

The Utilization of Autologous Serum as a Substitute of Fetal Bovine Serum in the Expansion of Mesenchymal Stem Cells Derived from Menstrual Blood

Zeinab Rezaei Kiasari¹
Amirali Khodashenas²
Marzieh Zamaniyan³
Pedram Ebrahimnejad⁴
Fatemeh Zare Taji¹

¹ MSc Student in Medical Biotechnology, Faculty of Advanced Technologies in Medicine, Mazandaran University of Medical Science, Sari, Iran

² Assistant Professor, Department of Medical Biotechnology, Faculty of Advanced Technologies in Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

³ Associate Professor, Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁴ Associate Professor, Department of Pharmaceutics, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received December 12, 2023 ; Accepted March 2, 2024)

Abstract

Background and purpose: Menstrual blood-derived mesenchymal stem cells (MB-MSCs) expressing CD44, CD90, and CD105 markers were recently introduced. These cells are a good source of stem cells for research and use in regenerative medicine due to uncomplicated collection without invasive surgical intervention or ethical issues. Cell culture is one of the most essential techniques in molecular cell biology, and the culture medium is the most critical component. Serum is one of the crucial components of the culture medium and a protective solution. One of the most common serums used in cell culture is fetal bovine serum (FBS). This serum is an unknown mixture and can contain unfavorable factors such as endotoxin, mycoplasma, viral contaminants, or prion proteins. Therefore, there is a need for a human substitute for FBS that can be utilized for clinical applications. In this study, a humanized protocol utilizing autologous serum (AS) instead of FBS is tested to investigate the expansion of MB-MSCs and exosomes released from these cells.

Materials and methods: A menstrual blood sample was collected from the donor on the second day of menstruation. Autologous serum samples were also collected to prepare the culture medium. First, mesenchymal stem cells were extracted from menstrual blood and then cultured in an environment enriched with autologous serum at different concentrations of 10%, 15%, and 20%. The investigation was done on the cells obtained in the third passage. Cultured cells in autologous serum were analyzed regarding expansion and expression of mesenchymal surface markers (CD73 and CD105). An inverted microscope was used to study the expansion, and flow cytometry was used to investigate the expression of mesenchymal markers. Also, in the next step, the culture medium of cultured cells in autologous serum was collected for exosome isolation. Exosome isolation was done by a three-step combination method of sedimentation, size exclusion chromatography with CL-2B sepharose resin, and making it concentrated. Finally, the purified exosomes were analyzed regarding morphology, size, and expression of CD9, CD63, and CD81 markers. Transmission electron microscope (TEM), dynamic light scattering (DLS), and flow cytometry analysis were operated, respectively.

Results: According to the observations, cell expansion was observed in all three concentrations of autologous serum, and the most favorable results were marked in the concentration of 15%. In addition, flow cytometry results indicated the expression of mesenchymal markers CD73 and CD105 in cells cultured with 15% autologous serum. Exosomes were isolated from the culture medium of mesenchymal stem cells cultured with autologous serum, and their characteristics were investigated using dynamic light scattering, transmission electron microscope, and flow cytometry techniques. The size of the exosomes ranged from 30-150 nm, and their morphology was cup-shaped. The expression of exosome markers such as CD9, CD63, and CD81 was also confirmed.

Conclusion: As a result, with the increase of using mesenchymal stem cells in regenerative medicine, it is imperative to ensure the safety of the process and materials used in this field. Therefore, autologous serum can be a suitable option for the culture of mesenchymal stem cells derived from menstrual blood.

Keywords: Menstrual blood mesenchymal stem cells, fetal bovine serum, autologous serum, exosome, regenerative medicine

J Mazandaran Univ Med Sci 2024; 34 (231): 11-21 (Persian).

Corresponding Author: Amirali Khodashenas - Faculty of Advanced Technologies in Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran. (E-mail: s.khodashenas@mazums.ac.ir)

استفاده از سرم اتولوگ به عنوان جایگزین سرم جنین گاوی در گسترش سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از خون قاعدگی

زینب رضایی کیاسری^۱
امیرعلی خدشناس^۲
مرضیه زمانیان^۳
پدرام ابراهیم نژاد^۴
فاطمه زارع تاجی^۱

چکیده

سابقه و هدف: سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از خون قاعدگی (MB-MSCs)، اخیراً معرفی شده و بیان‌کننده مارکرهای CD44، CD90 و CD105 هستند. این سلول‌ها به علت جمع‌آوری آسان و بدون هیچ‌گونه مداخله جراحی تهاجمی و نداشتن هیچ‌گونه مسئله اخلاقی منبع خوبی از سلول‌های بنیادی برای تحقیقات و استفاده در پزشکی بازساختی هستند. کشت سلولی یکی از مهم‌ترین تکنیک‌ها در زیست‌شناسی سلولی مولکولی است و محیط کشت مهم‌ترین جزء است. سرم یکی از اجزای مهم محیط کشت و یک محلول محافظت‌کننده است. یکی از رایج‌ترین سرم‌های مورد استفاده در کشت سلول، سرم جنین گاوی (FBS) است. این سرم مخلوطی نامشخص است و می‌تواند حاوی فاکتورهای نامطلوبی مانند اندوتوکسین، میکوپلاسما، آلاینده‌های ویروسی یا پروتئین‌های پر یون باشد. بنابراین، نیاز به جایگزینی انسانی برای FBS وجود دارد که بتوان از آن برای کاربردهای بالینی استفاده کرد. در این مطالعه، یک پروتکل انسانی با استفاده از سرم اتولوگ (AS) به جای FBS برای بررسی رشد MB-MSCs و آگزوزوم‌های آزاد شده از این سلول‌ها آزمایش می‌شود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، در روز دوم قاعدگی، نمونه خون قاعدگی از اهداکننده جمع‌آوری شد. نمونه سرم اتولوگ نیز برای تهیه محیط کشت جمع‌آوری شد. ابتدا، سلول‌های بنیادی مزانشیمی از خون قاعدگی استخراج و سپس در محیطی غنی شده با سرم اتولوگ در غلظت‌های مختلف ۱۰، ۱۵ و ۲۰ درصد کشت داده شدند. بررسی بر روی سلول‌های حاصل شده در پاساژ سوم صورت گرفت. سلول‌های کشت داده شده در سرم اتولوگ از لحاظ رشد و بیان مارکرهای سطحی مزانشیمی (CD105 و CD73) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. برای بررسی رشد از میکروسکوپ اینورت و از فلوسایتومتری برای بررسی بیان مارکرهای مزانشیمی استفاده شد. هم‌چنین در گام بعدی محیط کشت سلول‌های کشت داده شده در سرم اتولوگ برای جداسازی آگزوزوم جمع‌آوری شد. جداسازی آگزوزوم از یک روش ترکیبی سه مرحله‌ای رسوب‌دهی، سایز اکسکلوزن کروماتوگرافی با رزین سفارز CL-2B و تغلیظ صورت گرفت. در نهایت آگزوزوم‌های خالص‌سازی شده از نظر مورفولوژی، اندازه و بیان مارکرهای CD9، CD63 و CD81 بررسی شدند. به ترتیب از آنالیز میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM)، تفرق نور دینامیکی (DLS) و فلوسایتومتری استفاده شد.

یافته‌ها: با توجه به مشاهدات در هر سه غلظت سرم اتولوگ، گسترش سلولی مشاهده شد که مطلوب‌ترین نتایج در غلظت ۱۵ درصد مشاهده شد. علاوه بر این، نتایج فلوسایتومتری حاکی از بیان مارکرهای مزانشیمی CD105 و CD73 در سلول‌های کشت شده با ۱۵ درصد سرم اتولوگ بودند. هم‌چنین در بررسی‌های انجام شده به وسیله DLS، TEM و فلوسایتومتری آگزوزوم‌های جداسازی شده از محیط کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی کشت داده شده با سرم اتولوگ اندازه ۳۰-۱۵۰ نانومتری داشتند، مورفولوژی آنان فنجانی شکل بود و بیان مارکرهای آگزوزومی (CD9، CD63 و CD81) نیز در آن‌ها تایید شد.

استنتاج: در نتیجه، با افزایش استفاده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی در پزشکی بازساختی، اطمینان از ایمنی فرآیند و مواد مورد استفاده در این حیطه بسیار حائز اهمیت می‌باشد. بنابراین می‌توان گفت، سرم اتولوگ می‌تواند گزینه مناسبی برای کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از خون قاعدگی باشد.

واژه‌های کلیدی: سلول‌های بنیادی مزانشیمی خون قاعدگی، سرم جنین گاوی، سرم اتولوگ، آگزوزوم، پزشکی بازساختی

مؤلف مسئول: امیرعلی خدشناس - ساری: کیلومتر ۱۷ جاده فرح آباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم، دانشکده فناوری‌های نوین پزشکی E-mail: s.khodashenas@mazums.ac.ir

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد زیست فناوری پزشکی، دانشکده فناوری‌های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۲. استادیار، گروه زیست فناوری پزشکی، دانشکده فناوری‌های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۳. دانشیار، گروه زنان و زایمان، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۴. دانشیار، گروه داروسازی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

✉ تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۹/۲۱ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۴۰۲/۱۰/۲۷ تاریخ تصویب: ۱۴۰۲/۱۲/۱۲

مقدمه

سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از خون قاعدگی (MB-MSCs)، سلول‌های بنیادی بالغی هستند که اخیراً معرفی شده است. این سلول‌ها بیان‌کننده مارکرهای CD44، CD90 و CD105 بوده که بخشی از مارکرهای اختصاصی سلول‌های بنیادی مزانشیمی هستند. از مزایای این سلول‌ها می‌توان به جمع‌آوری آسان و بدون هیچ‌گونه مداخله جراحی تهاجمی و نداشتن هیچ‌گونه مسئله اخلاقی اشاره کرد (۱). تحت شرایط osteogenic، adipogenic یا chondrogenic این سلول‌ها می‌توانند به ترتیب در شرایط آزمایشگاهی به استئوسیت، چربی یا غضروف تمایز پیدا کنند (۲). بنابراین می‌توان MB-MSCs ها را منبع خوبی از سلول‌های بنیادی برای تحقیقات و استفاده در پزشکی بازساختی دانست. کشت سلولی تکنیکی در نظر گرفته می‌شود که توسط آن سلول‌ها در خارج از یک موجود زنده تحت شرایط کنترل شده (مانند دما، pH، مواد مغذی و سطوح ضایعات) کشت می‌شوند (۳). یکی از مهم‌ترین تکنیک‌ها در زیست‌شناسی سلولی مولکولی است، زیرا بستری را برای بررسی بیولوژی، بیوشیمی، فیزیولوژی و متابولیسم سلول فراهم می‌کند (۴). محیط کشت مهم‌ترین جزء است، زیرا مواد مغذی، فاکتورهای رشد و هورمون‌هایی که برای رشد سلول لازم است را فراهم می‌کند و هم‌چنین باعث تنظیم pH و فشار اسمزی می‌شود (۵). هم‌چنین محیط کشت باعث بقا و تکثیر سلول‌های کشت داده شده می‌شود. این نکته باید ذکر شود که در صورت لزوم اگر پژوهشگر شرایط خاصی را برای مطالعه خود در نظر دارد می‌تواند محیط کشت را اصلاح و بهینه کند (۶). یکی از اجزای مهم محیط کشت، سرم است. سرم یک محلول محافظت‌کننده است که حاوی فاکتورهای رشد، هورمون‌ها و مولکول‌های سم‌زدایی‌کننده است. استفاده از آن باعث زنده ماندن کشت سلول می‌شود، هم‌چنین در انجماد سلولی نیز کاربرد دارد. رایج‌ترین سرم مورد استفاده در کشت سلول FBS (Fetal Bovine Serum) است (۷). با

مشخص شدن پتانسیل خوب سلول‌های بنیادی مزانشیمی در کاربردهای بالینی، چگونگی افزایش و گسترش کشت این سلول‌ها به صورت GMP گرید در مقیاس بزرگ مطرح می‌شود. بیش‌تر پروتکل‌های گسترش و کشت موجود از FBS به‌عنوان مکمل محیط کشت استفاده می‌کنند. استفاده از FBS برای کشت و گسترش این نوع سلول‌ها عملی است، زیرا مواد مغذی حیاتی، فاکتورهای چسبندگی و فاکتورهای رشد را برای سلول‌ها فراهم می‌کند (۸). با این حال، سرم زنونژنیک از دیدگاه علمی و بیولوژیکی، مخلوطی نامشخص است که می‌تواند یکسری مشکلات و پیچیدگی‌هایی رو به وجود آورد و از طرفی از نظر جنبه‌های ایمنی زیستی نیز نگرانی‌هایی در مورد استفاده از آن وجود دارد، زیرا FBS ممکن است حاوی فاکتورهای نامطلوب مانند اندوتوکسین، میکوپلاسما، آلاینده‌های ویروسی یا پروتئین‌های پرین باشد (۹). کمیسیون اروپا "یادداشتی برای راهنمایی در مورد به حداقل رساندن خطر انتقال عوامل آنسفالوپاتی اسفنجی شکل حیوانی از طریق فرآورده‌های دارویی انسانی و دامپزشکی" (EMA/410/01) منتشر کرد که بیان می‌کند باید ابتدا استفاده از مواد با منشأ غیر حیوانی ترجیح داده شود (۱۰). در این مطالعه پروتکل انسانی شده‌ای مورد آزمایش قرار می‌گیرد و به جای FBS از سرم خون اتولوگ برای رشد دادن سلول‌های مزانشیمی مشتق از خون قاعدگی خود فرد استفاده می‌شود.

مواد و روش‌ها

جداسازی سرم و سلول‌های بنیادی مزانشیمی خون قاعدگی در این مطالعه تجربی، با مجوز کمیته اخلاق (IR.MAZUMS.IMAMHOSPITAL.REC.1400.041) و کسب رضایت آگاهانه، از رگ وریدی دست راست بیمار خون گرفته شد و سرم اتولوگ از نمونه‌ی خون دست با سانتریفیوژ جداسازی و با فیلتر ۰/۲۲ فیلتر شد. سپس در دمای ۵۶ درجه به مدت ۳۰ دقیقه دکمپلمانه گردید. بعد از جداسازی سرم، از سرم اتولوگ حاصل شده

تعویض گردید. برای تکرارپذیری بررسی‌ها همزمان در سه چاهک دیگر با غلظت‌های سرم اتولوگ ذکر شده، سلول‌ها کشت داده شدند.

پاساژ سلول‌های کشت داده شده

زمانی که سلول‌ها به تراکم ۹۰ درصد رسیدند با تریپسین-EDTA (TrypLE، بیوست، فرانسه) سلول‌ها از کف پلیت جدا و در چندین چاهک تقسیم شدند. در ابتدا محیط کشت کاملاً خارج و کف پلیت با ۵۰۰ میکرولیتر PBS سرد به طور کامل شسته شد تا باقیمانده‌ی محیط کشت حاوی سرم از سطح سلول‌ها خارج شود. به مدت ۳ دقیقه PBS در پلیت در دمای محیط باقی ماند و سپس خارج شد. به صورت قطره‌ای ۱۰۰ میکرولیتر آنزیم تریپسین در سراسر پلیت بر روی سلول‌ها ریخته شد و با تکان دادن آرام پلیت سعی شد که تمام سطح سلول‌ها به تریپسین آغشته شود. سپس برای فعالیت بهینه آنزیم، پلیت در انکوباتور ۳۷ درجه به میانگین مدت زمانی ۱ دقیقه قرار داده شد. بعد از زمان مورد نظر سلول‌ها در زیرمیکروسکوپ بررسی شدند. زمانی که سلول‌ها شروع به جدا شدن از کف چاهک‌ها کردند بسیار آرام به کناره‌های پلیت ضربه وارد شد. سلول‌ها دوباره با میکروسکوپ بررسی شده و در صورت جدا شدن تمام سلول‌ها جهت خنثی‌سازی آنزیم، حدود ۵۰۰ میکرولیتر محیط DMEM F12 حاوی سرم به چاهک‌های پلیت اضافه شد. سپس سوسپانسیون سلولی به میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل و به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۳۵۰ سانتریفیوژ شد. سپس محیط رویی خارج و به رسوب سلولی ۱ میلی‌لیتر محیط کشت غنی شده با سرم اضافه شد. سپس سلول‌ها در دو چاهک با ۱ میلی‌لیتر محیط کشت غنی شده با درصد سرم‌های اتولوگ قبلی پاساژ و در انکوباتور CO₂ دار با میزان رطوبت مطلوب قرار داده شدند. تعویض محیط کشت سلول‌ها هر ۳ الی ۴ روز انجام شد تا به تراکم ۹۰ درصد برسند.

جهت کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از خون قاعدگی فرد استفاده شد. نمونه خون قاعدگی با کاپ قاعدگی از یک خانم مبتلا به کاهش ذخایر تخمدانی در روز ۲ تا ۳ سیکل قاعدگی بعد از گذراندن تست‌های HIV و HCV و دریافت رضایت آگاهانه گرفته شد. این فرد براساس معیارهای ورود مطالعه از جمله، ساختار تخمدانی و رحمی نرمال بود و بین ۲۰ تا ۴۲ سال سن را دارا بود و معیارهای خروج از مطالعه مانند بدخیمی‌های لگنی و ناهنجاری‌های ژنتیکی را شامل نمی‌شد. خون قاعدگی به محلول حاوی آنتی‌بیوتیک و آمفوتریسین B و EDTA منتقل و سپس به آزمایشگاه جهت جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از خون قاعدگی انتقال داده شد. نمونه خون گرفته شده ابتدا به مدت ۱ دقیقه ورتکس شد. سپس در دمای اتاق با ۱۷۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شده و مایع رویی اوت و سلول‌های خونی به روش RBC Lysis Buffer حذف شدند. به طور خلاصه ابتدا ۱۵ میلی‌لیتر از RBC Lysis Buffer به فالكون اضافه و سپس خوب ورتکس شد. سپس به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. بعد از ۱۵ دقیقه فالكون در دمای اتاق با دور ۱۸۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ و محیط رویی خارج شد.

به رسوب انتهای فالكون PBS اضافه و با دور ۲۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس سوپرناتانت خارج شده و رسوب سلولی در ۱ میلی‌لیتر سرم اتولوگ حل شد و سپس با غلظت‌های ۱۰، ۱۵ و ۲۰ درصد به پلیت ۲۴ خونه حاوی محیط کشت کامل DMEM F12 (گیکو، ایالات متحده آمریکا) به همراه ۱۰۰ U/ml پنی‌سیلین و ۱۰۰ mg/ml استرپتومایسین (گیکو، ایالات متحده) و ۲/۵ µg/ml آمفوتریسین B (سیگما، ایالات متحده آمریکا) اضافه شد. پلیت حاوی سلول‌ها به مدت ۱ شبانه‌روز در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO₂ و رطوبت ۹۰ درصد انکوبه شد و سپس محیط کشت آن تعویض شد. از این پس هر ۳ الی ۴ روز محیط کشت

فلوسایتومتری سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از خون قاعدگی

مارکرهای سطحی با استفاده از آنتی‌بادی‌های CD34، CD45، CD73 و CD105 با فلوسایتومتری مورد ارزیابی قرار گرفت. سلول‌های حاصل از پاساژ ۳ برای انجام فلوسایتومتری استفاده شد. بدین منظور ابتدا سلول‌ها بعد از شستشو با PBS ترپسینه و سپس سانتریفیوژ شدند. به سوسپانسیون سلولی مقدار کافی بافر رنگ‌آمیزی DPBS که حاوی ۵ درصد FBS بود، اضافه شد. سلول‌ها شمارش و ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون به هر لوله اضافه شد. ۵ میکرولیتر از آنتی‌بادی‌های ذکر شده با سلول‌ها مخلوط شد و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی انکوبه شد. به منظور حذف آنتی‌بادی‌های اضافی و سلول‌هایی که به آنتی‌بادی کوئزوگه نشدن، سانتریفیوژ با دور ۲۵۰۰ به مدت ۵ دقیقه انجام شد و سه مرتبه سلول‌ها با بافر رنگ‌آمیزی شستشو داده شدند. آنالیز آنتی‌ژن‌های سطح سلولی و داده‌ها به ترتیب توسط دستگاه FACS Calibur (BD Biosciences, US) و نرم‌افزار FLOWJo انجام شد.

جداسازی اگزوزوم‌های سلول‌های کشت داده شده در سرم اتولوگ ۱۵ درصد

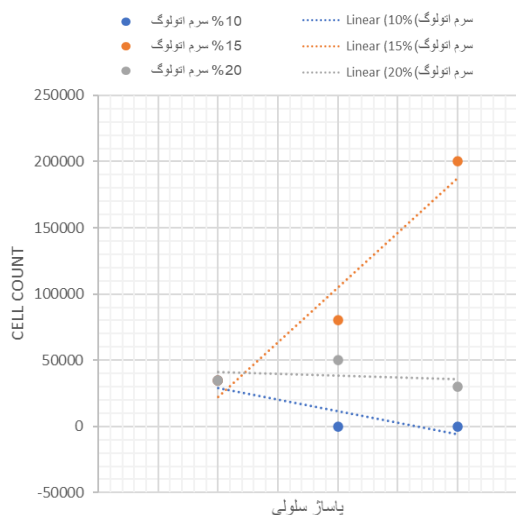
زمانی که در پاساژ سوم سلول‌های بنیادی مزانشیمی کشت داده شده در سرم اتولوگ ۱۵ درصد به کانفلوئسنسی ۹۰ درصد رسیدند، محیط کشت خارج گردید. سلول‌ها با PBS سه بار شستشو شد. سپس ۱ میلی‌لیتر محیط کشت خام به سلول اضافه و به مدت ۱۶ ساعت در شرایط انکوباسیون قبلی انکوبه شد. بعد از ۱۶ ساعت محیط کشت جمع‌آوری شد و سلول‌ها مجدد پاساژ و با سرم اتولوگ کشت داده شدند. جمع‌آوری محیط کشت از پاساژ ۳ تا ۷ انجام شد. ابتدا، محیط کشت‌های جمع‌آوری شده به مدت ۶۰ دقیقه با دور ۹۰۰۰ rpm در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ و محیط رویی با

فیلتر ۰/۲۲ PES فیلتر شد. محیط کشت فیلتر شده با ۸ درصد پلی‌اتیلن گلیکول ترکیب و به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد بر روی شیکر قرار داده شد. سپس با دور ۹۰۰۰ rpm به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتریفیوژ شد. محیط رویی خارج و رسوب انتهایی با PBS به حجم ۱ میلی‌لیتر رسانده و در آن حل گردید. برای خالص‌سازی اگزوزوم‌های جداسازی شده از روش سائز اکسکلوزن کروماتوگرافی با رزین سفارز CL-2B (ارگ بیوتک، ایران) استفاده شد. نمونه تغلیظ شده با پلی‌اتیلن گلیکول (۱ میلی‌لیتر) بر روی ستون لود شد و سپس شستشو با PBS فیلتر شده انجام شد. ۳۰ فرکشن متوالی ۰/۵ میلی‌لیتر جمع‌آوری شد. فرکشن‌های ۶ تا ۹ جمع‌آوری و توسط آمیکون ۱۰۰ کیلو دالتون تغلیظ شدند. اگزوزوم‌های جدا شده تا استفاده بعدی در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

تعیین ویژگی اگزوزوم‌های خالص سازی شده

برای تعیین ویژگی اگزوزوم‌های خالص‌سازی شده باید اندازه، مورفولوژی و مارکرهای اگزوزومی سنجیده شود. در این مطالعه از روش پراکندگی نور دینامیکی (DLS) برای اندازه‌گیری ذرات، الکتروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) برای بررسی مورفولوژی و فلوسایتومتری برای بررسی CD9، CD63 و CD81 به عنوان مارکرهای اگزوزومی استفاده شد. برای اندازه‌گیری سائز ذرات، ۲ میلی‌لیتر از اگزوزوم تخلیص شده با استفاده از یک سرنگ به درون کووت شرکت HORIBA اضافه شد. سپس کووت به منظور خوانش درون دستگاه زتا سائزر HORIBA-SZ100 قرار گرفت و پراکندگی ذرات بررسی شد. پس از اتمام اندازه‌گیری جهت شستشو کووت، ابتدا با استفاده از فشار آب محلول حاوی اگزوزوم درون کووت خارج شد. سپس به کمک یک سرنگ به درون کووت الکل ۷۰ درصد اضافه شد و به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. بعد از زمان گفته شد الکل از درون کووت خارج و ۳ مرتبه با آب مقطر

مانند، دوکی شکل و کشیده را در طول دوره کشت آزمایشگاهی نشان دادند (تصویر شماره ۲).



تصویر شماره ۱: نمودار شمارش سلولی، تعداد سلول‌های رشد داده شده در غلظت‌های مختلف سرم اتولوگ در پاساژهای اول تا سوم

سلول‌های بنیادی مزانشیمی جدا شده از خون قاعدگی در این مطالعه از استانداردهای سلول‌های بنیادی بالغ برخوردار بودند. جهت بررسی و تایید سلول‌های بنیادی مزانشیمی از بیان ۲ مارکر اختصاصی این سلول‌ها و عدم بیان ۲ مارکر خونساز استفاده شد. همچنین نتایج فلوسایتومتری نشان داد که سلول‌های کشت داده شده که برای CD73 و CD105 بیان مثبت و برای CD34 و CD45 منفی بودند (تصویر شماره ۳).

تعیین ویژگی‌های آگروزوم‌های خالص سازی شده آگروزوم‌ها نوعی وزیکول‌های کوچک با دو لایه فسفولیپیدی هستند که اندازه آن‌ها بین ۱۵۰-۳۰۰ نانومتر است و دارای عملکردهای مختلف بیولوژیکی هستند. استفاده از DLS برای اندازه‌گیری توزیع اندازه آگروزوم‌ها انجام شد. در شکل نشان داده شده است که قطر نانو ذرات جداسازی شده بین ۳۰-۱۵۰ نانومتر بود که با سایز آگروزوم‌ها کاملاً مطابقت داشته و حاکی از صحت جداسازی آگروزوم‌ها می‌باشد (تصویر شماره ۴).

شتشسو داده شد. برای TEM، به‌طور خلاصه، یک قطره از آگروزوم‌های جدا شده (۲۰ میکرولیتر) به مدت ۲ دقیقه روی گرید ۳۰۰ مش با پوشش کربن قرار داده شد و به مدت ۱ دقیقه با اورانیل استات آبی ۲ درصد رنگ آمیزی منفی شد. سپس، اجازه داده شد تا در هوا خشک شود و بر روی یک TEM (Zeiss, EM10C) که با ولتاژ شتاب‌دهنده ۱۰۰ کیلوولت کار می‌کند، مورد بررسی قرار گرفت.

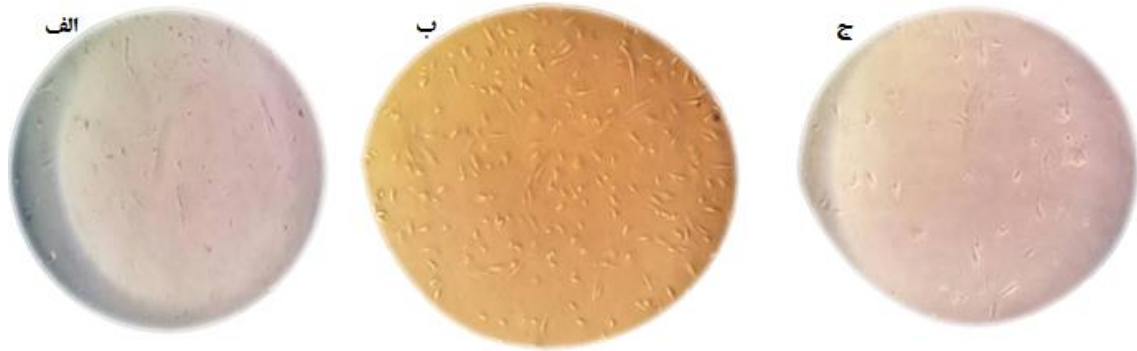
آنالیز آماری

برای آنالیز آماری از نرم‌افزار SPSS و از آزمون‌های t-test استفاده شده است. هم‌چنین P کم‌تر از ۰/۰۵ به صورت معنی‌دار در نظر گرفته شده است.

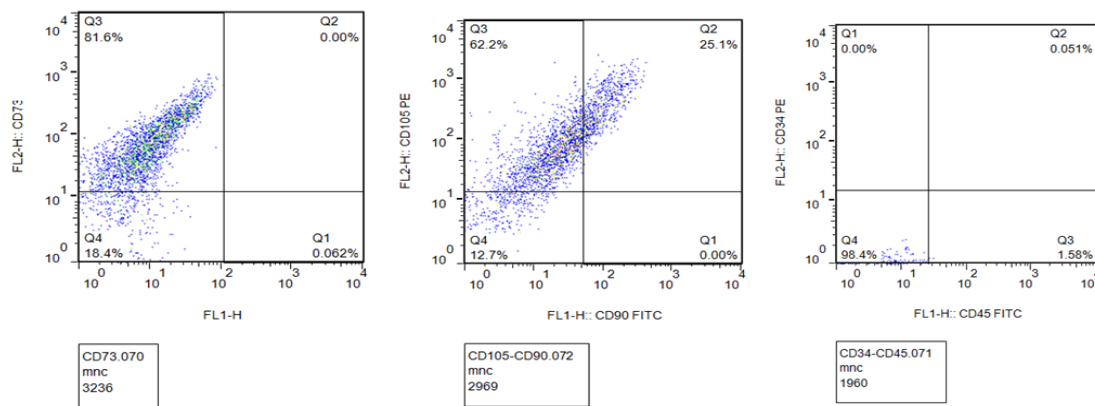
یافته‌ها

تعیین ویژگی‌های سلول‌های کشت داده شده در غلظت‌های متفاوت سرم اتولوگ

سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از خون قاعدگی پس از جداسازی در محیط کشت DMEM F-12 غنی شده با غلظت‌های ۱۰، ۱۵ و ۲۰ درصد سرم اتولوگ کشت داده شدند. سلول‌های کشت داده شده در غلظت ۱۰ درصد پس از ۷ روز رشد کردند. اما سلول‌های کشت داده شده در غلظت‌های سرم اتولوگ ۱۵ و ۲۰ درصد در ۳ روز رشد کردند. سلول‌های کشت داده شده در سرم ۱۰ درصد رشد ضعیفی از خود نشان داده و به تراکم نرسیدند و در نهایت از بین رفتند. سلول‌های کشت داده شده در سرم ۱۵ درصد بهترین رشد را داشته و به صورت معناداری گسترش یافتند ($P > 0/05$) و پس از ۷ روز به تراکم ۸۰ درصد رسیدند. سلول‌های کشت داده در محیط کشت ۲۰ درصد پس از ۲ پاساژ از تعداد سلول‌های کشت داده شده اولیه، تعدادشان کاهش پیدا کرد (تصویر شماره ۱). پس از کشت، سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از خون قاعدگی که در سرم ۱۵ درصد رشد پیدا کردند، در پاساژ سوم مورفولوژی فیروبلاست



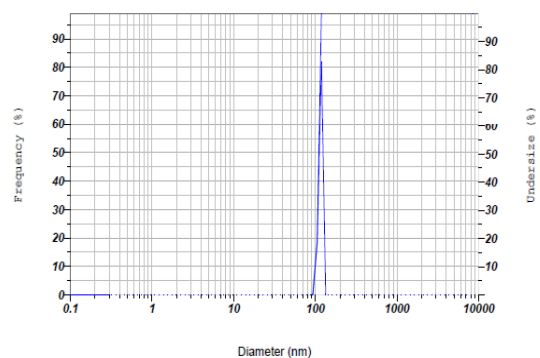
تصویر شماره ۲: سلول‌های کشت داده شده در غلظت‌های مختلف از سرم اتولوگ. الف) سلول‌های کشت داده شده در ۱۰ درصد سرم اتولوگ، ب) ۱۵ درصد سرم اتولوگ، ج) ۲۰ درصد سرم اتولوگ



تصویر شماره ۳: سلول‌های کشت داده شده در سرم ۱۵ درصد در پاساژ سوم بیان مثبتی برای مارکرهای مزانشیمی داشتند. در حالی که ماررهای خوشساز بیانی نداشتند



تصویر شماره ۵: نتایج TEM مورفولوژی فنجانی شکل را برای آگزوزوم‌های جدا شده نشان داد



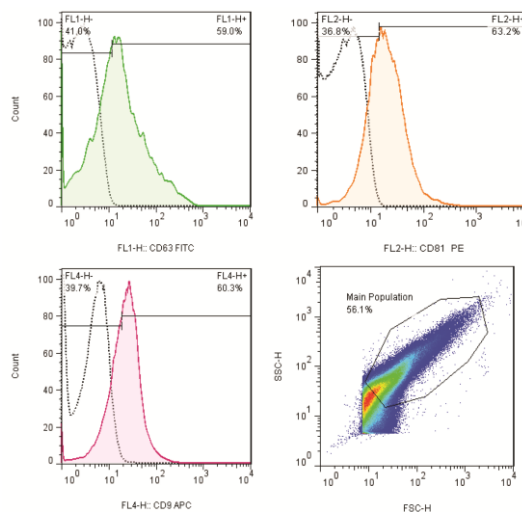
تصویر شماره ۴: اندازه آگزوزوم‌های جدا شده در تجزیه و تحلیل DLS یک پیک تیز در ۱۰۹ نانومتر داشتند

برای تایید بیان مارکرهای آگزوزومی از فلوسایتمتری استفاده شد و مارکرهای آگزوزومی CD9، CD63، CD81 بررسی شدند. آگزوزوم‌های جداسازی و خالص شده برای هر سه مارکر آگزوزومی بیان مثبت داشتند (تصویر شماره ۶).

سپس، مورفولوژی آگزوزوم‌ها از طریق TEM تأیید شد. نتایج عکسبرداری TEM مورفولوژی وزیکول‌های فنجانی شکل با دو لایه را تأیید کرد که همان مورفولوژی شناخته شده برای آگزوزوم‌ها را می‌باشد (تصویر شماره ۵).

در نتیجه، جایگزین‌های متعددی برای رفع کمبود FBS در نظر گرفته شدند (۱۲). در این مطالعه اثر استفاده از سرم اتولوگ به‌عنوان جایگزین FBS برای کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی خون قاعدگی خود فرد بررسی شد. بدین منظور، ابتدا سلول‌های بنیادی مزانشیمی را از خون قاعدگی جداسازی گردید. در مطالعه Chen (به نقل از Meng و همکارانش در سال ۲۰۰۷) برای اولین بار سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از خون قاعدگی را توصیف کردند. از آن زمان، این سلول‌ها به‌علت جمع‌آوری دوره‌ای، جداسازی غیر تهاجمی و بدون درد، نرخ تکثیر بالا، دفع کم ایمنولوژیک، و عدم وجود مسائل اخلاقی به یک استراتژی درمانی امیدوارکننده برای توسعه درمان‌های موثر تبدیل شده است (۱۳). سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از خون قاعدگی برای چندین مولکول سطحی مانند CD29، CD9، CD44، CD73، CD90، CD105، فاکتور رونویسی اتصال اکتامر ۴ (Oct-4)، CD166 و کمپلکس اصلی سازگاری بافتی I (MHC I) مثبت بوده و در میان این مولکول‌ها CD29، CD73، CD90، CD105 معمولاً برای نشانگرهای سلول‌های بنیادی مزانشیمی استفاده می‌شوند. سلول‌های بنیادی مزانشیمی خون قاعدگی هم‌چنین برای نشانگرهای سلول‌های بنیادی خون‌ساز مانند CD34، CD45 و CD133 و مارکرهای CD14، CD38 و ایزوتیپ آنتی‌ژن DR-لکوسیت انسانی (HLA-DR) بیان منفی دارند (۱۴). هم‌چنین این نوع سلول‌ها همانند سایر سلول‌های بنیادی مزانشیمی دوکی شکل هستند (۱۵).

در مطالعات مختلفی از سرم‌های انسانی برای رشد و تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی استفاده شده است. در مطالعه‌ای Shahdaddar و همکارانش از ۲۰ درصد سرم اتولوگ (AS) برای غنی‌سازی محیط کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان استفاده کردند و سلول‌ها رشد و تکثیر یافتند (۱۶). هم‌چنین LeBlanc و همکارانش سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان را در محیط کشت غنی شده با



تصویر شماره ۶: تمام آگروزوم‌های جدا شده مارکرهای آگروزومی CD9، CD63 و CD81 را بیان کردند

بحث

از زمان معرفی تکنیک کشت سلولی، این روش به ابزاری ضروری در زمینه‌های مختلف از جمله تحقیقات بیولوژیکی (مانند مدل‌سازی بیماری‌ها، سلول‌های بنیادی و زیست‌شناسی سرطان)، فناوری تولید مثل (مانند لقاح آزمایشگاهی)، بیوتکنولوژی و واحدهای تولیدی داروسازی (مانند تولید آنتی‌بادی‌ها، داروهای احیاکننده و واکسن‌ها) تبدیل شده است. کشت سلولی جایگزین آزمایشاتی شده است که فقط در یک سیستم زنده قابل انجام است. محیط‌های کشت و مکمل‌های مورد استفاده در کشت سلولی برای موفقیت آن بسیار مهم هستند. مکمل اولیه در محیط‌های پایه FBS است که منبع هورمون‌ها، فاکتورهای رشد، اسیدهای آمینه، پروتئین‌ها، ویتامین‌ها، نمک‌های معدنی، عناصر کمیاب، کربوهیدرات‌ها و لیپیدهای مورد نیاز برای متابولیسم و رشد سلولی می‌باشد (۱۱).

در تحقیقات، FBS یک مکمل ضروری برای سیستم‌های کشت سلولی و بافتی است. با این حال، به دلیل محدودیت در دسترس بودن و افزایش تقاضا، هزینه FBS در سال‌های اخیر بیش از ۳۰۰ درصد افزایش یافته است. جمع‌آوری و استفاده از FBS در سیستم‌های کشت نیز چالش‌های اخلاقی و علمی را به همراه دارد.

۱۰ درصد سرم AB کشت دادند و تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی در حضور سرم AB مشاهده شد. همچنین سلول‌های بنیادی مزانشیمی کشت داده شده در محیط غنی شده با سرم AB از نظر بیان مارکرهای CD90، CD105 و آنتی‌ژن لکوسیت انسانی (HLA) کلاس I در تمام پاساژهای سلولی بیش‌تر از ۹۵ درصد مثبت بود (۱۷). در این مطالعه نیز از سرم اتولوگ، برای حذف کردن FBS از محیط کشت استفاده شد. از سه غلظت مختلف سرم اتولوگ برای کشت استفاده شد. بعد از کشت، در هر سه غلظت از سرم، سلول‌های بنیادی مزانشیمی رشد کردند، اما بهترین رشد را MB- MSCs در محیط کشت غنی شده با ۱۵ درصد سرم اتولوگ مشاهده شد. MB- MSCs مورفولوژی دوکی شکل و فیروبلست مانند را نشان دادند. هم‌چنین در پاساژ سوم بیان مارکرهای مزانشیمی CD73 و CD105 برای MB- MSCs کشت داده شده با سرم اتولوگ ۱۵ درصد مثبت بوده است. این روش علاوه بر کارآمد بودن مقرون به صرفه نیز می‌باشد. هم‌چنین آگزوزوم‌های حاصله از سلول‌های کشت داده شده با سرم اتولوگ تمام ویژگی‌های مرتبط با آگزوزوم‌ها را دارند. آگزوزوم‌ها ۳۰ تا ۱۵۰ نانومتر اندازه دارند، شکل فنجان‌ی شکل دارند و با انتقال mRNA، microRNA، dncRNA، پروتئین‌ها و لیپیدها ارتباط محلی سلول به سلول را واسطه می‌کنند. در مطالعه‌ای Jung و همکارانش ساختار فنجان‌ی شکل آگزوزوم‌ها را نوعی مورفولوژی دانستند که می‌تواند به دلیل به دلیل فرآیند خشک کردن رخ دهد. نتایج Cryo-TEM آن‌ها نشان داده است که آگزوزوم‌ها ساختاری کاملاً کروی در محلول آبی دارند (۱۸). مارکرهای CD9، CD63، CD81 و Hsp70 اغلب روی سطح آگزوزوم‌ها قرار دارند، در حالی که مارکر شبکه آندوپلاسمی calnexin و مارکر لیزوزوم Lamp1 معمولاً وجود ندارند (۱۹، ۲۰). سلول‌های هدف می‌توانند آگزوزوم‌ها را به روش‌های مختلفی از جمله همجوشی

غشایی، اندوسیتوز و اتصال گیرنده جذب کنند (۲۱). مطالعات نشان داده‌اند که آگزوزوم‌ها از طریق انتقال افقی پروتئین‌ها و microRNAs باعث ترمیم آسیب‌های بافتی می‌شوند (۲۲، ۲۳). آگزوزوم‌های اتولوگ به دست آمده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی خون قاعدگی در این مطالعه ویژگی‌های یکسانی داشتند. به علت ارزیابی مورفولوژی از طریق رنگ‌آمیزی منفی، آگزوزوم‌ها مورفولوژی فنجان‌ی شکل را در TEM نشان دادند و بررسی DLS اندازه‌های ۳۰ تا ۱۵۰ نانومتر را تأیید کرد. تجزیه و تحلیل ایمونوفلوئورسینسینگ نشان داد که آگزوزوم‌های جداسازی شده برای بیان CD9، CD63 و CD81 مثبت هستند. بنابراین، می‌توان از این وزیکول‌های خارج سلولی تحت عنوان آگزوزوم در مراحل بعدی مطالعه استفاده کرد.

در نهایت، مطالعه حاضر نشان می‌دهد که استفاده از سرم اتولوگ برای گسترش MB- MSCs، نیاز به فاکتورهای رشد را از بین می‌برد و باعث گسترش این سلول‌ها می‌شود. این رویکرد می‌تواند جایگزین استفاده از FBS در بسیاری از پروتکل‌های سلول درمانی شود و به گزینه بهتری برای گسترش MB- MSC تبدیل شود.

سپاسگزاری

از همکاری صمیمانه تمام عزیزانی که در انجام این مطالعه به ما یاری رساندند، تشکر و قدردانی می‌شود. بین نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافع وجود ندارد. این مقاله مرتبط با پایان‌نامه با شماره ۱۰۲۷۸: «بررسی اثر آگزوزوم‌های مشتق از سلول‌های مزانشیمال خون قاعدگی اتولوگ بر ذخیره‌ی فولیکولی تخمدان و میزان حاملگی در بیماران مبتلا به کاهش ذخایر تخمدانی» با مصوبه اخلاق (IR.MAZUMS.IMAMHOSPITAL.REC.1400.041) نویسنده اول مقاله می‌باشد.

References

1. Faramarzi H, Mehrabani D, Fard M, Akhavan M, Zare S, Bakhshalizadeh S, et al. The Potential of Menstrual Blood-Derived Stem Cells in Differentiation to Epidermal Lineage: A Preliminary Report. *World J Plast Surg* 2016; 5(1): 26-31.
2. Mou XZ, Lin J, Chen JY, Li YF, Wu XX, Xiang BY, et al. Menstrual blood-derived mesenchymal stem cells differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J Zhejiang Univ Sci B* 2013; 14(11): 961-972.
3. Lin YH, Pan TM, Wu MH. Microfluidic Technology and Its Biological Applications. In: Moo-Young M, editor. *Comprehensive Biotechnology (Second Edition)*. Burlington: Academic Press; 2011: 141-157.
4. Segeritz C, Vallier L. Cell Culture: Growing Cells as Model Systems In Vitro. Chapter 9. *Basic Science Methods for Clinical Researchers*. Elsevier: Publish Online; 2017; 151-172.
5. Yao T, Asayama Y. Animal-cell culture media: History, characteristics, and current issues. *Reprod Med Biol* 2017; 16(2): 99-117.
6. van der Sanden B, Dhobb M, Berger F, Wion D. Optimizing stem cell culture. *J Cell Biochem* 2010; 111(4): 801-807.
7. Tekkate C, Gunasingh GP, Cherian KM, Sankaranarayanan K. "Humanized" stem cell culture techniques: the animal serum controversy. *Stem Cells Int* 2011; 2011: 504723.
8. Subbiahanadar Chelladurai K, Selvan Christyraj JD, Rajagopalan K, Yesudhasan BV, Venkatachalam S, Mohan M, et al. Alternative to FBS in animal cell culture- An overview and future perspective. *Heliyon* 2021; 7(8): e07686.
9. Gstraunthaler G, Lindl T, van der Valk J. A plea to reduce or replace fetal bovine serum in cell culture media. *Cytotechnology* 2013; 65(5): 791-793.
10. Witzeneder K, Lindenmair A, Gabriel C, Höller K, Theiß D, Redl H, et al. Human-Derived Alternatives to Fetal Bovine Serum in Cell Culture. *Transfus Med Hemother* 2013; 40(6): 417-423.
11. Subbiahanadar Chelladurai K, Selvan Christyraj JD, Rajagopalan K, Yesudhasan BV, Venkatachalam S, Mohan M, et al. Alternative to FBS in animal cell culture- An overview and future perspective. *Heliyon* 2021; 7(8): e07686.
12. Fang CY, Wu CC, Fang CL, Chen WY, Chen CL. Long-term growth comparison studies of FBS and FBS alternatives in six head and neck cell lines. *PloS One* 2017; 12(6): e0178960.
13. Chen L, Qu J, Mei Q, Chen X, Fang Y, Chen L, et al. Small extracellular vesicles from menstrual blood-derived mesenchymal stem cells (MenSCs) as a novel therapeutic impetus in regenerative medicine. *Stem Cell Res Ther* 2021; 12(1): 433.
14. Chen L, Qu J, Xiang C. The multi-functional roles of menstrual blood-derived stem cells in regenerative medicine. *Stem Cell Res Ther* 2019; 10(1): 1.
15. Haasters F, Prall WC, Anz D, Bourquin C, Pautke C, Endres S, et al. Morphological and immunocytochemical characteristics indicate the yield of early progenitors and represent a quality control for human mesenchymal stem cell culturing. *J Anat* 2009; 214(5): 759-767.
16. Shahdadfar A, Frønsdal K, Haug T, Reinholdt FP, Brinchmann JE. In vitro expansion of human mesenchymal stem cells: choice of serum is a determinant of cell proliferation,

- differentiation, gene expression, and transcriptome stability. *Stem Cells* 2005; 23(9): 1357-1366.
17. Le Blanc K, Samuelsson H, Lönnies L, Sundin M, Ringdén O. Generation of immunosuppressive mesenchymal stem cells in allogeneic human serum. *Transplantation* 2007; 84(8): 1055-1059.
 18. Jung MK, Mun JY. Sample Preparation and Imaging of Exosomes by Transmission Electron Microscopy. *J Vis Exp* 2018; (131): 56482.
 19. ISEV2022 Abstract Book. *J Extracell Vesicles* 2022; 11(Suppl 1): e12224.
 20. Anakor E, Le Gall L, Dumonceaux J, Duddy WJ, Duguez S. Exosomes in Ageing and Motor Neurone Disease: Biogenesis, Uptake Mechanisms, Modifications in Disease and Uses in the Development of Biomarkers and Therapeutics. *Cells* 2021; 10(11): 2930.
 21. Wei H, Chen Q, Lin L, Sha C, Li T, Liu Y, et al. Regulation of exosome production and cargo sorting. *Int J Biol Sci* 2021; 17(1): 163-177.
 22. Burke J, Kolhe R, Hunter M, Isales C, Hamrick M, Fulzele S. Stem Cell-Derived Exosomes: A Potential Alternative Therapeutic Agent in Orthopaedics. *Stem Cells Int* 2016; 2016: 5802529.
 23. Sun L, Li D, Song K, Wei J, Yao S, Li Z, et al. Exosomes derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells protect against cisplatin-induced ovarian granulosa cell stress and apoptosis in vitro. *Sci Rep* 2017; 7(1): 2552.