آماده‌سازی پانسمان زیستی به کمک پرده آمنیوتیک انسانی با هدف کاربرد در مطالعات ترمیم

سونیا ایران پور[۱و۲]، مریم مقدم متین[۱و۲و۳]، ناصر مهدوی شهری[۱]، راحله میری[۴]، حلیمه حسن زاده[۲]

[۱] گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد

[۳] گروه پژوهشی بیوتکنولوژی سلولی و مولکولی، پژوهشکده فناوری زیستی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد

[۲] گروه سلول‌های بنیادی و پزشکی ترمیمی، جهاد دانشگاهی خراسان رضوی، مشهد

[۴] مرکز پژوهشی ایدز و هپاتیت، دفتر مرکزی جهاد دانشگاهی مشهد، مشهد

matin@um.ac.ir

مقدمه

پوست انسان به عنوان یک سد فیزیکی بزرگ بین بدن و محیط اطراف، در معرض آسیب دیدگی‌های فراوانی چون سوختگی و زخم‌های ناشی از انواع بیماری‌ها قرار داشته و نقش مهمی در پیشگیری از تهاجم میکروارگانیسم‌ها و عفونت ناشی از آنها ایفا می‌کند [۱]. پس از آسیب به پوست، بسته به نوع مشکل ایجاد شده مهمترین اقدام برای کاهش مرگ و میر و احتمال بروز عفونت، برداشت آن ناحیه توسط جراحی و پیوند پوست جدید می‌باشد. با توجه به کمبود پوست دهنده و هزینه بالای آن، استفاده از جایگزین‌های پوستی و پانسمان مناسب مورد توجه ویژه‌ای قرار گرفته است [۲]. به علت نقش پانسمان‌های زیستی در حفاظت از زخم، بسته شدن سریع زخم، کاهش درد، کنترل رشد میکروبی و مزیت‌های اقتصادی، این پانسمان‌ها مورد توجه ویژه‌ای قرار گرفته‌اند [۳]. پرده آمنیوتیک به‌عنوان جایگزین پوست برای اولین بار در سال ۱۸۹۰ برای درمان زخم قربانیان سوختگی مورد استفاده قرار گرفت. سپس Davis گزارش موفقیت‌آمیز استفاده بالینی از پرده آمنیوتیک را در سال ۱۹۱۰ گزارش نمود [۴]. ۵۵ سال بعد پرده آمنیوتیک توسط Kim و Tseng برای بیماری‌های چشمی به‌کار گرفته شد [۵]. از آن زمان تا کنون به‌طور گسترده از پرده آمنیوتیک در پانسمان‌های زیستی، درمان زخم‌های ناشی از واریس و سوختگی [۶]، ترمیم و بازسازی مثانه [۷] و واژن [۸]، زخم‌های دهان و لثه [۹]، صدمات چشمی و آسیب‌های عصبی استفاده می‌شود [۱۰].

پرده آمنیوتیک داخلی‌ترین لایه جفت و بافتی نازک، فاقد سلول‌های ماهیچه‌ای، اعصاب، عروق خونی و لنفاوی است. ضخامت آن بین ۰/۵-۰/۲ میلی‌متر بوده [۱۱] و شامل ۳ بخش اپی‌تلیالی، غشای پایه و استرومایی می‌باشد [۱۲]. لایه اپی-تلیال از یک ردیف سلول‌های مکعبی یا استوانه‌ای اپی‌تلیال با منشا اکتودرمی تشکیل شده [۱۳] و خصوصیات آن‌ها مشابه با سلول‌های بنیادی می‌باشد [۱۴]. غشای پایه پرده آمنیوتیک ضخیم و شباهت زیادی به غشا پایه ملتحمه چشم داشته و اکتین، ویمنتین، سیتوکراتین، دسموپلاکین و α-اکتینین موجود در این لایه نقش مهمی در تکثیر، تمایز و جلوگیری از مرگ سلولی ایفا می‌کنند [۱۵]. لایه اسفنجی خارجی ترین بخش پرده آمنیوتیک و در مجاورت با کوریون بوده و غنی از موسین، پروتئوگلیکان، گلیکوپروتئین و کلاژن نوع III می‌باشد. پرده آمنیوتیک مواد غذایی و سایر مواد مورد نیازش را به‌طور مستقیم از طریق انتشار از مایع آمنیون و یا از لایه‌های زیرین به‌دست می‌آورد [۱۶]. این پرده با داشتن خواصی چون جلوگیری از ایجاد زخم و اسکار [۱۷]، خاصیت ضد باکتریایی [۱۸]، تحریک اپی‌تلیالیزاسیون و تمایز [۱۹, ۲۰]، ویژگی مکانیکی مناسب و ایمنی ذاتی پایین، به نظر می‌رسد می‌تواند به عنوان بستری مناسب برای جای‌گذاری سلول‌ها و پانسمان زیستی استفاده شود [۲۱, ۲۲].

امروزه از سلول‌های بنیادی به علت دارا بودن پتانسیل تمایزی بالا، قدرت تقسیم زیاد، کاهش احتمال بوجود آوردن بافت اسکار و افزایش سرعت بسته شدن زخم در سلول‌درمانی و پزشکی ترمیمی استفاده می‌شود [۲۳]. سلول‌های بنیادی بزرگسالان یکی از انواع سلول‌های بنیادی بوده که استفاده از آن‌ها انقلابی در درمان بیماری‌های حاد و مزمن ایجاد کرده است[۲۴]. از مزایای سلول‌های بنیادی بزرگسالان، تمایز آسان آن‌ها به رده سلولی خاص، عدم ایجاد تراتوما در صورت استفاده *in vivo* و عدم نیاز به لایه تغذیه کننده برای رشد می‌باشد. رعایت اخلاق و عدم نابودی رویان برای جداسازی سلول‌ها از مزایای مهم سلول‌های بنیادی بزرگسالان در مقایسه با سلول‌های بنیادی رویانی است [۲۴]. سلول‌های بنیادی مزانشیمی برای اولین بار در سال ۱۹۶۸، در مغز استخوان و با قابلیت چسبندگی به محیط کشت و تمایز به استخوان، غضروف، تاندون، چربی و عضله توسط Friedenstein و همکاران گزارش شد [۲۵]. این سلول‌ها با حضور در بافت-های بالغ چون مغز استخوان، چربی، بندناف، کبد، پالپ دندان و توانایی تبدیل به سلول‌های تمایز یافته مانند غضروف، استخوان، چربی، فیبروبلاست، استرومای حمایت کننده مغز استخوان و ... قابلیت احیا بافت را دارند [۲۶]. علاوه بر این با توجه به اثر پاراکرین این سلول‌ها و تولید انواع سیتوکین‌ها و فاکتورهای رشد به ترمیم بافت کمک می‌کنند [۲۷]. ازجمله ویژگی‌های مهم سلول‌های بنیادی مزانشیمی می‌توان به تعدیل سیستم ایمنی، تحریک مهاجرت سلول های کراتینوسیت و فیبروبلاست، فراخوانی سلول‌های پیش‌ساز اندوتلیال به محل زخم و فعالیت جهت حذف باکتری‌های موجود در محل زخم اشاره کرد [۲۸, ۲۹]. یکی از بافت‌های مناسب برای استخراج سلول‌های بنیادی مزانشیمی، بافت چربی است. چربی به مقدار زیادی در بدن وجود دارد و به‌راحتی قابل تهیه بوده و مقدار سلول‌های بنیادی آن حدود ۱۰۰۰۰۰ سلول به‌ازای یک گرم بافت چربی بوده که این مقدار در مقایسه با سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان بیشتر بوده و در عین حال خصوصیات آن‌ها در بهبود زخم مشابه سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان است. به علاوه، روش استخراج سلول‌های بنیادی مزانشیمی از مغز استخوان تهاجمی‌تر بوده و با عوارض بیشتری همراه است [۲۹].

فاطمی و همکاران در سال ۱۳۹۳ سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از چربی را بر داربست پرده آمنیوتیک کشت دادند و پانسمان حاصل را برای پوشش زخم حاصل از سوختگی های درجه ۳ در رت به‌کار بردند. هدف اصلی پژوهش آن‌ها به-کارگیری سلول‌های بنیادی برای ترمیم زخم جانوران بود.

Huang و همکاران در سال ۲۰۱۳ سلول‌های کراتینوسیت انسانی را بر روی داربست پرده آمنیوتیک کشت دادند و پانسمان حاصل را با ورقه کراتینوسیتی و داربست آمنیوتیک به تنهایی مقایسه نمودند. این محققان نشان دادند که پانسمان حاصل از سلول‌های کراتینوسیت و داربست آمنیوتیک نقش موثرتری در تشکیل اپی‌درم و بهبودی زخم دارد [۳۰]. هدف ما از این پژوهش آماده‌سازی پانسمان زیستی توسط سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از چربی انسانی کشت داده شده بر روی داربست پرده آمنیوتیک انسانی جهت کاربرد در تحقیقات ترمیمی می‌باشد.

مواد و روش

در این پژوهش، پرده آمنیوتیک پس از عمل سزارین مادران سالم از بانک بند ناف مشهد تهیه گردید و در دمای ۴ درجه سانتی گراد به آزمایشگاه منتقل شد. پس از چندین بار شستشو با بافر نمکی فسفات لخته‌های خونی حذف و پرده آمنیوتیک به قطعات کوچک تقسیم گردید و در محلول حاوی آنتی بیوتیک در فریزر ۸۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد. برای تهیه داربست، ابتدا با قرارگیری ویال حاوی پرده آمنیوتیک در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد فرایند یخ‌زدایی صورت گرفت و برای حذف سلول‌های اپی‌تلیالی از روی پرده آمنیون از NaOH۰/۵ M استفاده شد. سپس سلول‌های

بنیادی مزانشیمی مشتق از چربی انسانی از مرکز جهاد دانشگاهی مشهد تهیه و در پاساژ ۳ با تراکم ۵×۱۰^{۴} به ازای هر سانتی-متر مربع بر روی داربست در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۱ روز کشت شدند. از مطالعات بافت شناسی و میکروسکوپ الکترونی نگاره برای بررسی سلول‌زدایی استفاده و چسبندگی و بقا سلول‌ها در روزهای ۷، ۱۴ و ۲۱ توسط رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین مورد بررسی قرار گرفت. نمونه‌های برداشت شده در روزهای مختلف توسط فرمالین ۱۰٪ به مدت ۲۴ ساعت تثبیت و بلوک‌های پارافینی تهیه شد. پس از برش توسط میکروتوم، نمونه‌ها توسط هماتوکسیلین برای رنگ آمیزی هسته‌ها و پس از شستشو با ائوزین رنگ آمیزی شدند و در انتها توسط میکروسکوپ نوری مورد ارزیابی قرار گرفتند.

نتایج

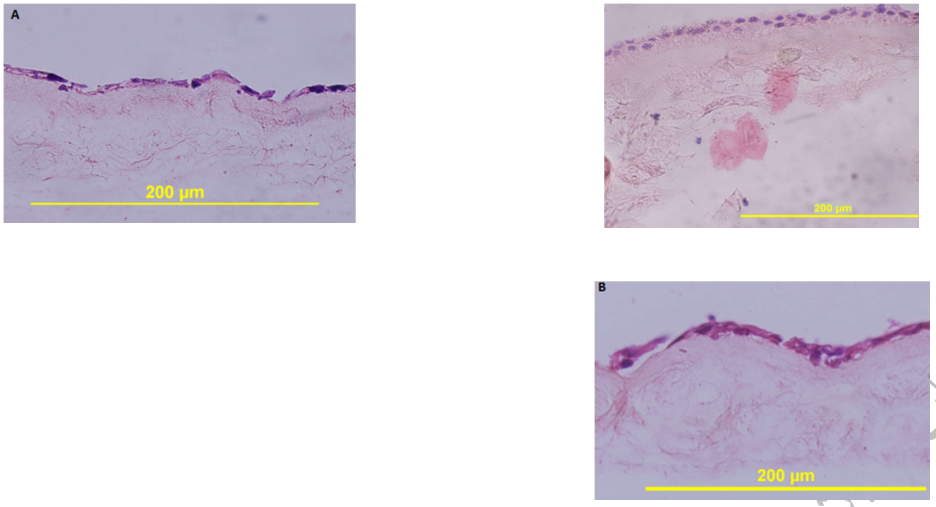
در این مطالعه از پرده آمنیوتیک انسانی سلول‌زدایی شده به عنوان بستری برای چسبندگی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از چربی استفاده گردید. برای سلول‌زدایی از NaOH ۰/۵ M استفاده شده و اجزای سلولی طی فرایند سلول‌زدایی از پرده آمنیوتیک حذف شدند (شکل ۱).

شکل ۱: پرده آمنیوتیک انسانی قبل (A) و بعد (B) از فرایند سلول‌زدایی (رنگ آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین).

به منظور بررسی بیشتر و دقیق‌تر تغییرات ساختاری پرده آمنیوتیک طی فرایند آماده سازی، داربست تهیه شده توسط میکروسکوپ الکترونی نگاره نیز مورد بررسی قرار گرفت. همانطور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود، ساختار کلی پرده آمنیوتیک پس از فرایند سلول‌زدایی حفظ شده و غشای پایه سالم باقی مانده است.

شکل ۲: بررسی پرده آمنیوتیک قبل (A) و بعد (B) از فرایند سلول‌زدایی توسط میکروسکوپ الکترونی نگاره.

در این مطالعه از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از چربی انسانی برای کشت بر روی داربست پرده آمنیوتیک انسانی استفاده گردید. بر اساس شکل ۳ سلول‌ها در هفته اول یک لایه سلول را بر روی غشای پایه تشکیل داده و در هفته‌های دوم و سوم این سلول‌ها تکثیر یافته و به ترتیب دو و سه لایه شدند.



شکل۳: مقایسه چسبندگی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از چربی بر روی داربست پرده آمنیوتیک. تشکیل یک لایه سلولی در روز ۷ (A)، دو لایه سلولی در روز ۱۴ (B) و سه لایه سلولی در روز۲۱ (C). (رنگ آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین).

بحث

آسیب‌های وارد شده به پوست به عنوان مشکلات اساسی در پزشکی مطرح شده و به علت محدودیت منابع پیوند پوست دهنده و هزینه بالای آن از پانسمان‌های زیستی استفاده می‌شود. پرده آمنیوتیک با داشتن خواصی چون جلوگیری از ایجاد زخم و اسکار، خاصیت ضد باکتریایی و ایمنی ذاتی پایین به عنوان پانسمان زیستی مورد توجه قرار گرفته است [۳۱]. علاوه بر این، ماتریکس خارج سلولی پرده آمنیوتیک غنی از پروتئوگلیکان، موسین، کلاژن، اکتین و گلیکوپروتئین بوده و این عوامل بستر مناسبی را برای تکثیر و تمایز سلول‌ها فراهم می‌کنند [۳۲]. برای انجام کارهای مهندسی بافت، انتخاب داربست مناسب اهمیت ویژه‌ای داشته و یک نوع پرکاربرد آن داربست‌های طبیعی می‌باشد. سلول‌زدایی بافت یک فرایند مهم برای تهیه داربست‌های طبیعی بوده و با هدف حذف همه مواد سلولی، حفظ خصوصیات مکانیکی و فعالیت زیستی ماتریکس خارج سلولی به‌منظور جای‌گذاری بهتر سلول‌ها وکاهش خواص آنتی‌ژنی بافت صورت می‌گیرد. روش‌های مختلفی برای سلول‌زدایی پرده آمنیوتیک پیشنهاد شده که یکی از آن‌ها تیمار به کمک NaOH می‌باشد. Saghizadeh و همکاران در سال ۲۰۱۳ از NaOH برای تهیه داربست طبیعی پرده آمنیوتیک استفاده نمودند و با مطالعات ایمنوهیستوشیمی نشان دادند که پس از سلول‌زدایی، غشای پایه، کلاژن، لامینین، نیدوژن و پرلکان حفظ شدند. از مزایای این روش سلول‌زدایی می‌توان به عدم تماس مستقیم عامل سلول‌زدایی با لایه استرومایی، خنثی شدن آسان آن پس از سلول‌زدایی، سرعت بالای سلول‌زدایی و عدم نیاز به انکوباتور اشاره نمود [۳۳]. در این پژوهش از NaOH برای سلول‌زدایی استفاده شد و مطالعات میکروسکوپ الکترونی نگاره نشان داد که پس از سلول‌زدایی بافت به کمک NaOH، ساختار کلی پرده آمنیوتیک حفظ شده و غشای پایه به عنوان عاملی برای تحریک تکثیر سلول‌ها بدون آسیب باقی مانده است. این داربست تهیه شده به عنوان بستری برای کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از چربی انسانی استفاده شد و پس از کشت سلول‌ها بر روی داربست پرده آمنیوتیک، در هفته اول یک لایه و در هفته‌های دوم و سوم به ترتیب دو و سه لایه سلولی بر روی غشای پایه مشاهده شد که مبین تکثیر سلول‌ها می‌باشد.

با توجه به اثرات پاراکرین و قابلیت بالای تمایزی سلول‌های بنیادی مزانشیمی، مطالعات زیادی در زمینه کاربرد این سلول‌ها در حوزه ترمیم زخم صورت گرفته است. تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به کراتینوسیت‌ها و فیبروبلاست‌ها منجر به تسریع بهبودی و افزایش سرعت بسته شدن زخم می‌شود [۳۴, ۳۵]. اثر حمایتی پرده آمنیوتیک بر روی تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از چربی انسانی و ارتباط متقابل بین آن‌ها می‌تواند اثرات مفید این سلول‌ها در ترمیم زخم را افزایش دهد. با توجه به برتری‌های سلول‌های بنیادی مزانشیمی و پرده آمنیوتیک در عدم ایجاد پاسخ ایمنی، این مطالعات منجر به یافتن روش مناسب‌تری برای تولید پانسمان‌های زیستی در مطالعات ترمیمی خواهد شد.

منابع

1. Suskind, R.R., *Environment and the skin.* The Medical clinics of North America, 1990. **74**(2): p. 307-324.
2. Sharma, S.C., et al., *Amniotic membrane is an effective burn dressing material.* The Japanese journal of surgery, 1985. **15**(2): p. 140-143.
3. May, S.R., *The effects of biological wound dressings on the healing process.* Clinical materials, 1991. **8**(3): p. 243-249.
4. Davis, J.S., *Skin transplantation.* Johns Hopkins Hospital Reports, 1910. **15**: p. 307-96.
5. Kim, J.C. and S.C. Tseng, *Transplantation of preserved human amniotic membrane for surface reconstruction in severely damaged rabbit corneas.* Cornea, 1995. **14**(5): p. 473-484.
6. Bose, B., *Burn wound dressing with human amniotic membrane.* Annals of the Royal College of Surgeons of England, 1979. **61**(6): p. 444.
7. Iijima, K., et al., *Transplantation of preserved human amniotic membrane for bladder augmentation in rats.* Tissue engineering, 2007. **13**(3): p. 513-524.
8. Dhall, K., *Amnion graft for treatment of congenital absence of the vagina.* BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology, 1984. **91**(3): p. 279-282.
9. Lawson, V.G., *Oral cavity reconstruction using pectoralis major muscle and amnion.* Archives of Otolaryngology, 1985. **111**(4): p. 230-233.
10. Shimazaki, J., H.-Y. Yang, and K. Tsubota, *Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction in patients with chemical and thermal burns.* Ophthalmology, 1997. **104**(12): p. 2068-2076.
11. Kesting, M.R., et al., *Amniotic membrane in oral and maxillofacial surgery.* Oral and maxillofacial surgery, 2014. **18**(2): p. 153-164.
12. Benirschke, K., P. Kaufman, and M.B. Qumsiyeh, *Pathology of the Human Placenta.* International Journal of Gynecologic Pathology, 1998. **17**(1): p. 93.
13. Toda, A., et al., *The potential of amniotic membrane/amnion-derived cells for regeneration of various tissues.* Journal of pharmacological sciences, 2007. **105**(3): p. 215-228.
14. Sri Sujan, S., et al., *The Amniotic Membrane in Oral and Maxillofacial Surgery-an Overview.* 2014.
15. Riau, A.K., et al., *Preservation, sterilization and de-epithelialization of human amniotic membrane for use in ocular surface reconstruction.* Biomaterials, 2010. **31**(2): p. 216-225.
16. Niknejad, H., et al., *Properties of the amniotic membrane for potential use in tissue engineering.* Eur Cells Mater, 2008. **15**: p. 88-99.
17. Fidel, P., et al., *Interleukin 1 Receptor Antagonist (IL 1ra) Production by Human Amnion, Chorion, and Decidua.* American journal of reproductive immunology, 1994. **32**(1): p. 1-7.
18. Kim, H.S., et al., *Endotoxin-neutralizing antimicrobial proteins of the human placenta.* The Journal of Immunology, 2002. **168**(5): p. 2356-2364.
19. Ohshima, M., et al., *Laminin and fibronectin like molecules produced by periodontal ligament fibroblasts under serum free culture are potent chemoattractants for gingival epithelial cells.* Journal of periodontal research, 2003. **38**(2): p. 175-181.

20. Meller, D. and S.C. Tseng, *Conjunctival epithelial cell differentiation on amniotic membrane.* Investigative Ophthalmology and Visual Science, 1999. **40**: p. 878-886.
21. Wilshaw, S.-P., et al., *Production of an acellular amniotic membrane matrix for use in tissue engineering.* Tissue engineering, 2006. **12**(8): p. 2117-2129.
22. Kesting, M.R., et al., *The role of allogenic amniotic membrane in burn treatment.* Journal of burn care & research, 2008. **29**(6): p. 907-916.
23. Maharlooei, M.K., et al., *Adipose tissue derived mesenchymal stem cell (AD-MSC) promotes skin wound healing in diabetic rats.* Diabetes research and clinical practice, 2011. **93**(2): p. 228-234.
24. Bongso, A. and M. Richards, *History and perspective of stem cell research.* Best practice & research Clinical obstetrics & gynaecology, 2004. **18**(6): p. 827-842.
25. AI, A.K., *Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues.* Transplantation, 1968. **6**: p. 230.
26. Tuan, R.S., G. Boland, and R. Tuli, *Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering.* Arthritis Research and Therapy, 2003. **5**(1): p. 32-45.
27. Nomura, T., et al., *Therapeutic potential of stem/progenitor cells in human skeletal muscle for cardiovascular regeneration.* Current stem cell research & therapy, 2007. **2**(4): p. 293-300.
28. Chan, B. and K. Leong, *Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations.* European spine journal, 2008. **17**(4): p. 467-479.
29. Meruane, M.A., M. Rojas, and K. Marcelain, *The Use of Adipose Tissue–Derived Stem Cells within a Dermal Substitute Improves Skin Regeneration by Increasing Neoangiogenesis and Collagen Synthesis.* Plastic and Reconstructive Surgery, 2012. **130**(1): p. 53-63.
30. Huang, G., et al., *Accelerated expansion of epidermal keratinocyte and improved dermal reconstruction achieved by engineered amniotic membrane.* Cell transplantation, 2013. **22**(10): p. 1831-1844.
31. Kim, S.S., et al., *Effects of human amniotic membrane grafts combined with marrow mesenchymal stem cells on healing of full-thickness skin defects in rabbits.* Cell and tissue research, 2009. **336**(1): p. 59-66.
32. Delo, D.M., et al., *[17]-Amniotic Fluid and Placental Stem Cells.* Methods in enzymology, 2006. **419**: p. 426-438.
33. Saghizadeh, M., et al., *A Simple Alkaline Method for Decellularizing Human Amniotic Membrane for Cell Culture.* PloS one, 2013. **8**(11): p. e79632.
34. Wu, Y., et al., *Mesenchymal stem cells enhance wound healing through differentiation and angiogenesis.* Stem cells, 2007. **25**(10): p. 2648-2659.
35. Kim, W.-S., et al., *Wound healing effect of adipose-derived stem cells: a critical role of secretory factors on human dermal fibroblasts.* Journal of dermatological science, 2007. **48**(1): p. 15-24.