AUMJ Journal Alborz University of Medical Sciences
نشریه دانشگاه علوم پزشکی البرز، زمستان ۱۴۰۲، سال ۱۳، شماره ۱، صفحه‌های ۳۳-۲۶
مقاله تحقیقی

بررسی تاثیر محلول پرده آمنیوتیک بر رفتار سلول‌های بنیادی مزانشیمی بند ناف انسانی در شرایط آزمایشگاهی

تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۱/۰۷/۰۸ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۹/۲۳

محمدعظیمی الموتی[۱۳]
محمدامین حبیبی[۲]
امین ابراهیمی[۳٤]
زهرا جمالپور[*۱]

۱. مرکز تحقیقات جراحی و تروما ، دانشگاه علوم پزشکی ارتش، تهران، ایران
۲. بانک بافت ایران و مرکز تحقیقات موسسه ژن، سلول و بافت، دانشگاه علوم پزشکی تهران
۳. گروه مهندسی بافت، دانشکده فناوری‌های پیشرفته پزشکی، موسسه رویان RCECA، تهران، ایران.
٤. گروه تحقیقاتی سیتوتک و بیوانفورماتیک، تهران، ایران

*نویسنده‌مسئول:
مرکز تحقیقات تروما، دانشگاه علوم پزشکی آجا
تهران، ایران
تلفن: +۹۸۹۱۲٦۰۱۱۹٤۱
ایمیل: z_jamalpoor2000@yahoo.com
z.jamlapoor@ajaums.ac.ir

چکیده

مقدمه و اهداف: استفاده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی یک رویکرد امیدوارکننده برای بازسازی بافت‌های آسیب دیده است. داربست‌های مهندسی‌شده بارگذاری شده با سلول یکی از روش‌های پیوند سلول در محل آسیب است. با این حال، زنده‌مانی سلول در داربست همچنان یک چالش است. فاکتورهای رشد نقش ثابت شده‌ای در افزایش فعالیت متابولیک سلول دارند. محلول پرده آمنیوتیک یک منبع غنی از فاکتور رشد است. هدف از این مطالعه تعیین غلظت بهینه محلول پرده آمنیوتیک بر رفتار سلول‌های بنیادی مزانشیمی در شرایط آزمایشگاهی بود.

روش‌ها: محلول پرده آمنیوتیک به روش آنزیمی در غلظت‌های از پیش تعیین شده تهیه شد. سلول‌های بنیادی مزانشیمی بارگذاری شده در هیدروژل با غلظت‌های مختلف تیمار شد. میزان زنده‌مانی، تکثیر و فعالیت متابولیکی سلول‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: سمیت سلولی محلول پرده آمنیوتیک به روش MTT اندازه‌گیری شد. افزایش غلظت از ۰/۱ mg/ml تا ۱ هیچگونه سمیت نشان نداد و در غلظت ۱/۵ mg/ml کاهش چگالی نوری (DO=۰/۵۸±۰/۰۱۲) نسبت به کنترل (DO=۰/۳۹±۰/۰۱٤) مشاهده شد. فعالیت متابولیکی سلول بارگذاری شده در هیدروژل در غلظت ۱ mg/ml افزایش معنی داری نسبت به گروه کنترل داشت(p۰/۰۱۲) و میزان محتوی DNA در این گروه (۰/۹±۱۹/٦ نانوگرم/ماتریس) آن را تایید کرد.

نتیجه‌گیری: پیشنهاد می‌شود که محلول پرده آمنیوتیک به عنوان یک منبع غنی از فاکتور رشد با دوز بهینه ۱ mg/ml موجب افزایش زنده‌مانی و فعالیت متابولیکی سلول بنیادی مزانشیمی بارگذاری شده در داربست جهت سلول درمانی می‌شود.

واژه‌های کلیدی: پرده آمنیوتیک، سلول بنیادی مزانشیمی، مهاجرت سلولی، تکثیر سلولی

مقدمه

اخیرا، درمان‌های مبتنی بر سلول یک رویکرد درمانی جدید است که انواع مختلفی از سلول‌های بنیادی برای بازسازی و ترمیم آسیب‌های بافتی استفاده می‌شود[۱،۲]. این سلول‌ها با ظرفیت خود برای تجدیدپذیری و تمایز به انواع سلول‌های خاص تمام بافت‌ها و سیستم‌های اندام بدن، با توجه به شرایط ریزمحیطی مشخص تبدیل شده و توانایی ترمیم آسیب در میزبان را حفظ می‌کنند [۳،۴]. پیوند سلول‌های بنیادی اگزوژن می‌تواند اتولوگ ویا آلوژنیک (غیر اتولوگ) باشد [۵،۶]. در موارد تجویز سلول‌های بنیادی آلوژنیک، سلول‌های بنیادی گیرنده اصلی کمپلکس سازگاری بافتی (MHC) را بیان می‌کنند و احتمال رد پیوند وجود دارد [۶،۷]. برای جلوگیری از عواقب واکنش میزبان در مقابل پیوند، درمان مبتنی بر سلول رویکردهای جدید با پشتیبانی از فناوری‌های مهندسی بافت در حال توسعه هستند، تکنیک‌هایی که اصول علم و مهندسی مواد را با زیست شناسی سلول‌های بنیادی ترکیب می‌کند [۸]. بارگذاری سلول‌ها درون هیدروژل یکی از روش‌های عدم تحریک سیستم ایمنی می‌باشد[۹،۱۰]. یکی از چالش‌های بارگذاری سلول درون هیدروژل مرگ سلولی آن می‌باشد[۱۱]. مطالعات مختلف همراهی فاکتور رشد اگزوژن با سلول‌ها را برای افزایش فعالیت متابولیک و زنده مانی سلول گزارش کردند[۱۲]. یکی از منابع غنی از فاکتور رشد، پرده آمنیوتیک است. پرده آمنیوتیک لایه داخلی پرده‌های جفتی است که پس از زایمان به عنوان زباله زیستی امحا می‌شود. غشای پایه پرده آمنیوتیک به عنوان منبع ذخیره فاکتورهای رشد عمل می‌کند که مهمترین این فاکتور شامل فاکتور رشد اپیدرمی (EGF)، فاکتور رشد ترانسفورم کننده (TGF a, -b1,b2, b3)، فاکتور رشدکراتینوسیت و گیرنده آن (KGF, KGFR)، فاکتور رشد هپاتوسیت و گیرنده آن (HGF,HGFR)، فاکتور رشد فیبروبلاستی (bFGF)، فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (VEGF)، فاکتور رشد مشتق از پلاکت (PDGF) که در بحث ترمیم موثر است. اولین کاربرد آن در حوزه مهندسی بافت استفاده از آن به عنوان پانسمان بیولوژیک در درمان زخم پوستی و چشمی بود[۱۳،۱۴]. اخیراً، محققان از فرم محلول غشای آمنیوتیک (AME) به عنوان منبع غنی از فاکتورهای رشد و پروتئین‌های ECM برای بهبود زخم استفاده کردند [۱۵]. آنها گزارش کرده‌اند که انتشار موضعی AME در محل زخم، سلول‌های درون‌زا را به سمت رگ‌زایی و تشکیل بافت جدید فراخوان می‌کند [۱۶]. از طرفی سلول های بنیادی مزانشیمی (MSCs) سلول‌های استرومال غیرخونی اند که توانایی تمایز به رده های هر سه لایه جنینی همچون استخوان، غضروف، ماهیچه، کاردیومیوسیت، سلول های اندوتلیال، چربی و کراتینوسیت را دارند. این سلول‌ها از منابع مختلفی نظیر بافت چربی، مایع آمنیوتیک، بند ناف واستخوان بدست می‌آیند. این سلول‌ها سبب تعدیل پاسخ ایمنی، تکثیر و مهاجرت سلول های کراتینوسیت و اندوتلیال، فراخوانی ماکروفاژها و سلول های پیش ساز اندوتلیال به محل زخم و رگ زایی می‌شوند. استخراج MSCs بند ناف سریعتر و راحت‌تر از مغز استخوان است [۱۷،۱۸]. در این مطالعه ما رفتار سلول بنیادی MSCs را در تماس با دوزهای مختلف محلول پرده آمنیوتیک به عنوان یک منبع دارای فاکتور رشد فراوان بررسی کردیم.

مواد و روش‌ها

تهیه محلول پرده آمنیوتیک: غشای آمنیوتیک خشک (شرکت پیشتاز طب آبادیس، تهران، ایران) به قطعات کوچک بریده شد و سپس با روش کرایوژنیک (نیتروژن مایع) آسیاب شد. پودر تهیه شده با آنزیم پپسین (1 w/w) و HCL (۰/۰۱ N) به مدت ٤٨ ساعت در دمای C37° هضم شد. محلول به دست آمده با دور ۱۸۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ و مایع رویی خارج شد. مایع رویی با سدیم هیدروکسید (NaOH) خنثی (pH: ۷) و با استفاده از روش فیلتراسیون (۰/۲ mμ) استریل شد. میزان پروتئین‌کل محلول با روش Bicinchoninic acid assay (BCA) سنجیده شد و محلول نهایی در غلظت‌های مشخص(جدول۱) تهیه شدند.

جدول۱. غلظت‌های مختلف محلول آمنیوتیک

گروه‌ها	غلظت (میلی گرم/میلی لیتر)
نمونه ۱	۰/۱
نمونه۲	۰/۵
نمونه ۳	۱
نمونه ٤	۱/۵
کنترل مثبت	محیط کشت کامل (+DMEM 20% FBS)
کنترل منفی	محیط کشت پایه بدون سرم

ارزیابی سازگاری سلولی به روش MTT: تست MTT بر اساس روش رنگ سنجی است و اساس آن تبدیل نمک تترازولیوم زرد رنگ (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide or) یا معرف MTT، به کریستال‌های فرمازان بنفش رنگ در سلول‌های

فعال است. در واقع آنزیم‌های اکسیدوردوکتاز وابسته به NADP و NADPH موجود در سلول‌های فعال عمل احیای MTT به فرمازان را انجام می‌دهند. از آنجایی که کریستال‌های فرمازان نامحلول از یک ماده حلال (DMSO) استفاده شد تا رنگ ایجاد شده توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر در جذب ۶۰۰–۵۰۰ نانومتر توسط دستگاه قابل خوانش باشد. برای این منظور سلول‌های بنیادی مزانشیمی (انستیتوپاستور، بانک سلول، تهران، ایران) تهیه و تا پاساژ چهارم در فلاسک T۲۵ کشت داده شدند. محیط (+ DMEM + 20% FBS آنتی‌بیوتیک ۱٪) برای تکثیر سلولی استفاده شد[۱۷]. تعداد ۵×۱۰^{۴}سلول داخل هر چاهک پلیت ۹۶–خانه ریخته شد و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷° C و دی‌اکسیدکربن ۵٪ انکوبه شد. سپس محیط رویی خارج و غلظت‌های مختلف (جدول ۱) محلول پرده آمنیون به سلول اضافه شد. در بازه زمانی۴۸،۲۴و۷۲ ساعت میزان چگالی نوری(OD) با دستگاه خوانش پلیت در طول موج ۵۷۰ نانومتر قرائت شد.

بارگذاری سلول بنیادی مزانشیمی در هیدروژل ژلما

سنتز ژلما: ژلاتین خوکی نوع A (w/v) ۱۰٪ در دو فالکون به صورت جدا توسط PBS در دمای C60° حل شد و بر روی همزن مغناطیسی با دور آرام قرار گرفت. به ازای هر گرم ژلاتین، ۰/۱ میلی‌لیتر (methacrylic anhydride) در طی مدت ۳ساعت به محلول اضافه شد و برای مدت ۳ ساعت واکنش انجام گرفت. متاکریلیک انیدرید یک مونومر واکنشی با فرمول شمیایی (C۸H۱۰O۳) و وزن مولکولی ۱۵۴/۱۶ است که اساساً در تهیه مونومرهای جدید در شرایط واکنش خفیف استفاده می‌شود. همچنین می‌تواند با گروه‌های هیدروکسیل و آمین موجود در برخی از ترکیبات آلی واکنش داده و منجر به پیوند کووالانسی جزئی متاکریلوئیل شود. از این گروه‌های عملکردی می‌تواند با موفقیت در پلیمریزاسیون بعدی یا واکنش با تیول‌ها استفاده گردد. از سدیم هیدروکسید ۱مولار برای خنثی کردن(۷/۴ pH) و توقف واکنش استفاده شد. از واکنش مستقیم ژلاتین و متاکریلیک انیدرید پلیمر ژلما ساخته شد. ژلما با آب مقطر برای ۴ روز در دمای۳۷ درجه دیالیز(کاتاف۱۲–۹کیلودالتون) و سپس لیوفلیز گشت و در دمای ۸۰ °C– ذخیره شد[۱۹].

تهیه هیدروژل سلولار: پودر لیوفلیز ژلما با استفاده اشعه فرابنفش (UV) به مدت ۴۰ دقیقه استریل گشت. سپس این پودر در Dulbecco's phosphate–buffered saline, (DPBS) شامل (2-hydroxy-1-4-(hydroxyethoxy)phenyl)-2-methyl-1-propanone ۰/۵ ٪ (w/v) به عنوان آغازگرنوری در C 60° حل کرده و به غلظت ۱۰ درصد رسید[۱۷]. تعداد ۱×۱۰^{۶} سلول با محلول ژلما مخلوط شد. محلول همگن در پلیت ۲۴–خانه با ضخامت ۱میلیمتر و قطر ۱ سانتی‌متر ریخته شد و تحت نور ماورای بنفش (UV 360 نانومتر) برای ۶۰ ثانیه ژل گشت. دیسک‌های هیدروژلی سلولار در پلیت‌های ۶–خانه حاوی محلول پرده آمنیوتیک با غلظت‌های از پیش تعیین شده قرار داده شدند و هر ۳ روز محلول قبلی برداشته و محلول جدید به آن اضافه شد. در روزهای ۳،۷ و ۱۴ میزان فعالیت متابولیکی و تکثیر سلول‌ها ارزیابی شد[۱۹].

ارزیابی زنده‌مانی سلول: تجزیه و تحلیل زنده مانی سلول‌ها در هیدروژل به روش تست Live&Dead با رنگ آمیزیAcridine orange (AO) and propidium iodide (PI) در روزهای ۳، ۷ و ۱۴ مورد ارزیابی قرار گرفت. ابتدا محلول‌های استوک (AO: 660 µmol/L، PI: 760 µmol/L) توسط PBS تهیه شد و در دمای C 4° در تاریکی نگهداری شد. درست قبل از استفاده، محلول کاری با مخلوط کردن AO (۰/۰۱ میلی‌لیتر) و PI تهیه شد. هیدروژل‌های سلولار با محلول بافر فسفات سالین(PBS) شسته شدند و در محلول AO/PI به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه و زیر میکروسکوپ فلورسانس (Olympus، IX71) مشاهده شدند. سلول‌های زنده رنگ سبز (AO) را حفظ کردند، در حالی که سلول‌های غیر زنده رنگ قرمز (PI) داشتند[۲۰،۲۱].

آزمونMTS: فعالیت متابولیکی MSCs درون هیدروژل‌ها توسط روش MTS بر اساس پروتکل سازنده ارزیابی شد. ترکیب MTS توسط سلول‌ها به یک محصول رنگی فرمازان که در محیط کشت سلولی محلول است تبدیل می‌شود. این تبدیل احتمالاً توسط NADPH یا NADH تولید شده توسط آنزیم‌های دهیدروژناز در سلول‌های فعال انجام می‌شود. مقدار محصول فورمازان با تعداد سلول‌های زنده در کشت نسبت مستقیم دارد. پس از دوره‌های انکوباسیون از پیش تعیین شده ۳،۷ و ۱۴ روزه، سلول‌ها/ هیدروژل با PBS شسته و محیط با محلول MTS (رقت ۱:۵ در محیط کشت) جایگزین شد و به مدت ۳ ساعت در تاریکی در دمای ۳۷° C و (CO_2 ۵٪) انکوبه گشت. چگالی نوری (OD) در ۴۹۰ نانومتر در صفحه خوان ELISA اندازه‌گیری شد[۲۱].

کمی سازی محتوای:DNA محتوای کل DNA برای ارزیابی تکثیر سلولی تعیین شد .هیدروژل‌های سلولار در روز ۱۴ کشت به طور کامل

همگن و محلول شدند. نمونه‌ها ۱۸ ساعت با بافر (۵۰ میلی‌مول در لیتر tris–HCl، ۵۰ میلی‌مول در لیتر EDTA، ۱ درصد وزنی SDS، ۱۰ میلی‌مول در لیتر NaCl، ۸ pH) در حضور پروتئیناز K (۱۰ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر) و در دمای 65° C تیمار شدند. پس از آن، DNA با فنل/کلروفرم استخراج و از فاز آبی با اتانول رسوب داده شد. رسوب حاصل در آب خالص بدون نوکلئاز(RNase) حل شد و غلظت DNA را در ۲۸۰ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر تعیین گشت. مقدار DNA به صورت میکروگرم بر میلی‌گرم هیدروژل (وزن خشک) بیان شد[۲۱].

تحلیل آماری

مقادیر میانگین و SD آنها و همچنین محدوده و مقادیر میانه برای هر متغیر با استفاده از برنامه نرم افزار SPSS (SPSS, Chicago, IL, USA) ۱۱ محاسبه شد. آزمون‌های تی تست برای مقایسه اثر زنده‌مانی و تکثیر انجام شد. آزمایش ناپارامتریک نیز برای سنجش MTT انجام شد. تعداد موارد برای هر آزمایش در شکل‌های مربوطه مشخص شده است. مقادیر p کمتر از ۰/۰۱ از نظر آماری معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

ارزیابی سازگاری سلولی به روش MTT

پس از ۲۴ ساعت تمامی سلول‌ها در کف چاهک پلیت ۹۶ خانه چسبیده بودند. سمیت سلول تیمار شده با محلول آمنیون با روش MTT، به طور همزمان با تکثیر سلولی در ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت ارزیابی شد (شکل ۲). نمونه‌های ۱، ۲و۳ سازگاری سلولی خوبی را در طی ۷۲ ساعت نشان دادند و افزایش قابل توجهی در مقادیر OD با توجه به افزایش غلظت محلول آمنیون از ۰/۱ تا ۱ میلی‌گرم/میلی‌لیتر داشتند(شکل۲)، اما افزایش غلظت بیشتر از ۱ میلی‌گرم/میلی‌لیتر موجب افزایش مرگ سلولی و درنتیجه میزان OD نمونه ٤ (۰/۰۱۲±۰/۳۹) در مقایسه با گروه کنترل مثبت(محیط اختصاصی کشت سلول) (۰/۰۱۰±۰/۵۸)کاهش معنی‌داری یافت.

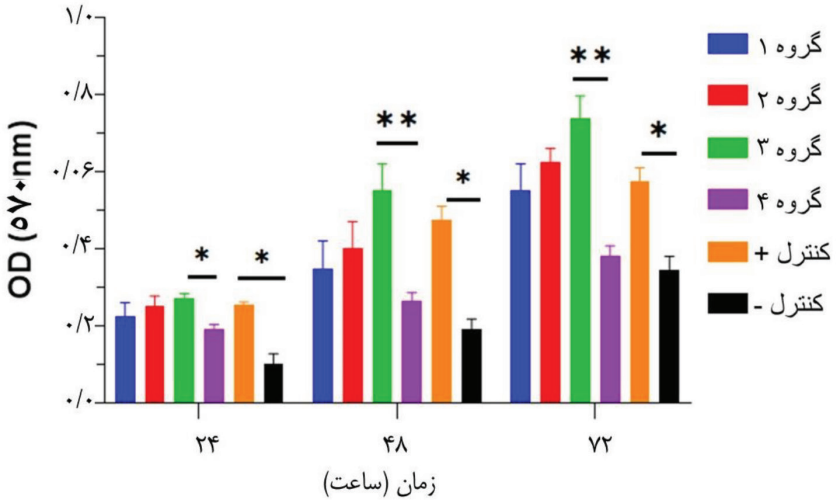
بررسی زنده‌مانی سلول

آزمون live/dead

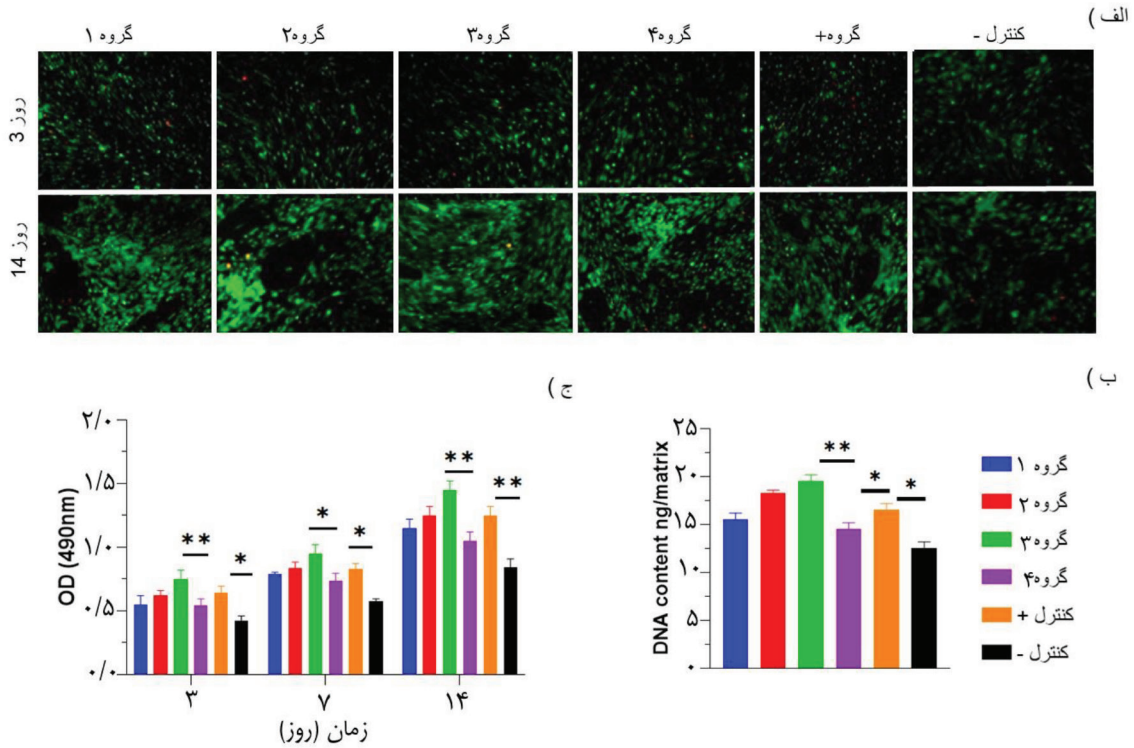
این تست به صورت کیفی میزان و پراکندگی سلول‌های زنده(سبز) و مرده(قرمز) را نشان می‌دهد. در روزهای ۳ و ١٤ نمونه هیدروژل حاوی سلول در زیر زیر میکروسکوپ فلورسانس مشاهده شد. سلول‌های بنیادی مزانشیمی زنده تعیین شده با رنگ‌آمیزی live/dead در هیدروژل‌ها نشان‌دهنده سازگاری سلولی مناسب همراه با اتصال سلولی کارآمد و در نتیجه تکثیر آن در طول ١٤ روز است که نتایج MTS را پشتیبانی می‌کند (شکل ۳الف).

آزمون MTS

ویژگی‌های سلول MSCs بارگذاری شده در این هیدروژل تحت تاثیر همزمان محلول آمنیون ارزیابی شد. سنجش MTS هیدروژل‌ها در روزهای ۳، ۷ و ١٤ به منظور ارزیابی فعالیت متابولیکی هیدروژل‌های سلولار انجام شد (شکل ۳ج) همه نمونه‌ها در طول ١٤ روز سازگاری سلولی مناسبی را



شکل ۱. بررسی سمیت محلول آمنیون بر روی سلول بنیادی مزانشیمی در بازه زمانی ۲٤،٤٨ و۷۲ ساعت. گروه۱:محلول آمنیون (۰/۱ میلی‌گرم/میلی لیتر)، گروه ۲: (۰/۵ میلی‌گرم/میلی لیتر)،گروه۳: (۱ میلی‌گرم/میلی لیتر)،گروه٤: (۱/۵ میلی‌گرم/میلی لیتر)، گروه کنترل مثبت(محیط کشت کامل) و گروه کنترل منفی(محیط کشت پایه بدون سرم)، تعداد نمونه‌ها برای هر تکرار ۳ مرتبه بود.(۰/۰۱ *، ۰/۰۰۱ **،۰/۰۰۰۱ ***)



شکل۲. زیست سازگاری هیدروژل سلولار (الف) آنالیز زنده/مرده با استفاده از رنگ‌آمیزی آکریدین اورنج/ یدید پروپیدیوم (AO/PI) برای هیدروژل‌های سلولار در مقاطع زمانی مختلف (مقیاس: ۲۰۰ میکرومتر). ب) تعیین کمیت DNA سلول‌های محصور شده در هیدروژل‌ها در طی ١٤ روز کشت ج)سنجش MTS سلول‌های بنیادی مزانشیمی بارگذاری شده در هیدروژل‌ها در مقاطع زمانی مختلف. گروه۱:محلول آمنیون (۰/۰ میلی‌گرم/میلی لیتر)، گروه ۲: (۰/۵ میلی‌گرم/میلی لیتر)،گروه۳: (۱ میلی‌گرم/میلی لیتر)،گروه٤: (۱/۵ میلی‌گرم/میلی لیتر)، گروه کنترل مثبت(محیط کشت کامل) و گروه کنترل منفی(محیط کشت پایه بدون سرم)، تعداد نمونه‌ها برای هر تکرار ۳ مرتبه بود.(۰/۰۱ *، ۰/۰۰۱ **،۰/۰۰۰۱ ***)

نشان دادند. همه گروه‌ها افزایش قابل توجهی در OD از روز ۳ تا ۷ و ١٤ داشتند. میزان متابولیسم سلولی گروه (mg/ml ۱) ۳ در روز ١٤ افزایش قابل توجهی را در مقایسه با سایر گروه‌ها و گروه کنترل نشان داد.

آزمون محتوی DNA

تکثیر سلولی در شرایط آزمایشگاهی سلول‌های کشت شده با کمی سازی محتوای DNA در ١٤ روز پس از انکوباسیون هیدروژل‌های حاوی سلول در محیط حاوی محلول آمنیون مورد بررسی قرار گرفت. میزان محتوای کل DNA در گروه ۳ آزمایش ۰/۹±۱۹/٦ نانوگرم/ماتریس بود(شکل ۳ب) و به طور قابل توجهی نسبت به گروه کنترل (۰/۲۱±١٦/٤ نانوگرم/ماتریس) و گروه‌های تیمار با محلول آمنیون افزایش داشت که این اطلاعات تست l&d را پشتیبانی می‌کند.

بحث

فاکتورهای رشد با تنظیم عملکردهای مختلف سلولی مانند تکثیر، مهاجرت، تمایز و ایجاد ارتباط بین سلول‌ها نقش مهمی در ترمیم بافت آسیب دیده دارد [۲۲،۲۳]. کاهش فاکتور رشد به دنبال آسیب سلولی و یا حذف آن توسط سیستم ایمنی یا محیط سلولی یکی از چالش‌های مهم در طب ترمیم است. فاکتورهای رشد برون زا در بحث ترمیم و بخصوص در بهبود زخم‌های پوستی مدت‌ها مورد توجه بوده است. پرده آمنیون دارای حجم زیادی از فاکتورهای رشد است و چندین کارآزمایی بالینی برای این منظور ثبت شده است. تأثیر فاکتورهای رشد بر تکثیر، تمایز و مهاجرت سلولی کاملا به غلظت آن بستگی دارد[۲۵،۲٤]. ایجیمیا و همکاران، ۲۰۱٤، گزارش کردند که تکثیر فیبروبلاست در یک فلاسک حاوی محیط کشت با bFGF بین ۲ تا ۱۰ میکروگرم در ۱۵ میلی‌لیتر تسهیل شد، اما غلظت ۵۰ میکروگرم در ۱۵ میلی‌لیتر نتوانست تکثیر فیبروبلاست را تسهیل کند [۲٦]. در این مطالعه، غلظت‌های ۰/۱، ۰/۵، ۱ و mg/ml ۱/۵ عصاره آمنیون به روش هضم بافتی تهیه شد و دوز موثر آن بر روی سلول‌های بنیادی مزانشیمی بررسی شد. ما مشاهده کردیم که در دوز بیشتر از ۱ میلی‌گرم/میلی‌لیتر، میزان کاهش معنی‌داری در چگالی نوری نسبت به سایر گروه‌ها و کنترل

داشت (شکل ۲) و این موضوع می‌تواند به دلیل تجمع سیتوکین‌ها باشد که اثرات سمیت بر سلول‌ها داشته است. در مطالعه‌ای توسط Iijima، Emi و همکاران، سلول‌های فیبروبلاست را در هیدروژل بارگذاری کردن و این سلولها در معرض فاکتور رشد EGF قرار گرفت. آنها گزارش کردند که فیبروبلاست تحت تاثیر EGF دارای فعالیت متابولیکی بیشتر بوده و میزان فاکتور رشد بیشتری تولید کرده است.این اطلاعات با داده‌های ما مطابقت داشت. در مطالعه ما، سلول‌های بنیادی مزانشیمی تحت تاثیر محلول آمنیون فعالیت متابولیکی بیشتری از خود نشان دادند. ما مشاهده کردیم که دوز ۱ میلی‌گرم/میلی لیتر این فعالیت متابولیکی را افزایش داده است. اثرات پاراکرینی فاکتورهای رشد محلول آمنیون می‌تواند منجر به افزایش زنده مانی و تکثیر سلولهای بنیادی مزانشیمی شود. ارزیابی زنده مانی MSCs با رنگ آمیزی l&d و کمی سازی آن با بررسی میزان کل محتوی DNA در ماتریس طی ۱٤ روز آن را تایید می‌کند. بر اساس نتایج ما، دوز ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر محلول آمنیون دوز بهینه جهت طب ترمیم و مطالعات مهندسی بافت می‌باشد.

تشکر و قدردانی

این مطالعه با کد رهگیری ۹۷۰۰۰۵۷۷ و کد اخلاق .IR.IR.AJAUMS REC.1398.033 در گروه جراحی و تروما دانشگاه علوم پزشکی ارتش، دانشکده پزشکی به تصویب رسید. بدین وسیله از شرکت پیشتاز طب آبادیس و آقای دکتر بهرام میرزا باباپور امیری جهت تامین محصول پرده آمنیوتیک و نهیه محلول آمنیوتیک تشکر می‌نمایم و همچنین از همه کسانی که ما را در انجام مطلوب این پژوهش یاری دادند، سپاسگزاری می‌نماییم.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می کنند که در این پژوهش هیچ گونه تعارض منافعی وجود ندارد.

سهم نویسندگان

در مقاله حاضر م.ع–الف و ز.ج در ایده و اجرای طرح، م.ا.ح و م.ع در نگارش و ا.ا در آنالیز اطلاعات نقش داشتند.

منابع مالی

این مقاله از کد رهگیری ۹۷۰۰۰۵۷۷ نویسنده اول استخراج شده است. برای این طرح از دانشگاه علوم پزشکی ارتش کمک مالی دریافت شده است.

منابع

1. Monsel, Antoine, et al. "Cell-based therapy for acute organ injury: preclinical evidence and ongoing clinical trials using mesenchymal stem cells." Anesthesiology 2014; 121.5: 1099-1121.
2. Fan, X.L.; Zhang, Y.; Li, X.; Fu, Q.L. Mechanisms underlying the protective effects of mesenchymal stem cell-based therapy. Cell. Mol. Life Sci. 2020. 0.1007/s00018-020-03454-6
3. Kolios, G.; Moodley, Y. Introduction to stem cells and regenerative medicine. Respiration 2013; 85: 3-10.
4. Sumer, H.; Liu, J.; Roh, S. Mesenchymal Stem Cells and Regenerative Medicine. Stem Cells Int. 2018; 9810972.
5. Tao, Y.C.; Wang, M.L.; Chen, E.Q.; Tang, H. Stem Cells Transplantation in the Treatment of Patients with Liver Failure. Curr. StemCell Res. Ther. 2018; 13: 193-201.
6. Lee, J.H.; Park, H.J.; Kim, Y.A.; Lee, D.H.; Noh, J.K.; Kwon, C.H.; Jung, S.M.; Lee, S.K. Differentiation and major histocompatibility complex antigen expression in human liver-derived stem cells. Transplant. Proc. 2012; 44: 1113-1115.
7. Watt SM, Gullo F, van der Garde M, Markeson D, Camicia R, Khoo CP, Zwaginga JJ . The angiogenic properties of mesenchymal stem/stromal cells and their therapeutic potential. Brit Med Bull 2013;108(1):25-53.
8. Wang, Y.; Tian, M.;Wang, F.; Heng, B.C.; Zhou, J.; Cai, Z.; Liu, H. Understanding the Immunological Mechanisms of Mesenchymal Stem Cells in Allogeneic Transplantation: From the Aspect of Major Histocompatibility Complex Class I. Stem Cells Dev. 2019; 28:1141-1150.
9. Correia CR, Reis RL, Mano JF. Design Principles and multifunctionality in cell encapsulation systems for tissue regeneration. Adv. Healthcare Mater. 2018; 7: 1701444..

10. Costa RR, Mano JF. Polyelectrolyte multilayered assemblies in biomedical technologies. Chem Soc Rev. 2014; 43: 3453-3479. 10.1039/c3cs60393h.
11. Correia, Clara R., Maryam Ghasemzadeh-Hasankolaei, and João F. Mano. "Cell encapsulation in liquified compartments: Protocol optimization and challenges." Plos one 2019;14.6: e0218045.
12. Jeon, Oju, David W. Wolfson, and Eben Alsberg. "In-situ formation of growth-factor-loaded coacervate microparticle-embedded hydrogels for directing encapsulated stem cell fate." Advanced materials 2015;27.13: 2216-2223.
13. Elkhenany, H., El-Derby, A., Abd Elkodous, M., Salah, R. A., Lotfy, A., & El-Badri, N. Applications of the amniotic membrane in tissue engineering and regeneration: the hundred-year challenge. Stem Cell Research and Therapy 2022;13(1).
14. John, T. Human amniotic membrane transplantation: Past, present, and future. In Ophthalmology Clinics of North America 2003 ; 16(1): 43-65.
15. Investigation on the safety of amniotic membrane extracts in improving diabetic foot ulcers (phase 1 clinical trial study). Iranian Journal of Diabetes and Metabolism 2019.
16. Murphy, S. V., Skardal, A., Song, L., Sutton, K., Haug, R., Mack, D. L., Jackson, J., Soker, S., & Atala, A. Solubilized Amnion Membrane Hyaluronic Acid Hydrogel Accelerates Full-Thickness Wound Healing. Stem Cells Translational Medicine 2017; 6(11): 2020-2032.
17. Li T, Xia M, Gao Y, Chen Y, Xu Y. Human umbilical cord mesenchymal stem cells: An overview of their potential in cell-based therapy. Expert Opin Biol Ther. 2015;15:1293-1306.
18. Lu L, Zhao Q, Wang X, Xu Z, Lu Y, Chen Z, Liu Y. Isolation and characterization of human umbilical cord mesenchymal stem cells with hematopoiesis-supportive function and other potentials. Haematologica 2006;91:1017.
19. Zhao, Xin, et al. "Photocrosslinkable gelatin hydrogel for epidermal tissue engineering." Advanced healthcare materials 2016;5.1:108-118.
20. Bank, H. L. "Assessment of islet cell viability using fluorescent dyes." Diabetologia 1987;30.10: 812-816.
21. Adan, Aysun, Yagmur Kiraz, and Yusuf Baran. "Cell proliferation and cytotoxicity assays." Current pharmaceutical biotechnology 2016;17.14: 1213-1221.
22. Cooper, D.M., Yu, E.Z., Hennessey, P., Ko, F. and Robson, M.C. Determination of Endogenous Cytokines in Chronic Wounds. Annals of Surgery 1994;219: 688-691.
23. Ren, Xiaochen, et al. "Growth factor engineering strategies for regenerative medicine applications." Frontiers in bioengineering and biotechnology 2020;7: 469.
24. Aguilar, Lilith M. Caballero, Saimon M. Silva, and Simon E. Moulton. "Growth factor delivery: Defining the next generation platforms for tissue engineering." Journal of controlled Release 2019;306: 40-58.
25. Thönes, Stephan, et al. "Hyaluronan/collagen hydrogels containing sulfated hyaluronan improve wound healing by sustained release of heparin-binding EGF-like growth factor." Acta biomaterialia 2019;86: 135-147.

AUMJ Journal Alborz University of Medical Sciences
Alborz University of Medical Sciences Journal, February 2024, Vol. 13, No 1: 26-33 *Review Article*

Investigating the effect of amniotic membrane solution on the behavior of human umbilical cord mesenchymal stem cells in an in vitro condition

Received: 30 Sep 2022 ; Accepted: 14 Dec 2022

Mohammad Azimi-Alamouty[1]
Mohammad-Amin Habibi[2]
Amin Ebrahimi[3],[4]
Zahra Jamalpoor[1]*

1- Trauma Research Center, Aja University of Medical Sciences, Tehran, Iran
2- Iranian tissue bank and research center, Gene, Cell and Tissue Institute, Tehran University of medical sciences
3- Department of Tissue Engineering, School of Advanced Technologies in Medicine, Royan Institute, Tehran, Iran
4- Cytotech and Bioinformatics Research Group, Tehran, Iran

***Corresponding author**:
Trauma Research Center, Aja University of Medical Sciences.
Tel: +98126011941
Email: z_jamalpoor2000@yahoo.com
z.jamlapoor@ajaums.ac.ir.

Abstract

Introduction and objectives: Mesenchymal stem cells are a promising approach for the regeneration of damaged tissues. Engineered scaffolds loaded with cells is one of the methods of cell transplantation at the site of injury. However, viability of the cells loaded in the scaffold is still a challenge. Growth factors have a proven role in increasing the metabolic activity of cells. Amniotic membrane solution is a rich source of growth factor. The aim of this study was to determine the optimal concentration of amniotic membrane solution on the behavior of mesenchymal stem cells in in vitro.

Methods: Amniotic membrane solution was prepared by enzymatic method in predetermined concentrations. Mesenchymal stem cells loaded in hydrogel were treated with different concentrations. The viability, proliferation, and metabolic activity of the cells were evaluated.

Results: Cytotoxicity of amniotic membrane solution was measured by MTT method. Increasing the concentration from 0.1 to 1 mg/ml did not show any toxicity, and at the concentration of 1.5 mg/ml, a decrease in optical density (OD=0.58±0.012) was observed compared to the control (OD=0.39±0.014). The metabolic activity of the cell loaded in the hydrogel at a concentration of 1 mg/ml had a significant increase compared to the control group (p 0.012) and the amount of DNA content in this group (19.6 ± 0.9 ng/matrix) confirmed it.

Conclusion: It is suggested that amniotic membrane solution as a rich source of growth factor with an optimal dose of 1mg/ml increases the viability and metabolic activity of the MSCs-loaded scaffold for cell therapy.

Keywords: amniotic membrane, mesenchymal stem cell, cell migration, cell proliferation