



بررسی اثر القایی پیرونیلیک اسید بر بقا سلول‌های بنیادی بافت چربی انسانی بر روی پرده آمینون سلول‌زدایی شده

زهرا نیکوزاد^۱، تقی طریحی^{۱*}، محمود اعظمی^۲، سعید آبرون^۳، فریده فیضی^۴

۱- گروه علوم تشریح، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

۲- گروه مهندسی بافت، دانشکده فناوری‌های نوین، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

۳- گروه خون‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

۴- گروه علوم تشریح، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بابل، بابل، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۲/۲۳، تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۴/۰۳

چکیده

مقدمه: در علم مهندسی بافت، استفاده از سلول‌های بنیادی دارای اهمیت ویژه بوده و نقش مهمی در ایجاد بافت‌های قابل پیوند دارد. سلول‌های بنیادی استخراج شده از بافت چربی (ADSCs) از رایج‌ترین سلول‌های بنیادی مورد استفاده در درمان بسیاری از بیماری‌ها و همچنین در بهبود روند ترمیم زخم‌ها در مطالعات پیش بالینی و بالینی هستند. پرده آمینون انسانی به‌عنوان یکی از ساختارهای زیستی با ویژگی‌های خاص در مهندسی بافت کاربرد دارد. پیرونیلیک اسید (PA) یک مولکول زیستی کوچک می‌باشد که از فلفل سیاه قابل استخراج است. پیرونیلیک اسید می‌تواند مسیرهای انتقال پیام مرتبط با بقا، رشد و تکثیر سلول‌ها را فعال کند.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه، سلول‌های بنیادی استخراج شده از چربی انسانی (hADSCs) بر روی پرده آمینون سلول‌زدایی شده انسانی (DHAM)، در حضور پیرونیلیک اسید به‌عنوان مولکول کوچک در محیط کشت، کشت داده شدند، سپس بقا و تکثیر سلول‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت. بیان ژن‌های Bax و Bcl2 به‌عنوان ژن‌های مرتبط با آپوپتوز نیز با روش Real-time PCR مورد مطالعه قرار گرفت.

نتایج: نتایج رنگ‌آمیزی H&E و PI و همچنین سنجش محتوای DNA فرآیند سلول‌زدایی پرده آمینون را تأیید کردند. بقا و تکثیر hADSCs کشت شده بر روی DHAM افزایش معنی‌داری را در حضور ۷۵ میکرومولار PA نشان دادند. کشت سلولی بر روی DHAM و در حضور ۷۵ میکرومولار PA کاهش معنی‌دار بیان ژن Bax و افزایش معنی‌دار بیان ژن Bcl2 را نشان داد.

نتیجه‌گیری: نتایج مطالعه ما نشان دادند که DHAM به‌عنوان یک داربست زیستی به همراه مولکول PA می‌تواند قابلیت بقا و پتانسیل تکثیر hADSCs را در شرایط آزمایشگاهی بهبود بخشد. PA به‌عنوان مولکولی با ویژگی‌های شبیه به فاکتور رشد می‌تواند در مهندسی بافت‌های مختلف و کشت سلولی *in vitro* استفاده شود.

واژه‌های کلیدی: سلول‌های بنیادی بافت چربی، پرده آمینون سلول‌زدایی شده، پیرونیلیک اسید، بقا سلول، مهندسی بافت.

***نویسنده مسئول:** تهران، بزرگراه جلال آل احمد، پل نصر، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه علوم تشریح، تلفن: ۰۲۱-۸۲۸۳۸۹۵، فکس: ۰۲۱-۸۲۸۳۸۹۵، Email: takialtr@modares.ac.ir

ارجاع: نیکوزاد زهرا، طریحی تقی، اعظمی محمود، آبرون سعید، فیضی فریده. بررسی اثر القایی پیرونیلیک اسید بر بقا سلول‌های بنیادی بافت چربی انسانی بر روی پرده آمینون سلول‌زدایی شده. مجله دانش و تندرستی در علوم پایه پزشکی ۱۴۰۱؛ ۱۷(۴): ۲۵-۳۳.

مقدمه

زخم‌های پوستی شامل ضایعات تروماتیک، سوختگی‌ها، زخم بستر و زخم‌های مزمن مانند زخم دیابتی و غیره می‌توانند منجر به از دست رفتن سطح وسیعی از پوست، ایجاد پیامدهای شدید بالینی و حتی مرگ شوند (۱) و (۲). مهندسی بافت به‌عنوان زمینه‌ای از علم پزشکی مدرن می‌تواند با استفاده از داربست‌های سه بعدی زیست تخریب‌پذیر، منابع سلولی و مولکول‌های زیستی برای بازسازی بافت‌های مختلف و همچنین در ترمیم پوست مورد استفاده قرار گیرد (۳). استفاده از جایگزین‌های پوستی برای اولین بار در سال ۱۸۷۱ توسط ریوردین صورت پذیرفت (۴) و پس از آن تا به امروز مواد زیستی گوناگونی جهت ساخت جایگزین‌های پوستی مورد استفاده قرار گرفته است و اشکال مختلفی از جایگزین‌های مصنوعی و زیستی پوست ایجاد شده است (۵ و ۶).

از یک سو، پرده آمنیون انسانی (Human amniotic Membrane: HAM) یکی از جایگزین‌های زیستی با پتانسیل خاص برای استفاده در مهندسی بافت است (۴). این غشا، بافت نازکی است که جنین را احاطه کرده است و سه لایه اصلی دارد که این لایه‌ها شامل یک لایه اپیتلیال، یک لایه غشای پایه و یک لایه بافت همبند (۱۰-۷) می‌باشند، که در آن لایه غشای پایه متشکل از کلاژن نوع I، III، IV، V، الاستین، لامینین، فیبرونکتین و پروتوگلیکان‌ها می‌باشد (۹-۱۲). HAM به‌دلیل رهاش فاکتورهای رشد و سیتوکین‌هایی مانند فاکتور رشد اپیدرمی (EGF)، فاکتور رشد کراتینوسیتی، فاکتور رشد کبدی، فاکتور تغییردهنده رشد بتا (TGF-β)، اینترلوکین ۶ (IL-6)، IL-8 و IL-10 که توسط اپیتلیوم و ماتریکس استرومایی آن تولید می‌شوند، به‌طور گسترده‌ای به‌عنوان یک منبع طبیعی برای ساخت داربست در جراحی‌های پوست جهت درمان سوختگی‌ها استفاده می‌شود (۱۶-۱۳). علاوه بر این، HAM به‌دلیل دارا بودن خواص ضدالتهابی، ضد میکروبی، غیر آنتی‌ژنی و همچنین ویژگی‌هایی مانند در دسترس بودن، مقرون به صرفه بودن، خواص مکانیکی قابل قبول، نفوذپذیری، پایداری، کشسانی و انعطاف‌پذیری به‌عنوان یک ماده زیستی در جهت ساختن داربست‌های مورد استفاده در مهندسی بافت بسیار مورد توجه قرار گرفته است (۹، ۱۰ و ۱۷). HAM به دو صورت مورد استفاده قرار می‌گیرد: به شکل طبیعی و به شکل سلول‌زدایی شده. شکل طبیعی آن به‌عنوان پانسمان بیولوژیک در کاربردهای بالینی و شکل سلول‌زدایی شده (Decellularized Amniotic Membrane: DAM) آن به‌عنوان داربست در پزشکی باز ساختی مورد توجه می‌باشد (۹، ۱۰، ۱۸ و ۱۹). اجزای ماتریکس خارج سلولی در DAM در تعاملات و رفتارهای سلولی در شرایط آزمایشگاهی حائز اهمیت هستند. پرده آمنیون داربست ایده آلی برای رساندن سلول‌های بنیادی به بافت‌های هدف است زیرا از مواد تشکیل‌دهنده ماتریکس خارج سلولی و عوامل فعال تشکیل شده است و می‌تواند با تقلید از شرایط درون تنی رفتار سلول‌های بنیادی را در داخل بدن

پشتیبانی کند (۲۰). به‌دلیل نقش مهم ماتریکس خارج سلولی در حمایت از رشد سلولی، پرده آمنیون سلول‌زدایی شده (DAM) می‌تواند به‌عنوان یک داربست، اتصال، تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی را پشتیبانی کند (۹ و ۱۰). در مهندسی بافت، استفاده از سلول‌های بنیادی یک بخش ضروری است و نقش بسزایی در تولید بافت‌های قابل پیوند دارد (۱۰). در میان منابع متعدد سلول‌های بنیادی که در آزمایش‌های بالینی مورد استفاده قرار می‌گیرند، سلول‌های بنیادی مزانشیمی (Mesenchymal Stem Cells: MSCs) در سال‌های اخیر توجه زیادی را به خود جلب کرده‌اند (۲۰). سلول‌های بنیادی استخراج شده از چربی (Adipose-Derived Stem Cells: ADSCs) رایج‌ترین انواع سلول‌های بنیادی هستند که برای درمان انواع بیماری‌ها و همچنین بهبود روند ترمیم زخم در آزمایش‌های بالینی استفاده می‌شوند (۲۱ و ۲۲). این سلول‌ها پتانسیل خودتجدیدی دارند و می‌توانند به انواع سلول‌های تخصصی مانند سلول‌های چربی، استئوبلاست‌ها، کندروسیت‌ها، کاردیومیوسیت‌ها و نوروسیت‌ها تمایز یابند (۲۳). مطالعات زیادی DAM را به‌عنوان پانسمان بیولوژیک ارزیابی کرده‌اند (۲۴)، اما در مطالعات کمی پتانسیل کاربردی ساختار DAM و سلول‌های بنیادی با هم در بهبود زخم گزارش شده است.

پیپرونیلید اسید (PA) یک مولکول زیستی کوچک است که از لفل سلول استخراج می‌شود. این مولکول عملکردی مشابه با EGF دارد و می‌تواند سیگنال‌های مرتبط با بقا، رشد و تکثیر سلولی را فعال کند اما در مقایسه با EGF مولکولی کوچک و پایدار می‌باشد. با این حال، مطالعات تجربی مرتبط با این مولکول هنوز محدود است. هدف از این مطالعه ارزیابی اثر PA به‌عنوان ماده‌ای شبه فاکتور رشد بر بقا و تکثیر ADSC‌های انسانی (hADSCs) کشت داده شده بر روی غشای آمنیون سلول‌زدایی شده انسانی به‌عنوان یک ماتریکس خارج سلولی طبیعی و همچنین معرفی این استراتژی برای کشت و تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی بر روی پرده آمنیون سلول‌زدایی شده جهت استفاده در رویکردهای درمانی ترمیم زخم‌ها می‌باشد.

مواد و روش‌ها

غشاهای جنینی (غشاهای کوریوآمینیوتیک) در شرایط استریل از زنان اهداکننده سالمی که تحت عمل سزارین در بیمارستان محب کوثر تهران قرار گرفته بودند، جمع‌آوری شد. پس از اطلاع از هدف مطالعه، فرم‌های رضایت آگاهانه امضا شده از هر اهداکننده دریافت شد. همه اهداکنندگان قبلاً از لحاظ ابتلا به عفونت‌های قابل انتقال به انسان از جمله ایدز، هپاتیت B و C و سیفلیس غربالگری شده بودند و آزمایش همه آنها برای این ویروس‌ها و عفونت‌ها منفی بود. پرده‌های آمنیون در سرم فیزیولوژیک قرار داده و در شرایط استریل به آزمایشگاه منتقل شدند. بافت‌ها در محلول فسفات بافر (PBS) حاوی آنتی‌بیوتیک قرار داده شدند. در آزمایشگاه، پرده‌های آمنیون تازه سه مرتبه با آب مقطر سرد استریل شسته شدند. پس

(Gibco؛ FBS) کشت داده شدند. محیط کشت هر ۲ روز یکبار تعویض شد و پس از رسیدن به ۹۰٪ تراکم سلولی در فلاسک کشت، پاساژ داده شدند. پس از تریپسینه کردن، سلول‌های hADSCs با غلظت 1.0×10^5 سلول بر روی سطح اپیتلیال DHAM قرار داده شده در کف چاهک‌ها در پلیت کشت ۲۴ چاهکی کشت داده شدند. بررسی اتصال سلول‌ها بر روی DHAM از طریق میکروسکوپ الکترونی نگاره (Scanning Electron Microscopy: SEM) انجام شد.

DHAM حاوی hADSCs کشت شده بر روی آنها در محیط کشت DMEM با ۱٪ آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین/استرپتومایسین و غلظت‌های مختلف PA (Piperonylic Acid 99%, Sigma-Aldrich) شامل ۰، ۰.۲۵، ۰.۵۰، ۰.۷۵، ۱.۰۰، ۱.۲۵ و ۱.۵۰ میکرومولار در پلیت کشت ۹۶ چاهکی جهت آزمون MTT و پس از انتخاب غلظت بهینه در پلیت ۲۴ چاهکی جهت ارزیابی بیان ژن کشت داده شدند. کشت hADSCها در غیاب DHAM و PA به‌عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شد.

بقا hADSCهای کشت شده بر روی DHAM در گروه‌های آزمایش با روش MTT (-2,5-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-3-diphenyltetrazolium bromide, Sigma-Aldrich) ارزیابی شد. برای ارزیابی زنده‌مانی سلول‌ها، سلول‌ها به مدت ۴۸ ساعت در پلیت ۹۶ چاهکی کشت و سپس تریپسینه شدند و سلول‌ها با غلظت 1.0×10^3 برای سنجش MTT در هر گروه در نظر گرفته شدند. برای سنجش تکثیر، پس از ۴۸ ساعت کشت، محیط‌های کشت با ۱۰۰ میکرولیتر محلول MTT (۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در محیط کشت) در هر چاهک به مدت ۴ ساعت جایگزین شد. پس از انکوباسیون، محلول MTT خارج شد و محلول دی‌متیل سولفوکسید (Sigma-Aldrich، DMSO) برای حل کردن بلورهای فورمازان اضافه شد. پس از پیمت کردن، چگالی نوری محلول در طول موج ۵۷۰ نانومتر با استفاده از صفحه خوان الیزا (ELISA) (Anthos 2020) و Microplate Readers (UK) تجزیه و تحلیل شد.

بیان ژن‌های Bax و Bcl-2 با روش Real-time RT-PCR مورد ارزیابی قرار گرفت. سلول‌های کشت شده با تریپسینزاسیون از DHAM جدا شدند، سپس RNA کل با استفاده از معرف ترایزول طبق پروتکل سازنده (Qiagen، Ready Mini Kit)، ایالات متحده آمریکا) استخراج شد. DNA مکمل از طریق رونویسی معکوس، با استفاده از کیت سنتز (Roche، Transcript First Strand cDNA Synt)، ایالات متحده آمریکا) سنتز شد. Real-time PCR از طریق پرایمرهای اختصاصی ژن و SYBR Green PCR Master Mix (Qiagen) در سه تکرار و توسط Applied Bioscience 7500HT Fast انجام شد. توالی پرایمر در جدول ۱ نشان داده شده است. تجزیه و تحلیل منحنی ذوب برای تشخیص وجود تکثیر غیراختصاصی پس از هر اجرا انجام شد. β -اکتین به‌عنوان ژن

از حذف خون باقیمانده از بافت‌ها و مشاهده شفافیت بافت، غشاهای آمینون از غشای کوریون زیرین جدا شدند و سپس برای فرآیند سلول‌زدایی مورد استفاده قرار گرفتند.

سلول‌زدایی HAM طبق پروتکل شرح داده شده در رفرنس ۲۷ انجام شد. به‌طور خلاصه، غشای آمینون انسان با محلول EDTA 0.2% w/v در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه تیمار شد. سپس نمونه با آب مقطر سه مرتبه به مدت ۵ دقیقه شسته شد. در مرحله دوم غشای آمینون به مدت ۳۰ ثانیه در محلول NaOH 0.5 مولار غوطه‌ور شد و سپس با آب مقطر سه مرتبه به مدت ۵ دقیقه شست و شو شد. سپس نمونه در 5% NH4Cl به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد و به شدت تکان داده شد. غشای آمینون تیمار شده نهایی با یک اسکراپر سلولی خراش داده شد تا سلول‌ها از دو طرف غشاء خارج شوند. سپس نمونه‌ها با اندازه موردنیاز در گلیسرول ۸۷٪ غوطه‌ور شدند و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

برای اثبات اینکه آیا سلول‌ها با موفقیت از نمونه‌های بافت برداشته شدند، غشای آمینون سلول‌زدایی شده (DHAM، n=3) از نظر بافت‌شناسی و همچنین با سنجش محتوای DNA مورد ارزیابی قرار گرفت. برای بررسی بافت‌شناسی، نمونه‌های بافت به مدت ۴۸ ساعت در فرمالین ۱۰ درصد تثبیت شدند، با غوطه‌ور شدن در محلول اتانول با غلظت‌های فزاینده تا الکل ۱۰۰ درصد، آبیگری شدند و پس از غوطه‌ور شدن در گزیل در پارافین قالب‌گیری شدند. نمونه‌ها با استفاده از میکروتوم به ضخامت ۴ میکرومتر برش داده شدند و سپس با هماتوکسیلین و ائوزین (H&E) و تری کروم ماسون (MT) رنگ‌آمیزی شدند. در نهایت اسلایدهای بافتی رنگ‌آمیزی شده با میکروسکوپ نوری مورد مطالعه قرار گرفتند. به روشی دیگر برای تأیید عدم وجود سلول‌ها در DHAM رنگ‌آمیزی PI (Propidium iodide) به‌عنوان یک عامل intercalating فلورسنت برای رنگ‌آمیزی هسته سلول‌ها انجام شد.

سنجش محتوای DNA برای تأیید دیگری از فرآیند سلول‌زدایی با تعیین غلظت DNA در نمونه‌ها انجام شد. استخراج DNA از نمونه‌های سلول‌زدایی نشده و DHAM (n = 3) توسط کیت استخراج DNA (Invitrogen TRIzol reagent) انجام شد. بر اساس روش کیت استخراج، نمونه‌ها در محلول TRIzol لیز و همگن شدند. سپس خالص سازی DNA انجام شد. پس از خالص‌سازی، فرآیند رسوب DNA انجام شد. در نهایت، با محلول‌سازی DNA غلظت آن تعیین شد.

کشت hADSCها بر روی DHAM

hADSCها (Human Adipose-Derived Stem Cells) از بانک سلول‌های بنیادی رویان، موسسه رویان، ایران خریداری شدند و سپس در محیطی متشکل از محیط کشت DMEM (Invitrogen) همراه با ۱٪ آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین/استرپتومایسین (Sigma) و ۱۰٪ سرم جنین گاوی

- سنجش MTT

ارزیابی زنده مانی و تکثیر hADSCها بر روی DHAM در حضور غلظت‌های مختلف PA، به کمک سنجش MTT انجام شد. نتایج آزمون افزایش معنی‌دار بقا و تکثیر سلولی را در گروهی که hADSCs بر روی DHAM با غلظت ۷۵ میکرومولار PA کشت داده شده بودند نشان داد (شکل ۴). PA اثر سمی بر روی زنده مانی و تکثیر سلولی در غلظت بیش از ۱۵۰ میکرومولار نشان داد که در آن بقا و تکثیر سلولی به‌طور معنی‌داری در غلظت‌های ۱۷۵ و ۲۰۰ میکرومولار PA کاهش یافت.

- qRT-PCR

پس از ۲ هفته کشت، نتایج بیان ژن Bcl-2 در گروه تیمار شده با ۷۵ میکرومولار PA نسبت به گروه کنترل به‌طور معنی‌داری بیشتر بود (۱ در مقابل 0.5452 ± 0.3633 ، $P < 0.05$). به‌طور معنی‌دار، سلول‌های این گروه سطوح پایین‌تری از ژن Bax را نسبت به گروه کنترل بیان کردند (۱ در مقابل 0.1069 ± 0.3733 ، $P < 0.05$). نسبت Bax/Bcl-2 به‌عنوان شاخص حساسیت سلولی به آپوپتوز، کاهش قابل توجه آپوپتوز را در hADSCهای کشت داده شده روی DHAM در حضور ۷۵ میکرومولار PA نشان داد.

کنترل داخلی در نظر گرفته شد. سطح بیان هر ژن به‌صورت $2^{-\Delta CT}$ (۲۵) محاسبه و سپس به‌صورت تغییرات چندبرابری بیان شد. داده‌های حاصل از این مطالعه به کمک آزمون‌های one-way ANOVA و t-test در نرم‌افزار GraphPad Prism مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند و اختلافات معنی‌دار به‌صورت $P < 0.05$ در نظر گرفته شد.

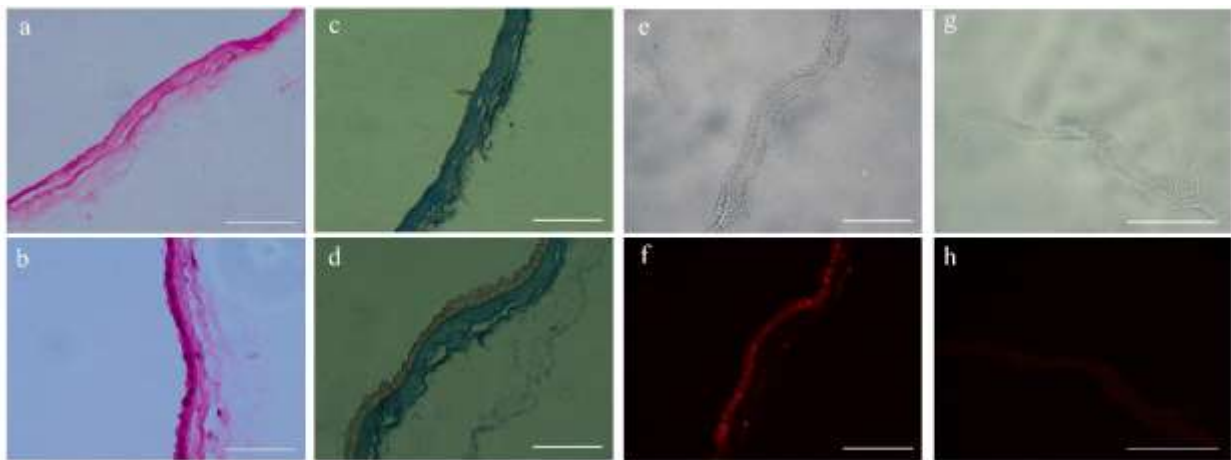
نتایج

- بررسی بافت‌شناسی DHAM در مقایسه با HAM دست نخورده رنگ‌آمیزی‌های بافت‌شناسی نشان دادند که لایه اپیتلیال به‌طور کامل از روی غشای پایه DHAM حذف شده بود. همچنین دستجات الیاف کلاژن نیز در لایه اسفنجی DHAM مشاهده شدند (شکل ۱). رنگ‌آمیزی PI همچنین نشان داد که لایه اپیتلیال پس از فرآیند سلول‌زدایی حذف شده بود (شکل ۱).

سنجش محتوای DNA برای بررسی حضور DNA در DHAM کاهش قابل توجهی را در مقایسه با HAM دست نخورده نشان داد (شکل ۲). این ارزیابی همچنین تأیید دیگری بر موفقیت فرآیند سلول‌زدایی بود.

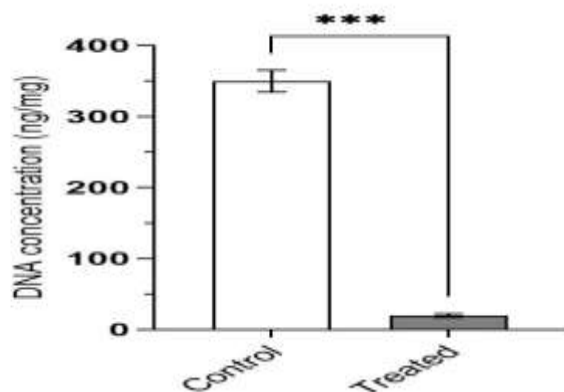
- بررسی اتصال hADSCها بر روی DHAM

میکروگراف الکترونی توسط SEM نشان داد که اتصال hADSCها بر روی DHAM با تراکم مناسب همان‌طور که در شکل ۳ نشان داده شده است انجام شده بود.

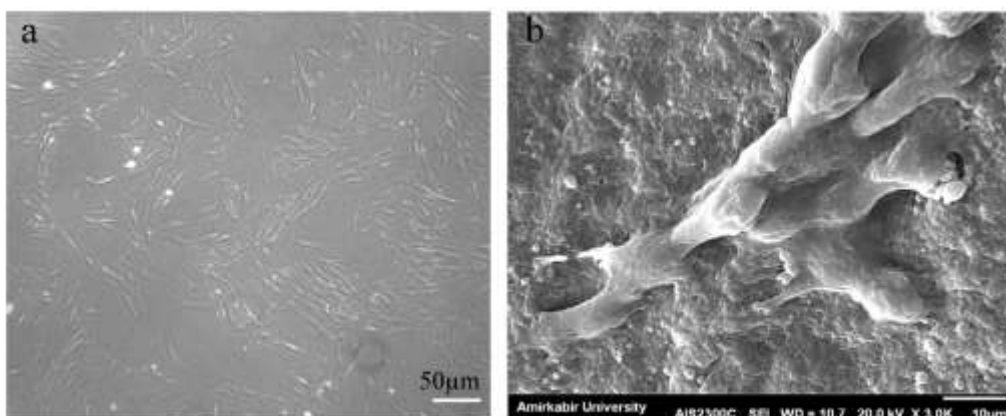


شکل ۱- ارزیابی بافت‌شناسی پرده آمینون سلول‌زدایی شده

رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین در پرده آمینون سلول‌زدایی شده (a) پرده آمینون دست نخورده (b)، رنگ‌آمیزی تری کروم ماسون در پرده آمینون سلول‌زدایی شده (c) پرده آمینون دست نخورده (d). رنگ‌آمیزی PI برای ارزیابی حضور سلول‌ها بر روی پرده آمینون دست نخورده (e) تصویر فاز کنتراست و f تصویر میکروسکوپ فلورسنت) پرده آمینون سلول‌زدایی شده (g) تصویر فاز کنتراست و h تصویر میکروسکوپ فلورسنت). {PI: propidium iodide} Scale bar = 50 μm, Abbreviation, }

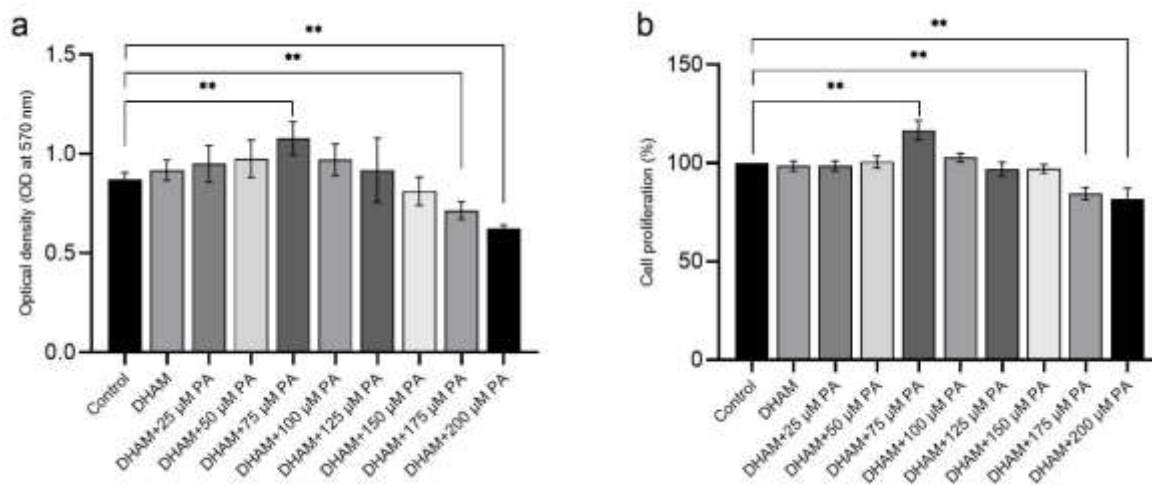


شکل ۲- سنجش محتوای DNA



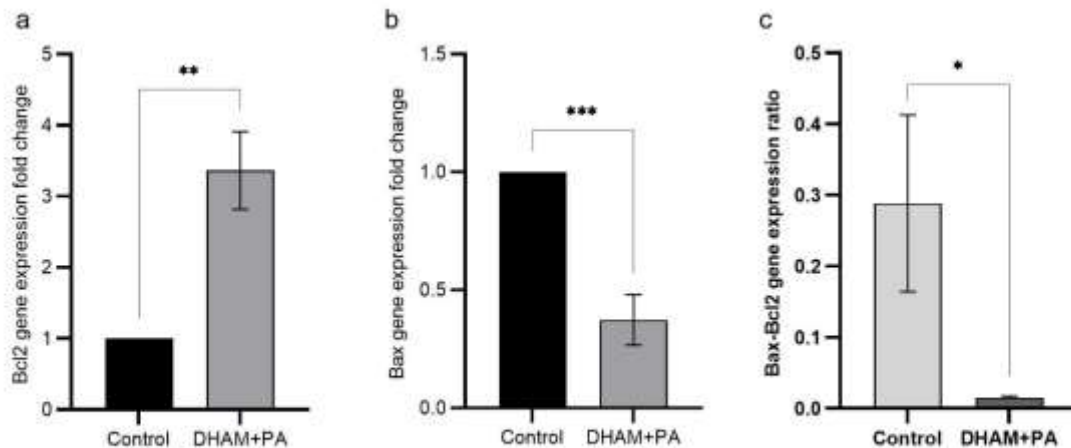
شکل ۳- a- تصویر فاز متضاد سلول‌های hADSCs در شرایط کشت معمولی در فلاسک کشت. b- تصویر میکروسکوپ الکترونی SEM سلول‌های hADSCs بر روی داربست DHAM

تصاویر اتصال سلول‌ها و مورفولوژی آنها را بر روی بستر نشان می‌دهد. (Abbreviation, SEM: scanning electron microscopy, hADSC: human adipose derived stem cell, DHAM: decellularized human amniotic membrane)



شکل ۴- آزمون MTT جهت ارزیابی بقا و تکثیر سلول‌های hADSCs بر روی DHAM و در حضور غلظت‌های مختلف PA در محیط کشت

نمودار a نشان می‌دهد که سلول‌ها بر روی DHAM و حضور 75 μM PA بقا بیشتری داشتند و PA در غلظت‌های ۱۷۵ و ۲۰۰ μM اثر سمی داشته است. نمودار b نشان می‌دهد که سلول‌ها بر روی DHAM و حضور 75 μM PA دارای قدرت تکثیر بیشتر و در غلظت‌های ۱۷۵ و ۲۰۰ μM توان تکثیری کمتری داشته‌اند. اختلافات معنی‌دار با * نمایش داده شده‌اند. (Abbreviation, DHAM: decellularized human amniotic membrane, PA: piperonylic acid)



شکل ۵- بیان ژن‌های مرتبط با آپوپتوز. بیان ژن‌های Bax و Bcl2 به روش Real-time PCR (a و b) و همچنین نسبت بیان Bax/Bcl-2 نیز (c) نشان داده شده است. (Abbreviation, DHAM: decellularized human amniotic membrane, PA: piperonylic acid)

بحث

داربست‌های زیستی تولید شده به‌طور قابل توجهی برای محافظت از ترمیم زخم‌ها در مهندسی بافت پوست استفاده شده‌اند (۲۷). پرده آمیون انسانی یکی از قدیمی‌ترین داربست‌های سه بعدی است که برای اولین بار به‌عنوان جایگزین زیستی در پیوند پوست استفاده شده است (۱۰). پرده آمیون بافت نیمه شفاف نازکی است که متشکل از سلول‌ها و ECM بوده و اطراف جنین را احاطه کرده است. از آغاز قرن بیستم، از پرده آمیون (AM) به‌عنوان زخم‌پوش برای درمان و ترمیم سوختگی پوست استفاده شده است (۲۸). اولین گزارش استفاده از پرده آمیون تازه برای درمان زخم‌های پوستی به سال ۱۹۱۰ و مطالعه J.S. دیویس بر می‌گردد (۲۹). AM به‌صورت طبیعی و یا سلول زدایی شده در زمینه‌های مختلف پزشکی از جمله درماتولوژی، جراحی مغز و اعصاب، اختلالات دستگاه ادراری، جراحی لگن و بازسازی مصنوعی واژن مورد استفاده قرار گرفته است. (۱۶ و ۳۰). یک داربست مناسب باید دارای ویژگی‌هایی مانند زیست سازگاری، زیست تخریب‌پذیری و خواص مکانیکی مناسب باشد و همچنین بتواند به راحتی با بافت میزبان ادغام شود تا ریزمحیطی مناسب برای حمایت از رشد، تکثیر و تمایز سلولی را فراهم کند (۳۱). پرده آمیون به‌عنوان یک داربست بیولوژیکی به‌دلیل دارا بودن ویژگی‌هایی همچون زیست سازگاری، زیست تخریب‌پذیری و خواص مکانیکی مناسب مانند کشسانی، انعطاف پذیری و همچنین نفوذپذیری، به‌طور گسترده‌ای در پزشکی بازساختی

هدف اصلی این مطالعه ایجاد یک ماتریکس سه بعدی از جنس پرده آمیون به‌عنوان یک سیستم تحویل سلولی در حضور مولکول زیستی کوچک PA به‌عنوان القاکننده رشد برای ADSC‌های کشت داده شده بود. در مطالعه حاضر، hADSC‌ها بر روی داربست پرده آمیون سلول‌زدایی شده انسانی در حضور PA کشت شدند. نتایج ما بر اساس تصاویر SEM و سنجش MTT، اتصال ADSC‌ها به سطح DAM را نشان داد و همچنین بقا و ظرفیت تکثیر این سلول‌ها را بر روی DAM تأیید کرد. همچنین نتایج این مطالعه نشان داد که حضور PA در محیط کشت می‌تواند این شاخص‌ها را بهبود بخشد.

آسیب‌های پوستی که منجر به از دست رفتن تمام ضخامت پوست می‌شوند در کنار دیگر آسیب‌های عمیق پوستی، چالش‌های مهمی در درماتولوژی و جراحی پلاستیک هستند. در طول دهه‌های گذشته، نتایج موفقیت‌آمیز و پیشرفت‌های گسترده‌ای در استفاده از جایگزین‌های پوستی به‌دست آمده است. با این حال، معمولاً جایگزین‌های پوستی رایج مانند پانسمان و همچنین پیوندهای پوستی قادر به ترمیم کامل پوست و دستیابی به ویژگی‌های پوست سالم نیستند و باید مشکلاتی مانند کمبود افراد اهداکننده، عفونت محل زخم، هزینه‌های بالا و تشکیل اسکار هیپرتروفیک را نیز در نظر گرفت (۲۱ و ۲۶). تا به امروز، بسیاری از

منابع ذکر شده جداسازی کرد، اما دسترسی کافی به مقادیر انبوه EGF دشوار است. بنابراین، استفاده از مولکول‌های کوچک طبیعی ایمن با پایداری مناسب برای جایگزینی با این فاکتور رشد مفید خواهد بود. پیرونیلیک اسید یک ترکیب مشتق شده از فلفل سیاه می‌باشد که می‌تواند فعالیت EGF را از طریق القای مسیر انتقال پیام گیرنده EGF تقلید کند (۳۶). ما در این مطالعه مشاهده کردیم که PA می‌تواند پتانسیل تکثیر و بقا سلول‌های hADSC را در محیط کشت بهبود بخشد. علاوه بر این، بیان ژن‌های Bax و Bcl2 تأیید کرد که PA می‌تواند آپوپتوز سلولی را سرکوب کند و سلول‌های قرار گرفته در معرض PA، پتانسیل بیشتری برای بقا در شرایط آزمایشگاهی دارند. از آنجایی که PA خواصی شبیه به EGF دارد، می‌توان آن را به‌عنوان یک شبه فاکتور رشد برای کشت سلول‌های بنیادی در شرایط آزمایشگاهی معرفی کرد. علاوه بر این، PA دارای فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی است که دلیل دیگری برای استفاده بالقوه آن در بهبود روند ترمیم زخم است. ما PA را به‌عنوان یک مولکول کوچک برای کاربرد در مهندسی بافت توصیه می‌کنیم، به‌طوری‌که که می‌توان از آن به‌عنوان یک فاکتور رشد در داربست‌ها و دیگر سازه‌های مهندسی شده به منظور حمایت بیشتر از سلول‌ها در محل‌های پیوند استفاده کرد. بر اساس خواص شبه فاکتور رشدی PA، می‌توان از آن برای کشت منابع مختلف سلول‌های بنیادی در شرایط آزمایشگاهی و همچنین برای حفظ بقای سلول در سیستم‌های تحویل سلولی استفاده کرد.

PA یک مولکول طبیعی کوچک است که با خاصیت شبه فاکتور رشدی خود می‌تواند همراه با DHAM و همچنین دیگر سازه‌های مهندسی بافت مورد استفاده قرار گیرد و کارایی سازه را در پشتیبانی از بقا و تکثیر سلولی افزایش دهد. DHAM نیز به‌عنوان یک ECM طبیعی می‌تواند بستر مناسبی برای اتصال سلول‌ها باشد و از بقا و تکثیر سلول‌ها در کاربردهای بالینی حمایت کند.

تشکر و قدردانی

این مطالعه توسط کمیته اخلاق دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس (شناسه تأیید شده: IR.MODARES.REC.1397.083) تأیید شده است و نویسندگان از حمایت‌های مالی دانشگاه تربیت مدرس کمال تشکر و قدردانی را دارند.

References

1. Bacakova L, Zikmundova M, Pajorova J, Broz A, Filova E, Blanquer A, et al. Nanofibrous scaffolds for skin tissue engineering and wound healing based on synthetic polymers. Applications of Nanobiotechnology 2019;1. doi: 10.5772/intechopen.88744
2. Das U, Behera SS, Singh S, Rizvi SI, Singh AK. Progress in the Development and Applicability of Potential Medicinal Plant Extract-Conjugated Polymeric Constructs for Wound Healing and Tissue Regeneration. Phytother Res 2016;30:1895-904. doi: 10.1002/ptr.5700

مورد استفاده قرار گرفته است (۱۰). در مطالعات صورت گرفته جهت سلول زدایی HAM، روش‌های شیمیایی و آنزیمی متفاوتی مورد آزمایش قرار گرفته است. اگرچه این روش‌ها به طور موثری سلول‌ها را حذف می‌کنند، اما عموماً زمان‌بر و پرهزینه می‌باشند و ممکن است ساختار ECM را تغییر دهند. قلی پور ملک‌آبادی و همکاران در سال ۲۰۱۵ در مطالعه خود یک روش ساده و ارزان را بر اساس تکنیک‌های شیمیایی و مکانیکی برای سلول‌زدایی HAM منتشر کردند (۳۲). در مطالعه ما، روش سلول‌زدایی بر اساس روش قلی پور ملک‌آبادی و همکاران (۳۲) انجام شد و نتایج مشابه مشاهده گردید. در مطالعه ما همسو با مطالعات مشابه گذشته، نتایج رنگ‌آمیزی H&E و PI و همچنین بررسی محتوای DNA پرده آمینون پس از سلول‌زدایی، کارایی روش مورد استفاده را تأیید کردند. hADSCها بر روی پرده آمینون سلول‌زدایی شده کشت داده شدند و کارایی DHAM به‌عنوان یک حامل و پشتیبان برای رشد سلول‌های hADSC مورد بررسی قرار گرفت. هر دو روش MTT و بیان ژن Bax/Bcl2 به‌طور معنی‌داری نشان دادند که DHAM هیچ اثر سمی بر روی سلول‌های کشت داده شده ندارد. همسو با نتایج مطالعه ما، Moravvej و همکاران در سال ۲۰۲۱ بقا و قابلیت تکثیر سلول‌های فیبروبلاستی بر روی پرده آمینون سلول‌زدایی شده را به کمک روش‌هایی مشابه با مطالعه ما بررسی و گزارش کردند. گزارش آن‌ها نشان داد که سلول‌های فیبروبلاستی قادرند به پرده آمینون سلول‌زدایی شده انسان در محیط کشت متصل شوند و توان بقا و تکثیر خود را نیز حفظ کنند (۳۳). ویژگی اتصال سلولی داربست‌های مهندسی بافت بسیار حائز اهمیت است زیرا که می‌تواند عمیقاً بر کارایی داربست تأثیر بگذارد. به همین دلیل، چسبندگی hADSCs کشت داده شده بر روی DHAM با تصویربرداری SEM ارزیابی شدند و میکروگراف‌های الکترونی اتصال فعال سلول‌ها به DHAM را نشان دادند. این ویژگی مناسب DHAM می‌تواند آن را به‌عنوان یک کاندید مناسب در رویکردهای بازسازی پوست معرفی کند.

بهبود زخم فرآیندی فعال است که شامل مراحل التهاب، تکثیر و بازسازی ماتریکس خارج سلولی است که در این روند انواع مختلف سلول‌ها و فاکتورهای مربوط باعث بهبود روند ترمیم زخم و بازسازی بافت پوست می‌گردند. از میان فاکتورهای دخیل، فاکتورهای رشد، عناصر اصلی و مهم در روند ترمیم زخم می‌باشند (۳۴). از آنجا که سلول‌های فیبروبلاست و همچنین کراتینوسیت‌ها گیرنده‌هایی با میل ترکیبی بالا برای اتصال به فاکتور رشد اپیدرمی (EGF) بیان می‌کنند، استفاده از EGF به‌عنوان یکی از مؤثرترین فاکتورهای رشد مورد مطالعه در رویکردهای بالینی در فرآیند ترمیم زخم بوده است. EGF می‌تواند تکثیر و بقای سلول‌ها را افزایش دهد و همچنین سبب تسهیل بازسازی سلول‌های اپیدرمی و فیبروبلاستی در روند بهبود زخم گردد (۳۵). EGF انسانی در ادرار، بزاق، شیر و پلاسما انسان قابل شناسایی می‌باشد. این پلی‌پپتید تک زنجیره‌ای را می‌توان از

3. Pandey AR, Singh US, Momin M, Bhavsar C. Chitosan: Application in tissue engineering and skin grafting. *Journal of Polymer Research* 2017;24:1-22. doi:10.1007/s10965-017-1286-4
4. Farhadhosseinabadi B, Farahani M, Tayebi T, Jafari A, Biniastian F, Modaresifar K, et al. Amniotic membrane and its epithelial and mesenchymal stem cells as an appropriate source for skin tissue engineering and regenerative medicine. *Artif Cells Nanomed Biotechnol* 2018;46:431-40. doi: 10.1080/21691401.2018.1458730
5. Norouzi M, Boroujeni SM, Omidvarkordshouli N, Soleimani M. Advances in skin regeneration: application of electrospun scaffolds. *Adv Healthc Mater* 2015;4:1114-33. doi: 10.1002/adhm.201500001
6. Vig K, Chaudhari A, Tripathi S, Dixit S, Sahu R, Pillai S, et al. Advances in Skin Regeneration Using Tissue Engineering. *Int J Mol Sci* 2017;18. doi: 10.3390/ijms18040789
7. Mohamad H. Anatomy and embryology of human placenta, amnion and chorion. *The Scientific Basis of Tissue Transplantation: World Scientific*; 2001. p.139-48.
8. Bourne GL. The microscopic anatomy of the human amnion and chorion. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 1960;79:1070-3. doi: 10.1016/0002-9378(60)90512-3
9. Ramuta TZ, Kreft ME. Human Amniotic Membrane and Amniotic Membrane-Derived Cells: How Far Are We from Their Use in Regenerative and Reconstructive Urology? *Cell Transplant* 2018;27:77-92. doi: 10.1177/0963689717725528
10. Niknejad H, Peirovi H, Jorjani M, Ahmadiani A, Ghanavi J, Seifalian AM. Properties of the amniotic membrane for potential use in tissue engineering. *Eur Cells Mater* 2008;15:88-99. doi: 10.22203/ecm.v015a07
11. Farazdaghi M, Adler J, Farazdaghi SM. Electron Microscopy of Human Amniotic Membrane. *The scientific basis of tissue transplantation: World Scientific*; 2001. p. 149-71. doi: 10.1142/9789812811400_0011
12. Parry S, Strauss JF. Premature rupture of the fetal membranes. *New England Journal of Medicine* 1998;338:663-70. doi: 10.1056/NEJM199803053381006
13. Wilshaw SP, Kearney JN, Fisher J, Ingham E. Production of an acellular amniotic membrane matrix for use in tissue engineering. *Tissue Eng* 2006;12:2117-29. doi: 10.1089/ten.2006.12.2117
14. Gholipourmalekabadi M, Bandehpour M, Mozafari M, Hashemi A, Ghanbarian H, Sameni M, et al. Decellularized human amniotic membrane: more is needed for an efficient dressing for protection of burns against antibiotic-resistant bacteria isolated from burn patients. *Burns* 2015;41:1488-97. doi: 10.1016/j.burns.2015.04.015
15. Salah RA, Mohamed IK, El-Badri N. Development of decellularized amniotic membrane as a bioscaffold for bone marrow-derived mesenchymal stem cells: ultrastructural study. *J Mol Histol* 2018;49:289-301. doi: 10.1007/s10735-018-9768-1
16. Dadkhah Tehrani F, Firouzeh A, Shabani I, Shabani A. A Review on Modifications of Amniotic Membrane for Biomedical Applications. *Front Bioeng Biotechnol* 2020;8:606982. doi: 10.3389/fbioe.2020.606982
17. Inge E, Talmi YP, Sigler L, Finkelstein Y, Zohar Y. Antibacterial properties of human amniotic membranes. *Placenta* 1991;12:285-8. doi: 10.1016/0143-4004(91)90010-d
18. Gilpin A, Yang Y. Decellularization Strategies for Regenerative Medicine: From Processing Techniques to Applications. *Biomed Res Int* 2017;2017:9831534. doi: 10.1155/2017/9831534
19. Gholipourmalekabadi M, Sameni M, Radenkovic D, Mozafari M, Mossahebi-Mohammadi M, Seifalian A. Decellularized human amniotic membrane: how viable is it as a delivery system for human adipose tissue-derived stromal cells? *Cell Prolif* 2016;49:115-21. doi: 10.1111/cpr.12240
20. Goodarzi P, Alavi-Moghadam S, Sarvari M, Tayanloo Beik A, Falahzadeh K, Aghayan H, et al. Adipose Tissue-Derived Stromal Cells for Wound Healing. *Adv Exp Med Biol* 2018;1119:133-49. doi: 10.1007/5584_2018_220
21. Aghayan HR, Hosseini MS, Gholami M, Mohamadi-Jahani F, Tayanloo-Beik A, Alavi-Moghadam S, et al. Mesenchymal stem cells' seeded amniotic membrane as a tissue-engineered dressing for wound healing. *Drug Deliv Transl Res* 2021; doi: 10.1007/s13346-021-00952-3
22. Zhang J, Liu Y, Chen Y, Yuan L, Liu H, Wang J, et al. Adipose-Derived Stem Cells: Current Applications and Future Directions in the Regeneration of Multiple Tissues. *Stem Cells Int* 2020;2020:8810813. doi: 10.1155/2020/8810813
23. Miana VV, Gonzalez EAP. Adipose tissue stem cells in regenerative medicine. *Ecancermedicalscience* 2018;12:822. doi: 10.3332/ecancer.2018.822
24. Zelen CM, Snyder RJ, Serena TE, Li WW. The use of human amnion/chorion membrane in the clinical setting for lower extremity repair: a review. *Clin Podiatr Med Surg*. 2015;32:135-46. doi: 10.1016/j.cpm.2014.09.002
25. Pfaffl MW, Bustin S. AZ of quantitative PCR. Quantification strategies in real-time PCR. 2004;1:87-112.
26. Kohlhauser M, Luze H, Nischwitz SP, Kamolz LP. Historical Evolution of Skin Grafting-A Journey through Time. *Medicina* 2021;57. doi: 10.3390/medicina57040348
27. Fu X, Li H. Mesenchymal stem cells and skin wound repair and regeneration: possibilities and questions. *Cell Tissue Res* 2009;335:317-21.
28. Murphy SV, Skardal A, Nelson RA, Jr., Sunnon K, Reid T, Clouse C, et al. Amnion membrane hydrogel and amnion membrane powder accelerate wound healing in a full thickness porcine skin wound model. *Stem Cells Transl Med* 2020;9:80-92. doi: 10.1002/sctm.19-0101
29. Yusof N, Hilmy N. Historical development of amnion. *Human Amniotic Membrane: Basic Science and Clinical Application: World Scientific*; 2018. p.73-86. doi: 10.1142/9789813226357_0004
30. Trelford JD, Trelford-Sauder M. The amnion in surgery, past and present. *Am J Obstet Gynecol* 1979;134:833-45. doi: 10.1016/0002-9378(79)90957-8
31. Nigam R, Mahanta B. An overview of various biomimetic scaffolds: Challenges and applications in tissue engineering. *Journal of Tissue Science & Engineering* 2014;5:1. doi: 10.4172/2157-7552.1000137
32. Gholipourmalekabadi M, Mozafari M, Salehi M, Seifalian A, Bandehpour M, Ghanbarian H, et al. Development of a Cost-effective and simple protocol for decellularization and preservation of human amniotic membrane as a soft tissue replacement and delivery system for bone marrow stromal cells. *Adv Healthc Mater* 2015;4:918-26. doi: 10.1002/adhm.201400704
33. Moravvej H, Memariani H, Memariani M, Kabir-Salmani M, Shoaie-Hassani A, Abdollahimajid F. Evaluation of Fibroblast Viability Seeded on Acellular Human Amniotic Membrane. *BioMed Research International* 2021;2021:5597758. doi: 10.1155/2021/5597758
34. Park JW, Hwang SR, Yoon IS. Advanced Growth Factor Delivery Systems in Wound Management and Skin Regeneration. *Molecules* 2017;22. doi: 10.3390/molecules22081259
35. Norouzi M, Shabani I, Atyabi F, Soleimani M. EGF-loaded nanofibrous scaffold for skin tissue engineering applications. *Fibers and Polymers* 2015;16:782-7. doi: 10.1007/s12221-015-0782-6
36. Lee D, Lim J, Woo KC, Kim KT. Piperonylic acid stimulates keratinocyte growth and survival by activating epidermal growth factor receptor (EGFR). *Sci Rep* 2018;8:162. doi: 10.1038/s41598-017-18361-3



Viability of Human Adipose-Driven Stem Cells Seeded on Decellularized Amniotic Membrane Combined with Piperonylic Acid Induction

Zahra Nikoozad (Ph.D. Student)¹, Taki Tiraihi (Ph.D.)^{1*}, Mahmoud Azami (Ph.D.)², Saeid Abroun (Ph.D.)³, Farideh Feizi (Ph.D.)⁴

1- Dept. of Anatomical Sciences, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

2- Dept. of Tissue Engineering, School of Advanced Technologies in Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

3- Dept. of Haematology and Blood Banking, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

4- Dept. of Anatomical Sciences, School of Medicine, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran.

Received: 13 May 2022, Accepted: 24 June 2022

Abstract:

Introduction: Adipose-derived stem cells (ADSCs) are the most common stem cell types used for treating a variety of diseases and also improve wound healing in preclinical and clinical trials. Human amniotic membrane (HAM) is one of the biological substitutes with specific potential to be applied in tissue engineering. Piperonylic acid (PA) is a small molecule extracted from black *Piper nigrum* that can activate signals associated with cell survival, growth, and proliferation.

Methods: To evaluate the viability and proliferation of cells, we decellularized HAM and human adipose-derived stem cells (hADSCs) seeded on DHAM in the presence of piperonylic acid as a small molecule in culture media. *Bax* and *Bcl2* gene expression as apoptosis-related genes was also studied by real-time PCR.

Results: HAM decellularization was confirmed through the H&E and PI staining and DNA content assay. The viability and proliferation of hADSCs seeded on DHAM showed a significant increase in the presence of 75 μ M PA. Cell cultivation on DHAM demonstrated significantly decreased *Bax* gene expression and increased *Bcl2* gene expression.

Conclusion: Based on our findings, DHAM as a bio-scaffold and PA can improve the viability and proliferative potential of hADSCs in vitro. PA with growth factor-like properties can be used in various tissues engineering and in vitro cell cultures.

Keywords: Adipose derived stem cell, Decellularized amniotic membrane, Piperonylic acid, Cell viability, Tissue engineering.

Conflict of Interest: No

*Corresponding author: T. Tiraihi, Email: takialtr@modares.ac.ir

Citation: Nikoozad Z, Tiraihi T, Azami M, Abroun S, Feizi F. Viability of human adipose- driven stem cells seeded on decellularized amniotic membrane combined with piperonylic acid induction. Journal of Knowledge & Health in Basic Medical Sciences 2023;17(4):25-33.