Daneshvar Medicine
Basic and Clinical Research Journal Vol. 28, No. 6, 2021

Research Paper

The efficacy of isolation and culture of human amniotic mesenchymal stem cells in cell culture medium

Sona Zare[1], Rahim Ahmadi[2*], Abdolreza Mohammadnia[3], Mohammad Ali Nilforouszadeh[4], Minoo Mahmoodi[5]

1. Department of Biology, Hamedan Branch, Islamic Azad University, Hamedan, Iran
2. Department of Biology, Hamedan Branch, Islamic Azad University, Hamedan, Iran
3. Chronic Respiratory Diseases Research Center, National Research Institute of Tuberculosis and Lung Diseases (NRITLD), Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
4. Skin and Stem Cell Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
5. Department of Biology, Hamedan Branch, Islamic Azad University, Hamedan, Iran

*** Corresponding author e-mail: drrahahmadi@yahoo.com**

Citation: Zare S, Ahmadi R, Mohammadnia A, Nilforouszadeh MA, Mahmoodi M. The efficacy of isolation and culture of human amniotic mesenchymal stem cells in cell culture medium. Daneshvar Medicine 2021; 28(6):1-11. **doi: 10.22070/DANESHMED.2021.12957.0**

Abstract

Background and Objective: He efficacy of methods for amniotic membrane-derived mesenchymal stem cells isolation, culture, and biological characterization faces serious challenges. The present study aimed to investigate the efficacy of methods for amniotic membrane-derived mesenchymal stem cells isolation, culture, and differentiation in cell culture.

Materials and Methods: In this experimental laboratory study, ten placenta specimens were obtained from pregnant mothers during cesarean section and amniotic membranes were separated. The protocol for isolation and culture of mesenchymal cells was optimized by enzymatic method. The morphological characteristics of mesenchymal cells were examined by invert microscopy and biological characteristics were measured by flow cytometry and differentiation capacity was evaluated by mesenchymal cells capacity to differentiate to osteocyte and adipocyte. Data were analyzed using descriptive statistics.

Results: The expression level of CD44, CD73, CD90, and CD29 was significant in cells isolated from the human amniotic cell membrane. CD14, CD34, and CD45 were not expressed or slightly expressed. The cells had high viability and successfully differentiated into osteocyte and adipocyte.

Conclusion: The protocol used in this study to isolate and culture human amniotic membrane-derived mesenchymal stem cells was highly efficient to prepare mesenchymal stem cells for cell therapy and tissue engineering.

Keywords: Mesenchymal stem cells, Amniotic membrane, Differentiation, Specific markers

Received: 08 Nov 2020
Last revised: 13 Feb 2021
Accepted: 28 Feb 2021

مقاله پژوهشی

بررسی کارایی جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی پرده آمنیون انسان در محیط کشت سلولی

نویسندگان: سونا زارع[۱]، رحیم احمدی[۲*]، عبدالرضا محمدنیا[۳]، محمدعلی نیلفروش‌زاده[٤]، مینو محمودی[٥]

۱. گروه زیست شناسی، واحد همدان، دانشگاه آزاد اسلامی، همدان، ایران
۲. گروه زیست شناسی، واحد همدان، دانشگاه آزاد اسلامی، همدان، ایران
۳. گروه بیوتکنولوژی و پزشکی مولکولی، دانشکده فن آوری های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
۴. مرکز تحقیقات پوست و سلول های بنیادی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۵. گروه زیست شناسی، واحد همدان، دانشگاه آزاد اسلامی، همدان، ایران

*نویسنده مسئول: رحیم احمدی **Email:drrahahmadi@yahoo.com**

دریافت: ۱۳۹۹/۰۸/۱۸
آخرین اصلاح‌ها: ۱۳۹۹/۱۱/۲۵
پذیرش: ۱۳۹۹/۱۲/۱۰

چکیده

مقدمه و هدف: کارایی تکنیک های جداسازی، کشت و مشخصه یابی بیولوژیکی سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از پرده آمنیون با چالش های جدی روبروست. هدف از مطالعه حاضر بررسی کارایی جداسازی و کشت و تمایز سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از پرده آمنیون در محیط کشت سلولی می‌باشد.

مواد و روش ها: طی این تحقیق تجربی- آزمایشگاهی، ۱۰ نمونه جفت از مادران باردار طی سزارین تهیه و پرده آمنیون جداسازی شد. پروتکل جداسازی و کشت سلول‌های مزانشیمی به روش آنزیمی بهینه سازی شد. ویژگی‌های مورفولوژیک سلول‌های مزانشیمی با استفاده از میکروسکوپ اینورت بررسی شد و مشخصه‌های بیولوژیک آنها با استفاده از فلوسایتومتری بررسی گردید و ظرفیت تمایزی سلول‌های مزانشیمی با استفاده از ظرفیت تمایز آنها به سلول‌های استخوانی و چربی مورد ارزیابی قرار گرفت. داده ها با استفاده از آمار توصیفی تجزیه و تحلیل شدند.

نتایج: بیان مارکرهای CD44، CD73، CD90 و CD29 در سلول‌های مشتق شده از پرده آمنیون انسان در حد معناداری بود. مارکرهای CD14، CD34 و CD45 بیان نشده یا به میزان کمی بیان شدند. این سلول‌ها قابلیت زنده مانی بالایی داشتند و به طور موفقیت آمیزی به سلول‌های استخوانی و چربی تمایز یافتند

نتیجه‌گیری: پروتکل استفاده شده در این مطالعه جهت جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از پرده آمنیون انسان از کارایی بالایی جهت تولید سلول‌های بنیادی مزانشیمی به منظور استفاده در سلول درمانی و مهندسی بافت برخوردار بود.

واژه های کلیدی: سلول‌های بنیادی مزانشیمی، پرده آمنیون، تمایز، مارکرهای تخصصی

مقدمه

سلول‌های بنیادی مزانشیمی سلول‌هایی با توانایی تقسیم بالا هستند که به طور کامل تمایز نیافته‌اند و آنها را می‌توان از بافت های مختلف جداسازی کرد. این سلول ها از لایه مزودرم جنینی مشتق شده و در بافت های مختلفی همچون مغز استخوان، بند ناف، مایع آمنیون، بافت چربی و ... یافت می‌شوند. بررسی‌های وسیع انجام گرفته در خصوص ظرفیت تمایزی سلول‌های بنیادی مزانشیمی نشانگر آن است که این سلول‌ها دارای پتانسیل تمایزی قابل توجهی هستند و می توانند به طیف گسترده‌ای از سلول‌های بالغ تمایز یابند (۱). تکنیک‌های بررسی و اثبات ماهیت سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از بافت های مختلف و نیز بررسی کارایی و سلامت این سلول ها به منظور تمایز به سلول های بالغ و استفاده در مهندسی بافت و اهداف درمانی، از مهمترین مسائل روز در کار با سلول های بنیادی مزانشیمی می‌باشد. در این راستا گرچه بررسی آنتی‌ژن های سطحی سلول‌های بنیادی مزانشیمی یکی از روش های متداول جهت اثبات مزانشیمی بودن این سلول‌ها است، اما هنوز هم از منظر تکنیکی چالش های قابل اعتنایی در این خصوص وجود دارد. در واقع مهمترین وجه شناسایی و اثباتی سلول‌های بنیادی مزانشیمی، آنتی ژن های سطحی غشایی موسوم به بیومارکرهای CD44، CD90، CD105، CD106 و CD166 می باشد، گرچه شناسایی این مارکرها از نظر تکنیکی هنوز هم با چالش‌هایی همراه است (۳،۲).

سلول‌های بنیادی، به ویژه سلول‌های بنیادی مزانشیمی، از دید سیستم ایمنی مخفی می‌مانند و بر این مبنا می‌توان از این قابلیت به عنوان یک تکنیک بیولوژیکی در ترمیم آسیب های بافتی یا پیوند بافت و اعضا استفاده نمود. در همین راستا، دستیابی به تکنیک های مؤثر شناسایی سلامت و سنجش قدرت زنده مانی و ارزیابی توانایی تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی که بتوان از آنها در مراکز آزمایشگاهی و کلینیکی به خوبی و با اطمینان استفاده نمود، از ارزش فوق‌العاده‌ای برخوردار است، گرچه هنوز هم پس از گذشت سالیان متمادی این تکنیک‌ها گاهی به خوبی جواب نمی‌دهند و یا با نتایج ضد و نقیضی همراه هستند که سبب بروز تناقض های جدی میان محققین شده است (۸-۳).

از میان منابع بافتی مربوط به سلول های بنیادی مزانشیمی، پرده آمنیوتیک یکی از مهمترین منابع می باشد. در واقع این منبع به راحتی در دسترس می باشد و حاوی سلول های متعدد بنیادی است (۹). اگرچه گاهی محققین تردیدهای جدی در خصوص استفاده از این سلول ها در مقاصد درمانی را ابراز می دارند، اما سلول-های بنیادی مزانشیمی پرده آمنیون (AM-MSCs) به دلیل ویژگی های منحصربه‌فرد خود از قبیل قدرت تحریکی کم سیستم ایمنی، دستیابی به روش غیرتهاجمی و امکان کشت و تکثیر آسان، از مهمترین سلول‌های بنیادی در حیطه سلول درمانی محسوب می‌شوند. مطالعات قابل توجهی نشان داده‌اند که سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از پرده آمنیوتیک دارای پتانسیل تمایزی بالایی هستند و می توان آنها را با کشت مناسب تکثیر نموده و مورد استفاده قرار داد (۱۰).

با توجه به کاربردهای بالقوه سلول‌های بنیادی مزانشیمی در حوزه بالینی و نیز با توجه به اینکه پرده آمنیون یکی از مهمترین منابع بافتی سلول های بنیادی مزانشیمی است که به راحتی در دسترس می‌باشد و همچنین از آنجا که سلول‌های بنیادی مزانشیمی جداسازی شده از پرده آمنیون می‌توانند در حوزه سلول درمانی مورد استفاده قرار گیرند و از طرفی با توجه به این امر که روش های متعدد و گوناگونی جهت جداسازی و کشت و بانکینگ سلول های بنیادی مطرح شده اند، ولی هنوز هم این بررسی ها به منظور دستیابی به اطلاعات دقیق ادامه داشته و با چالش های جدی همراه می‌باشند؛ بنابراین و با هدف دستیابی به تکنیکهای روتین و کاربردی کارا، پژوهش حاضر به بررسی کارایی جداسازی و کشت سلول های بنیادی مزانشیمی از پرده آمنیون انسان می پردازد تا بدان وسیله

امکان استفاده از این تکنیک‌ها در حوزه جداسازی و بررسی ماهیت سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از پرده آمنیون مورد ارزیابی قرار گرفته و به عنوان یک تکنیک روتین به جامعه علمی تحقیقاتی معرفی گردد.

مواد و روش ها

تهیه پرده آمنیوتیک

طی این تحقیق تجربی آزمایشگاهی، نمونه کامل جفت از ۱۰ اهدا کننده با رعایت شرایط اخلاق در پژوهش و کسب رضایت مادر پس از زایمان با روش سزارین از بین زنان ۲۰ تا ٤٠ ساله دریافت شد. بر روی نمونه خون محیطی هر داوطلب دهنده جفت، تست های ویروسی HIV، HBV، HCV، HPV، EBV، CMV، HSV، HTLV، Parvovirus B19، سیفیلیس، توکسوپلاسما و سرخجه انجام شدند. ظرف حاوی نمونه به روش استریل از اتاق عمل به آزمایشگاه منتقل گردید.

استریلیزاسیون پرده آمنیوتیک

پرده آمنیون پس از جدا شدن از لایه کوریون، با استفاده از محلول PBS حاوی ۱٪ پنی سیلین استرپتومایسین و آمفوتریسین B شستشو داده شد. در حین این کار سطح اپی‌تلیالی با استفاده از اسکراپر شیشه ای از بخش موکوسی سطحی تمیز شد. سپس پرده آمنیوتیک در ابعاد تقریبی 5 ×5 cm2 بریده و جداسازی شد.

جداسازی AM-MSCs

مطابق تجربیات پیشین (۱۱) سه تکه از بافت پرده آمنیون به یک لوله فالکون ۵۰ منتقل شد. به داخل لوله فالکون ۲۰ سی‌سی آنزیم کلاژناز (1/0 mg/ml) اضافه گردید و به مدت ۲ ساعت در انکوباتور قرار داده شد. پس از این مدت، فعالیت آنزیم با اضافه کردن حجم مساوی از محیط کشت ۱۰ درصد خنثی شد. پیپتاژ به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. محتویات لوله فالکون از قیف حاوی گاز استریل به عنوان صافی عبور داده شد و محتویات لوله مورد سانتریفوژ (۲۰۰۰ RPM و ۱۰ دقیقه) قرار گرفت و پلت سلولی به صورت رسوب در لوله حاصل شد.

کشت AM-MSCs

بر روی پلت سلولی، ۱ سی‌سی محیط کشت DMEM (Low glucose) حاوی ۱۰ درصد سرم اضافه گردید. تعویض محیط سلول ها روزانه انجام شد و سلول ها توسط میکروسکوپ اینورت (Olympus IX70) مورد ارزیابی و عکس‌برداری قرار گرفتند. در مجموع سلول ها با استفاده از آنزیم تریپسین سه بار پاساژ داده شدند. تکثیر سلول‌ها در فلاسک های 150 cm2 انجام شد. جهت انجام تست‌های کنترل کیفیت، نمونه های سلولی از پاساژ اول، دوم و سوم برداشته شدند. مازاد سلول ها در محیط فریز حاوی ۱۰ درصد DMSO و ۹۰ درصد سرم جهت انجماد سلول ها ذخیره گردید.

تست های کنترل کیفی

تست های کنترل کیفی شامل Sterility، Mycoplasma، Endotoxin، Apoptosis، Flowcytometry و Differentiation در فرایند ایجاد بانک سلولی در مراحل کشت اولیه، پاساژ دوم و سوم انجام شد.

بررسی میکروبی و اندوتوکسین

۱ سی سی از کشت سلول ها در ویال و تحت شرایط استریل به آزمایشگاه میکروب شناسی جهت بررسی میکروبی و اندوتوکسین ارسال شد.

بررسی آپاپتوز و نکروز

این تست بر مبنای آنالیز سلول با استفاده از کیت انکسین (Annexin V) انجام شد. در این راستا ۱۰٦ سلول در پاساژ ۳ و تراکم ۸۰٪ جهت بررسی میزان آپاپتوز و نکروز به آزمایشگاه فلوسایتومتری ارسال شد. سلول ها یک بار شستشو و سانتریفوژ و مایع رویی دور ریخته شد. ۱۰۰ میکرولیتر بافر اتصال انکسین به سلولها اضافه گردید. سپس انکسین V و فسفاتیدیل (PI) اضافه شد و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی قرار داده شد. سپس خوانش توسط دستگاه فلوسایتومتری انجام شد.

بررسی مارکرهای تخصصی در AM-MSCs

برای بررسی وجود یا عدم وجود CD مارکرها از آنتی بادی های کونژوگه با فلورسنت شامل مارکرهای CD44، CD73، CD90، CD14،CD29، CD34 و CD45 استفاده شد. نمونه‌ها پس از اضافه شدن آنتی بادی ها به مدت ۳۰ دقیقه در یخچال قرار داده شدند و سپس بررسی با استفاده از دستگاه فلوسایتومتری انجام گرفت.

تمایز AM-MSCs به سلول های چربی

جهت تمایز سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق از پرده آمنیون به سلول های چربی، سلول ها در دو گروه کنترل و تحت تمایز کشت داده شد و وقتی به تراکم ۵۰-۴۰٪ رسیدند، به مدت ۲۱ روز در محیط تمایز به بافت چربی قرار داده شدند. محیط کشت تمایزی هر ۴۸ ساعت یک بار تعویض شده و در روز ۲۱ یک سی‌سی فرمالین بر روی سلول ها ریخته شد و به مدت ۱ ساعت در دمای محیط قرار داده شد. سپس رنگ اویل رد (Oil-Red) بر روی سلول ها ریخته شد و پس از ۱۵ دقیقه با بافر شستشو داده شد.

تمایز AM-MSCs به سلول های استخوان

جهت تمایز سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق از پرده آمنیون به سلول های استخوان، سلول‌ها در دو گروه کنترل تحت تمایز کشت داده شدند و وقتی به تراکم ۵۰-۴۰٪ رسیدند، برای ۲۱ روز در محیط تمایز به بافت استخوان قرار گرفتند. محیط کشت تمایزی هر ۴۸ ساعت یک بار تعویض شده و در روز ۲۱ یک سی‌سی متانول بر روی سلول‌ها ریخته شده و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای محیط قرار داده شد. سپس رنگ آلیزارین رد (Alizarin-Red) به مدت ۵-۲ دقیقه بر روی سلول ها ریخته شد و با بافر شستشو داده شد.

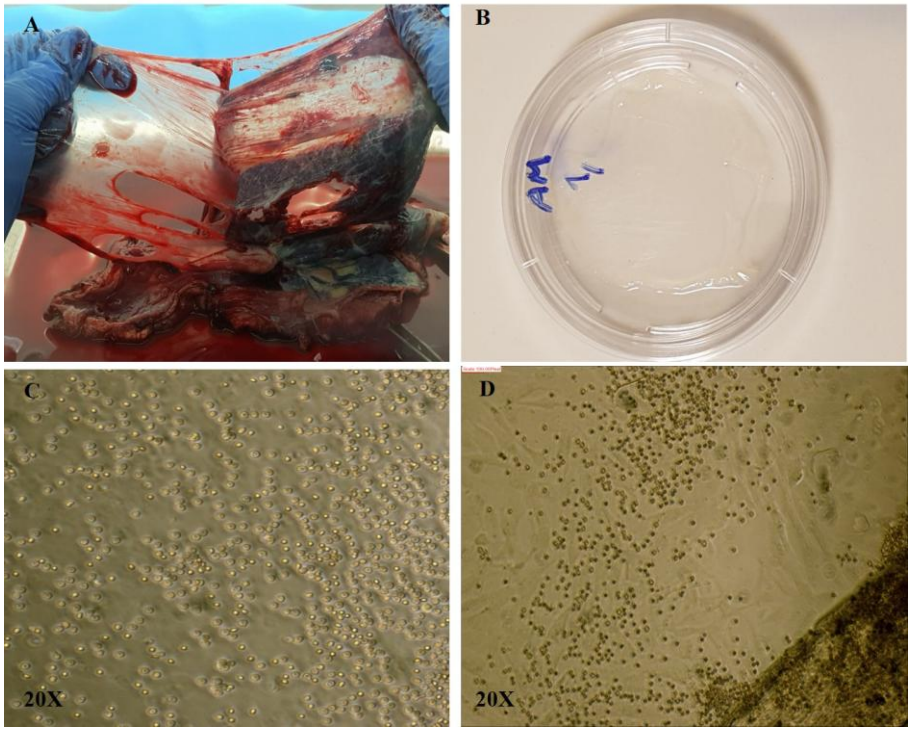
نتایج

ساختار پرده آمنیوتیک

پرده آمنیون پس از استریلیزاسیون و شستشو با PBS، به صورت ساختاری شفاف جهت کاربردهای تهیه سلول، آسلولار کردن و تهیه ماتریکس قابل استفاده بود (شکل ۱).

جداسازی و کشت AM-MSCs

سلول‌های مزانشیمی از پرده آمنیون انسان با موفقیت جدا شده و کشت داده شدند. در روزهای اول سلول‌های مزانشیمی قابل مشاهده عمدتاً به شکل گرد بودند، اما پس از گذشت ۷ روز، رفته رفته سلول‌های مزانشیمی به شکل دوکی درآمدند. پس از دو هفته جمعیت نسبتاً یکسانی از سلول‌های مزانشیمی تشکیل گردید. از سویی در پاساژهای مختلف کلونی‌های کوچک و بزرگ مشاهده شد (شکل ۱).



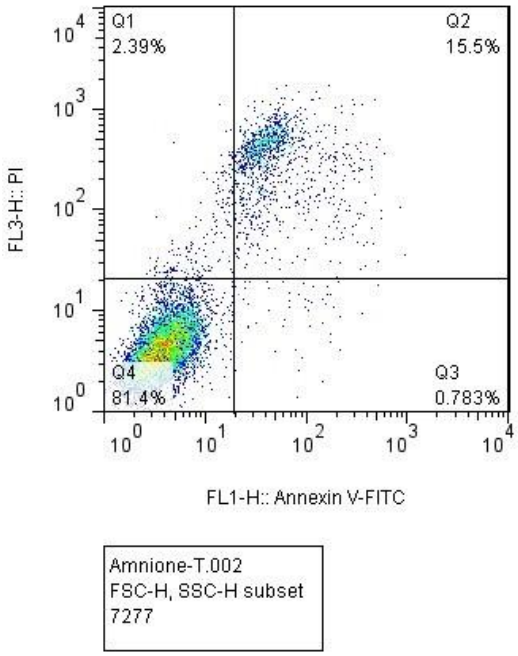
شکل ۱. جداسازی پرده آمنیون از لایه کوریون (**A**)، ساختار پرده آمنیون (**B**)، **AM-MSCs** ۹ روز بعد از جداسازی (لنز **20X**) (**C**) و **AM-MSCs** ۱۲ روز بعد از جداسازی (لنز **20X**) (**D**)

تست میکروبی و اندوتوکسین

نتایج تست های کنترل کیفی نشان داد که در نمونه سلولی هیچ‌گونه آلودگی وجود نداشت و آثاری از سمیت اندوتوکسین مشاهده نشد.

میزان زنده مانی و آپاپتوز در AM-MSCs

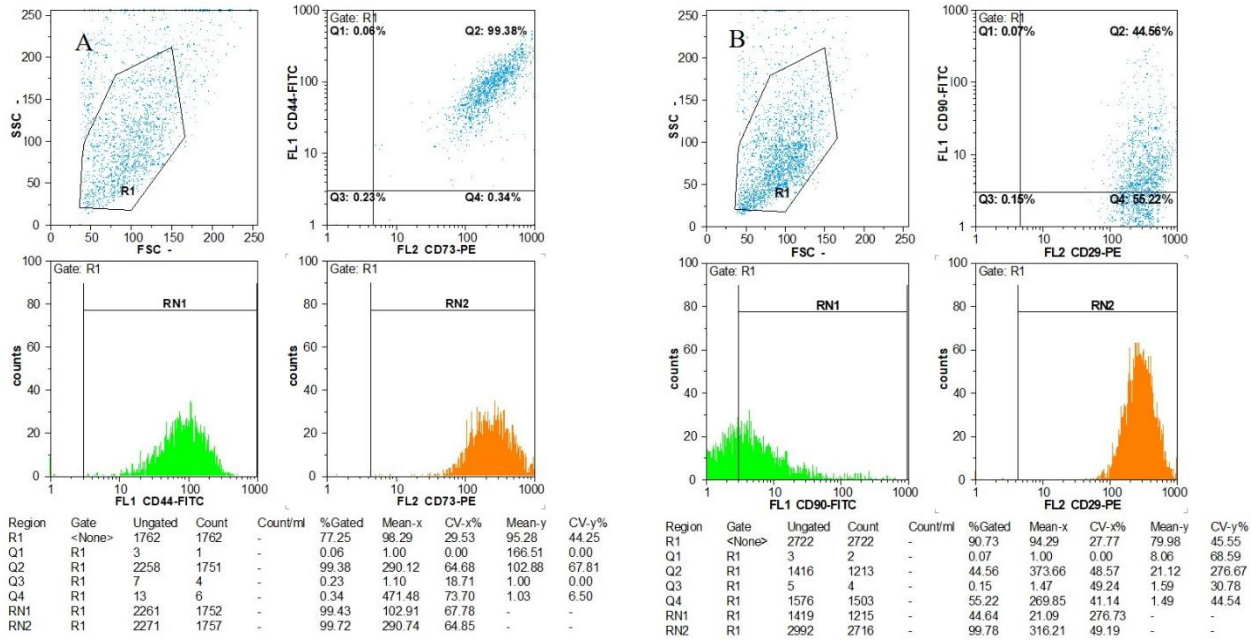
بررسی آپوپتوز در سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق از پرده آمنیون نشان داد که ۸۱ درصد از سلول‌ها زنده بوده و تنها حدود ۱۵ درصد آنها دچار آپوپتوز شده بودند (شکل ۲).



شکل ۲. میزان زنده‌مانی در سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از پرده آمنیون در پاساژ سوم

فلوسایتومتری AM-MSCs

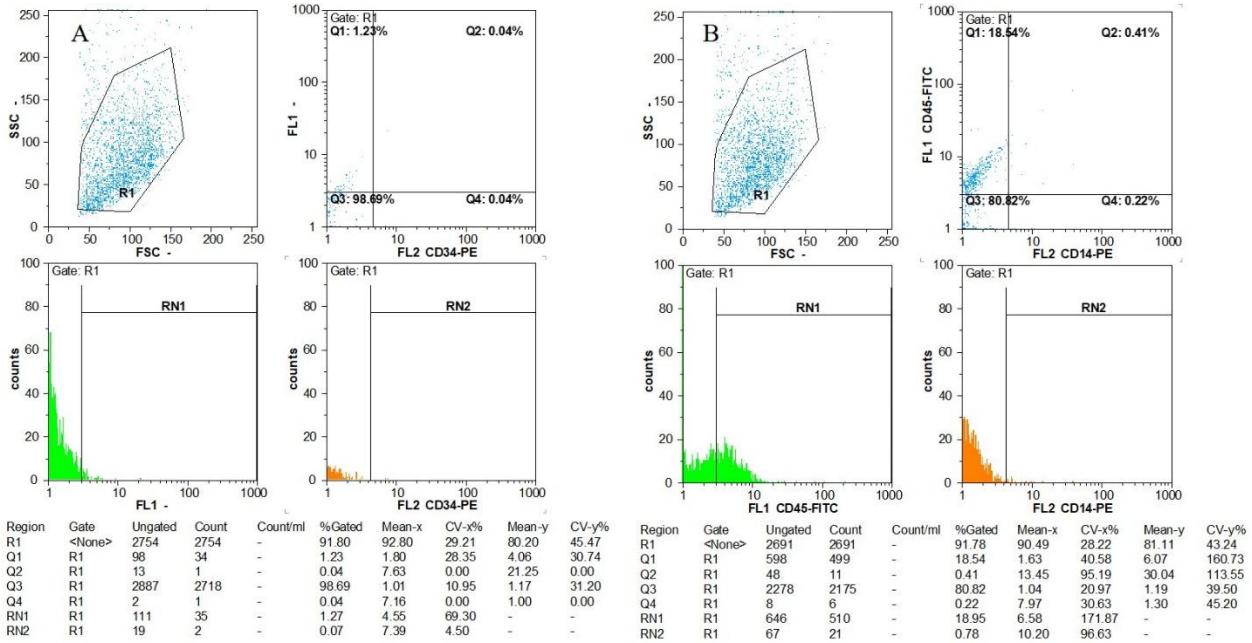
آنالیز فلوسایتومتری مشخص ساخت که سلول های بنیادی پرده آمنیوتیک نسبت به مارکرهای سلول های بنیادی مزانشیمی مانند CD73، CD29، CD90 و CD44 مثبت بوده و نسبت به مارکرهای CD34، CD14 و CD45 منفی بودند (شکل های ۳ و ٤) (جدول ۱).



Region	Gate	Ungated	Count	Count/ml	%Gated	Mean-x	CV-x%	Mean-y	CV-y%
R1	<None>	1762	1762	-	77.25	98.29	29.53	95.28	44.25
Q1	R1	3	1	-	0.06	1.00	0.00	166.51	0.00
Q2	R1	2258	1751	-	99.38	290.12	64.68	102.88	67.81
Q3	R1	7	4	-	0.23	1.10	18.71	1.00	0.00
Q4	R1	13	6	-	0.34	471.48	73.70	1.03	6.50
RN1	R1	2261	1752	-	99.43	102.91	67.78	-	-
RN2	R1	2271	1757	-	99.72	290.74	64.85	-	-

Region	Gate	Ungated	Count	Count/ml	%Gated	Mean-x	CV-x%	Mean-y	CV-y%
R1	<None>	2722	2722	-	90.73	94.29	27.77	79.98	45.55
Q1	R1	3	2	-	0.07	1.00	0.00	8.06	68.59
Q2	R1	1416	1213	-	44.56	373.66	48.57	21.12	276.67
Q3	R1	5	4	-	0.15	1.47	49.24	1.59	30.78
Q4	R1	1576	1503	-	55.22	269.85	41.14	1.49	44.54
RN1	R1	1419	1215	-	44.64	21.09	276.73	-	-
RN2	R1	2992	2716	-	99.78	316.21	49.19	-	-

شکل ۳. آنالیز فلوسایتومتری سلول‌های بنیادی مزانشیمی جداشده از پرده آمنیون مربوط به پاساژ سوم – واکنش سلول‌ها با آنتی CD73 و آنتی CD44 (A)، آنتی CD29 و آنتی CD90 (B)



Region	Gate	Ungated	Count	Count/ml	%Gated	Mean-x	CV-x%	Mean-y	CV-y%
R1	<None>	2754	2754	-	91.80	92.80	29.21	80.20	45.47
Q1	R1	98	34	-	1.23	1.80	28.35	4.06	30.74
Q2	R1	13	1	-	0.04	7.63	0.00	21.25	0.00
Q3	R1	2887	2718	-	98.69	1.01	10.95	1.17	31.20
Q4	R1	2	1	-	0.04	7.16	0.00	1.00	0.00
RN1	R1	111	35	-	1.27	4.55	69.30	-	-
RN2	R1	19	2	-	0.07	7.39	4.50	-	-

Region	Gate	Ungated	Count	Count/ml	%Gated	Mean-x	CV-x%	Mean-y	CV-y%
R1	<None>	2691	2691	-	91.78	90.49	28.22	81.11	43.24
Q1	R1	598	499	-	18.54	1.63	40.58	6.07	160.73
Q2	R1	48	11	-	0.41	13.45	95.19	30.04	113.55
Q3	R1	2278	2175	-	80.82	1.04	20.97	1.19	39.50
Q4	R1	8	6	-	0.22	7.97	30.63	1.30	45.20
RN1	R1	646	510	-	18.95	6.58	171.87	-	-
RN2	R1	67	21	-	0.78	10.20	96.63	-	-

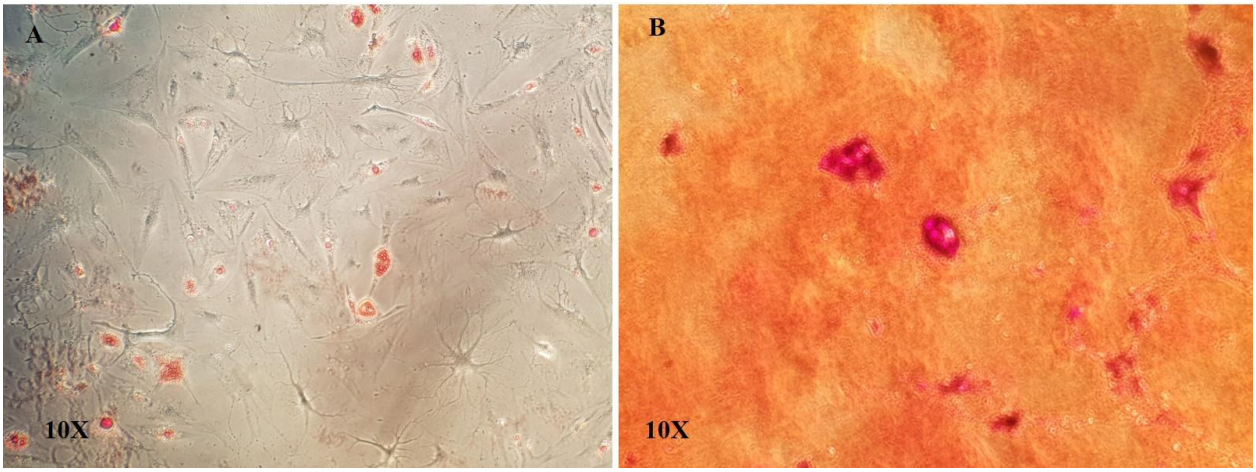
شکل ۴. آنالیز فلوسایتومتری سلول‌های بنیادی مزانشیمی جداشده از پرده آمنیون مربوط به پاساژ سوم – واکنش سلول‌ها با آنتی CD34 (A)، آنتی CD14 و آنتی CD45 (B)

جدول ۱. میزان بیان هر یک از مارکرهای مثبت و منفی در سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از پرده آمنیون

CD Markers		Percentage	Acceptance Criteria
Positive Markers	CD44	99.43	≥90%
	CD90	99.78	≥90%
	CD29	99.5	≥90%
	CD73	99.72	≥90%
Negative Markers	CD45	18.95	≤5%
	CD34	0.07	≤5%
	CD14	0.78	≤5%

پتانسیل تمایزی AM-MSCs

بررسی تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی پرده آمنیون به سلول‌های چربی و استخوان نشان داد این سلول‌ها قابلیت تمایز به سلول‌های استخوان و چربی را دارا می‌باشند. در این راستا نتایج رنگ‌آمیزی سلول‌های تمایز یافته به استخوان با آلیزارین رد نشانگر وجود توده‌های قرمز رنگ و اثبات کننده مورفولوژی سلول استخوانی بود، اما در کشت کنترل هیچ گونه توده قرمز رنگی ایجاد نشد. از طرفی نتایج رنگ آمیزی سلول‌های تمایز یافته به سلول های چربی با اویل رد نشانگر وجود واکوئل های چربی به رنگ زرد و اثبات کننده مورفولوژی سلول چربی بود حال آنکه در کشت کنترل اثری از وجود چنین واکوئل هایی وجود نداشت (شکل ۵).



شکل ۵. تمایز AM-MSCs به سلول های چربی (لنز ۱۰A) (X) و استخوان (لنز ۱۰B) (X)

بحث

تکنیک های جداسازی و تعیین ماهیت سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافتهای مختلف به ویژه پرده آمنیون با چالش های جدی روبرو است و نتایج تحقیقات نشانگر آن هستند که تکنیک های به کار رفته در موارد قابل توجهی با نقاط ضعف مهمی همراه هستند به گونه‌ای که شک‌ها و تردیدهای جدی در به کارگیری این سلول‌ها جهت مهندسی بافت و سلول درمانی وجود داشته و یا اصولاً تکنیک های روتین و پرکاربرد قابل استفاده در طیف وسیع وجود ندارند. این پژوهش به منظور نیل به تکنیک روتین در تهیه سلول های بنیادی مزانشیمی از پرده آمنیون جفت انسان با دقت بسیار بالا طراحی و اجرا گردید تا در پی آن

بتوان از سلول‌های به دست آمده در ترمیم ضایعات پوستی استفاده نمود. نتایج این پژوهش نشان دادند که با استفاده از روش ها و تکنیک‌های بهینه سازی شده در این تحقیق می‌توان سلول های بنیادی مزانشیمی را به روش مناسب از بافت پرده آمنیون جفت انسان جداسازی کرد و متعاقباً در محیط کشت طراحی شده با فرمول بهینه، کشت و تکثیر داد و پس از اثبات سلامت آنها از نظر ماهیت مزانشیمی و ارزیابی قابلیت زنده‌مانی و تکثیر مناسب، می‌توان آنها را به سلول‌های رده چربی و استخوان تمایز داد. همراستا با یافته های این پژوهش مطالعات دیگری نیز نشان می‌دهند که می‌توان سلول‌های مزانشیمی را از بخش های مختلف بافت جفت انسان جداسازی نمود و به سلول های بالغ تمایز داد (۱۲،۱۳). از سویی، در مطالعه حاضر جهت بررسی ماهیت بنیادی مزانشیمی سلول‌های جدا شده از پرده آمنیون از نظر مارکرهای تخصصی از روش فلوسایتومتری استفاده شد که نتایج مبین بیان مارکرهای مزانشیمی و عدم بیان مارکرهای آندوتلیالی و هماتوپوئتیک در سلول های تحت بررسی بودند و این امر اثبات کننده ماهیت مزانشیمی سلول‌های جداسازی شده از پرده آمنیون بود. مطالعات قبلی انجام یافته در خصوص بررسی بیومارکرهای اختصاصی سلول‌های مزانشیمی نیز همسو با نتایج تحقیق حاضر بود (۱۱). تحقیقات قبلی منطبق بر یافته های این پژوهش نشان داده اند که سلول‌های مزانشیمی بیومارکرهای اختصاصی خود از قبیل مارکرهای CD44، CD73، CD90 و CD105 را بیان می کنند و در مقابل مارکرهای دیگری از قبیل CD34 و CD45 را بیان نمی‌کنند (۱٤).

یکی دیگر از شاخص سلول‌های مزانشیمی توان تمایز آن‌ها به سلول‌های بالغ دیگر از قبیل سلول‌های استخوان و چربی می‌باشد. نتایج این تحقیق نشان دادند سلول‌های مزانشیمی مشتق شده از پرده آمنیون در پاساژ سوم می‌توانند در محیط کشت اختصاصی به طور موفقیت آمیزی به سلول‌های استخوان و چربی تبدیل شوند. مطالعات پیشین نیز نشان داده اند که حداکثر قدرت تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی بین پاساژهای ۲ و ٦ می‌باشد و در پاساژهای بالاتر توان تمایزی به شدت کاهش می‌یابد (۱۵،۱٦). از طرفی بررسی‌ها حکایت از آن دارند که سلول‌های بنیادی مزانشیمی قابلیت تمایز به سلول‌های بالغ مختلف از قبیل استئوسیت، هپاتوسیت و سلول‌های اپی‌تلیالی دارند (۱۹-۱۷).

تحقیق حاضر در محدوده بررسی کارایی جداسازی، کشت و تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از پرده آمنیون به سلول‌های بالغ دیگر انجام گرفته و تفسیر نتایج در این حیطه قابل تبیین می‌باشد. این تحقیق از نظر بررسی های سلولی و مولکولی دیگر از قبیل بررسی سیستم اکسیداتیو و رادیکال های آزاد و نیز بیان ژن‌ها و پروتئین‌های تمایزی در سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از پرده آمنیون با محدودیت همراه است. امید است در آینده نزدیک امکان بررسی سیستم اکسیداتیو و رادیکال های آزاد و نیز بیان ژن‌ها و پروتیین‌های تمایزی در سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از پرده آمنیون به منظور اطمینان از سلامت سلول‌ها در سطح سلولی و مولکولی فراهم آید.

نتیجه‌گیری

در مجموع نتایج این پژوهش نشان دادند که روش به کار رفته در این پژوهش یک روش مطمئن جهت جداسازی، کشت و تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از پرده آمنیون است و قابلیت آن را دارد تا به عنوان یک روش روتین در مراکز تحقیقاتی مورد استناد و استفاده قرار گیرد. بررسی های فلوسایتومتری نشان دادند که سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از پرده آمنیون که به روش به کار رفته در این تحقیق به دست آمده اند، دارای ماهیت مزانشیمی بوده و توانایی زنده مانی قابل ملاحظه ای دارند و می توانند در بانک سلولی به صورت ذخیره نگهداری شوند. از سویی، این سلول ها دارای قدرت تکثیر و تمایز قابل ملاحظه ای در محیط کشت می باشند.

تشکر و قدردانی

این مطالعه با پشتیبانی دانشگاه آزاد اسلامی واحد همدان و مرکز تحقیقات پوست و سلول‌های بنیادی دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام گرفته است، بدینوسیله از پشتیبانی معنوی و حمایت های مالی این مراکز تقدیر و تشکر به عمل می آید.

منابع

1. Ciciarello M, Corradi G, Loscocco F, Visani G, Monaco F, Curti A, et al. The Yin and Yang of the Bone Marrow Microenvironment: Pros and Cons of Mesenchymal Stromal Cells in Acute Myeloid Leukemia. Frontiers in Oncology 2019; 9:1135. doi: 10.3389/fonc.2019.01135.
2. Stoltz JF, De Isla N, Li YP, Bensoussan D, Zhang L, Huselstein C, Chen Y, et al. Stem cells and regenerative medicine: myth or reality of the 21th century. Stem Cells International 2015; 2015:734731. doi: 10.1155/2015/734731.
3. Li N, Hua J. Interactions between mesenchymal stem cells and the immune system. Cellular and Molecular Life Sciences 2017;74(13):2345-60. doi: 10.1007/s00018-017-2473-5.
4. Le Blanc K, Davies LC. Mesenchymal stromal cells and the innate immune response. Immunology Letters 2015;168(2):140-6. doi: 10.1016/j.imlet.2015.05.004.
5. Vladimirovna IL, Sosunova E, Nikolaev A, Nenasheva T. Mesenchymal stem cells and myeloid derived suppressor cells: common traits in immune regulation. Journal of Immunology Research 2016;2016:7121580. doi: 10.1155/2016/7121580.
6. Li F, Cao J, Zhao Z, Li C, Qi F, Liu T. Mesenchymal Stem Cells Suppress Chronic Rejection in Heterotopic Small Intestine Transplant Rat Models Via Inhibition of CD68, Transforming Growth Factor-β1, and Platelet-Derived Growth Factor Expression. Experimental and Clinical Transplantation 2017;15(2):213-21. doi: 10.6002/ect.2016.0067.
7. Fulle S, Centurione L, Mancinelli R, Sancilio S, Antonio Manzoli F, Di Pietro R. Stem cell ageing and apoptosis. Current Pharmaceutical Design 2012;18(13):1694-717. doi: 10.2174/138161212799859657.
8. Choudhery MS, Khan M, Mahmood R, Mehmood A, Khan SN, Riazuddin S. Bone marrow derived mesenchymal stem cells from aged mice have reduced wound healing, angiogenesis, proliferation and anti-apoptosis capabilities. Cell Biology International 2012;36(8):747-53. doi: 10.1042/CBI20110183.
9. Díaz-Prado S, Muiños-López E, Hermida-Gómez T, Rendal-Vázquez ME, Fuentes-Boquete I, de Toro FJ, et al. Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from human amniotic membrane. Tissue Engineering Part C Methods 2011;17(1):49-59. PMID: 20673138.
10. Pirjali T, Azarpira N, Ayatollahi M, Aghdaie MH, Geramizadeh B, Talai T. Isolation and characterization of human mesenchymal stem cells derived from human umbilical cord Wharton's jelly and amniotic membrane. International Journal of Organ Transplantation Medicine 2013;4(3):111. PMID: 25013662
11. Motedayyen H, Esmaeil N, Tajik N, Khadem F, Ghotloo S, Khani B, Rezaei A. Method and key points for isolation of human amniotic epithelial cells with high yield, viability and purity. BMC Research Notes 2017;10(1):552. doi: 10.1186/s13104-017-2880-6.

12. Nagamura-Inoue T, He H. Umbilical cord-derived mesenchymal stem cells: their advantages and potential clinical utility. World Journal of Stem Cells 2014;6(2):195. PMID: 24772246

13. Pires AO, Mendes-Pinheiro B, Teixeira FG, Anjo SI, Ribeiro-Samy S, Gomes ED, et al. Unveiling the differences of secretome of human bone marrow mesenchymal stem cells, adipose tissue-derived stem cells, and human umbilical cord perivascular cells: a proteomic analysis. Stem cells and development. 2016;25(14):1073-83. doi: 10.1089/scd.2016.0048.

14. Kobolak J, Dinnyes A, Memic A, Khademhosseini A, Mobasheri A. Mesenchymal stem cells: Identification, phenotypic characterization, biological properties and potential for regenerative medicine through biomaterial micro-engineering of their niche. Methods 2016;99:62-8. doi: 10.1016/j.ymeth.2015.09.016.

15. Dennis JE, Charbord P. Origin and differentiation of human and murine stroma. Stem Cells 2002;20(3):205-14 PMID: 12004079.

16. Martin DR, Cox NR, Hathcock TL, Niemeyer GP, Baker HJ. Isolation and characterization of multipotential mesenchymal stem cells from feline bone marrow. Experimental Hematology 2002;30(8):879-86. doi: 10.1016/s0301-472x(02)00864-0.

17. Zajdel A, Kałucka M, Kokoszka-Mikołaj E, Wilczok A. Osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells from adipose tissue and Wharton's jelly of the umbilical cord. Acta Biochimica Polonica. 2017;64(2):365-9. PMID: 28600911.

18. Khosravi M, Azarpira N, Shamdani S, Hojjat-Assari S, Naserian S, Karimi MH. Differentiation of umbilical cord derived mesenchymal stem cells to hepatocyte cells by transfection of miR-106a, miR-574-3p, and miR-451. Gene 2018;667:1-9. doi: 10.1016/j.gene.2018.05.028.

19. Sierra-Sanchez A, Ordonez-Luque A, Ibanez OE, Ruiz-Garcia A, Santiago SA. Epithelial in vitro differentiation of mesenchymal stem cells. Current Stem Cell Research & Therapy. 2018;13(6):409-22. PMID: 29714147 Review.