

کرایوپرزروشن سلول های اپی تلیال آمینون انسانی در محیط فاقد سرم

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

دریافت: ۹۱/۴/۲۷، پذیرش: ۹۱/۱۰/۱۲

چکیده:

مقدمه و هدف: از مباحث مطرح در نگهداری طولانی مدت سلول ها، حذف سرم حیوانی از محیط های نگهداری است. در این مطالعه از مایع آمینون که سرشار از فاکتور های رشد و مواد غذایی است به عنوان جایگزین سرم حیوانی استفاده شد و اثرات استفاده از آن در تعداد سلول های زنده و پرتوانی سلول ها پس از کرایوپرزروشن (نگهداری به روش انجماد) بررسی گردید. **روش کار:** در این مطالعه تجربی پس از تهیه پرده آمینون و کنترل میکروبی آن، سلول های اپی تلیال آمینون انسانی جداسازی گردید. سلول ها در ۲۴ حالت مختلف در دمای 196°C - در نیتروژن مایع به مدت ۱۲ ماه نگهداری شدند و درصد سلول های زنده قبل و پس از نگهداری به روش انجماد با روش های تریپان بلو و MTT ارزیابی و بیان مارکر Oct-4 به منظور بررسی پرتوانی سلول ها قبل و بعد از نگهداری به روش انجماد با روش ایمونوسیتوشیمی بررسی شدند. نتایج حاصل در بین گروه ها با روش ANOVA مقایسه شد (Tukey Post-Test). تفاوت بین نمونه ها در دو سطح $P < 0.05$ و $P < 0.01$ بررسی گردید. **نتایج:** یافته های حاصل نشان داد که وجود FBS، DMEM، FBS و یا مایع آمینوتیک (بجای FBS) برای نگهداری بهینه سلولها به روش انجماد ضروری است. تعداد سلول های زنده و درصد بیان Oct-4 در مواردی که مایع آمینون به جای سرم استفاده شده بود تغییر معنی داری نداشت. همچنین یافته ها نشان داد که DMSO نسبت به گلیسرول، ماده محافظ بهتری برای نگهداری سلول های اپی تلیال آمینونی می باشد.

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

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

مقدمه:

ترمیم آن (۴) باعث شده است که آمینون به عنوان یک ماده زیستی کاربردهای مختلف درمانی داشته باشد. از جمله این کاربردها می توان به استفاده از پرده آمینون به عنوان یک پوشش مناسب در سوختگی های پوستی (۵)، ترمیم زخمها (۶) و بسیاری دیگر از بیماری های پوستی اشاره کرد. از سوی دیگر در حال حاضر پرده آمینون برای درمان ناهنجاری ها و بیماری های قرنیه و ملتحمه (۷،۸) و ترمیم آسیب های چشمی دیگر (۹،۱۰) بطور وسیعی استفاده می شود. اخیراً مطالعات جدیدی در زمینه استفاده از آمینون به عنوان یک داربست مناسب و همچنین منبع سلولی ایده آل در کاربردهای مهندسی

پرده آمینون از رشد و نمو بافتهای خارج جنینی جنین بوجود می آید، آمینون شامل یک لایه سلول اپی تلیال با نام سلول های اپی تلیال آمینونی (AECs) است که بطور یکنواخت و منظم بر روی غشاء پایه ضخیم و یک لایه استرومایی بدون عروق قرار دارد. آمینون مواد غذایی و سایر مایحتاج لازم را مستقیماً با مکانیسم انتشار از مایع آمینونی و یا از لایه زیرین یعنی جفت و اجزاء آن بدست می آورد (۱). خصوصیات ویژه این بافت مانند جلوگیری از رشد میکروب ها (۲) مهارکنندگی واکنشهای ایمونولوژیک (۳) و جلوگیری از ایجاد زخم و کمک به

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

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

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

بافت صورت گرفته است (۱).

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

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

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

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

روش کار:

جمع آوری بافت ها و مایع آمنیون: در این مطالعه تجربی نمونه های جفت و اجزاء آن از سزارین های انتخابی (Elective) که در هفته ۳۶ و ۳۷ بارداری قرار داشتند از بیمارستانهای عرفان و آیت الله طالقانی تهران تهیه گردید. مادران اهدا کننده از نظر عوامل عفونی مانند HIV، HCV، HBV و سیفلیس با انجام تستهای سرولوژی کنترل می شدند. با اینکه جفت یک عضو دور انداختنی و زائد پس از زایمان است ولی اطلاعات لازم برای استفاده از جفت به والدین ارائه شد و فرم رضایتنامه کتبی از آنها اخذ گردید. بافت ها به محض انجام جراحی در شرایط آسپتیک در بافر فسفات سالین (PBS) استریل که حاوی $50 \mu\text{g/ml}$ پنی سیلین و $50 \mu\text{g/ml}$ استرپتومایسین بود در دمای 4°C سریعاً به آزمایشگاه منتقل شد. کلیه مراحل در محیط آزمایشگاه در زیر هود کشت سلولی و بصورت استریل انجام گردید، سپس پرده آمنیون با روش مکانیکی (Peeling) از کوریون جفت جداسازی شده و چندین بار توسط بافر فسفات سالین سرد (4°C) شستشو داده می شد تا لکه های خونی کاملاً از روی آن شسته شوند. مایع آمنیون توسط پزشک جراح در حین سزارین در سرنگ استریل جمع آوری می شد. در دمای 4°C به سرعت به آزمایشگاه منتقل می گردید و بمدت ۱۰ دقیقه در $2000 \times \text{g}$ سانتریفیوژ شده و سپس مایع رویی از فیلتر $22 \mu\text{m}$ میکرومتری عبور داده می شد. مرحله غیرفعال سازی (inactivation) مایع آمنیون مانند سرم حیوانی (مدت ۲۰ دقیقه در دمای 56°C) صورت می گرفت. جداسازی سلول: برای جداسازی سلول های اپی تلیال آمنیونی، پرده آمنیون به چند تکه کوچک تر تقسیم می شد و برای هضم آنزیمی در محلول Trypsin-EDTA با غلظت ۰/۱۵٪ قرار می گرفت. از این مرحله به بعد، کلیه مراحل در دمای 37°C انجام می شد. هضم آنزیمی در سه مرحله صورت گرفت. مواد حاصل از ۱۰ دقیقه اول هضم آنزیمی که بیشتر زوائد بافتی بودند، دور ریخته شد و سپس بافت طی دو مرحله که هر کدام ۴۰ دقیقه طول می کشید در محلول آنزیمی جدید قرار گرفت. محلول حاصل از هضم آنزیمی دوم و سوم به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت $2500 \times \text{g}$ سانتریفیوژ می شد و سلول های حاصل در ته فالكون جمع آوری می گردید، سپس سلول ها در PBS به شکل سوسپانسیون مورد استفاده قرار می گرفت. تعداد

محیط نگهداری سلول ها می تواند علاوه بر جلوگیری از تشکیل کریستال های یخ و صدمه به پیش ساز ها و سلول های عصبی، شرایط بدون نیاز به سرم را در پروسه نگهداری به روش انجماد ایجاد نماید (۲۸، ۲۷).

مایع آمنیون (Amniotic fluid = AF) یک مایع سرشار از فاکتورهای رشد، مواد غذایی و سایر موادی است که در رشد و نمو جنین نقش بسیار مهمی دارند (۳۰). مایع آمنیون به عنوان یک ماده انسانی و مغذی می تواند به عنوان جایگزین مناسبی برای سرم حیوانی در کشت و نگهداری سلول های مختلف مطرح باشد. در همین راستا در این مطالعه از مایع آمنیون انسانی به عنوان جایگزین سرم حیوانی در نگهداری به روش انجماد سلول های اپی تلیال آمنیون انسانی به منظور حذف سرم و اثرات جانبی استفاده از آن در نگهداری طولانی مدت این سلول ها استفاده شد. بدین منظور اثرات وجود مایع آمنیون به تنهایی و به همراه سایر مواد در نگهداری طولانی مدت سلول های اپی تلیال انسانی از نظر تعداد سلول های زنده پس از نگهداری به روش انجماد و همچنین حفظ قدرت پرتوانی آنها مورد بررسی قرار دادیم.

از سوی دیگر موادی که به عنوان مواد محافظت کننده از انجماد (Cryoprotectant) در نگهداری سلول ها استفاده می شوند بسیار متنوع می باشند. همه این مواد یک وجه اشتراک عمده دارند و آن اینکه از تشکیل کریستال های یخ در حین انجماد جلوگیری می کنند تا این کریستال ها به غشاء سلول و سایر ارگانل های داخل سلولی آسیب وارد نکنند. از رایج ترین و قدیمی ترین مواد محافظ انجماد می توان به گلیسرول اشاره کرد که یک الکل با سه عامل هیدروکسیل است که با ایجاد پیوند هیدروژنی با آب می تواند عملکرد محافظتی خود را ایفا کند. ماده DMSO نیز یک ماده آلی است که می تواند با آب داخل سلول واکنش داده و بدین ترتیب از تشکیل کریستال های یخ در دماهای زیر صفر جلوگیری نماید (۳۱). با توجه به مطالعات انجام گرفته در مورد سلول های اپی تلیال آمنیون (۳۲) و سایر سلول های بنیادی که خواص و ویژگی های مشابهی دارند (۲۲)، هدف دیگر این مطالعه استفاده از DMSO و گلیسرول به عنوان مواد محافظ انجماد (۳۳) و بررسی اثرات استفاده از این مواد بر روی پرتوانی و تعداد سلول های زنده می باشد.

C ۸۰°- قرار گرفتند و پس از ۲۴ ساعت سریعاً به تانک نیتروژن مایع انتقال داده شدند. پس از ۱۲ ماه ویال های کرایو از نیتروژن مایع خارج و در دمای محیط ذوب شدند. درصد viability و بیان مارکر Oct-4 در همه نمونه ها قبل و بعد از نگهداری به روش انجماد بررسی شدند و نتایج حاصل با روش آماری ANOVA مقایسه گردید. برای بدست آوردن نتایج آماری قابل قبول از هر نمونه ۱۰ عدد تهیه شد و مورد بررسی گرفت.

بررسی Viability: برای بررسی میزان زنده بودن سلولها از دو روش استفاده گردید:

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

۲- روش MTT: اساس این روش احیاء تترازول زرد رنگ بنام [3-(4,5-Dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] توسط آنزیم های میتوکندری سلول های زنده، به Formazan با رنگ بنفش است که در طول موج ۵۷۰ نانومتر حداکثر جذب را دارد. درصد سلول های زنده قبل و پس از نگهداری به روش انجماد با این روش مورد بررسی قرار گرفتند.

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

کنترل میکروبی بانک سلولی: با اینکه کلیه شرایط تهیه و آماده سازی بافت و جداسازی سلول ها در شرایط

سلول ها در سوسپانسیون فوق طوری تنظیم می گردید که تعداد نهایی سلول ها در هر ویال کرایو 2×10^7 سلول در هر میلی لیتر باشد.

گروه های مطالعه: گروههای مورد بررسی در این طرح شامل سه گروه اصلی بود که با توجه به نوع ماده محافظ انجماد تقسیم بندی شدند:

۱- گروه DMSO: ماده محافظ انجماد در این گروه DMSO با غلظت ۱۰٪ انتخاب شد. هدف از انتخاب این گروه بررسی مواد مختلف مانند FBS، AF (Amniotic Fluid) و DMEM در نگهداری به روش انجماد سلولهای اپی تلیال آمینیون انسانی بود. با توجه به ترکیب این مواد، ۸ حالت مختلف برای نگهداری به روش انجماد سلول ها ایجاد گردید که جزئیات در جدول ۱ نشان داده شده است.

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

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

(●) ماده مورد نظر در نمونه موجود است.

(○) ماده مورد نظر در نمونه موجود نیست.

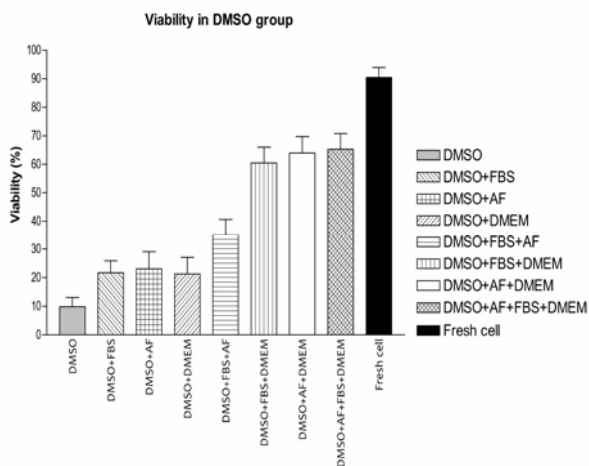
(A.F) مایع آمنیوتیک.

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

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

به منظور رساندن ویال ها به حجم یک میلی لیتر (غیر از ترکیبات مورد مقایسه و سلول ها) به ویال ها PBS اضافه گردید. پس از اینکه ویال ها به مدت ۳ دقیقه در دمای محیط نگهداری شدند، به مدت ۲۴ ساعت در فریزر

نتایج حاصل از بررسی ها نشان داد که بیش از ۹۴٪ از سلول های اپی تلیال آمینون انسانی جدا شده از آمینون، قبل از نگهداری به روش انجماد قدرت حیات دارند. درصد سلول های زنده پس از نگهداری به روش انجماد در گروه DMSO بررسی گردید و نتایج حاصل به همراه درصد سلول های زنده قبل از کرایو پرزرویشن (Fresh cell) در نمودار ۱ نشان داده شده است.



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

در این گروه ۸ حالت مختلف با تغییر مواد موجود در محیط سلول ها فراهم گردید. کمترین میزان سلول های زنده (۹/۸±۲/۹) در حالتی است که فقط DMSO در محیط وجود دارد و بیشترین درصد سلول های زنده (۶۵/۳±۵/۱) در نمونه هایی که ترکیب DMEM+FBS+AF حضور دارند.

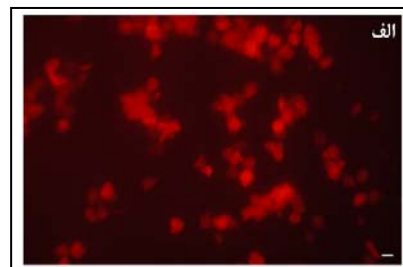
در گروهی که گلیسرول بعنوان ماده محافظ استفاده شد، کمترین درصد سلولهای زنده (۴/۵±۱/۸) در شرایطی حاصل شد که فقط گلیسرول در محیط وجود دارد، از سوی دیگر در نمونه هایی که به همراه گلیسرول DMEM+AF نیز وجود دارند بیشترین تعداد سلول ها (۵۴/۲±۶/۳) پس از نگهداری به روش انجماد قدرت حیات دارند. نتایج حاصل نشان می دهد در این گروه نیز بیشترین بازده سلول های زنده پس از نگهداری به روش انجماد در حالتی که ترکیبی از سه ماده DMEM، FBS و AF به همراه گلیسرول استفاده شده است، دیده می شود (نمودار ۲).

استریل انجام گردید، اما احتمال وجود آلودگی های ناخواسته میکروبی بخصوص هنگام تهیه بافت و انتقال آن به آزمایشگاه وجود داشت و این آلودگی های میکروبی می تواند درصد viability سلول ها را به میزان چشمگیری کاهش دهد، بدین جهت همه بافت ها و سلول ها قبل و بعد از نگهداری به روش انجماد از نظر وجود عوامل میکروبی (باکتری ها و قارچ ها) با استفاده از محیط های کشت مختلف بررسی می شدند. بدین منظور بافت ها و سوسپانسیون های سلولی با استفاده از محیط های کشت مختلف، در دماهای ۳۷° C و ۱۵° C به مدت ۱۴ روز انکوبه می شدند. محیط های کشت به ترتیب پس از گذشت ۲۴ ساعت، ۷۲ ساعت و ۱۴ روز از نظر رشد میکروبی بررسی می گردید و در صورت مثبت بودن نتایج کشت از مطالعه حذف می شدند. محیط های کشت شامل: الف) محیط کشت Trypticase soy broth برای فراهم کردن شرایط رشد هوازی برای گونه های گرم مثبت و گرم منفی هوازی و بی هوازی اختیاری.

ب) محیط کشت Blood agar برای فراهم کردن شرایط رشد مغذی برای گونه های گرم مثبت هوازی و بی هوازی اختیاری. ج) محیط کشت Thioglycollate broth برای فراهم کردن شرایط رشد برای گونه های بی هوازی اجباری. د) محیط کشت Sabouraud's dextrose agar برای فراهم کردن شرایط رشد مغذی برای قارچ ها.

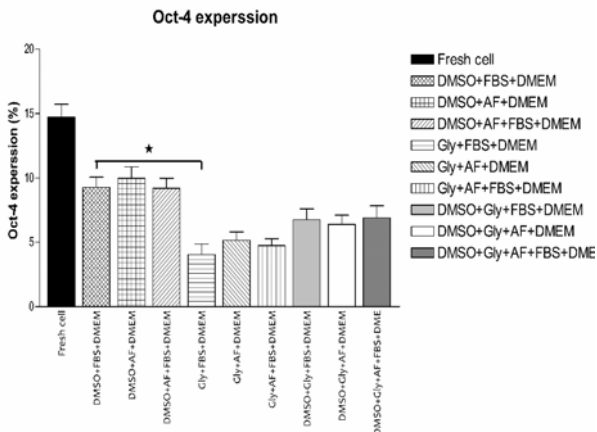
نتایج:

نتایج حاصل از بررسی مارکر Pancytokeratin نشان داد که همه سلول های اپی تلیال آمینون انسانی پس از جداسازی Pancytokeratin را بیان می کنند که بیانگر جداسازی صحیح این سلول ها و عدم آلودگی به سلولهای مزانشیمال می باشد (شکل ۱- الف).



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

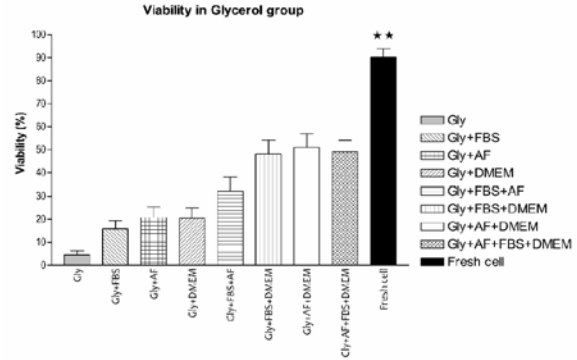
به منظور بررسی تمایزهای ناخواسته در طول نگهداری طولانی مدت، پرتوانی سلول ها پس از نگهداری به روش انجماد نیز بررسی گردید. از آنجائیکه در هر سه گروه مورد مطالعه، در حالت هایی که ترکیبی از مواد FBS، AF و DMEM به همراه ماده محافظ انجماد، بیشترین میزان سلولهای زنده را داشتند، درصد بیان Oct-4 در نمونه هایی که این مواد حضور داشتند، ارزیابی گردید (نمودار ۴).



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

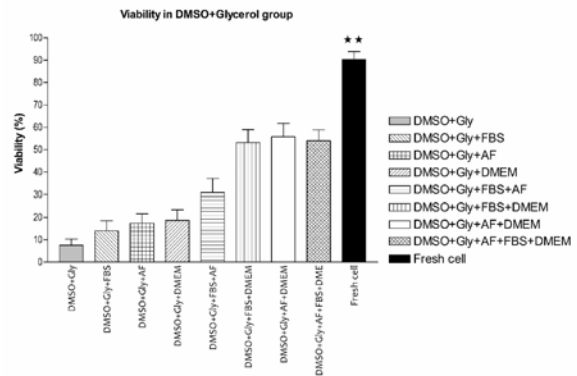
نتایج حاصل از بررسی ها نشان داد که بیان Oct-4 در سلول هایی که محیط اطرافشان حاوی گلیسرول، FBS و DMEM بود در کمترین حالت به ۴٪ رسید، در حالی که سلول های کرایوپرزو شده در محیط حاوی DMSO، AF و DMEM بالاترین میزان پرتوانی (۲/۶ ± ۱۰/۱٪) را نشان می دهند.

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



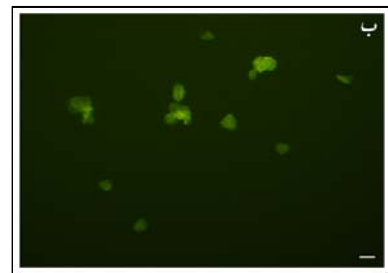
نمودار ۲: مقایسه درصد سلول های اپی تلیال آمینون انسانی زنده قبل و پس از نگهداری به روش انجماد در گروه Glycerol **P<0.05

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



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

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



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

بر اساس یافته های این مطالعه، مایع آمنیون انسانی می تواند جایگزین مناسبی برای سرم حیوانی در نگهداری به روش انجماد سلول های اپی تلیال آمنیون انسانی باشد. مشابه بودن ترکیبات مایع آمنیون انسانی با سرم حیوانی می تواند توجیه کننده نتایج حاصل باشد (۳۰). به هر روی، در حال حاضر، مطالعات محدودی در زمینه استفاده از مایع آمنیون در نگهداری طولانی مدت سلول ها وجود دارد (۳۴)، بنابراین بررسی های بیشتر در این زمینه ضروری بنظر می رسد.

طبق نتایج حاصل از این مطالعه، استفاده از گلیسرول می تواند بازده نگهداری به روش انجماد سلول های مزبور را کاهش دهد و میزان تمایز های ناخواسته در حین نگهداری به روش انجماد را افزایش دهد. گلیسرول و DMSO دو ماده محافظت کننده از انجماد می باشند که استفاده وسیعی در نگهداری به روش انجماد سلول ها و بافتهای مختلف دارند (۳۱). در مورد مزایا و معایب استفاده از این مواد مطالعات مختلفی صورت گرفته است و به نظر می رسد علاوه بر نوع ماده محافظ انجماد، عوامل مختلف دیگری مانند نوع سلول، غلظت مواد محافظ و مقاومت و نفوذپذیری دیواره سلولی و غیره از عوامل تاثیر گذار در نگهداری به روش انجماد سلول ها می باشد، بنابراین نتایج متناقضی در مورد استفاده از این مواد در نگهداری به روش انجماد سلول ها وجود دارد. با توجه به نتایج مطالعه حاضر بنظر می رسد که استفاده از DMSO در نگهداری سلول های اپی تلیال آمنیونی ارجح می باشد که این یافته با مطالعات قبلی که توسط راما و هنربکلر در سال های ۲۰۰۱ و ۲۰۰۶ بر روی رده های سلولی دیگر صورت گرفته (۳۲،۳۳) در زمینه کاربرد DMSO همخوانی دارد.

نتیجه نهایی:

نتایج حاصل از این مطالعه نشان می دهد می توان نگهداری به روش انجماد سلول های اپی تلیال آمنیون انسانی را با استفاده از مایع آمنیون در محیط فاقد عوامل حیوانی (Xeno-free) انجام داد. استفاده از مایع آمنیون بر روی بازده نگهداری به روش انجماد تفاوتی با سرم حیوانی ندارد و منجر به حفظ پرتوانی سلول ها پس از نگهداری به روش انجماد می گردد. همچنین DMSO در مقایسه با گلیسرول یک ماده محافظ انجماد مناسب تری برای نگهداری طولانی مدت این سلول ها می باشد.

شامل FBS+DMEM + ماده محافظ انجماد بود با نمونه های حاوی AF+DMEM + ماده محافظ انجماد، تفاوت معنی داری در میزان سلول های زنده و همچنین بیان Oct-4 وجود نداشت.

بررسی اثر مواد محافظ انجماد در نگهداری به روش انجماد سلول های اپی تلیالی آمنیون انسانی نشان داد که تفاوت معنی داری در تعداد سلول های زنده بین نمونه های DMSO+FBS+DMEM و Glycerol+FBS+DMEM وجود ندارد. در حالی که میزان بیان Oct-4 در نمونه های حاوی DMSO+FBS+DMEM بیشتر از نمونه های حاوی Glycerol+FBS+DMEM بود ($P < 0.01$). این یافته نشان می دهد که در نمونه هایی که در ترکیب آنها گلیسرول وجود ندارد تمایز های ناخواسته در طی نگهداری به روش انجماد سلول های اپی تلیال آمنیون انسانی کمتر است.

بحث:

با توجه به نتایج بدست آمده در این مطالعه، استفاده از مایع آمنیون در میزان سلول های زنده و پرتوانی سلولهای اپی تلیال آمنیون انسانی پس از نگهداری به روش انجماد تفاوتی با سرم حیوانی ندارد. سرم حیوانی سرشار از فاکتور های رشد، هورمونها، مواد غذایی و مواد ناشناخته دیگری است که در حضور آن سلول ها قدرت حیات و تکثیر بیشتری دارند و در محیط فاقد سرم میزان viability کاهش می یابد (۲۲). همانطور که قبلاً ذکر شد یکی از مشکلات کشت و نگهداری سلول های بنیادی استفاده از سرم حیوانی است. سلول هایی که در محیط های حاوی سرم حیوانی نگهداری می شوند برای استفاده در سلول درمانی مناسب نیستند زیرا پروتئین ها و سایر عوامل سرم حیوانی به عنوان یک ماده آنتی ژنیک قوی عمل کرده و کمترین مقدار باقیمانده از آن حتی پس از شستشوی متوالی سلول ها پس از کشت و نگهداری می تواند تحریک سیستم ایمنی گیرنده سلول ها را منجر شود (۲۴). از سوی دیگر حضور سرم در محیط باعث انتقال احتمالی عوامل عفونی می گردد (۲۵). مطالعات بسیار گسترده ای در راستای حذف سرم حیوانی از بانک های سلولی انجام شده است و با اینکه در برخی از کاربردهای خاص جایگزین هایی برای سرم معرفی شده است (۲۷-۲۹) اما تاکنون جایگزین مناسبی که بتوان در همه موارد از آن استفاده کرد وجود ندارد.

14. Ilancheran S, Michalska A, Peh G, Wallace EM, Pera M, Manuelpillai U. Stem cells derived from human fetal membranes display multilineage differentiation potential. *Biol Reprod* 2007; 77 (3):577-88.
15. Takashima S, Ise H, Zhao P, Akaike T, Nikaido T. Human amniotic epithelial cells possess hepatocyte-like characteristics and functions. *Cell Struct Funct* 2004;29 (3):73-84.
16. Wei JP, Zhang TS, Kawa S, Aizawa T, Ota M, Akaike T, et al. Human amnion-isolated cells normalize blood glucose in streptozotocin-induced diabetic mice. *Cell Transplant* 2003; 12(5):545-52.
17. Niknejad H, Deihim T, Ahmadiani A, Jorjani M, Peirovi H. Permanent expression of midbrain dopaminergic neurons traits in differentiated amniotic epithelial cells. *Neurosci Lett* 2012; 506(1):22-7.
18. Niknejad H, Peirovi H, Ahmadiani A, Ghanavi J, Jorjani M: Differentiation factors that influence neuronal markers expression in vitro from human amniotic epithelial cells. *Eur Cell Mater*. 2010; 19: 22-9.
19. Miyamoto K, Hayashi K, Suzuki T, Ichihara S, Yamada T, Kano Y, et al. Human placenta feeder layers support undifferentiated growth of primate embryonic stem cells. *Stem Cells* 2004; 22 (4):433-40.
20. Sakuragawa N, Tohyama J, Yamamoto H. Immunostaining of human amniotic epithelial cells: possible use as a transgene carrier in gene therapy for inborn errors of metabolism. *Cell Transplant* 1995; 4 (3):343-6.
21. Lefebvre S, Adrian F, Moreau P, Gourand L, Dausset J, Berrih-Aknin S, Carosella ED, Paul P. Modulation of HLA-G expression in human thymic and amniotic epithelial cells. *Hum Immunol* 2000; 61 (11):1095-101.
22. Zeisberger SM, Schulz JC, Mairhofer M, Ponsaerts P, Wouters G, Doerr D, et al. Biological and physicochemical characterization of a serum- and xeno-free chemically defined cryopreservation procedure for adult human progenitor cells. *Cell Transplant* 2011; 20(8):1241-57.
23. Müller P, Aurich H, Wenkel R, Schäffner I, Wolff I, Walldorf J, et al. Serum-free cryopreservation of porcine hepatocytes. *Cell Tissue Res* 2004;317(1):45-56.
24. Martin M.J, Muotri A, Gage F, Varki A. Human embryonic stem cells express an immunogenic nonhuman sialic acid. *Nat Med* 200; 11(2):228-232.
25. Bradley, R. Bovine spongiform encephalopathy and its relationship to the variant form of Creutzfeldt-Jakob disease. *Contrib Microbiol* 2004; 11:146-185.
26. Corsini JC, Hacker C, Bare C. Serum-Free Cryopreservation of Five Mammalian Cell Lines in Either a Pelleted or Suspended State. *Biological Procedures Online* 2004;6(1): 61-66.

سپاسگزاری:

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

منابع:

1. Niknejad H, Peirovi H, Jorjani M, Ahmadiani A, Ghanavi J, Seifalian AM. Properties of the amniotic membrane for potential use in tissue engineering. *Eur Cell Mater* 2008; 15:88-99.
2. Ganatra MA. Amniotic membrane in surgery. *J Pak Med Assoc* 2003; 53(1):29-32.
3. Gomes JA, Romano A, Santos MS, Dua HS. Amniotic membrane use in ophthalmology. *Curr Opin Ophthalmol* 2005; 16(4):233-40.
4. Hao Y, Ma DH, Hwang DG, Kim WS, Zhang F. Identification of antiangiogenic and antiinflammatory proteins in human amniotic membrane. *Cornea* 2000; 19(3):348-52.
5. Rao TV, Chandrasekharam V. Use of dry human and bovine amnion as a biological dressing. *Arch Surg* 1981; 116: 891-896.
6. Bennett JP, Matthews R, Faulk WP. Treatment of chronic ulceration of the legs with human amnion. *Lancet* 1980; 1: 1153-1156.
7. Kim JC, Tseng SCG. Transplantation of preserved human amniotic membrane for surface reconstruction in severely damaged rabbit corneas. *Cornea* 1995; 14: 473-484.
8. Gomes JA, Romano A, Santos MS, Dua HS. Amniotic membrane use in ophthalmology. *Curr Opin Ophthalmol* 2005; 16:233-240.
9. Andonovska D, Dzokic G, Spasevska L, Trajkovska T, Popovska K, Todorov I, et al. The advantages of the application of amniotic membrane in the treatment of burns. *Prilozi* 2008; 29(1):183-98.
10. Gomes JAP, Dos Santos MS, Cunha MC, Mascaro VL, Barros JDN, De Sousa LB. Amniotic membrane transplantation for partial and total limbal stem cell deficiency secondary to chemical burn. *Ophthalmology* 2003; 110: 466-473.
11. Miki T, Lehmann T, Cai H, Stolz DB, Strom SC. Stem cell characteristics of amniotic epithelial cells. *Stem Cells* 2005; 23 (10):1549-59.
12. Miki T, Mitamura K, Ross MA, Stolz DB, Strom SC. Identification of stem cell marker-positive cells by immunofluorescence in term human amnion. *J Reprod Immunol* 2007; 75 (2): 91-6.
13. Miki T. Amnion-derived stem cells: in quest of clinical applications. *Stem Cell Res Ther* 2011; 2(3): 25.

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

*Original Article***Serum-Free Cryopreservation of Human Amniotic Epithelial Cells**

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

Received: 17.7.2012 Accepted: 1.1.2013

Abstract

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

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

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

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

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

Keywords: Amniotic Fluid / Cryopreservation / Epithelial Cells/ Glycerol

^{*} Assistant Professor of Pharmacology, Nanomedicine and Tissue Engineering Research Center

Shahid Beheshti University of Medical Sciences & Health Services, Tehran Iran. (niknejad@sbmu.ac.ir)

^{**} Professor of Surgery, Nanomedicine and Tissue Engineering Research Center

Shahid Beheshti University of Medical Sciences & Health Services, Tehran Iran.

^{***} M.Sc student in Nanotechnology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences & Health Services, Tehran, Iran