ORIGINAL ARTICLE

Effects of Cryopreservation on Epithelial Cells before and after Isolation from Human Amniotic Membrane

Hassan Niknezhad[1],
Habibollah Peirovi[2]

[1] Department of Pharmacology, Nanomedicine and Tissue Engineering Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[2] Department of Surgery, Nanomedicine and Tissue Engineering Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

(Received June 10, 2012 ; Accepted October 21, 2012)

Abstract

Background and purpose: One of the recent techniques for increasing the output of cryopreservation is using different scaffolds in long-term preservation of stem cells for cell therapy. Undesirable differentiation and decrease in the number of viable cells are two major problems in this process. In order to overcome these problems, in this study the human amniotic epithelial cells were cryopreserved using amniotic membrane as their natural scaffold.

Materials and methods: After tissue preparation and extraction of amniotic epithelial cells, the cells were preserved for 12 months in two different groups of with and without scaffold in 24 different patterns in -196°C in liquid nitrogen. The percentage of viable cells and their pluripotency were determined before and after cryopreservation. The data was analyzed using ANOVA (Tukey Post-Test) statistical method.

Results: Cell viability and percentage of Oct-4 positive cells were higher in the group with scaffold. The difference between the number of viable cells and pluripotency was not statistically significant between freshly extracted cells and cells that were cryopreserved with scaffold. Moreover, glycerol decreased the output of cryopreservation.

Conclusion: This study showed that employing amniotic membrane as a scaffold for cryopreservation of human amniotic epithelial cells could increase the number of viable cells and reduce the amount of undesirable differentiation in the process of cryopreservation.

Keywords: Cryopreservation, human amniotic epithelial cells, scaffold, amniotic membrane, pluripotency

J Mazand Univ Med Sci 2012; 22(94): 15-26 (Persian).

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و دوم شماره ۹۴ آبان سال ۱۳۹۱ (۲۶-۱۵)

بررسی اثرات کرایوپرزرویشن بر سلول های اپی تلیال قبل و بعد از جداسازی از پرده آمنیون انسانی

حسن نیک‌نژاد[1]
حبیب‌الله پیروی[2]

چکیده

سابقه و هدف: یکی از تکنیک‌های جدید در نگهداری طولانی مدت سلول‌های بنیادی به منظور استفاده از آن‌ها در سلول درمانی، استفاده از داربست‌های مختلف برای افزایش بازده کرایوپرزرویشن سلولی است. از مشکلات عمده کرایوپرزرویش، کاهش تعداد سلول‌های زنده و ایجاد تمایزهای ناخواسته در سلول‌ها می‌باشد مطالعه حاضر به منظور بررسی روش‌های احتمالی کاهش این مشکلات، انجام شد و بدین منظور سلول‌های اپی‌تلیال آمنیون انسانی با استفاده از داربست پرده آمنیون که داربست طبیعی این سلول‌ها است کرایوپرزرو شدند.

مواد و روش‌ها: در بررسی حاضر پس از تهیه بافت و جداسازی سلول‌های اپی‌تلیال آمنیون انسانی، سلول‌ها در دو گروه با داربست و بدون داربست در ۲۴ حالت مختلف در دمای $196^{\circ}C$- در نیتروژن مایع به مدت ۱۲ ماه نگهداری شدند و پس از آن درصد سلول‌های زنده و میزان پرتوانی (pluripotency) سلول ها، قبل و بعد از کرایوپرزرویشن بررسی شد. نتایج حاصل با روش آماری ANOVA (Tukey Post-Test) مقایسه و آنالیز گردید.

یافته‌ها: نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان داد تعداد سلول‌های زنده و درصد بیان Oct-4 در گروه با داربست نسبت به گروه بدون داربست بیشتر بود. تعداد سلول‌های زنده و میزان پرتوانی در سلول‌هایی که به همراه داربست کرایوپرزرو شده بودند با سلول‌های تازه جداشده تفاوت معنی‌داری نداشت. همچنین حضور گلیسرول در محیط، میزان بازده کرایوپرزرویشن را کاهش داد.

استنتاج: مطالعه حاضر نشان داد که استفاده از پرده آمنیون به عنوان یک داربست در کرایوپرزرویشن سلول‌های اپی‌تلیال آمنیون انسانی می‌تواند تعداد سلول‌های زنده پس از کرایوپرزرویشن را افزایش داده و از ایجاد تمایزهای ناخواسته طی نگهداری طولانی مدت جلوگیری نماید.

واژه های کلیدی: کرایوپرزرویشن، سلول‌های اپی‌تلیال آمنیون انسانی، داربست، پرده آمنیون، پرتوانی

مقدمه

پرده آمنیون انسان از رشد و نمو بافت‌های خارج رویانی جنین به‌وجود می‌آید، این پرده شامل یک لایه اپی‌تلیوم حاوی سلول‌های اپی‌تلیال آمنیونی انسانی (hAECs) است که به‌طور یکنواخت و منظم بر روی غشاء پایه ضخیم و یک لایه استرومایی بدون عروق قرار دارد. آمنیون یک بافت فاقد هرگونه رگ و عصب

مولف مسئول: حسن نیک نژاد– تهران: دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، مرکز تحقیقات نانوتکنولوژی پزشکی و مهندسی بافت E-mail :niknejad@sbmu.ac.ir
۱. گروه فارماکولوژی، مرکز تحقیقات نانوتکنولوژی پزشکی و مهندسی بافت، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
۲. گروه جراحی، مرکز تحقیقات نانوتکنولوژی پزشکی و مهندسی بافت، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
تاریخ دریافت :۱۳۹۱/۴/۱۰ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۳۹۱/۶/۱۹ تاریخ تصویب : ۱۳۹۱/۷/۳۰

بوده و مواد غذایی و سایرمواد مورد نیازش را مستقیماً با مکانیسم انتشار از مایع آمنیونی و یا از لایه زیرین خود یعنی جفت و اجزای آن به دست می‌آورد(۱). پرده آمنیون انسان، خصوصیات ویژه‌ای دارد که از میان آن‌ها می‌توان به توانایی آن در جلوگیری از رشد باکتری‌ها(۲)، مهار و جلوگیری از ایجاد واکنش‌های التهابی سیستم ایمنی(۳)، جلوگیری از ایجاد زخم(۴)، کمک به ترمیم زخم و تسریع اپیتلیالزاسیون(۵) اشاره کرد. این ویژگی‌ها باعث شده است که از پرده آمنیون در پزشکی به‌طور وسیعی استفاده شود، از جمله می‌توان به استفاده از پرده آمینون به عنوان یک پوشش بیولوژیک در سوختگی‌های پوستی(۶)، درمان زخم‌ها(۷) و بسیاری دیگر از بیماری‌های پوستی اشاره کرد. همچنین پرده آمنیون برای درمان بیماری‌های چشمی از جمله درمان انواع ناهنجاری‌ها و بیماری‌های قرنیه و ملتحمه(۸)، ترمیم سوختگی‌ها و آسیب‌های چشم که به دلیل مواد شمیایی و غیره ایجاد شده، استفاده وسیعی دارد(۹). علاوه بر موارد فوق از آمنیون در جراحی نیز استفاده می‌شود(۱۰). اخیرا مطالعات جدیدی در زمینه استفاده از آمنیون به عنوان یک داربست مناسب و همچنین منبع سلولی ایده‌آل در مهندسی بافت انجام گرفته است(۱).

از سوی دیگر، سلول های اپی‌تلیال آمنیون مارکرهای سطحی سلول‌های بنیادی جنینی مثل SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-80 را بیان می‌کنند. این سلول‌ها همچنین فاکتورهای مرتبط با پرتوانی (pluripotency) سلول‌های بنیادی نظیر Oct-4 و Nanog را نیز بیان می‌نمایند(۱۲،۱۱). تحقیقات بیشتر بر روی سلول‌های اپی‌تلیال آمنیونی نشان داده است که این سلول‌ها پرتوان هستند و توانایی تمایز به هر سه رده مزودرمی، اکتودرمی و اندودرمی را دارا (۱۳) و از جمله می‌توان به مطالعاتی در زمینه تمایز این سلول‌ها به سلول‌های رده مزودر می مانند میوسیت، کاردیومیوسیت، استئوسیت و آدیپتوسیت(۱۴)، سلول‌های رده اندودرمی مانند هپاتوسیت(۱۵) و سلول‌های پانکراس(۱۶) و سلول‌های رده اکتودرمی مانند سلول‌های عصبی(۱۸،۱۷) اشاره کرد. سلول‌های اپی‌تلیال آمنیونی همچنین خصلت کلونی‌زایی دارند(۱۴). در مطالعاتی نشان داده شد با وجود این‌که سلول‌های اپی تلیال آمنیونی پرتوان هستند اما در پیوند به موش‌هایی، با سیستم ایمنی سرکوب (SCID) و توانایی ایجاد تراتوما را ندارند(۱۹،۱۴). علاوه بر آن، سلول‌های اپی‌تلیال آمنیونی از نظر ایمونولوژیکی خنثی هستند و این موضوع ریسک رد پیوند یا واکنش‌های ایمونولوژیکی پس از پیوند این سلول ها را کاهش می‌دهد(۲۱،۲۰). همچنین این سلول‌ها بدون نیاز به سلول‌های ثانویه به عنوان لایه مغذی (Feeder layer) قدرت رشد و تکثیر دارند(۱۱). با توجه به این خصوصیات ویژه، سلول‌های اپی‌تلیال آمنیونی به عنوان جایگزینی مناسب برای سلول‌های بنیادی جنینی در کاربردهای تحقیقاتی و درمانی مطرح می باشند. استفاده از درمان‌های نوین از جمله سلول درمانی و مهندسی بافت در ترمیم ضایعات گوناگون و درمان بیماری‌های مختلف افزایش روز افزونی داشته است و از سوی دیگر پتانسیل بالقوه جهت به‌کارگیری سلول‌های اپی‌تلیال آمنیونی و پرده آمنیون در این درمان ها وجود دارد. در این راستا، ضروری به نظر می‌رسد که روش‌های مناسبی برای نگهداری طولانی مدت سلول‌های اپیتلیال آمنیون انسانی ایجاد شود تا بتوان از این سلول‌ها به نحو مناسب‌تر، سریع‌تر و بهتری در کاربردهای تحقیقاتی و درمانی استفاده کرد. در تمامی مطالعاتی که تا به‌حال در زمینه تهیه بانک سلولی انجام گرفته، کاهش تعداد سلول‌های زنده و ایجاد تمایزهای ناخواسته در طول کرایوپرزرویشن به‌عنوان دو مشکل اساسی در نگهداری طولانی مدت سلول‌های بنیادی مورد توجه قرار گرفته است(۲۴-۲۲). برای رفع این مشکلات، تکنیک‌های مختلفی بررسی و پیشنهاد شده است. یکی از تکنیک های جدید که در

کرایوپرزرویشن سلول‌های مختلف در سال‌های اخیر مورد استفاده قرار گرفته، استفاده از بسترها و داربست‌ها است. کُنام سلولی (Niche) که شامل مواد مختلف مانند پروتیئن‌های ماتریکس خارج سلولی، فاکتورهای رشد و سایر عوامل است، نقش بسیار مهمی در رشد، تمایز و عملکرد فیزیولوژیک سلول‌های بنیادی دارد(۲۲) از این رو استفاده از شرایط خاصی که بتواند محیط طبیعی رشد سلول‌های بنیادی را در حین کرایوپرزرویشن تقلید نماید، می‌تواند در بهبود روند کرایوپرزرویشن این سلول‌ها نقش مهمی داشته باشد. مطالعات مختلفی در این زمینه بر روی سلول‌های مختلف صورت گرفته که در آن‌ها سلول ها قبل از کرایوپرزرویشن در داربست‌های مختلف و به شکل منجمد و طولانی مدت نگهداری شده‌اند(۲۴،۲۳). از این رو وجود داربست‌های مشابه با کنام سلول‌ها، منجر به افزایش تعداد سلول‌های زنده و کاهش تمایزهای ناخواسته پس از کرایوپرزرویشن سلول های بنیادی می‌گردد.

مطالعه حاضر با استفاده از روش‌های رایج در کرایوپرزرویشن سلولی و با به‌کارگیری مواد مختلف محافظ انجماد (DMSO, Glycerol)، سرم حیوانی (FBS)، محیط کشت سلول (DMEM) و استفاده از پرده آمنیون به عنوان کنام طبیعی سلول‌های اپی‌تلیال آمنیون انسانی، تأثیر شرایط مختلف کرایوپرزرویشن بر میزان زنده بودن (Viability) و بیان مارکر پرتوانی (Oct-4) سلول‌های اپی‌تلیال آمنیون انسانی پس از انجام مراحل کرایوپرزرویشن و نگهداری طولانی مدت (۱۲ ماه) بررسی گردید.

مواد و روش‌ها

جمع آوری بافت

نمونه‌های جفت و اجزای آن از سزارین‌های انتخابی (Elective) مادرانی که در هفته‌های ۳۵ و ۳۶ بارداری قرار داشتند، از بیمارستان‌های عرفان و آیت‌الله طالقانی تهران تهیه گردید. پیش از آن تست‌های سرولوژیکی مربوط به بیماری‌های عفونی مانند HIV ، HCV ، HBV و سیفلیس بر روی مادران انجام گرفت و مادرانی که از نظر بیماری‌های عفونی فوق سالم بودند وارد مطالعه شدند. اطلاعات لازم برای استفاده از جفت به والدین ارائه شد و فرم رضایت کتبی نیز از آن‌ها اخذ گردید.

بافت جفت به محض انجام جراحی و خارج‌سازی از بدن در ظروف استریل حاوی بافر فسفات سالین (PBS) و ۵۰µg/ml پنی سیلین و ۵۰µg/ml استرپتومایسین قرار داده شد و در دمای $4^{\circ}C$ سریعاً به آزمایشگاه منتقل گردید. کلیه مراحل بعدی کار در محیط آزمایشگاه در زیر هود کشت سلولی و به‌صورت استریل انجام شد. پرده آمنیون با روش مکانیکی (Peeling) از کوریون جفت جداسازی شده و چندین بار توسط بافر فسفات سالین سرد ($4^{\circ}C$) شستشو داده شد تا لکه‌های خونی کاملاً از روی آن شسته شوند. نتایج به‌دست آمده از مطالعات اولیه نشان داد که نقاط تاخورده و چروکیده شده بافت پس از کرایوپرزرویشن مقدار viability کمتری دارند. به منظور جلوگیری از این مشکل در گروه هایی که سلول‌ها به همراه داربست استفاده می‌شدند پس از شستشوی کامل، بافت بر روی غشاهای نیتروسلولز طوری پهن می‌شد که سمت اپی‌تلیوم آن به سمت بالا قرار گیرد و سپس بافت به قطعات با ابعاد ۰/۵ × ۰/۵ سانتی‌متر بریده و استفاده گردید همچنین به منظور یکسان کردن شرایط در هر دو گروه با داربست و بدون داربست، تعداد سلول‌های اپی‌تلیالی روی پرده آمنیون در زیر میکروسکوپ فاز معکوس با عدسی چشمی مدرج در یک مساحت خاص شمارش شد و به همان تعداد سلول در گروه های بدون داربست مورد استفاده قرار گرفت. تعداد سلول‌ها در پرده آمنیون با ابعاد فوق به‌طور میانگین ۲×۱۰^{۷} بود و غلظت نهایی گروه بدون داربست نیز با توجه به این نتایج تنظیم گردید.

جداسازی سلول

برای جداسازی سلول‌های اپی‌تلیال آمنیونی، پرده آمنیون به قطعات کوچک‌تر تقسیم و برای هضم آنزیمی در محلول Trypsin-EDTA (0.15%) (Sigma-Aldrich) قرار گرفت(۷، ۲۰). بعد از این مرحله کلیه عملیات در دمای ۳۷° C انجام شد. هضم آنزیمی در سه مرحله صورت گرفت. مواد حاصل از مرحله اول هضم آنزیمی به مدت ۱۰ دقیقه که بیشتر زوائد پرده آمنیون بودند، دور ریخته شد، محلول حاصل از مجموع هضم آنزیمی مراحل دوم و سوم که هرکدام ۴۰ دقیقه طول کشید به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت 2300 rpm سانتریفیوژ شده و سلول‌های حاصل، جمع‌آوری و سپس در PBS به شکل سوسپانسیون مورد استفاده قرار گرفت. تعداد سلول در سوسپانسیون فوق طوری تنظیم گردید که تعداد نهایی سلول‌ها در هر ویال کرایو ۲×۱۰^{۷} سلول در هر میلی‌لیتر (برابر تعداد سلول ها در گروه با داربست پرده آمنیون) باشد.

گروه های مطالعه

گروه‌های مورد بررسی در مطالعه حاضر شامل دو گروه اصلی بودند که عبارتند از:

۱- گروه سلول بدون داربست: در این گروه سلول‌های اپی‌تلیال آمنیونی جدا شده از پرده آمنیون به صورت سوسپانسیون سلولی محلول در PBS استفاده شدند و مواد لازم برای کرایوپرزرویشن به آن‌ها اضافه شد و با حجم‌های یک میلی لیتری در کرایوتیوب قرار داده شدند. هدف از انتخاب این گروه بررسی تأثیر شرایط و مواد مختلف مانند FBS ، محیط کشت DMEM (Invitrogen)، DMSO (Sigma-Aldrich) و گلیسرول در کرایوپرزرویشن سلول‌های اپی‌تلیال آمنیون انسانی بود. بنابراین گروه شامل سه دسته اصلی (DMSO, Glycerol, DMSO+Glycerol) بود که جزئیات هریک از گروه‌ها در جدول شماره ۱ نشان داده شده است. پس از این‌که ویال ها به مدت ۵ دقیقه در دمای محیط نگهداری شدند، به مدت ۲۴ ساعت در فریزر ۸۰° C- قرار گرفته و پس از ۲۴ ساعت سریعاً به تانک نیتروژن مایع انتقال داده شدند. پس از ۱۲ ماه کرایوتیوب‌ها از نیتروژن مایع خارج و در دمای محیط ذوب شدند. درصد زنده ماندن و بیان نشانگر Oct-4 در همه نمونه‌ها بعد از کرایوپرزرویشن اندازه‌گیری شد و نتایج حاصل با روش ANOVA بررسی گردید. برای به‌دست آوردن نتایج قابل قبول و مقایسه‌های آماری، نمونه های به دست آمده از ۱۲ جفت به‌صورت مستقل بررسی و برای هر گروه ۵ بار (n=5) تکرار، انجام شد.

۲- گروه سلول با داربست: در این گروه از پرده آمنیون سلول دار استفاده شد. بدین منظور قطعات بافتی تهیه شده با شرایط و مواد مختلف که جزییات آن در جدول شماره ۱ نشان داده شده کرایوپرزرو گردیدند. حجم نهایی محتویات کرایوتیوب توسط PBS به یک میلی لیتر رسانده شد. شرایط کرایو پرزرویشن این گروه کاملاً مشابه با گروه سلول بدون داربست بود. همچنین در این گروه از نمونه‌های به‌دست آمده از همان جفت‌های گروه سلول بدون داربست و با همان تعداد تکرر استفاده شد تا بتوان خطا های احتمالی را کاهش داد و تاثیر شرایط مختلف کرایوپرزرویشن را در میزان زنده بودن سلول ها و بیان مارکر Oct-4 در دو گروه، مقایسه بهتری نمود. از آزمون (Tukey Post-Test) ANOVA برای محاسبات آماری استفاده شد.

روش های بررسی Viability

برای بررسی میزان زنده بودن سلول‌ها از دو روش استفاده گردید:

۱- روش رنگ آمیزی Trypan blue : در این روش از محلول تریپان بلو برای غربالگری اولیه استفاده شد و بافت‌ها و سوسپانسیون هایی که درصد سلول‌های زنده در آن‌ها کمتر از ۸۵ درصد بود از مطالعه حذف شدند و تعداد سلول‌های زنده در نمونه‌های باقی مانده با روش MTT مورد بررسی دقیق تری قرار گرفت.

جدول شماره ۱: ترکیب مواد استفاده شده برای کرایو پرزرویشن سلول های اپی تلیال آمنیون انسانی در هر دو گروه سلول بدون داربست و سلول با داربست.

	ترکیب محتویات نمونه ها در هر دو گروه با و بدون داربست				
	ردیف	DMSO(10%)	Glycerol(50%)	FBS(10%)	DMEM(10%)
DMSO	۱	●	○	○	○
	۲	●	○	●	○
	۳	●	○	○	●
	۴	●	○	●	●
Glycerol	۵	○	●	○	○
	۶	○	●	●	○
	۷	○	●	○	●
	۸	○	●	●	●
DMSO + Glycerol	۹	●	●	○	○
	۱۰	●	●	●	○
	۱۱	●	●	○	●
	۱۲	●	●	●	●

گروه های مورد بررسی در این طرح شامل سه گروه اصلی بود که با توجه به نوع ماده محافظ انجماد تقسیم بندی شدند: DMSO، Glycerol و DMSO+Glycerol. به هر یک از این گروه ها بر اساس جدول بالا، افزودنی های دیگر شامل سرم و DMEM اضافه گردید.

(●) ماده مورد نظر در نمونه موجود است.

(○) ماده مورد نظر در نمونه موجود نیست.

۲- روش MTT : اساس این روش احیاء تترازول زرد رنگ به‌نام 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromibe)، توسط آنزیم‌های میتوکندری سلول‌های زنده، به Formazan با رنگ بنفش است که در طول موج ۵۷۰ نانومتر حداکثر جذب را دارد. درصد سلول‌های زنده به‌طور دقیق قبل و پس از کرایوپرزرویشن با این روش مورد بررسی قرار گرفتند(۷).

ایمونو سیتوشیمی

در این روش با استفاده از آنتی‌بادی‌های اختصاصی بر علیه مارکر های سلول‌های اپی‌تلیال آمنیون انسانی بیان پروتئین‌های Pancytokeratin و Oct-4 ارزیابی شدند. برای بررسی مارکر Pancytokeratin از آنتی‌بادی Monoclonal Anti-Pan Cytokeratin (Sigma-Aldrich) کونژوگه شده با FITC و برای بررسی مارکر Oct-4 از آنتی بادی اولیه Anti-POU5F1 (Sigma-Aldrich) و آنتی‌بادی ثانویه Goat anti-rabbit IgG (Chemicon) کونژوگه شده با رودامین استفاده شد. به منظور محاسبه درصد سلول‌های بیان کننده پروتئین، رنگ آمیزی هسته سلول‌ها توسط DAPI (Sigma-Aldrich) صورت گرفت. همچنین از گروه‌های کنترل مثبت و منفی برای کنترل مراحل ایمونوسیتوشیمی استفاده شد(۷).

کنترل میکروبی بانک سلولی

با این‌که کلیه مراحل تهیه و آماده سازی بافت و همچنین جداسازی سلول‌ها در شرایط استریل انجام گرفت، اما به جهت احتمال وجود آلودگی‌های ناخواسته میکروبی به‌خصوص هنگام تهیه بافت و انتقال آن به آزمایشگاه و این که این آلودگی‌های میکروبی می‌تواند درصد viability سلول‌ها را به میزان چشمگیری کاهش دهد، همه بافت‌ها و سلول‌ها قبل و بعد از کرایوپرزرویشن از نظر وجود عوامل میکروبی (باکتری‌ها و قارچ ها) به شرح زیر بررسی و در کوچک‌ترین موارد تثبیت آلودگی از گروه مطالعه حذف شدند.

محیط‌های کشت برای بررسی آلودگی باکتریایی و قارچی شامل:

الف) محیط کشت Trypticase soy broth برای فراهم کردن شرایط رشد هوازی برای گونه‌های گرم مثبت و گرم منفی هوازی و بی‌هوازی اختیاری و قارچ‌ها.

ب) محیط کشت Blood agar برای فراهم‌کردن شرایط رشد مغذی برای گونه‌های گرم مثبت هوازی و بی‌هوازی اختیاری.

ج) محیط کشت Thioglycollate broth برای فراهم‌کردن شرایط رشد برای گونه‌های بی‌هوازی اجباری.

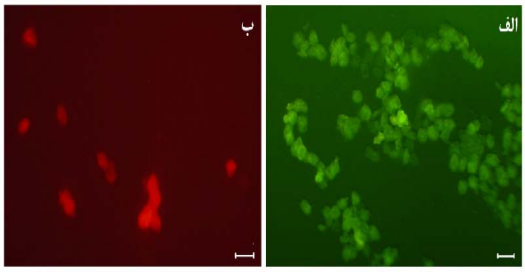
د) محیط کشت Sabouraud's dextrose agar برای فراهم کردن شرایط رشد مغذی برای قارچ ها.

در همه گروه‌های مورد مطالعه، مقداری از سوسپانسیون‌های سلولی و بافت‌ها در محیط‌های فوق

کشت و در دمای ۳۷°C و ۱۵°C به مدت ۱۴ روز انکوبه شدند. محیط‌های کشت به ترتیب پس از گذشت ۲۴ ساعت، ۷۲ ساعت و ۱۴ روز از نظر رشد میکروبی بررسی گردیدند.

یافته‌ها

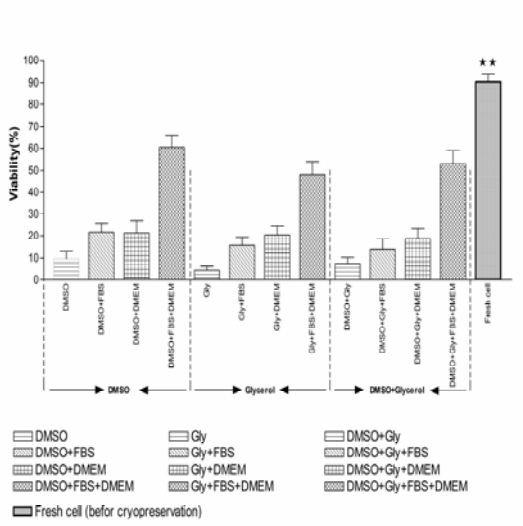
نتایج حاصل از بررسی مارکر Pancytokeratin نشان داد که همه سلول‌های اپی‌تلیال آمنیون انسانی پس از جداسازی Pancytokeratin را بیان می‌کنند که بیانگر جداسازی صحیح این سلول‌ها و عدم آلودگی به سلول‌های مزانشیمال می‌باشد (تصویر شماره- ۱الف).



تصویر شماره ۱: الف: واکنش آنتی بادی کونژوگه شده با FITC بر علیه مارکر Pancytokeratin در سلول های اپی تلیالی آمنیون انسانی. ب: واکنش آنتی بادی ثانویه کونژوگه شده با رودامین با آنتی بادی اولیه بر علیه مارکر پرتوانی Oct-4 در سلول های اپی تلیال آمنیون انسانی قبل از کرایوپرزرویشن (Scale bar = 50µm).

تصویر شماره ۲: تصویری از نتایج کشت میکروبی منفی پس از ۷۲ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷°C؛ الف) در محیط کشت Trypticase soy broth، ب) در محیط کشت Sabouraud's dextrose agar.

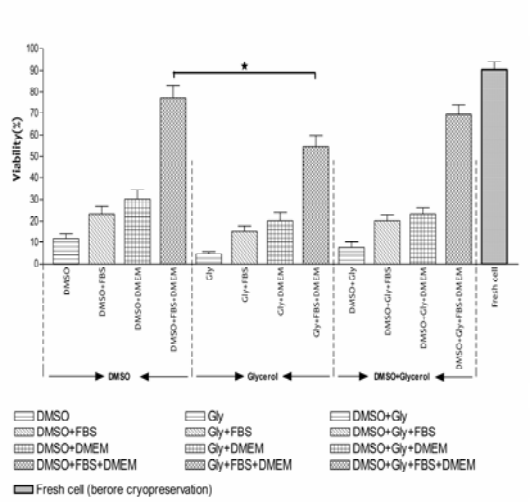
درصد زنده ماندن سلول‌های اپی‌تلیال آمنیون انسانی به دو روش MTT و Trypanblue قبل از کرایوپرزرویشن بررسی و نتایج حاصل نشان داد، بیش از ۹۴ درصد از سلول‌های اپی تلیال آمنیون انسانی پس از جداسازی از پرده آمنیون قدرت حیات دارند. درصد سلول‌های زنده پس از کرایوپرزرویشن سلول‌های اپی‌تلیال آمنیون انسانی با روش MTT بررسی و در گروهی که سلول ها به همراه داربست نگهداری می شدند، سلول های اپی‌تلیال آمنیون انسانی پس از کرایوپرزرویشن جداسازی و سپس مورد ارزیابی قرار گرفتند. در گروه سلول بدون داربست درصد سلول‌های زنده در سوسپانسیون سلول‌های اپی‌تلیال آمنیون انسانی پس از کرایوپرزرویشن بررسی و نتایج حاصل به همراه درصد سلول‌های زنده قبل از کرایو پرزرویشن (Fresh cell) در نمودار شماره ۱ نشان داده شده است.



نمودار شماره ۱: مقایسه درصد سلول‌های زنده قبل و پس از کرایوپرزرویشن در سلول‌های اپی تلیال آمنیون انسانی در گروه بدون داربست. ترکیب DMSO+FBS+DMEM دارای تفاوت معنی‌داری نسبت به سایر گروه‌ها می‌باشد ($p<0.05$). با اینحال در این گروه کاهش معنی‌دار زنده ماندن سلول‌ها نسبت به سلول‌های قبل از کرایوپرزرو مشاهده می‌شود. (★★ $p<0.01$)

همچنین نتایج نشان داد دسته‌ای که ماده محافظ انجماد، فقط شامل DMSO بود. بالاترین درصد سلول‌های زنده، توسط ترکیبی که از مواد FBS و DMEM بود به‌دست آمد (62.2±4.6%) و کمترین میزان سلول های زنده، در ویال‌هایی بود که فقط حاوی

DMSO بودند. در دسته‌ای از نمونه‌ها که ماده محافظ انجماد فقط شامل گلیسرول بود درصد سلول‌های زنده کمتر از گروه‌های حاوی DMSO مشاهده گردید و در دسته‌ای که سلول‌ها در حضور هر دو ماده محافظ انجماد DMSO و گلیسرول نگهداری شده بودند بالاترین میزان سلول‌های زنده پس از کرایوپرزرویشن، در نمونه‌هایی دیده شدند که علاوه بر مواد محافظ انجماد، حاوی ترکیبی از FBS و DMEM بودند. درگروه سلول با داربست، سلول‌های اپی‌تلیال آمنیون انسانی بدون جداسازی از بستر، در شرایط کاملاً مشابه با گروه بدون داربست نگهداری و میزان درصد سلول‌های زنده پس از یکسال بررسی گردیدند که نتایج آن به همراه درصد سلول‌های زنده قبل از کرایوپرزرویشن (Fresh cell) در نمودار شماره ۲ نشان داده شده است.

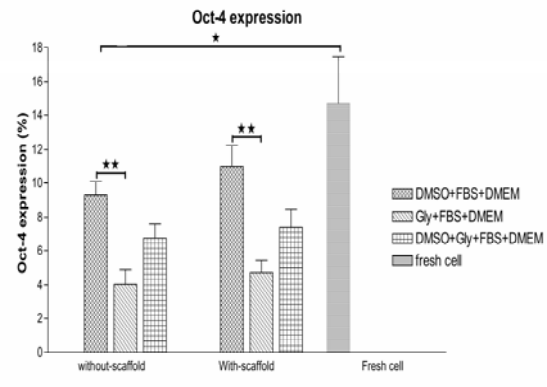


نمودار شماره ۲: مقایسه درصد سلول های زنده قبل و پس از کرایوپرزرویشن در سلول های اپی تلیال آمنیون انسانی در گروه با داربست (★ P<0.05). تفاوت معنی داری بین سلول های تازه تهیه شده (Fresh) و سلول های کرایو شده بر روی داربست در گروه DMSO+FBS+DMEM وجود ندارد.

در دسته‌ای که فقط از DMSO به عنوان ماده محافظ انجماد استفاده شده بود کمترین میزان سلول‌های زنده در گروه‌هایی دیده شد که فقط ماده محافظ در آن حضور داشت و بیشترین درصد سلول‌های زنده در حالت‌هایی مشاهده گردید که علاوه بر ماده محافظ، ترکیبی از FBS و محیط کشت DMEM هم به آن اضافه شده بود (77.9±4.8). در نمونه هایی که حاوی DMSO+FBS و DMSO+DMEM بودند، درصد سلول‌های زنده به ترتیب ۲۳/۴ و ۳۰/۲ درصد گزارش شد. در دسته‌های که از گلیسرول و گلیسرول+DMSO به عنوان عوامل محافظت از انجماد استفاده شده بود درصد سلول‌های زنده پس از کرایوپرزرویشن کمتر از گروه حاوی DMSO بود.

به منظور بررسی تمایزهای ناخواسته سلول‌های اپی‌تلیال آمنیون انسانی در حین نگهداری دراز مدت در بانک سلولی، درصد بیان مارکر پرتوانی Oct-4 در نمونه‌هایی که بیشترین میزان سلول‌های زنده را داشتند، با روش رنگ‌آمیزی ایمونوسیتوشیمی بررسی و نتایج حاصل نشان داد که ۱۴/۷±۳/۱ درصد از این سلول‌ها مارکر فوق را قبل از کرایوپرزرویشن بیان می کنند. در شکل شماره ۱- ب نمونه ای از سلول‌های اپی‌تلیال آمنیون انسانی که مارکر پرتوانی را بیان می‌کنند نشان داده شده است. با توجه به شرایط مختلف نگهداری که در گروه سلول بدون داربست ایجاد شد و نتایج حاصل از درصد سلول‌های زنده، میزان بیان مارکر Oct-4 در حالت‌هایی که ترکیبی از مواد FBS و DMEM به همراه مواد محافظ انجماد در محیط سلول‌ها وجود دارند، بررسی گردید و نتایج حاصل از آن به همراه درصد بیان Oct-4 قبل از کرایوپرزرویشن (Fresh cell) در نمودار شماره ۳ نشان شده است. درصد بیان مارکر Oct-4 پس از کرایوپرزرویشن در دسته‌ای از سلول‌ها که فقط از ماده گلیسرول برای محافظت از انجماد در آن‌ها استفاده شده بود کم‌ترین مقدار به‌دست آمد، به‌طوری که در سلول‌هایی که در محیط حاوی گلیسرول، FBS و DMEM نگهداری شده بودند میزان بیان مارکر Oct-4 به حدود ۴ درصد رسید. از سوی دیگر بالاترین میزان بیان مارکر Oct-4 در سلول‌هایی دیده شد که از DMSO به عنوان ماده محافظ انجماد در آن ها استفاده

شده بود. در این دسته بیشترین درصد بیان Oct-4 در حالتی گزارش شد که سلول‌ها در DMSO، FBS و DMEM نگهداری می شدند. نتایج حاصل همچنین نشان داد که در دسته‌ای از سلول‌ها که از DMSO و گلیسرول به همراه هم به عنوان مواد محافظ انجماد استفاده می‌شد، به‌طور کلی بیان مارکر Oct-4 کمتر از حالتی است که DMSO به تنهایی استفاده شود.



نمودار شماره ۳: مقایسه درصد بیان Oct-4 قبل و پس از کرایوپرزرویشن سلول های اپی تلیال آمنیون انسانی در هر دوگروه بدون داربست و با داربست (★ p<0.05),(★★ p<0.01).

در سلول‌هایی که به همراه بسترشان نگهداری شده بودند نیز میزان بیان مارکر Oct-4 پس از کرایوپرزرویشن سلول‌ها بررسی گردید که نتایج حاصل از آن به همراه درصد بیان Oct-4 قبل از کرایوپرزرویشن در نمودار شماره ۳ نشان داده شده است. همان‌طور که دیده می‌شود در این گروه نیز بیشترین میزان بیان مارکر Oct-4 در سلول‌هایی دیده می‌شود که در محیطی حاوی DMSO، FBS و DMEM نگهداری می شدند که در این حالت ۲/۶ ± ۱۰/۹ درصد از سلول ها مارکر Oct-4 را بیان می‌کردند. کمترین میزان بیان مارکر Oct-4 نیز در سلول‌هایی دیده شد که با استفاده از FBS، DMEM و گلیسرول نگهداری شده بودند.

با توجه به نتایج به‌دست آمده از میزان سلول‌های زنده و میزان بیان مارکر Oct-4 و مقایسه این نتایج با سلول‌های کرایوپرزرو نشده (Fresh cells)، اختلاف معنی‌داری در میزان سلول‌های زنده نمونه های حاوی DMSO+FBS+DMEM در گروه سلول بدون داربست با سلول‌هایی که کرایوپرزرو نشده بودند وجود داشت (p <۰/۰۵)، در صورتی که در درصد سلول‌های زنده در نمونه‌های مشابه در گروه سلول با داربست اختلاف معنی داری وجود نداشت. در مورد بیان Oct-4 نتایج حاصل نشان داد که میزان بیان Oct-4 در گروه با داربست تفاوت معنی‌داری با سلول‌های قبل از کرایوپرزرویشن نداشته، در حالی که بیان این مارکر در گروه بدون داربست پس از کرایوپرزرویشن کاهش معنی‌داری را نشان می‌دهد (p <۰/۰۵) (نمودار شماره ۳). برای بررسی اثرات مواد محافظ در کرایوپرزرویشن سلول‌های اپی تلیال آمنیون انسانی، میزان بیان Oct-4 در نمونه‌هایی که در ترکیب آن‌ها FBS+DMEM+ماده محافظ انجماد بود، در هر دو گروه سلول با داربست و بدون داربست مقایسه شد (نمودار شماره ۳). در گروهی که از گلیسرول استفاده شده کاهش معنی‌داری نسبت به گروه DMSO در بیان Oct-4 دیده می شود (p <۰/۰۱). این وضعیت در هر دو گروه با و بدون داربست مشاهده گردید. این یافته ها نشان می‌دهد، در گروه سلول بدون داربست، نمونه‌هایی که در ترکیب آن‌ها DMSO به‌عنوان ماده محافظت کننده از انجماد به‌کار رفته است نسبت به گروه حاوی گلیسرول تمایزهای ناخواسته کمتری دارند.

بحث

یکی از چشم اندازهای بسیار مهم در پزشکی، استفاده از روش‌های نوین مانند سلول درمانی جهت درمان بیماری‌ها است. از سوی دیگر با روشن شدن زوایای مختلف بیولوژیک سلول‌های بنیادی و پتانسیل‌های بالقوه آن‌ها، نحوه نگهداری و استفاده از سلول‌های بنیادی یکی از مباحث مهمی است که در سراسر دنیا مورد توجه ویژه‌ای قرار گرفته است. در همین راستا تهیه بانک سلولی مناسب از سلول‌های

بنیادی دانشمندان مختلفی را در سراسر دنیا به چالش کشیده و بدین منظور تحقیقات وسیعی در زمینه بهینه‌سازی و نگهداری طولانی مدت سلول‌ها در حال انجام می باشد. از مشکلات عمده نگهداری طولانی مدت سلول‌هایی که خواص بنیادی دارند می‌توان به کاهش تعداد سلول‌های زنده و تمایزهای ناخواسته در طول زمان نگهداری سلول‌ها اشاره کرد. هدف مطالعه حاضر، بررسی اثر داربست آمنیون در کرایوپرزرویشن سلول‌های اپی‌تلیال آمنیون انسانی به منظور افزایش تعداد سلول‌های زنده و کاهش میزان تمایزهای ناخواسته پس از کرایوپرزرویشن بود. اولین هدف مطالعه حاضر، استفاده از پرده آمنیون به عنوان داربست سلولی در کرایوپرزرویشن سلول های اپی‌تلیال آمنیون انسانی بود. طبق نتایج حاصله، کرایوپرزرو کردن سلول‌ها بر روی بستر طبیعیشان باعث افزایش ماندگاری در مقایسه با سلول های جدا شده می‌گردد. این نتایج در راستای گزارش‌هایی است که حضور بستر برای انجماد سلول‌ها را ضروری می‌دانند. مطالعه Liu و همکاران (۲۰۰۰)، بر روی سلول‌های فیبروبلاست نشان داد، انجام شد، سلول‌هایی که در بستر سه بعدی قرار داده شده بودند بیشتر نسبت به سلول‌های فاقد بستر، زنده ماندند(۲۵). در مطالعه دیگری که توسط Birraux و همکاران (۲۰۰۲) انجام گردید، سلول‌های کبدی به شکل ساندویجی بین دو لایه کلاژن قرار داده و پس از نگهداری طولانی مدت، افزایش در تعداد سلول‌های زنده و همچنین افزایش در عملکرد ترشحی پس از کرایوپرزرویشن مشاهده گردید که این نتایج بیانگر تأثیر مثبت داربست بود(۲۴). همچنین، در مطالعه Lin و همکاران (۲۰۰۴)، سلول‌های بنیادی جنینی قبل از انجماد در Matrigel قرار داده و سپس کرایوپرزرو شدند که تعداد سلول‌های زنده پس از نگهداری به این شیوه به‌طور چشمگیری افزایش نشان داد و همچنین درصد سلول‌هایی که به شکل ناخواسته در طول کرایوپرزرویشن تمایز پیدا می‌کردند کاهش داشت(۲۳). استفاده از داربست ها در اکثر موارد باعث افزایش بهره وری کرایوپرزرویشن می شود. همچنین مطالعه حاضر نشان داد کرایو کردن سلول‌ها بر روی بستر، می تواند باعث کاهش تمایز های ناخواسته در پروسه نگهداری سلول‌ها به روش انجماد گردد و بدین منظور، از Oct-4 استفاده گردید. این نشانگر یکی از مجموعه فاکتورهای همانندسازی سلول های انسانی است که در سلول‌های بنیادی که خاصیت پرتوانی دارند دیده می‌شود و یکی از مارکرهای شناسایی سلول های بنیادی تمایز نیافته و پرتوان می باشد(۲۶). برای توجیه اثر مثبت داربست آمنیون در کرایوپرزرویشن طولانی مدت سلول‌های اپی‌تلیال آمنیون انسانی می‌توان دلایل مختلفی را مطرح نمود. از جمله این‌که استفاده از آمنیون به عنوان کنام می‌تواند شرایط طبیعی زندگی سلول‌های اپی‌تلیال آمنیونی را در طول کرایوپرزرویشن حفظ نماید. پرده آمنیون بافتی غنی از پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی مانند کلاژن تایپ I و IV، فیبرونکتین، لامینین، پرلکان و غیره است(۲۷) و حضور این پروتئین‌ها به عنوان عوامل اصلی کنام سلول‌های اپی‌تلیالی می‌تواند از آسیب‌های ایجاد شده در طول کرایوپرزرویشن سلول‌ها بکاهد. نتایج مطالعه حاضر علاوه بر تأئید نتایج مطالعاتی که قبلا در این راستا صورت گرفته بود، پرده آمنیون را به عنوان یک داربست جدید در روند کرایوپرزرویشن سلول ها معرفی می‌نماید. بدیهی است که انجام مطالعات وسیع تر در زمینه استفاده از پرده آمنیون در نگهداری طولانی مدت سایر سلول ها نیز ضروری به نظر می رسد. یکی دیگر از اهداف مطالعه حاضر بررسی اثرات حضور DMSO و گلیسرول در نگهداری طولانی مدت سلول‌های اپی تلیال آمنیون انسانی بود. یافته های مطالعه حاضر نشان داد نمونه‌هایی که در ترکیب آن‌ها گلیسرول وجود دارد، پرتوانی سلول‌های اپی تلیال آمنیون انسانی در طول کرایوپرزرویشن کاهش بیشتری دارد. همچنین حضور گلیسرول در کرایوپرزرویشن سلول‌های اپی تلیال آمنیون انسانی می تواند باعث کاهش تعداد سلول‌های

زنده گردد. در مورد استفاده از مواد محافظ انجماد، مطالعات بسیار زیادی صورت گرفته است. مواد مختلفی برای جلوگیری از تشکیل کریستال های یخ و آسیب‌های سلولی ناشی از آن در کرایوپرزرویشن سلولی استفاده می‌شود که انتخاب نوع ماده با توجه به نوع سلول، نحوه انجام کرایوپرزرویشن، مدت زمان نگهداری سلول و غیره انتخاب می گردد(۲۸). نتایج متناقضی در مورد اثرات مثبت و منفی استفاده از گلیسرول یا DMSO در کرایوپرزرویشن سلول ها وجود دارد(۲۸). از عوامل مؤثر در این زمینه می توان به میزان نفوذپذیری ماده محافظ به درون سلول، نوع سلول، غلظت مواد محافظ، مکانیسم محافظت در برابر انجماد و غیره اشاره کرد(۲۹). در نهایت چنین به‌نظر می رسد ماده جلوگیری کننده از تشکیل کریستال یخ می باید بر اساس نوع سلول تعیین گردد.

در پایان می‌توان نتیجه گیری کرد که آمنیون به عنوان یک داربست طبیعی و کنام سلول‌های اپی تلیال آمنیون انسانی می‌تواند نقش مثبتی در کرایوپرزرویشن این سلول‌ها داشته باشد. استفاده از آمنیون می‌تواند از مرگ و میر ناشی از کرایوپرزرویشن سلول‌ها جلوگیری کرده و قدرت پرتوانی آن‌ها را حفظ نماید. با انجام مطالعات وسیع تر در این زمینه، می‌توان پرده آمنیون را به عنوان داربست جدیدی در تهیه بانک سلول‌های مختلف معرفی نمود.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از پرسنل محترم اتاق عمل بیمارستان‌های عرفان و آیت الله طالقانی به‌خصوص سرکار خانم دکتر نیرومنش و سرکار خانم یوسفی کمال قدردانی و تشکر به‌عمل می‌آید. این مطالعه با حمایت مالی مرکز تحقیقات نانوتکنولوژی پزشکی و مهندسی بافت دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی انجام گردید.

References

1. Niknejad H, Peirovi H, Jorjani M, Ahmadiani A, Ghanavi J, Seifalian AM. Properties of the amniotic membrane for potential use in tissue engineering. Eur Cell Mater 2008; 15: 88-99.
2. Ganatra, MA, Amniotic membrane in surgery. J Pak Med Assoc 2003; 53(1): 29-32.
3. Gomes JA, Romano A, Santos MS, Dua HS. Amniotic membrane use in ophthalmology. Curr Opin Ophthalmol 2005; 16(4): 233-240.
4. Dua HS, Gomes JA, King AJ, Maharajan VS. The amniotic membrane in ophthalmology. Surv Ophthalmol 2004; 49(1): 51-77.
5. Hao Y, Ma DH, Hwang DG, Kim WS, Zhang F. Identification of antiangiogenic and antiinflammatory proteins in human amniotic membrane. Cornea 2000; 19(3): 348-352.
6. Rao TV, Chandrasekharam V. Use of dry human and bovine amnion as a biological dressing. Arch Surg 1981; 116: 891-896.
7. Niknejad H, Deihim T, Ahmadiani A, Jorjani M, Peirovi H. Permanent expression of midbrain dopaminergic neurons traits in differentiated amniotic epithelial cells. Neurosci Lett 2012; 506(1): 22-27.
8. Niknejad H, Deihim T, Solati-Hashjin M, Peirovi H. The effects of preservation procedures on amniotic membrane's ability to serve as a substrate for cultivation of endothelial cells. Cryobiology 2011; 63(3): 145-151.
9. Massaro-Giordano M, Caporossi A, Toti P, tosi GM. Amniotic membrane transplantation in ocular surface disorders. J Cell Physiol 2005; 2029(3): 849-851.

10. Gomes JA, Romano A, Santos MS, Dua HS. Amniotic membrane use in ophthalmology. Curr Opin Ophthalmol 2005; 16(4): 233-240.
11. Andonovska D, Dzokic G, Spasevska L, Trajkovska T, Popovska K, Todorov I, et al. The advantages of the application of amnion membrane in the treatment of burns. Prilozi 2008; 29(1): 183-198.
12. Georgy MS, Aziz NL. Vaginoplasty using amnion graft: New surgical technique using the laparoscopic transillumination light. J Obstet Gynecol 1996; 16(4): 262-264.
13. Miki T, Lehmann T, Cai H, Stolz DB, Strom SC. Stem cell characteristics of amniotic epithelial cells. Stem Cells 2005; 23(10): 1549-1559.
14. Miki T, Mitamura K, Ross MA, Stolz DB, Strom SC. Identification of stem cell marker-positive cells by immunofluorescence in term human amnion. J Reprod Immunol 2007; 75(2): 91-96.
15. Miki T. Amnion-derived stem cells: in quest of clinical applications. Stem Cell Res Ther 2011; 2(3): 25.
16. Ilancheran S, Michalska A, Peh G, Wallace EM, Pera M, Manuelpillai U. Stem cells derived from human fetal membranes display multilineage differentiation potential. Biol Reprod 2007; 77(3): 577-588.
17. Takashima S, Ise H, Zhao P, Akaike T, Nikaido T. Human amniotic epithelial cells possess hepatocyte-like characteristics and functions. Cell Struct Funct 2004; 29(3): 73-84.
18. Wei JP, Zhang TS, Kawa S, Aizawa T, Ota M, Akaike T, et al. Human amnion-isolated cells normalize blood glucose in streptozotocin-induced diabetic mice. Cell Transplant 2003; 12(5): 545-552.
19. Sakuragawa N, Thangavel R, Mizuguchi M, Hirasawa M, Kamo I. Expression of markers for both neuronal and glial cells in human amniotic epithelial cells. Neurosci Lett 1996; 209(1): 9-12.
20. Niknejad H, Peirovi H, Ahmadiani A, Ghanavi J, Jorjani M. Differentiation factors that influence neuronal markers expression in vitro from human amniotic epithelial cells. Eur Cell Mater 2010; 4(4): 37-47.
21. Miyamoto K, Hayashi K, Suzuki T, Ichihara S, Yamada T, Kano Y, et al. Human placenta feeder layers support undifferentiated growth of primate embryonic stem cells. Stem Cells 2004; 22(4): 433-440.
22. Lensch MW, Daheron L, Schlaeger TM. Pluripotent stem cells and their niches. Stem Cell Rev 2006; 2(3): 185-201.
23. Ji L, de Pablo JJ, Palecek SP. Cryopreservation of adherent human embryonic stem cells. Biotechnol Bioeng 2004; 88(3): 299-312.
24. Birraux J, Genin B, Matthey-Doret D, Mage R, Morel P, Le Coultre C. Hepatocyte cryopreservation in a three-dimensional structure. Transplant Proc 2002; 34(3): 764-767.
25. Liu K, Yang Y, Mansbridge J. Comparison of the stress response to cryopreservation in monolayer and three-dimensional human fibroblast cultures: stress proteins, MAP kinases, and growth factor gene expression. Tissue Eng 2000; 6(5): 539-554.
26. Niwa H, Miyazaki J, Smith AG. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. Nature Genetics 2000; 24(4): 372-376.
27. Lee EJ, Vunjak-Novakovi G, Wang Y, Niklason LE A biocompatible endothelial cell delivery system for in vitro tissue engineering. Cell Transplant 2009; 18(7): 731-743.
28. Jomha NM, Weiss ADH, Forbes JF, Law GK, Elliott JAW, McGann LE.

Gabriel C, Eibl J, Redl H. The influence of various storage conditions on cell viability in amniotic membrane. Cell Tissue Banking 2007; 8(1): 1-8.

Cryoprotectant agent toxicity in porcine articular chondrocytes. Cryobiology 2010; 61(3): 297-302.

29. Hennerbichler S, Reichl B, Pleiner D,