مجله دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد
سال ۶۶، شماره ۱
فروردین، اردیبهشت ۱۴۰۲، صفحه ۱۰-۱

www.mums.ac.ir
Medical Journal of Mashhad
University of Medical Sciences
Vol. 66, No.1, P: 1-10
Mar-May 2023

مقاله اصلی

کشت و تکثیر سلول‌های بنیادی واقع در لیمبوس قرنیه انسانی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۹/۲۲- تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۱/۲۰

الهه عمادی[۱]
دانیال طاهرزاده[۲]
داریوش حمیدی علمداری[۳*]

[۱] دانشجوی پسادکتری پزشکی مولکولی، پژوهشکده بوعلی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
[۲] کارشناسی ارشد بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
[۳] دانشیار گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
*مشهد- دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

Email: hamidiad@mums.ac.ir

خلاصه

مقدمه

سلول‌های اپیتلیوم قرنیه به طور طبیعی از بین می‌روند و سلول‌های بنیادی ناحیه لیمبوس با تکثیر و تمایز جایگزین آن‌ها می گردند. در صورت نقص در این سلول‌ها امکان جایگزینی وجود ندارد و در بسیاری از موارد بیمار بینایی خود را از دست می‌دهد. یکی از جدیدترین روش‌های درمان نقص سلول‌های بنیادی لیمبال، کشت آن‌ها در آزمایشگاه و انتقالشان روی چشم بیمار است. بدین منظور در مطالعه حاضربه ارتقاء کیفیت کشت آزمایشگاهی سلول‌های لیمبال پرداختیم.

روش کار

ابتدا ناحیه ی لیمبوس نمونه‌های چشم‌های اهدایی جدا شدند. سپس قطعات جدا شده با روش Explant بر روی پرده آمینوتیک کشت داده شدند. حضور و تکثیر سلول‌های بنیادی لیمبال با روش ایمونوفلورسنت وآنتی بادی علیه مارکرهای ΔNP63α و ABCG2 در روزهای دهم، چهاردهم و بیست و یکم بررسی گردید. همچنین با استفاده از روش فلوسایتومتری و آنتی بادی علیه مارکر ΔNP63α درصد سلول‌های لیمبال در بهترین روز کشت آن‌ها بر اساس نتایج ایمونوفلورسنت تعیین گردید.

نتایج

نتایج ایمونوفلورسنت هر سه روز تایید کننده ی کشت موفق سلول‌های بنیادی لیمبال بودند. با توجه به نتیجه بهتر کشت در روز چهاردهم آزمون فلوسایتومتری برای کشت‌های روز چهاردهم انجام شد. به طور متوسط ۵٫۸ درصد از سلول‌های کشت داده شده، سلول‌های بنیادی لیمبال بودند.

نتیجه گیری

نتایج حاکی از کشت موفق سلول‌های لیمبال در شرایط آزمایشگاهی بود اما به منظور کاربرد بالینی آن‌ها بهینه سازی بیشتر کشت مورد نیاز می‌باشد.

کلمات کلیدی

سلول‌های بنیادی لیمبوس قرنیه، نقص سلول‌های بنیادی لیمبال، کشت سلول‌های بنیادی

پی نوشت: این مطالعه فاقد تضاد منافع می‌باشد.

مقدمه

قرنیه اولین جزء از سیستم بینایی در مسیر انتقال نور از محیط پیرامون به چشم می باشد، بنابراین اختلال در عملکرد طبیعی آن بینایی صحیح را مختل می نماید (۱). یکپارچگی، شفافیت و بازسازی قرینه برای عملکرد مطلوب آن مورد نیاز می‌باشد. سلول‌های بنیادی لیمبال (LSCs)[1]واقع در لیمبوس قرینه مسئول حفظ شفافیت و بازسازی قرینه هستند (۲, ۳). نقص سلول‌های بنیادی لیمبال(LSCD)[2]در اثر عوامل ارثی، ریز محیط نامناسب، عوامل خارجی مخرب یا عوامل آیدیوپتیک رخ می‌دهد و عوارضی همچون درد، ضعف بینایی و حتی کوری را به دنبال خواهد داشت (۷-۴).

به دنبال نقص سلول‌های بنیادی لیمبال، سلول‌های جدید نمی‌توانند جایگزین سلول‌های اپیتلیوم ریزشی قرنیه شوند، بدین ترتیب اپی تلیوم قرنیه به تدریج از بین می رود و سلول‌های اپی تلیوم متمایز شده ملتحمه به سمت قرنیه مهاجرت می‌کنند. همزمان با مهاجرت آن‌ها سلولی عروق خونی نیز وارد ناحیه قرنیه می شوند و در نتیجه شفافیت قرنیه کاهش می یابد. این امر منجر به کاهش دید، ترس از نور، دوره هایی از درد و التهاب مزمن می شود (۸).

در حال حاضر یک روش معمول درمان نقص سلول‌های بنیادی لیمبال پیوند قرینه است. یکی دیگر از راهکارهای درمانی موثر برای این بیماران، پیوند LSCهای کشت شده در آزمایشگاه است. منبع اولیه این سلول‌ها برای کشت در بیمارانی که دارای نقص در یک چشم هستند از چشم سالم (منبع اتولوگوس) و در بیمارانی که دارای نقص در هر دو چشم هستند از بافت لیمبال چشم فرد دیگری (منبع هترولوگوس) است. میزان کاشت‌های موفقیت آمیز از منبع اتولوگوس (۸۵ درصد) بیشتر از منبع هترلوگوس (۷۵ درصد) است (۱۱-۹). با توجه به نتایج مثبت پیوند سلول‌های کشت‌شده، دانشمندان در صدد بهینه‌سازی شرایط کشت آزمایشگاهی به منظور افزایش میزان موفقیت پیوند و بهبود نتایج بالینی هستند (۱۴-۱۲). بدین منظور با طراحی انواع داربست ها، بسترها و سیستم‌های Co-Culture، افزودن مواد زمینه ای خارجی سلولی و مواد القایی اختصاصی سعی در نزدیک کردن شرایط آزمایشگاهی به شرایط ریز محیط سلولی دارند. مسلماً در چنین شرایطی سلول‌ها ماهیت خود را بهتر حفظ می‌کنند و کاندید مناسب تری برای پیوند خواهند بود (۱۷-۱۵). بر اساس مطالعات انجام شده، غشای آمنیوتیک انسانی سلول‌زدایی شده[3]به دلیل ویژگی‌های مطلوب از جمله ایمنی زایی کم، دارابودن خاصیت ضد باکتریایی، ضد توموری و ضد رگزایی، تسهیل مهاجرت، تکثیر و چسبندگی سلول‌ها و کمک به لایه ای شدن بافت اپی تلیالی یک بستر مناسب برای کشت LSCها است (۱۸-۲۳). علاوه بر این، ثابت شده است که استفاده از چسب فیبرینی (FG)[4]در کشت سلولی با به تاخیر انداختن رشد و مهاجرت سلول‌های اپی تلیال و پلاسمای غنی از پلاکت (PRP)[5]با دارابودن فاکتورهای رشد در پیوند LSC مفید می‌باشند (۲۴, ۲۵).

این مطالعه با هدف بومی کردن و بهینه سازی کشت سلول‌های لیمبال به روش Explant انجام گردید. بدین منظور، بیوپسی لیمبال آماده شده با استفاده از PRP-FG به غشای آمنیوتیک انسانی سلول زدایی شده متصل و کشت داده شد.

روش کار

آماده سازی نمونه برای کشت

این مطالعه با شماره IR. MUMS.fm.REC.1395.141 به تایید کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی مشهد رسید. ۲۳

1 Limbal stem cells
2 Limbal stem cell deficiency
3 Decellularized human amniotic membrane
4 Fibrin glue
5 Platelet-rich plasma

نمونه بافتی ناحیه لیمبوس قرنیه و مقداری از صلبیه چشم اهداکنندگان مرگ مغزی از بیمارستان تخصصی چشم خاتم الانبیاء مشهد به دست آمد. بافت‌های جمع آوری شده ابتدا به مدت ۳ دقیقه در بتادین به منظور ضد عفونی و رنگ شدن لایه ملتحمه نفوذی به لیمبوس قرار داده شدند. سپس لایه ملتحمه صورتی رنگ شده، قسمت‌های اضافی صلبیه و قرنیه باقیمانده از روی ناحیه لیمبوس جدا گردیدند. در نهایت ریم لیمبوس پاکسازی شده به قطعات کوچک (۱٫۵×۱٫۵ mm^2) برای کشت تقسیم شد.

تهیه فیبرین گلو-پلاسمای غنی از پلاکت (PRP-FG)

۱۰۰ میلی لیتر خون از ورید بازویی گرفته شد و پلاکت‌ها و فیبرین گلو طبق روش‌های استاندارد تهیه شد. فاکتور رشد پلاکتی با سانتریفیوژ در g × ۲۰۰۰ به مدت ۸ دقیقه (به منظور جداسازی گلبول‌های قرمز) تهیه گردید و سپس سانتریفیوژ پلاسمای غنی از پلاکت در g × ۲۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه (برای رسوب پلاکت ها) انجام شد. برای تهیه فیبرین گلو از پلاسمای پلاکتی استفاده شد. پلاسمای به‌دست‌آمده در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد منجمد گردید و سپس در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد ذوب شد و به مدت ۵ دقیقه در g × ۶۵۰۰ سانتریفیوژ شد. پلاسمای رویی تا باقی ماندن ۷ میلی لیتر پلاسما و فیبرینوژن رسوب شده (فیبرینوژن-PRP) حذف شد. ترومبین با افزودن ۱۰۰ میکرولیتر کلرید کلسیم ۱۰ درصد به ۱ میلی لیتر پلاسمای رویی حذف شده تهیه شد. فیبرین گلو-پلاسمای غنی از پلاکت (PRP-FG) با افزودن ۷ میلی لیتر ترومبین تهیه ی شده به۷ میلی لیتر فیبرینوژن-PRP فراهم گردید (۲۵).

محیط کشت

محیط کشت مورد استفاده DMEM/F-12 شامل FBS (۱۰٪)، انسولین (۵ میکروگرم در میلی لیتر)، سم وبا۱(۳۰ نانوگرم در میلی لیتر)، جنتامایسین (۵۰ میکروگرم در میلی لیتر)، hEGF (۲ نانوگرم در میلی لیتر)، ترانسفرین (۵ میکروگرم در میلی لیتر)، سلنیوم (۵ نانوگرم در میلی لیتر)، هیدروکورتیزون (۰٫۵ میکروگرم در میلی لیتر)، گلوتاماکس (۴ میلی مولار)، آمفوتریسین B (۱٫۲۵ میکروگرم در میلی لیتر) و پنی سیلین (۱٫۵ میکروگرم در میلی لیتر) بود.

کشت explant سلول‌های لیمبال

پرده آمنیوتیک برش داده شده به ابعاد ۱×۱ cm^2 بر روی کاغذ نیتروسلولزی در چاهک‌های پلیت کشت قرارداده شد. قطعات کوچک لیمبوس تهیه شده در محیط DMEM/F-12 حاوی ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر جنتامایسین و ۱٫۲۵ میکروگرم در میلی لیتر آمفوتریسین B سه مرتبه شستشو داده شدند. سپس قطعات لیمبوس از سمت اپی تلیال خود بر روی قطعات آمنیوتیک داخل پلیت کشت قرار داده شدند. از ترکیب PRP-FG به میزانی که کاملا قطعات را پوشش دهد روی آن‌ها ریخته شد و ۵ دقیقه به آن زمان داده شد. قطعات لیمبوس تثبیت شده بر روی پرده آمنیوتیک با ۲-۱میلی لیتر سیترات به مدت ۲ دقیقه شستشو داده شدند. بعد از تخیله کامل سیترات از پلیت ۲ میلی لیتر از محیط کشت تهیه شده که در قسمت قبل به آن اشاره شده به قطعات اضافه گردید. پلیت کشت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، رطوبت ۸۵ درصد و CO_2 ۵ درصد انکوبه شد. گسترش سلول‌ها به طور متوالی در زیر میکروسکوپ معکوس بررسی و عکسبرداری گردید. پس از فرآیند کشت، explantها و PRP-FG از پرده آمنیوتیک برای سنجش‌های ایمونوفلورسنت و فلوسایتومتری جدا شدند.

تایید وجود سلول‌های بنیادی لیمبال به روش ایمنوفلورسنت

برای تایید حضور سلول‌های بنیادی لیمبال کشت شده از رنگ‌آمیزی ایمونوفلورسنت و آنتی بادی‌های مونوکلونال موشی ΔNP63α و ABCG2 (Santa Cruz) به عنوان نشانگرهای اختصاصی آن‌ها استفاده شد. explantهای جدا شده از پرده آمینوتیک در پارافورمالدئید ۴ درصد به مدت ۱۵ دقیقه تثبیت شدند و متعاقباً با PBS شستشو داده شدند.

1 Cholera toxin

سلول‌های فیکس شده با ۱۰۰ میکرولیتر Triton X-100 ۱ درصد به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق نفوذ پذیر شدند. سپس مکان‌های اتصال غیر اختصاصی با BSA ۳ درصد و سرم بزی ۱۰درصد غیر اختصاصی به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد مسدود شد. آنتی بادی‌های sc-8431 :(A4A) ΔNP63α و sc-18841PE :ABCG2 (5D3) رقیق شده، به طور جداگانه برای تشخیص LSCها استفاده شدند. در نهایت نمونه‌ها تحت یک میکروسکوپ فلورسانس (Nikon Eclipse E200، JAPAN) مورد بررسی قرار گرفتند. برای تشخیص سلول‌های ΔNP63α مثبت، بخش لنفوم و سرطان پروستات به ترتیب به عنوان کنترل منفی و مثبت استفاده شد. به طور مشابه، برای تشخیص سلول‌های ABCG2 مثبت، سلول‌های جفت به عنوان کنترل مثبت و سلول‌های هلا به عنوان کنترل منفی استفاده شدند. تکنیک ایمنو فلورسنت در روزهای دهم، چهاردهم و بیست یکم بر روی نمونه‌های کشت داده شده صورت پذیرفت.

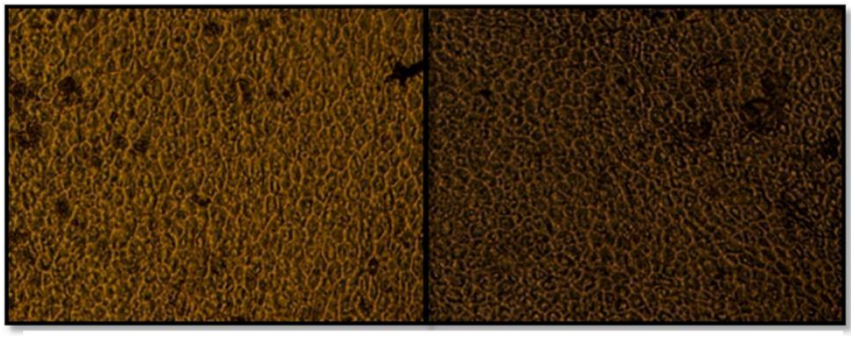
بررسی کمی‌کشت سلول‌های بنیادی لیمبال با روش فلوسایتومتری

سلول‌های explantهای کشت داده شده با استفاده از تریپسین از پرده آمینوتیک جدا شدند سپس تریپسین با استفاده از سانتریفیوژ به مدت ۵ دقیقه در rpm × ۲۰۰۰ حذف گردید. پلت سلولی ایجاد شده پس از یک مرتبه شستشو با بافر staining(PBS استریل همراه با FBS ۲ درصد) در مقداری از همین بافر حل گردید. سپس ۹۸ میکرولیتر از محلول سلولی با ۲ میکرولیتر آنتی بادی علیه مارکر ΔNP63α مخلوط گردید و به مدت ۳۰ دقیقه روی یخ انکوبه شد. پس از انکوباسیون ۱ میلی لیتر از بافر staining به مخلوط اضافه گردید و مجدد سانتریفیوژ با شرایط ذکر شده تکرار شد. پلت باقی مانده دوباره در بافر staining حل گردید و در نهایت ۳۰۰ میکرولیتر بافر Fast Fix (۰,۵ درصد پارافرمالدهید در PBS) به سلول‌ها اضافه شد و نمونه‌های آماده شده توسط دستگاه فلوسایتومتری مورد سنجش قرار گرفت. نتایج با استفاده از نرم افزار WinMDI 2.9 به صورت گراف رسم گردید.

نتایج

کشت قطعات ناحیه لیمبوس به روش explant

بر اساس بررسی میکروسکوپی سلول‌های کشت داده شده، عمده ی سلول‌ها سلول‌های اپی تلیالی تمایز یافته با مورفولوژی سنگفرشی بودند (شکل ۱).



شکل ۱. سلول‌های اپی تلیال تمایز یافته ناحیه ی لیمبوس با مورفولوژی سنگفرشی. تصویر مربوط به کشت روز چهاردهم می باشد (بزرگنمایی × ۴۰).

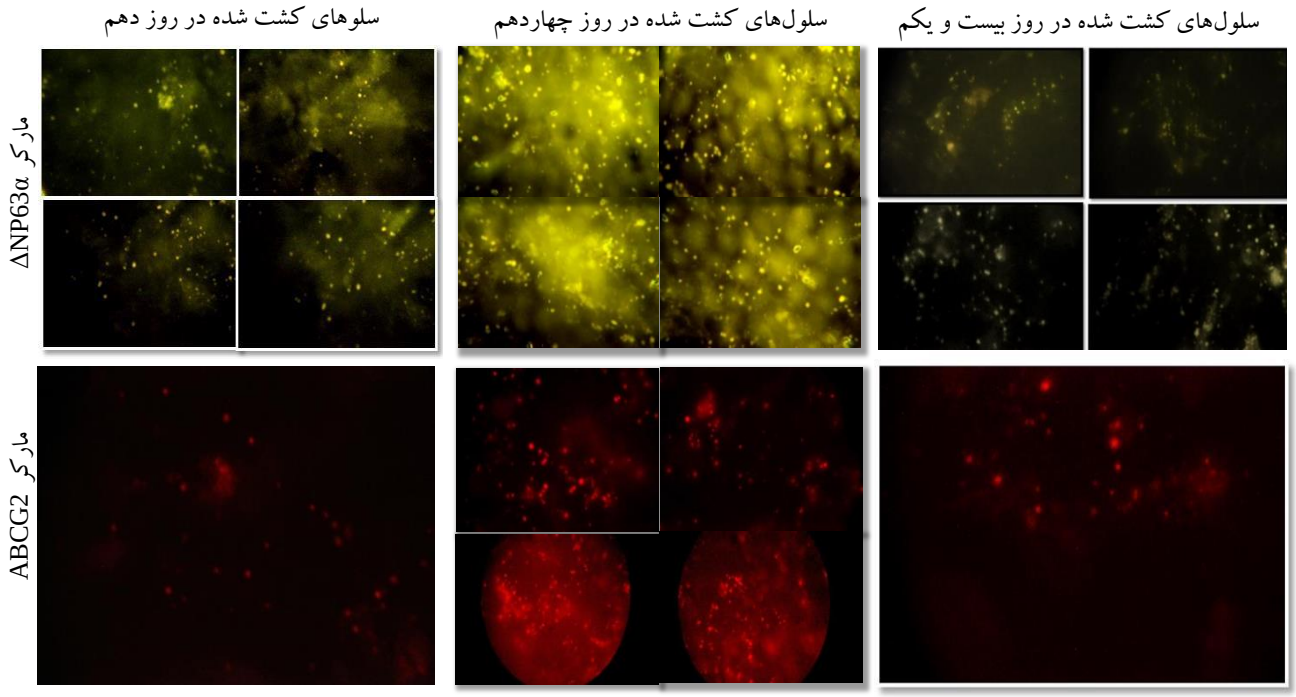
با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت و دو آنتی بادی ΔNP63α و ABCG2 لیبل شده با مواد فلورسنت که مارکرهای اختصاصی سلول‌های بنیادی لیمبال هستند، بررسی گردید. سلول‌های بنیادی لیمبال به صورت نقاط ساطع کننده

تأیید کشت سلول‌های لیمبال با روش ایمنوفلورسنت

نتایج حاصل از کشت explant سلول‌های بنیادی لیمبال در روزهای دهم، چهاردهم و بیست ویکم پس از شروع کشت

و تکثیر سلول‌های بنیادی لیمبال بر روی پرده ی آمنیوتیک در روز چهاردهم بود. کمیت سلول‌های بنیادی لیمبال در روز دهم و بیست و یکم تقریبا مشابه و کمتر از روز چهاردهم بود. کشت‌های روز چهاردهم برای بررسی درصد سلول‌های LSC با روش فلوسایتومتری انتخاب شدند. نکته قابل توجه این بود که سلول‌های بنیادی لیمبال در شرایط آزمایشگاهی حتی تا روز بیست ویکم قابلیت رشد و تکثیر خود را بطور نسبی حفظ می نمایند.

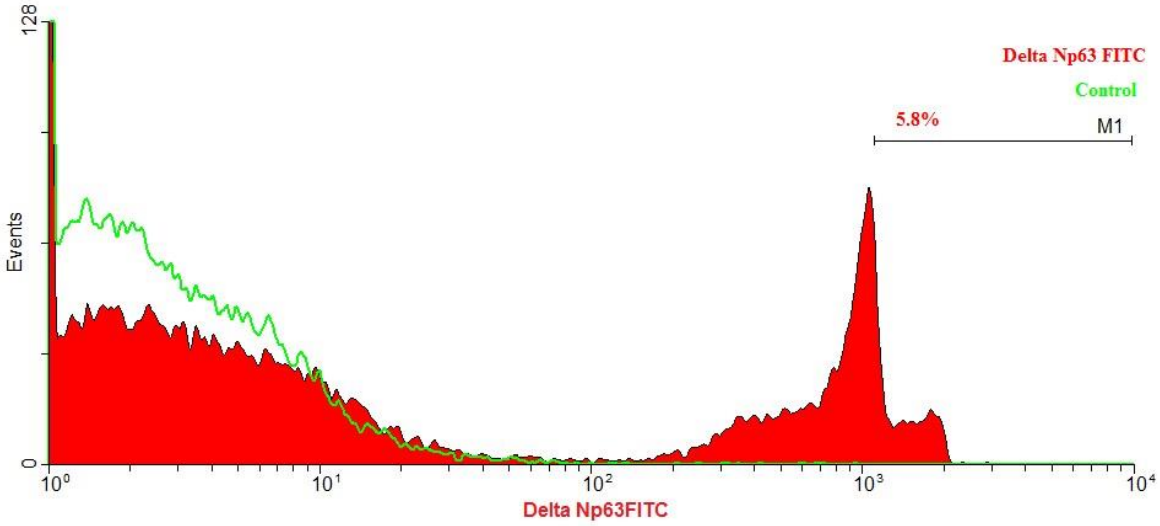
ی نور فلورسنت در بررسی میکروسکوپی قابل تشخیص بودند. نتایج بیانگر کشت پذیر بودن سلول‌های بنیادی لیمبال در شرایط in-vitro بود. با توجه به تصاویر ایمنوفلورسنت کشت روزهای مختلف، از نظر کیفی تفاوت چشمگیری بین تعداد نقاط نورانی و شدت نور حاصل از سلول‌های بنیادی لیمبال قابل روئیت شده با مارکرهای ΔNP63α و ABCG2 در روز چهاردهم نسبت به روزهای دهم و بیست و یکم وجود داشت (شکل ۲) که بیانگر جهش قابل توجه در رشد



شکل ۲. تصویر ایمونوفلورسنت سلول‌های ΔNP63α و ABCG2 مثبت در روزهای مختلف کشت سلول‌های ناحیه لیمبوس به روش explant. سلول‌های بنیادی لیمبال کشت شده روی پرده ی آمینوتیک بیان کننده ی ΔNP63α و ABCG2 در روزهای دهم و چهاردهم و بیست و یکم با بزرگنمایی × ۱۰۰ نشان داده شده اند. حساسیت مارکر ΔNP63α در تشخیص سلول‌های بنیادی لیمبال بسیار بیشتر از مارکر ABCG2 است. سلول‌های بنیادی لیمبال کمیت نسبتا کمتری در روز دهم و بیست و یکم در قیاس با روز چهاردهم نشان می‌دهند.

کمیت سلول‌های بنیادی لیمبال در ناحیه لیمبوس کشت داده شده

درصد بیان مارکر ΔNP63α سلول‌های بنیادی لیمبال با استفاده از فلوسایتومتری مورد بررسی قرار گرفت. همانطور که در شکل ۳ مشاهده می‌شود ۵،۸ درصد سلول‌های کشت شده مارکر ΔNP63α را بیان کرده‌اند.



شکل ۳. هیستوگرام بررسی بیان مارکر ΔNP63α توسط سلول‌های بنیادی لیمبال در روز چهاردهم. **۵,۸ درصد سلول‌های کشت شده مارکر ΔNP63α رابیان کرده اند.**

بحث

استفاده از کشت سلول‌های اتولوگ ناحیه لیمبوس بیمار، یکی از امید بخش‌ترین مسیرهای درمان بیماری نقص سلول‌های بنیادی لیمبال است. امروزه سلول‌های بنیادی در نقاط مختلف دنیا به عنوان یک استراتژی درمانی مورد استفاده قرار می گیرند و تغییر در شیوه‌های درمانی و جهت دادن روش‌های درمانی از پیوند عضو به سمت درمان‌های نوین از جمله استفاده از سلول‌های بنیادی در ایران امری ضروری به نظر می رسد. به همین جهت کسب دانش کشت سلول‌های بنیادی بالغ از جمله سلول‌های بنیادی لیمبال به بهبود کیفیت درمان، کاهش عوارض جانبی ناشی از پیوند عضو و سرعت بخشی روند درمان بیماران می انجامد. کشت سلول‌های بنیادی لیمبالی موفق هستند که پس از انتقال به روی چشم بیمار بتوانند جایگزین سلول‌های آسیب دیده شوند و پاسخ ایمنی ایجاد نکند. بدین منظور باید در شرایط مناسب کشت شوند که از کیفیت مطلوب برخوردار باشند.

زمان شروع کشت پس از دریافت نمونه اهدایی و سن اهداکننده جز عوامل کلیدی در کشت سلول‌های بنیادی لیمبال هستند. Baylis و همکاران طبق مطالعه خود اعلام کردند که برای به دست آوردن بهترین نتیجه در کشت، نمونه‌های اهدایی حداکثر سه روز پس از مرگ اهداکننده و ترجیحا از اهداکننده هایی با سن کم تهیه گردند (۲۶).

به منظور شبیه سازی هرچه بیشتر شرایط آزمایشگاهی با ریز محیط طبیعی سلول‌های بنیادی ناحیه لیمبوس، فراهم کردن بستر کشت مناسب ضرورت دارد. در سال ۱۹۹۹برای اولین بار از پرده ی آمنیوتیک به عنوان بستر برای رشد و انتقال سلول‌های بنیادی لیمبال استفاده شد که نتایج موفقیت آمیزی به همراه داشت (۲۷). در مطالعه بهاروند و همکاران که سلول‌های بنیادی لیمبال را به روش هضم آنزیمی بر روی پرده آمنیوتیک کشت دادند نشان دادند که پرده آمنیوتیک فراهم آورنده محیط لازم برای حفظ ونگهداری خاصیت تکثیری و عدم تمایز سلول‌های بنیادی لیمبال می باشد (۲۸). فیبرین گلو قادر است قطعات بافتی سبک قرنیه را به پرده آمنیوتیک متصل سازد تا شرایط با ثباتی برای رشد سلول‌ها فراهم گردد. علاوه بر این طبق مشاهدات Han و همکاران استفاده از فیبرین گلو تأثیر به سزایی در تحریک رشد و تکثیر سلول‌های بنیادی دارد (۲۹). اسدی و همکاران نیز نتیجه

مشابهی در مورد استفاده از فیبرین گلو را گزارش کرده اند (۳۰). فیبرین گلو همچنین به خاطر پلاکت‌ها و لکوسیت‌های خود نقش مهمی در دفاع ضد میکروبی دارد (۳۴-۳۱).

در این مطالعه برای کشت سلول‌های بنیادی لیمبال از روش کشت explant استفاده گردید. در این روش قطعات کوچکی بافتی نیاز است که باعث می شود در طول پروسه کشت و تکثیر، گازها و مواد غذایی آزادانه و سریع به تمام قسمت‌های بافت کشت شده دسترسی پیدا کنند (۳۵).

طبق نتایج بدست آمده از آزمون ایمنوفلورسنت، در روز چهاردهم کشت بیشترین تعداد سلول‌های بنیادی لیمبال در محیط قابل شناسایی بودند. به طوری که شدت نور فلورسنت حاصل از سلول‌های کشت شده در مقایسه با روزهای دهم و بیست و یکم بسیار چشمگیر بود. نتایج مطالعه ای که توسط Vergalloو همکاران در سال ۲۰۱۰ انجام گرفت با نتایج حاصل از مطالعه ما همخوانی داشت به این صورت که در روز چهاردهم کشت بیوپسی‌های لیمبال به تکثیر و ظرفیت بالای سلول‌های بنیادی لیمبال دست یافتند (۳۶). همچنین Estrada و همکاران بهترین نتایج خود را در روز چهاردهم بدست آوردند که کشت‌های آن‌ها حدود ۹۹ درصد زنده مانی (viability) داشت (۳۷). با توجه به وضعیت خوب کشت رو چهاردهم و با توجه به نتایج حاصل از دیگر مطالعات برای انجام بررسی کمی‌با استفاده از آزمون فلوسایتومتری فقط از کشت روز چهاردهم استفاده گردید.

به طور کلی در تحقیقات مختلف و با استفاده از روش فلوسایتومتری درصد سلول‌های بنیادی لیمبال بین ۳تا ۶ درصد کل سلول‌ها گزارش شده است (۳۸). در مطالعه ما نتایج فلوسایتومتری نشان داد که ۵،۸ درصد سلول‌ها مارکر ΔNP63α نشان دهنده‌ی حضور سلول‌های بنیادی لیمبال را بیان می کنند که در قیاس با نتایج تحقیقات مشابه درصد بالایی می‌باشد. در گزارش Arpitha و همکاران که در سال ۲۰۰۸ منتشر شد درصد سلول‌های بنیادی لیمبال با روش فلوسایتومتری ۴،۳ درصد تعیین گردید (۳۹). در مطالعه ای که توسط Shortt و همکاران جهت کشت سلول‌های بنیادی لیمبال بر روی پرده آمنیوتیک به روشexplant انجام شد، میزان بیان دو مارکر ΔNP63α و ABCG2 سلول‌های بنیادی لیمبال ۳،۸±۰،۳۴ و ۲،۵±۰،۸۱ درصد بود (۴۰). Rama و همکاران نیز بیان ۳ درصدی مارکر ΔNP63α را گزارش کردند (۳۸). همچنینDi Iorio و همکاران در سال ۲۰۱۰ درصد سلول‌های بنیادی کشت شده را ۳تا ۸ درصد بیان کردند (۴۱). نتایج حاصل از آزمون ایمنوفلورسنت مطالعه ما نیز تایید کننده ی کشت پذیری سلول‌های بنیادی لیمبال در شرایط in vitro بود.

نتیجه گیری

برای اولین بار در ایران، کشت سلول‌های بنیادی لیمبال به صورت کشت explant در دانشگاه علوم پزشکی مشهد انجام پذیرفت. به طور خلاصه، این مطالعه نشان داد که استفاده از پرده آمینوتیک و PRP-FG در کشت explantهای ناحیه ی لیمبوس چشم انسان می‌تواند تعداد سلول‌های ΔNP63α مثبت را به حدود ۶ درصد افزایش دهد. با این حال برای در نظر گرفتن سلول‌های بنیادی لیمبال به عنوان یک عامل ایمن برای درمان نقص سلول‌های بنیادی لیمبال مطالعات بیشتری مورد نیاز است.

References

1. Millodot M. A review of research on the sensitivity of the cornea. Ophthalmic and Physiological Optics. 1984;4(4):305-18.
2. Meek KM, Knupp C. Corneal structure and transparency. Progress in retinal and eye research. 2015;49:1-16.
3. Yoon JJ, Ismail S, Sherwin T. Limbal stem cells: Central concepts of corneal epithelial homeostasis. World journal of stem cells. 2014;6(4):391.

4. Ahmad S. Concise review: limbal stem cell deficiency, dysfunction, and distress. Stem cells translational medicine. 2012;1(2):110-5.
5. Daniels JT, Dart JK, Tuft SJ, Khaw PT. Corneal stem cells in review. Wound repair and regeneration. 2001;9(6):483-94.
6. Chew HF. Limbal stem cell disease: Treatment and advances in technology. Saudi Journal of Ophthalmology. 2011;25(3):213-8.
7. Javadi MA, Einollahi B, Baradaran Rafiei A, Baharvand H, Ebrahimi M, Rafati N, et al. Early results of autologous cultivated limbal stem cell transplantation in total limbal stem cell deficiency. Bina Journal of Ophthalmology. 2006;11(3):275-88.
8. Puangsricharern V, Tseng SC. Cytologlogic evidence of corneal diseases with limbal stem cell deficiency. Ophthalmology. 1995;102(10):1476-85.
9. Vemuganti GK, Fatima A, Madhira SL, Basti S, Sangwan VS. Limbal stem cells: application in ocular biomedicine. International review of cell and molecular biology. 2009;275:133-81.
10. Tseng SC. An integrated view and new perspectives of ocular surface and tear disorders. Archivos de la Sociedad Española de Oftalmologia. 1999;74(1):29-46.
11. Dua H, Gomes J, Singh A. Corneal epithelial wound healing. The British journal of ophthalmology. 1994;78(5):401.
12. Hogerheyde TA, Suzuki S, Walshe J, Bray LJ, Stephenson SA, Harkin DG, et al. Optimization of corneal epithelial progenitor cell growth on Bombyx mori silk fibroin membranes. Stem Cells International. 2016;2016.
13. Sharifi AM, Darabi R, Jadidi K. Isolation, culture, characterization and optimization of human corneal stem cells. Biocell. 2010;34(1):53-5.
14. Varghese VM, Prasad T, Kumary T. Optimization of culture conditions for an efficient xeno-feeder free limbal cell culture system towards ocular surface regeneration. Microscopy Research and Technique. 2010;73(11):1045-52.
15. Sangwan VS, Vemuganti GK, Singh S, Balasubramanian D. Successful reconstruction of damaged ocular outer surface in humans using limbal and conjuctival stem cell culture methods. Bioscience Reports. 2003;23(4):169-74.
16. Nishida K, Yamato M, Hayashida Y, Watanabe K, Maeda N, Watanabe H, et al. Functional bioengineered corneal epithelial sheet grafts from corneal stem cells expanded ex vivo on a temperature-responsive cell culture surface. Transplantation. 2004;77(3):379-85.
17. Pellegrini G, Traverso CE, Franzi AT, Zingirian M, Cancedda R, De Luca M. Long-term restoration of damaged corneal surfaces with autologous cultivated corneal epithelium. The Lancet. 1997;349(9057):990-3.
18. Baharvand H, Heidari M, Ebrahimi M, Valadbeigi T, Salekdeh GH. Proteomic analysis of epithelium-denuded human amniotic membrane as a limbal stem cell niche. Mol Vis. 2007;13:1711-21.
19. Sudha B, Sitalakshmi G, Iyer GK, Krishnakumar S. Putative stem cell markers in limbal epithelial cells cultured on intact & denuded human amniotic membrane. Indian Journal of Medical Research. 2008;128(2):149.
20. Zhang T, Yam GH-F, Riau AK, Poh R, Allen JC, Peh GS, et al. The effect of amniotic membrane de-epithelialization method on its biological properties and ability to promote limbal epithelial cell culture. Investigative ophthalmology & visual science. 2013;54(4):3072-81.
21. Tseng SC, Prabhasawat P, Lee S-H. Amniotic membrane transplantation for conjunctival surface reconstruction. American journal of ophthalmology. 1997;124(6):765-74.
22. Lee S-H, Tseng SC. Amniotic membrane transplantation for persistent epithelial defects with ulceration. American journal of ophthalmology. 1997;123(3):303-12.
23. Prabhasawat P, Barton K, Burkett G, Tseng SC. Comparison of conjunctival autografts, amniotic membrane grafts, and primary closure for pterygium excision. Ophthalmology. 1997;104(6):974-85.
24. Yeung AM, Faraj LA, McIntosh OD, Dua HS. Fibrin glue in cornea epithelial cell migration. Investigative Ophthalmology & Visual Science. 2014;55(13):5536-.

25. Shirvan MK, Alamdari DH, Ghoreifi A. A novel method for iatrogenic vesicovaginal fistula treatment: autologous platelet rich plasma injection and platelet rich fibrin glue interposition. The Journal of urology. 2013;189(6):2125-9.
26. Baylis O, Figueiredo F, Henein C, Lako M, Ahmad S. 13 years of cultured limbal epithelial cell therapy: a review of the outcomes. Journal of cellular biochemistry. 2011;112(4):993-1002.
27. Schwab IR, Reyes M, Isseroff RR. Successful transplantation of bioengineered tissue replacements in patients with ocular surface disease. Cornea. 2000;19(4):421-6.
28. Baharvand H, Ebrahimi M, Javadi M, Einollahi B, Massumi M. Culture and Proliferation of Human Limbal Stem Cells In Vitro. Bina Journal of Ophthalmology. 2005;10(4):419-29.
29. Han B, Schwab IR, Madsen TK, Isseroff RR. A fibrin-based bioengineered ocular surface with human corneal epithelial stem cells. Cornea. 2002;21(5):505-10.
30. Asadi M, Alamdari DH, Rahimi HR, Aliakbarian M, Jangjoo A, Abdollahi A, et al. Treatment of life‐threatening wounds with a combination of allogenic platelet‐rich plasma, fibrin glue and collagen matrix, and a literature review. Experimental and therapeutic medicine. 2014;8(2):423-9.
31. Krüger JP, Hondke S, Endres M, Pruss A, Siclari A, Kaps C. Human platelet- rich plasma stimulates migration and chondrogenic differentiation of human subchondral progenitor cells. Journal of Orthopaedic Research. 2012;30(6):845-52.
32. Lee H-R, Park KM, Joung YK, Park KD, Do SH. Platelet-rich plasma loaded hydrogel scaffold enhances chondrogenic differentiation and maturation with up-regulation of CB1 and CB2. Journal of Controlled Release. 2012;159(3):332-7.
33. Mei-Dan O, Lippi G, Sánchez M, Andia I, Maffulli N. Autologous platelet-rich plasma: a revolution in soft tissue sports injury management? The Physician and sportsmedicine. 2010;38(4):127-35.
34. Xie X, Wang Y, Zhao C, Guo S, Liu S, Jia W, et al. Comparative evaluation of MSCs from bone marrow and adipose tissue seeded in PRP-derived scaffold for cartilage regeneration. Biomaterials. 2012;33(29):7008-18.
35. Atala A, Lanza R, Lanza RP. Methods of tissue engineering: Gulf professional publishing; 2002.
36. Vergallo C, Fonseca T, Pizzi G, Dini L. Lycopersicon esculentum lectin is a marker of transient amplifying cells in in vitro cultures of isolated limbal stem cells. Tissue and Cell. 2010;42(4):259-65.
37. Estrada LMJ, Peláez CAR, Sáenz ZC, Bernal BHA. Cultivo de células madre limbares en membrana amniótica para reconstrucción de tejido corneal: una comparación de dos métodos. Medicina UPB. 2012;31(2):95-104.
38. Rama P, Matuska S, Paganoni G, Spinelli A, De Luca M, Pellegrini G. Limbal stem-cell therapy and long-term corneal regeneration. New England journal of medicine. 2010;363(2):147-55.
39. Arpitha P, Prajna NV, Srinivasan M, Muthukkaruppan V. A method to isolate human limbal basal cells enriched for a subset of epithelial cells with a large nucleus/cytoplasm ratio expressing high levels of p63. Microscopy Research and Technique. 2008;71(6):469-76.
40. Shortt AJ, Secker GA, Lomas RJ, Wilshaw SP, Kearney JN, Tuft SJ, et al. The effect of amniotic membrane preparation method on its ability to serve as a substrate for the ex-vivo expansion of limbal epithelial cells. Biomaterials. 2009;30(6):1056-65.
41. Di Iorio E, Ferrari S, Fasolo A, Böhm E, Ponzin D, Barbaro V. Techniques for culture and assessment of limbal stem cell grafts. The ocular surface. 2010;8(3):146-53.

Original Article

Culture and expansion of stem cells located at the corneoscleral limbus

Received: 13/12/2022 - Accepted: 09/04/2023

Elaheh Emadi[1]
Danial Taherzadeh[2]
Daryoush Hamidi Alamdari[3*]

[1] *Bo Ali Research Institute, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran*
[2] *Department of Clinical Biochemistry, Faculty of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran*
[3] *Department of Clinical Biochemistry, Faculty of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran*

*Mashhad- Faculty of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

Email: hamidiad@mums.ac.ir

Abstract

Introduction

Corneal epithelial cells are destroyed naturally and the limbal stem cells replace them by multiplying and differentiating. In case of defects in these cells, it is impossible to replace them, and in many cases, the patients lose their vision. One of the newest methods of treating limbal stem cell deficiency (LSCD) is to cultivate them in the laboratory and transfer them to the patient's eye. For this purpose, in this study, we aimed to culture limbal stem cells in vitro and optimized the culture quality.

Material and Method

First, the limbus region of the donated eye samples was separated. Then the separated parts were cultured on the amniotic membrane by the explant method. The presence and proliferation of limbal stem cells were investigated by immunofluorescent method and antibody against ΔNP63α and ABCG2 markers on the 10th, 14th, and 21st days. Also, by using the flow cytometry method and antibody against ΔNP63α marker, the percentage of limbal cells on the best day of their culture based on immunofluorescent results was determined.

Results

Findings showed that limbal stem cells could be cultured properly in vitro. All immunofluorescent assays confirmed limbal stem cell attendance, however, the result of day 14th of culture was more considerable. Therefore, the flow cytometry assay was performed on the 14th day and proved that there were 5.8% limbal stem cells using explant culture.

Conclusion

The results indicated the successful cultivation of limbal cells in laboratory conditions, but for their clinical application, further optimization of cultivation is required.

Key words

Corneal limbus stem cells, Limbal stem cell deficiency, Stem cell culture

Acknowledgement: There is no conflict of interest