

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

چکیده

محمدعظیمی الموتی^{۱*}

محمد امین حبیبی^۲

امین ابراهیمی^{۳،۴}

زهرا جمالپور^۵

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

۴. گروه تحقیقاتی سیتوتک و بیوانفورماتیک،

تهران، ایران

مقدمه و اهداف: استفاده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی یک رویکرد امیدوارکننده برای بازسازی بافت‌های آسیب دیده است. داربست‌های مهندسی شده 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 mg/ml هیچگونه سمیت نشان نداد و در غلظت ۱/۵ mg/ml کاهش چگالی نوری ($DO=0.058 \pm 0.012$) نسبت به کنترل ($DO=0.39 \pm 0.014$) مشاهده شد. فعالیت متابولیکی سلول بارگذاری شده در هیدروژل در غلظت ۱ mg/ml افزایش معنی داری نسبت به گروه کنترل داشت ($p=0.012$) و میزان محتوی DNA در این گروه (19.6 ± 0.9 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

*نویسنده مسئول:

مرکز تحقیقات تروما، دانشگاه علوم پزشکی آجا

تهران، ایران

تلفن: +۹۸۹۱۲۶۰۱۱۹۴۱

ایمیل: z_jamalpoor2000@yahoo.com

z.jamalpoor@ajaums.ac.ir

مقدمه

اخیراً، 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 آگروژن می‌تواند اتولوگ و یا آلونژیک (غیر اتولوگ) باشد.^{۵،۶} در موارد تجویز سلول‌های بنیادی آلونژیک، سلول‌های بنیادی گیرنده اصلی کمپلکس سازگاری بافتی (MHC) را بیان می‌کنند و احتمال رد پیوند وجود دارد.^{۷،۸} 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 زیست‌شناسی سلول‌های بنیادی ترکیب می‌کند.^۹ بارگذاری سلول‌ها درون هیدروژل یکی از روش‌های عدم تحریک سیستم ایمنی می‌باشد.^{۱۰} یکی از چالش‌های بارگذاری سلول درون هیدروژل مرگ سلولی آن می‌باشد.^{۱۱} مطالعات مختلف همراهی فاکتور رشد آگروژن با سلول‌ها را برای افزایش فعالیت متابولیک و زنده ماندن سلول گزارش کردند.^{۱۲} یکی از منابع غنی از فاکتور رشد، پرده آمینوتیک است. پرده آمینوتیک لایه داخلی پرده‌های جفتی است که پس از زایمان به عنوان زیاله زیستی امحا می‌شود. غشای پایه پرده آمینوتیک به عنوان منبع ذخیره فاکتورهای رشد عمل می‌کند که مهمترین این فاکتور شامل فاکتور رشد اپیدرمی (EGF)، فاکتور رشد ترانسفورم کننده (TGF α , -b1, b2, b3)، فاکتور رشد کراتینوسیت و گیرنده آن (KGF, KGFR)، فاکتور رشد هیپوتوسیت 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 آمینوتیک (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 سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSCs) سلول‌های استرومال غیرخونی اند که توانایی تمایز به رده‌های

هر سه لایه جنینی همچون استخوان، غضروف، ماهیچه، کاردیومیوسیت، سلول‌های اندوتلیال، چربی و کراتینوسیت را دارند. این سلول‌ها از منابع مختلفی نظیر بافت چربی، مایع آمینوتیک، بند ناف و استخوان بدست می‌آیند. این سلول‌ها سبب تعدیل پاسخ ایمنی، تکثیر و مهاجرت سلول‌های کراتینوسیت و اندوتلیال، فراخوانی ماکروفاژها و سلول‌های پیش‌ساز اندوتلیال به محل زخم و رگ‌زایی 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 آمینوتیک به عنوان یک منبع دارای فاکتور رشد فراوان بررسی کردیم.

مواد و روش‌ها

تهیه محلول پرده آمینوتیک: غشای آمینوتیک 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 (0.1 N) به مدت ۴۸ ساعت در دمای 37°C 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 μ m) استریل شد. میزان پروتئین کل محلول با روش Bicinchoninic acid assay (BCA) سنجیده شد و محلول نهایی در غلظت‌های مشخص (جدول ۱) تهیه شدند.

جدول ۱. غلظت‌های مختلف محلول آمینوتیک	
گروه‌ها	غلظت (میلی‌گرم/میلی لیتر)
نمونه ۱	۰/۱
نمونه ۲	۰/۵
نمونه ۳	۱
نمونه ۴	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 تترازولیموم زرد رنگ (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide or) یا معرف MTT، به کریستال‌های فرمازان بنفش رنگ در سلول‌های

l-1-propanone به عنوان آغازگر نوری در 60°C حل کرده و به غلظت ۱۰ درصد رسید^{۱۷}. تعداد 1×10^6 سلول با محلول ژلما مخلوط شد. محلول همگن در پلیت ۲۴-خانه با ضخامت ۱ میلیمتر و قطر ۱ سانتی متر 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 آمینوتیک 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 مانای سلول‌ها در هیدروژل به روش تست Live&Dead با رنگ آمیزی Acridine orange (AO) and propidium iodide (PI) در روزهای ۳، ۷ و ۱۴ مورد ارزیابی قرار گرفت. ابتدا محلول‌های استوک (AO: $660 \mu\text{mol/L}$; PI: $760 \mu\text{mol/L}$) توسط PBS تهیه شد و در دمای 4°C در تاریکی نگهداری شد. درست قبل از استفاده، محلول کاری با مخلوط کردن AO (۰/۰۱ میلی لیتر) و PI تهیه شد. هیدروژل‌های سلولار با محلول بافر فسفات سالیین (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}.

آزمون MTS: 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 (رقط ۱:۵) در محیط کشت جایگزین شد و به مدت ۳ ساعت در تاریکی در دمای 37°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

فعال است. در واقع آنزیم‌های اکسیدو و دواکتاز 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 ۵۰۰-۶۰۰ نانومتر توسط دستگاه قابل خوانش باشد. برای این منظور سلول‌های بنیادی مزانشیمی (انستیتو پاستور، بانک سلول، تهران، ایران) تهیه و تا پاساژ چهارم در فلاسک ۲۵T کشت داده شدند. محیط (+ DMEM + 20% FBS) آنتی بیوتیک ۱٪ برای تکثیر سلولی استفاده شد^{۱۷}. تعداد 1×10^4 سلول داخل هر چاهک پلیت ۹۶-خانه ریخته شد و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور با دمای 37°C و دی اکسید کربن ۵٪ انکوبه شد. سپس محیط رویی خارج و غلظت‌های مختلف (جدول ۱) محلول پرده آمینون به سلول اضافه شد. در بازه زمانی ۸، ۲۴ و ۷۲ ساعت میزان چگالی نوری (OD) با دستگاه خوانش پلیت در طول موج ۵۷۰ نانومتر قرائت شد.

بارگذاری سلول بنیادی مزانشیمی در هیدروژل ژلما

ستتر ژلما: ژلاتین خاکی نوع A (w/v) ۱۰٪ در دو فاکتور به صورت جدا توسط PBS در دمای 60°C حل شد و بر روی همزن مغناطیسی با دور آرام قرار گرفت. به ازای هر گرم ژلاتین، ۰/۱ میلی لیتر (methacrylic anhydride) در طی مدت ۳ ساعت به محلول اضافه شد و برای مدت ۳ ساعت واکنش انجام گرفت. متاکریلیک انیدرید یک مونومر واکنشی با فرمول شیمیایی ($\text{C}_8\text{H}_{10}\text{O}_3$) 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 ۱ مولار برای خنثی کردن ($\text{V}/4$) 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 دمای 37°C درجه دیالیز (کاتاف ۹-۱۲ کیلودالتون) و سپس لیوفلیز گشت و در دمای 80°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

۲). نمونه‌های ۱، ۲ و ۳ سازگاری سلولی خوبی را در طی ۷۲ ساعت نشان دادند و افزایش قابل توجهی در مقادیر OD با توجه به افزایش غلظت محلول آمینون از ۰/۱ تا ۱ میلی گرم/میلی لیتر داشتند (شکل ۲)، اما افزایش غلظت بیشتر از ۱ میلی گرم/میلی لیتر موجب افزایش مرگ سلولی و در نتیجه میزان OD نمونه ۴ (0.39 ± 0.12) در مقایسه با گروه کنترل مثبت (محیط اختصاصی کشت سلول) (0.58 ± 0.10) کاهش معنی داری یافت.

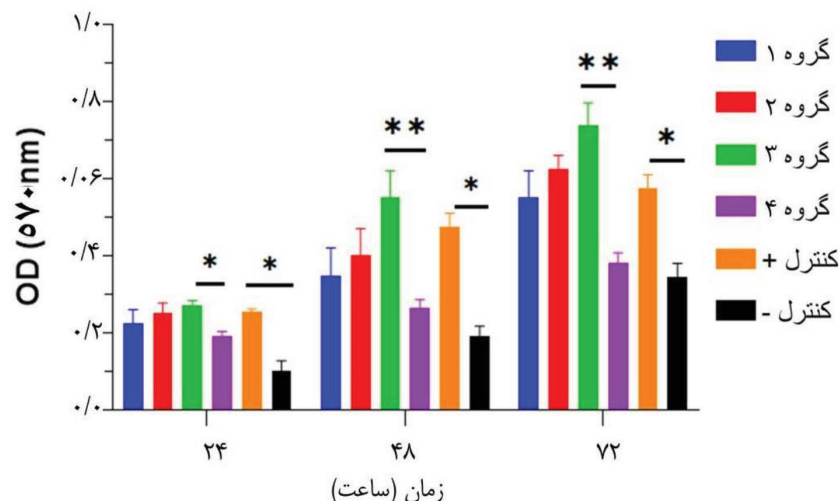
بررسی زنده‌مانی سلول

live/dead آزمون

این تست به صورت کیفی میزان و پراکندگی سلول‌های زنده (سبز) و مرده (قرمز) را نشان می‌دهد. در روزهای ۳ و ۱۴ 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 ۱۴ روز است که نتایج MTS را پشتیبانی می‌کند (شکل ۱۳ الف).

آزمون MTS

ویژگی های سلول MSCs بارگذاری شده در این هیدروژل تحت تاثیر همزمان محلول آمینون ارزیابی شد. سنسج MTS هیدروژل ها در روزهای ۷، ۳ و ۱۴ به منظور ارزیابی فعالیت متابولیکی هیدروژل های سلولار انجام شد (شکل ۳). همه نمونه ها در طول ۱۴ روز سازگاری سلولی مناسبی را



شکل ۱. بررسی سمیت محلول آمینون بر روی سلول بنیادی مزانشیمی در بازه زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت. گروه ۱: محلول آمینون (۱/۱ میلی گرم/میلی لیتر)، گروه ۲: (۰/۵ میلی گرم/میلی لیتر)، گروه ۳: (۱ میلی گرم/میلی لیتر)، گروه ۴: (۱/۵ میلی گرم/میلی لیتر)، گروه ۵: محلول مثبت (محیط کشت کامل) و گروه ۶: کنترل منفی (محیط کشت پایه بدون سرم). تعداد نمونه‌ها برای هر تکرار ۳ مرتبه بود. (۰/۰۱، *، ۰/۰۰۱، ***)

همگن و محلول شدند. نمونه‌ها ۱۸ ساعت با بافر (۵۰ میلی‌مول در لیتر HCl ، ۵۰ میلی‌مول tris-HCl ، ۱۰ درصد وزنی EDTA ، ۱۰ میلی‌مول SDS در لیتر pH ۸ NaCl) 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}

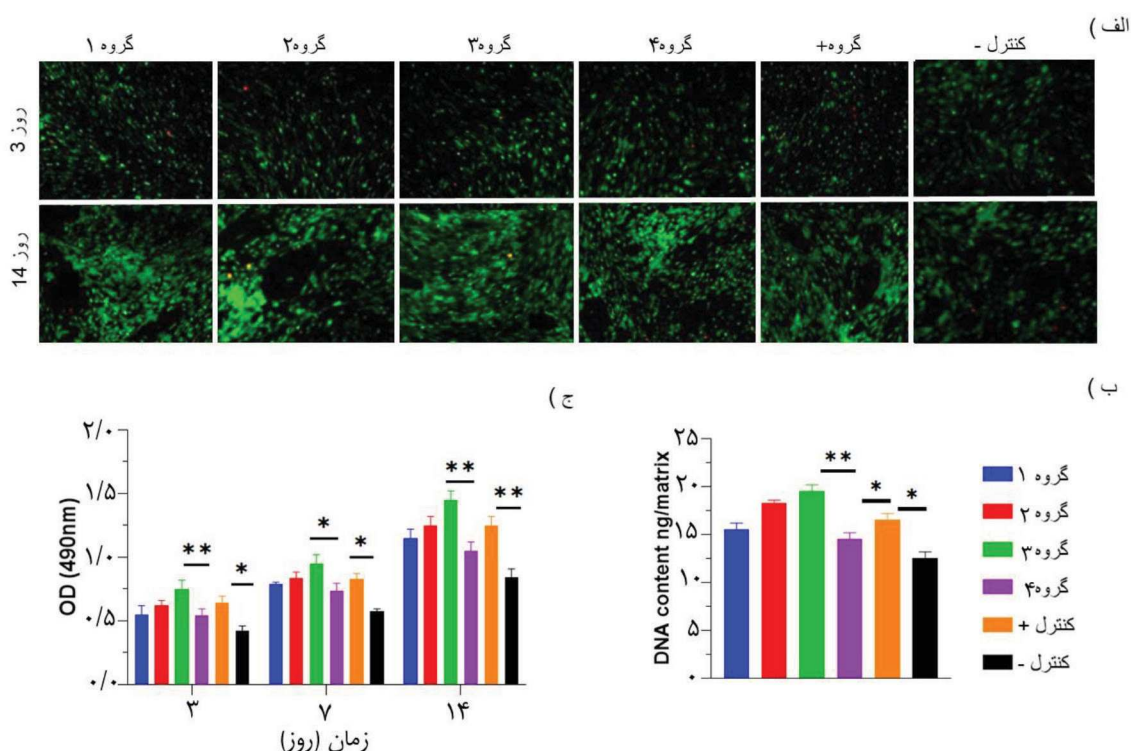
تحلیل آماری

مقادیر میانگین و SD آنها و همچنین محدوده و مقادیر میانه برای هر متغیر با استفاده از برنامه نرم افزار (SPSS, Chicago, IL) ۱۱ (USA) 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 آمینون با روش MTT، به طور همزمان با تکثیر سلولی در ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت ارزیابی شد (شکل



شکل ۲. زیست سازگاری هیدروژل سلولار (الف) آنالیز زنده/مرده با استفاده از رنگ آمیزی آکریدین اورنج / پدید پروپیدیوم (AO/PI) برای هیدروژل های سلولار در مقاطع زمانی مختلف (مقیاس: ۲۰۰ میکرومتر). (ب) تعیین کمیت DNA سلول های محصور شده در هیدروژل ها در طی ۱۴ روز کشت (ج) سنجش MTS سلول های بنیادی مزانشیمی بارگذاری شده در هیدروژل ها در مقاطع زمانی مختلف. گروه ۱: محلول آمینون (۰/۰ میلی گرم/میلی لیتر)، گروه ۲: (۰/۵ میلی گرم/میلی لیتر)، گروه ۳: (۱ میلی گرم/میلی لیتر)، گروه ۴: (۱/۵ میلی گرم/میلی لیتر)، گروه ۵: (۲ میلی گرم/میلی لیتر)، گروه کنترل مثبت (محیط کشت کامل) و گروه کنترل منفی (محیط کشت پایه بدون سرم)، تعداد نمونه ها برای هر تکرار ۳ مرتبه بود. (۰/۰۱)، (۰/۰۱)، (۰/۰۰۱)، (۰/۰۰۱) (*)**

آسیب دیده دارد ^{۲۲،۲۳}. کاهش فاکتور رشد به دنبال آسیب سلولی و یا حذف آن توسط سیستم ایمنی یا محیط سلولی یکی از چالش های مهم در طب ترمیم است. فاکتورهای رشد برون زاد در بحث ترمیم و بخصوص در بهبود زخم های پوستی مدت ها مورد توجه بوده است. پرده آمینون 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 کاملاً به غلظت آن بستگی دارد ^{۲۵،۲۶}. ایجیما و همکاران، ۲۰۱۴، گزارش کردند که تکثیر فیبروبلاست در یک فلاسک حاوی محیط کشت با bFGF بین ۲ تا ۱۰ میکروگرم در ۱۵ میلی لیتر تسهیل شد، اما غلظت ۵۰ میکروگرم در ۱۵ میلی لیتر نتوانست تکثیر فیبروبلاست را تسهیل کند ^{۲۶}. در این مطالعه، غلظت های ۰/۱، ۰/۵، ۱ و ۱/۵ mg/ml عصاره آمینون به روش هضم بافتی تهیه شد و دوز موثر آن بر روی سلول های بنیادی مزانشیمی بررسی شد. ما مشاهده کردیم که در دوز بیشتر از ۱ میلی گرم/میلی لیتر، میزان کاهش معنی داری در چگالی نوری نسبت به سایر گروه ها و کنترل

نشان دادند. همه گروه ها افزایش قابل توجهی در OD از روز ۳ تا ۷ و ۱۴ داشتند. میزان متابولیسم سلولی گروه (۱ mg/ml) در روز ۳ افزایش قابل توجهی را در مقایسه با سایر گروه ها و گروه کنترل نشان داد.

آزمون محتوی DNA

تکثیر سلولی در شرایط آزمایشگاهی سلول های کشت شده با کمی سازی محتوی DNA در ۱۴ روز پس از انکوباسیون هیدروژل های حاوی سلول در محیط حاوی محلول آمینون مورد بررسی قرار گرفت. میزان محتوی کل DNA در گروه ۳ آزمایش 19.7 ± 0.9 نانوگرم/ماتریس بود (شکل ۳ب) و به طور قابل توجهی نسبت به گروه کنترل (16.4 ± 0.21 نانوگرم/ماتریس) و گروه های تیمار با محلول آمینون افزایش داشت که این اطلاعات تست t&d را پشتیبانی می کند.

بحث

فاکتورهای رشد با تنظیم عملکردهای مختلف سلولی مانند تکثیر، مهاجرت، تمایز و ایجاد ارتباط بین سلول ها نقش مهمی در ترمیم بافت

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..

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 آمینون فعالیت متابولیکی بیشتری از خود نشان دادند. ما مشاهده کردیم که دوز ۱ میلی گرم/میلی لیتر این فعالیت متابولیکی را افزایش داده است. اثرات پاراکرینی فاکتورهای رشد محلول آمینون می‌تواند منجر به افزایش زنده ماندن و تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی شود. ارزیابی زنده ماندن مانی MSCs با رنگ آمیزی l&d و کمی سازی آن با بررسی میزان کل محتوی DNA در ماتریس طی ۱۴ روز آن را تایید می‌کند. بر اساس نتایج ما، دوز ۱ میلی گرم در میلی لیتر محلول آمینون 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 تهیه محلول آمنیوتیک تشکر می‌نمایم و همچنین از همه کسانی که ما را در انجام مطلوب این پژوهش یاری دادند، سپاسگزاری می‌نمایم.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌کنند که در این پژوهش هیچ گونه تعارض منافی 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.

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.

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-Alamouty¹
Mohammad-Amin Habibi²
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

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 ($OD=0.58\pm0.012$) was observed compared to the control ($OD=0.39\pm0.014$). 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

*Corresponding author:

Trauma Research Center, Aja University
of Medical Sciences.

Tel: +98126011941

Email: z_jamalpoor2000@yahoo.com
z.jamalpoor@ajams.ac.ir.