتایپینگ نشان داد که اگزوزوم‌های جداسازی‌شده برای بیان CD9، CD63 و CD81 مثبت هستند. بنابراین، می‌توان از این وزیکول‌های خارج سلولی تحت عنوان اگزوزوم در مراحل بعدی مطالعه استفاده کرد.

در نهایت، مطالعه حاضر نشان می‌دهد که استفاده از سرم اتولوگ برای گسترش MB-MSCs، نیاز به فاکتورهای رشد را از بین می‌برد و باعث گسترش این سلول‌ها می‌شود. این رویکرد می‌تواند جایگزین استفاده از FBS در بسیاری از پروتکل‌های سلول درمانی شود و به گزینه بهتری برای گسترش MB-MSC تبدیل شود.

سپاسگزاری

از همکاری صمیمانه تمام عزیزانی که در انجام این مطالعه به ما یاری رساندند، تشکر و قدردانی می‌شود. بین نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافع وجود ندارد. این مقاله مرتبط با پایان‌نامه با شماره ۱۰۲۷۸: «بررسی اثر اگزوزوم‌های مشتق از سلول های مزانشیمال خون قاعدگی اتولوگ بر ذخیره‌ی فولیکولی تخمدان و میزان حاملگی در بیماران مبتلا به کاهش ذخایر تخمدانی» با مصوبه اخلاق «IR.MAZUMS.IMAMHOSPITAL.REC.1400.041» نویسنده اول مقاله می‌باشد.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-05-12]

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

References

1. Faramarzi H, Mehrabani D, Fard M, Akhavan M, Zare S, Bakhshalizadeh S, et al. The Potential of Menstrual Blood-Derived Stem Cells in Differentiation to Epidermal Lineage: A Preliminary Report. World J Plast Surg 2016; 5(1): 26-31.
2. Mou XZ, Lin J, Chen JY, Li YF, Wu XX, Xiang BY, et al. Menstrual blood-derived mesenchymal stem cells differentiate into functional hepatocyte-like cells. J Zhejiang Univ Sci B 2013; 14(11): 961-972.
3. Lin YH, Pan TM, Wu MH. Microfluidic Technology and Its Biological Applications. In: Moo-Young M, editor. Comprehensive Biotechnology (Second Edition). Burlington: Academic Press; 2011: 141-157.
4. Segeritz C, Vallier L. Cell Culture: Growing Cells as Model Systems In Vitro. Chapter 9. Basic Science Methods for Clinical Researchers. Rlsevier: Publish Online; 2017; 151-172.
5. Yao T, Asayama Y. Animal-cell culture media: History, characteristics, and current issues. Reprod Med Biol 2017; 16(2): 99-117.
6. van der Sanden B, Dhobb M, Berger F, Wion D. Optimizing stem cell culture. J Cell Biochem 2010; 111(4): 801-807.
7. Tekkatte C, Gunasingh GP, Cherian KM, Sankaranarayanan K. "Humanized" stem cell culture techniques: the animal serum controversy. Stem Cells Int 2011; 2011: 504723.
8. Subbiahanadar Chelladurai K ,Selvan Christyraj JD, Rajagopalan K, Yesudhason BV, Venkatachalam S, Mohan M, et al. Alternative to FBS in animal cell culture- An overview and future perspective. Heliyon 2021; 7(8): e07686.
9. Gstraunthaler G, Lindl T, van der Valk J. A plea to reduce or replace fetal bovine serum in cell culture media. Cytotechnology 2013; 65(5): 791-793.
10. Witzeneder K, Lindenmair A, Gabriel C, Höller K, Theiß D, Redl H, et al. Human-Derived Alternatives to Fetal Bovine Serum in Cell Culture. Transfus Med Hemother 2013; 40(6): 417-423.
11. Subbiahanadar Chelladurai K, Selvan Christyraj JD, Rajagopalan K, Yesudhason BV, Venkatachalam S, Mohan M, et al. Alternative to FBS in animal cell culture- An overview and future perspective. Heliyon 2021; 7(8): e07686.
12. Fang CY, Wu CC, Fang CL, Chen WY, Chen CL. Long-term growth comparison studies of FBS and FBS alternatives in six head and neck cell lines. PloS One 2017; 12(6): e0178960.
13. Chen L, Qu J, Mei Q, Chen X, Fang Y, Chen L, et al. Small extracellular vesicles from menstrual blood-derived mesenchymal stem cells (MenSCs) as a novel therapeutic impetus in regenerative medicine. Stem Cell Res Ther 2021; 12(1): 433.
14. Chen L, Qu J, Xiang C. The multi-functional roles of menstrual blood-derived stem cells in regenerative medicine. Stem Cell Res Ther 2019; 10(1): 1.
15. Haasters F, Prall WC, Anz D, Bourquin C, Pautke C, Endres S, et al. Morphological and immunocytochemical characteristics indicate the yield of early progenitors and represent a quality control for human mesenchymal stem cell culturing. J Anat 2009; 214(5): 759-767.
16. Shahdadfar A, Frønsdal K, Haug T, Reinholt FP, Brinchmann JE. In vitro expansion of human mesenchymal stem cells: choice of serum is a determinant of cell proliferation,

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-05-12]

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

differentiation, gene expression, and transcriptome stability. Stem Cells 2005; 23(9): 1357-1366.

17. Le Blanc K, Samuelsson H, Lönnies L, Sundin M, Ringdén O. Generation of immunosuppressive mesenchymal stem cells in allogeneic human serum. Transplantation 2007; 84(8): 1055-1059.
18. Jung MK, Mun JY. Sample Preparation and Imaging of Exosomes by Transmission Electron Microscopy. J Vis Exp 2018; (131): 56482.
19. ISEV2022 Abstract Book. J Extracell Vesicles 2022; 11(Suppl 1): e12224.
20. Anakor E, Le Gall L, Dumonceaux J, Duddy WJ, Duguez S. Exosomes in Ageing and Motor Neurone Disease: Biogenesis, Uptake Mechanisms, Modifications in Disease and Uses in the Development of Biomarkers and Therapeutics. Cells 2021; 10(11): 2930.
21. Wei H ,Chen Q, Lin L, Sha C, Li T, Liu Y, et al. Regulation of exosome production and cargo sorting. Int J Biol Sci 2021; 17(1): 163-177.
22. Burke J, Kolhe R, Hunter M, Isales C, Hamrick M, Fulzele S. Stem Cell-Derived Exosomes: A Potential Alternative Therapeutic Agent in Orthopaedics. Stem Cells Int 2016; 2016: 5802529.
23. Sun L, Li D, Song K, Wei J, Yao S, Li Z, et al. Exosomes derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells protect against cisplatin-induced ovarian granulosa cell stress and apoptosis in vitro. Sci Rep 2017; 7(1): 2552.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-05-12]

Archive of SID.ir