

Assessment of Schwann cell purity cultured in autologous human serum for spinal cord injury repair

Arjmand B^{1*}, Aghayan SH¹, Shabanzadeh A², Norouzi Javidan A¹, Saberi H¹, Hosseini SK², Emami Razavi SH⁶, Soleimani M³

1- Brain and Spinal Injury Repair Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, I. R. Iran

2- Iranian Tissue Bank, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, I. R. Iran

3- Department of Hematology, Faculty of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, I. R. Iran

Received January 1, 2010; Accepted May 29, 2010

Abstract:

Background: Purity of cultured Schwann cell is very important in patients' outcome. The purpose of this study was evaluation of cell purity in a culture without nerve growth factors and fetal bovine serum.

Materials and Methods: In this experimental study, for culture of human Schwann cells, nerve growth factors and fetal bovine serum were replaced by human autologous serum. Obtaining a consent from the close relative, nerve grafts were harvested and transported to processing unit where they were cultured in DMEM upon aseptic condition. Then the cultured cells were evaluated with S100 antibody staining for both morphology and purity.

Results: Cell purity range was from 97% to 99% (mean=98.11±0.782%). Cell count was 14055.56±2480.479 per microliter. There was not significant correlation between cell purity with either the culture period or the age of donors ($P>0.05$). The Spearman correlation coefficient for the cell purity with the culture period and the age of donors was -0.21 and -0.09, respectively.

Conclusion: We found that the replacement of nerve growth factors and fetal bovine serum with human autologous serum improves the cultured Schwann cells for clinical use with more safety and minimum reagents.

Keywords: Purity, Blood serum, Schwann cells, Spinal cord

* Corresponding Author.

Email: arjmand_itb@yahoo.com

Tel: 0098 912 158 1633

Fax: 0098 21 665 81557

Conflict of Interests: No

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, Summer 2010; Vol 14, No 2, Pages 107-111

بررسی میزان خلوص سلول‌های شوان انسانی کشت داده شده با استفاده از سرم انسانی اتولوگ در ترمیم ضایعات نخاعی

بابک ارجمند^{۱*}، سید حمیدرضا آقایان^۱، علیرضا شعبانزاده^۲، عباس نوروزی جاویدان^۳، هوشنگ صابری^۳، سید کاظم حسینی^۴، سید حسن امامی رضوی^۳، مسعود سلیمانی^۵

خلاصه

سابقه و هدف: کشت سلول‌های شوان بالغ انسانی یکی از روش‌های مرسوم ترمیم ضایعات نخاعی است. هدف از این مطالعه تعیین درصد خلوص سلول‌های شوان به دست آمده با حذف فاکتورهای رشد و سرم جنین گاوی بوده است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، کشت سلول‌های شوان انسانی بدون استفاده از فاکتور رشد عصبی و فاکتور رشد شبه انسولین و جایگزینی سرم جنین گاوی با سرم اتولوگ انسانی انجام شد. پس از اخذ رضایت پژوهشی از اولیای موارد مرگ مغزی، تعداد ۱۰ عصب محیطی همراه با خون دهنده تحت شرایط ضد عفونی برداشت شد. قطعات عصب در محیط مغذی DMEM و با جایگزینی سرم انسانی به جای سرم جنین گاوی کشت داده شدند. در نهایت، سلول‌ها با آنتی بادی S100 رنگ آمیزی و بررسی شدند.

نتایج: خلوص سلول‌های شوان در نمونه‌ها بین ۹۷ تا ۹۹ درصد بود (میانگین $98/11 \pm 0/782$ درصد). تعداد سلول‌های شوان در هر میکرولیتر نمونه به طور میانگین $14050/56 \pm 2480/479$ بود. ارتباط آماری معنی‌داری میان طول مدت فرآیند کشت و میزان خلوص سلول‌های شوان و همچنین میان سن دهنندگان عصب و میزان خلوص سلول‌های شوان مشاهده نشد ($P > 0/05$). ضریب همبستگی اسپیرمن برای دو آزمون ذکر شده به ترتیب $-0/21$ و $-0/09$ بود.

نتیجه‌گیری: با توجه به حذف سرم جنین گاوی و فاکتورهای رشد معمول مورد استفاده در کشت‌های سلول می‌توان از خطرات تومورزایی احتمالی و نیز آلودگی‌های پریونی احتراز نمود.

واژگان کلیدی: خلوص سلولی، سرم خون، سلول شوان، نخاع

فصلنامه علمی - پژوهشی فیض، دوره چهاردهم، شماره ۲، تابستان ۱۳۸۹، صفحات ۱۱۱-۱۰۷

مقدمه

به دنبال حوادث داشت؛ به خصوص اگر قصد استفاده بالینی از فرآورده هم مد نظر باشد، اهمیت این موضوع بیشتر خواهد بود. در مطالعه‌ای که توسط Lopez و De Vries انجام شد، کشت سلول‌های اعصاب محیطی جنین انسانی به صورت Serum Free و بدون استفاده از سرم گاوی صورت گرفت که میزان خلوص سلولی پس از بررسی با S100، ۹۸ درصد گزارش شده است [۱]. در بررسی دیگری که توسط فیروزی و همکاران انجام شد سلول‌های شوان کشت داده شده در فضای زیر عنکبوتیه موش‌هایی که در آنها ضایعه نخاعی ایجاد شده بود تزریق شد؛ خلوص سلول‌های شوان در این مطالعه با استفاده از S100 بررسی شده و ۹۹ درصد گزارش شده است [۲]. Ansselin و همکارانش توانسته‌اند سلول‌های شوان را از اعصاب محیطی موش کشت دهند و به تعداد و خلوص قابل قبولی نیز دست یابند [۳]. در مطالعه‌ای که توسط Terenghi و همکارانش انجام شده، بررسی مورفولوژیک سلول‌های شوان اعصاب محیطی در ۱۰ نمونه انجام گرفته است که همانند مطالعه حاضر از رنگ آمیزی با آنتی بادی S100 برای این بررسی استفاده شده است [۶]. به دلیل استفاده بالینی از نتایج این کار و برای احتراز از خطرات احتمالی ذکر شده و دستیابی به میزان ایمنی زیستی بالاتر، هدف این بررسی دستیابی به نتایج

کشت سلول‌های شوان بالغ انسانی جهت ترمیم ضایعات نخاعی در کشور ما در حال انجام است. از آنجا که در اکثر مطالعات گذشته [۱،۲] از فاکتورهای رشد استفاده شده بود و با توجه به استفاده مرسوم از سرم گاوی در مراحل کشت انواع سلول‌ها از جمله سلول‌های عصبی [۵-۲] این موضوع خطرات احتمالی انتقال بیماری‌های پریونی از طریق سرم گاوی و همچنین احتمال تومورزایی فاکتورهای رشد سلولی استفاده شده در فرآیند کشت را

^۱پزشک عمومی، مرکز تحقیقات ترمیم ضایعات مغزی و نخاعی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

^۲دانشیار، مرکز تحقیقات و بانک فرآورده‌های پیوندی ایران، دانشگاه علوم پزشکی تهران

^۳استادیار، مرکز تحقیقات ترمیم ضایعات مغزی و نخاعی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

^۴کارشناس ارشد میکروبیولوژی، مرکز تحقیقات و بانک فرآورده‌های پیوندی ایران، دانشگاه علوم پزشکی تهران

^۵استادیار، گروه هماتولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

* نشانی نویسنده مسئول:

مرکز تحقیقات ترمیم ضایعات مغزی و نخاعی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

تلفن: ۰۹۱۲ ۱۵۸۱۶۳۳۳ | دورنویس: ۰۲۱ ۶۶۵۸۱۵۵۷

پست الکترونیکی: arjmand_itb@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۸۸/۱۰/۱۱ | تاریخ پذیرش نهایی: ۸۹/۳/۸

میزان خلوص بررسی شدند. در مجموع به جز حذف فاکتورهای رشد و جایگزینی سرم گاوی با سرم انسانی سایر مراحل کشت مشابه سایر مطالعات انجام گرفت [۳]. رنگ آمیزی S100 بدین صورت انجام گرفت که ابتدا سلول‌های کشت داده شده در پارافرمالدئید ۴ درصد در PBS (ICN آمریکا) فیکس شدند و سپس به مدت ۱۰ دقیقه با PBS شستشو داده شده و در مرحله بعد ۳ ساعت در دمای ۴ درجه سانتیگراد با آنتی بادی اولیه اینکوبه شده و پس از آن ۲ مرتبه و هر بار به مدت ۱۰ دقیقه با PBS شستشو داده شدند؛ سپس به مدت ۱ ساعت در Streptavidin اینکوبه شدند و پس از آن به وسیله میکروسکوپ مجهز به سیستم فلورسنت بررسی شده و تصاویر لازم تهیه گردید. سلول‌های شوان با هسته‌های برجسته و سیتوپلاسم دوکی Oval shape و یا Spindle shape دیده شدند [۳]. برای به دست آوردن خلوص، ۴ فیلد میکروسکوپی شمارش شد و تعداد سلول‌های شوان (که با S100 رنگ گرفته بودند) به صورت درصدی از کل سلول‌ها محاسبه شد [۷]. مارکرهای مختلفی برای تمایز سلول‌های شوان از فیبروبلاست مطرح می‌باشد که علاوه بر مورفولوژی دوکی شکل آنها در مقابل سیتوپلاسم Flat و چند وجهی فیبروبلاست که از وجوه تمایز آنهاست [۴]، این مارکرها نیز حایز اهمیت می‌باشند؛ از مهم‌ترین آنها رنگ آمیزی با S100 و یا P75 است که در فیبروبلاست‌ها منفی و در سلول‌های شوان مثبت هستند [۵، ۱]. ارتباط آماری با ضریب همبستگی اسپیرمن مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج

مشخصات اهدا کنندگان مطابق جدول شماره ۱ می‌باشد. به جز یک نمونه که به دلیل نامعلومی کشت آن موفقیت آمیز نبود، در سایر نمونه‌ها طبق جدول شماره ۱ تعداد و خلوص قابل قبولی به دست آمد که میزان خلوص سلول‌های شوان در نمونه‌های کشت داده شده بین ۹۷ تا ۹۹ درصد و میانگین آنها 98.11 ± 0.782 درصد بود. تعداد سلول‌های شوان در هر میکرولیتر نمونه به طور میانگین $14050/56 \pm 2480/479$ بود. در شکل شماره ۱ نیز مورفولوژی سلول‌های شوان که با رنگ اختصاصی S100 رنگ آمیزی شده‌اند به صورت دوکی و با زوایای سلولی مشخص می‌باشد. همبستگی آماری معنی‌داری میان طول مدت فرآیند کشت و میزان خلوص سلول‌های شوان مشاهده نشد ($P > 0.05$)؛ همچنین همبستگی آماری معنی‌داری میان سن دهنندگان عصب و میزان خلوص سلول‌های شوان مشاهده نشد ($P > 0.05$). ضریب همبستگی اسپیرمن برای دو آزمون ذکر شده به ترتیب ۰/۲۱- و ۰/۰۹- بود.

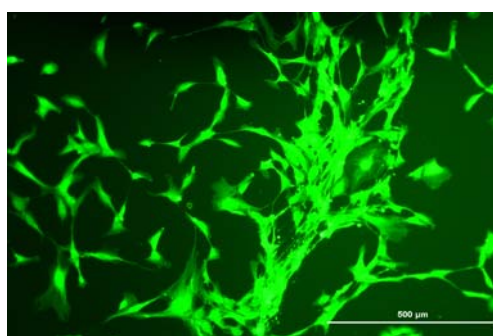
مورد نظر از نظر تعداد سلول شوان در واحد میکرولیتر و نیز درصد خلوص سلول‌ها بدون استفاده از سرم گاوی و فاکتورهای رشد بوده است.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق تجربی، جمعیت مورد مطالعه اهدا کنندگان مرگ مغزی ارجاع شده به مرکز تحقیقات و بانک فرآورده‌های پیوندی بیمارستان امام خمینی تهران بودند. با اخذ رضایت پژوهشی از اولیای موارد مرگ مغزی و یا خود بیماران آمپوتاسیون، تعداد ۱۰ نمونه اعصاب محیطی تحت شرایط استریل و ضد عفونی در اتاق عمل برداشت شد و بلافاصله در ظرف حاوی محلول مغذی RPMI 1640 (ICN آمریکا) قرار گرفته و در دمای 4°C درجه سانتیگراد به واحد فرآوری سلول و نسج بانک فرآورده‌های پیوندی ایران منتقل شدند؛ سپس تحت شرایط اتاق پاک، عملیات قطعه قطعه کردن انجام شده و پس از جداسازی فاسیکل‌های به قطعات ۱ تا ۲ میلی‌متری تقسیم شدند؛ پس از گذشت از هضم آنزیمی نمونه‌ها با کلاژناز (ICN آمریکا) آنها شستشو داده شده و پس از سانتریفوژ سرد با دستگاه سانتریفوژ یخچال دار (کمپانی Eppendorf کشور آلمان) سلول‌ها جداسازی شده و در پلیت‌های کشت سلولی مطابق با پروتکل زیر کشت داده شدند: محیط کشت حاوی DMEM (ICN آمریکا) و پنی سیلین-استرپتومایسین و اسید آسکوربیک بود که سرم اتولوگ انسانی نیز برای جلوگیری از آلودگی فیبروبلاستی و حذف آنها از محیط از روز دوم و به تدریج از درصدهای پایین مانند ۳ درصد شروع و تا ۱۰ درصد به محیط اضافه می‌شد. البته فاکتورهای رشد نظیر فاکتور رشد مشتق از پلاکت‌ها (PDGF) و فاکتور رشد عصبی (NGF) و فاکتور نوروتروفیک مشتق از سلول‌های گلیال (GDNF) به دلیل خطرات بالقوه مورد استفاده قرار نگرفتند و همچنین با جایگزینی سرم انسانی به جای سرم جنین گاوی کشت انجام گردید و به طور مرتب محیط سلول‌ها تعویض می‌شد و در تمامی مراحل، تست‌های میکروبی جهت رد آلودگی احتمالی انجام می‌شد؛ همچنین در تمام مدت کشت، سلول‌ها در محیط انکوباتور با میزان دی اکسید کربن ۵ درصد نگهداری می‌شدند. پس از گذشت ۳ تا ۴ هفته و رسیدن به تعداد کافی سلول، مرحله برداشت سلول‌ها انجام گردید. همان‌طور که اشاره شد، تنها روشی که جهت حذف آلودگی فیبروبلاست‌ها انجام شد، fasting در دو روز اول کشت سلولی است؛ به این صورت که در طی دو روز اول، سرم به محیط اضافه نشد. پس از رسیدن به تعداد کافی سلول در این مرحله قسمتی از سلول‌ها با آنتی بادی S100 (SIGMA آمریکا) رنگ آمیزی شدند و با میکروسکوپ فلورسنت از نظر تعداد و

جدول شماره ۱- مشخصات سنی و جنسی اهداکنندگان عصب و تعداد و خلوص سلول‌ها

ردیف	سن	جنس	طول مدت کشت (روز)	تعداد سلول‌ها در میکرولیتر	میزان خلوص %
۱	۴۰	مرد	۱۶	۱۴۰۰۰	۹۸
۲	۲۹	مرد	۱۴	۱۳۵۰۰	۹۹
۳	۳۰	زن	۱۶	۱۵۰۰۰	۹۸
۴	۴۵	مرد	۱۹	۱۶۰۰۰	۹۹
۵	۴۰	زن	۱۸	۱۲۰۰۰	۹۸
۶	۴۲	مرد	۲۱	۱۸۰۰۰	۹۷
۷	۲۸	مرد	۲۱	۱۰۰۰۰	۹۷
۸	۲۶	زن	۲۲	۱۶۰۰۰	۹۹
۹	۲۹	زن	۱۸	۱۲۰۰۰	۹۸



شکل شماره ۱- سلول‌های شوان با سیتوپلاسم دوکی و یا ستاره‌ای شکل

بحث

با توجه به اینکه پروژه ملی درمان سلولی بیماران مبتلا به ضایعات مغزی و نخاعی در کشور ما در حال اجرا است و نیز لزوم انجام اصلاحات و افزایش ضریب ایمنی این نوع درمان‌ها، پروژه حاضر طراحی و اجرا شد تا بر اساس نتایج حاصل از آن بتوانیم تغییر روش‌های شناخته شده کشت و تکثیر سلول‌های شوان را در جهت کاهش خطرات احتمالی، بدون کاهش تعداد و خلوص مورد نظر طبق مطالعات گذشته [۳-۵،۱] اعمال بنماییم. نتایج حاصل از این مطالعه موید این موضوع است که با رعایت روش‌های ایمن‌تر و حذف فاکتورهای خطر زایی مانند سرم جنین گاوی می‌توان به نتایج در مانی قابل قبول با حد اقل ریسک‌ها دست پیدا کرد. در مطالعه حاضر تعداد سلول‌ها در واحد حجم میکرولیتر حدود ۱۴۰۰۰ عدد بوده که تقریباً مشابه مطالعات دیگر در زمینه کشت سلول‌های شوان [۳،۲] می‌باشد؛ با این تفاوت که در روش‌های مطالعات دیگر از فاکتورهای رشد استفاده شده است ولی در مطالعه حاضر بدون استفاده از این فاکتورها نتایج مشابه و قابل قبولی به دست آمده است. به عنوان مثال در برخی از مطالعات گذشته [۴،۲] از سرم جنین گاوی در کشت استفاده شده که در صورت استفاده بالینی، ریسک بالایی به همراه دارد. این

درحالی است که در روش مطالعه حاضر سرم انسانی جایگزین آن شده است و وجه تمایز این روش می‌باشد. پیشنهاد می‌شود در مطالعات آتی با تعداد بیشتر نمونه دهنده این بررسی‌ها انجام گردد. موضوع دیگری که بالاخص در مطالعات با هدف استفاده درمانی باید مد نظر قرار گیرد، بررسی‌هایی نظیر مارک‌های سلول‌های کشت داده شده و مقایسه آن با سلول‌های اولیه و نیز مقایسه رفتارهای سلول‌ها از طریق روش‌های پروتئومیک و از این قبیل است. در مطالعه‌ای که توسط Lopez و De Vries انجام شد، کشت سلول‌های اعصاب محیطی جنین انسانی به صورت Serum Free و بدون استفاده از سرم گاوی صورت گرفت و میزان خلوص سلولی ۹۸ درصد گزارش شد که در مقایسه با مطالعه حاضر با خلوص ۹۷ تا ۹۸ درصد، هم از نظر عدم استفاده از سرم گاوی و هم از نظر میزان خلوص مشابه هم می‌باشند. در این مطالعه از سلول‌های به دست آمده Antigenic Profile نیز تهیه شده است که از جمله آنها S100 مورد بررسی قرار گرفته است [۱]. در بررسی دیگری که توسط فیروزی و همکاران انجام شد سلول‌های شوان کشت داده شده در فضای زیر عنکبوتیه موش-هایی که در آنها ضایعه نخاعی ایجاد شده بود تزریق شد که خلوص سلول‌های شوان در این مطالعه با استفاده از S100 بررسی

انسانی از ۲ نوع سرم انسانی استفاده شد. نوع اول از پلاسما معمولی و نوع دوم از پلاسما عاری از پلاکت تهیه شد. نمونه‌ها از ۱۰ بیمار برداشت شدند و نتیجه نهایی نشان داد سرعت رشد و تمایز سلول‌ها در محیط حاوی سرم تهیه شده از پلاسما عاری از پلاکت بهتر است [۹].

نتیجه‌گیری

با توجه به حذف سرم جنین گاوی از فرآیند کشت سلول‌ها به دلایل ایمنی و با توجه به عدم استفاده از فاکتورهای رشد معمول مورد استفاده در کشت‌های سلول، می‌توان بدون استفاده از موارد یاد شده که هرکدام از آنها از نظر انتقال پروتئین‌ها و یا احتمال تومورزایی خطر بزرگی برای استفاده‌های بالینی کشت سلولی محسوب می‌شوند از این خطرات احتراز نمود.

تشکر و قدردانی

از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی تهران و همچنین دکتر سعید یکانی نژاد، الهام روان آسا، حمیده غلامی، لیلا خطیب شاد و مریم اسلامی که ما را در انجام این مطالعه یاری نمودند، تقدیر و تشکر به عمل می‌آید.

شده و ۹۹ درصد گزارش شده است که مشابه مطالعه حاضر است؛ با این تفاوت که در تحقیق فیروزی و همکاران از سرم جنین گاوی Fcs و فاکتورهای رشد پلاکتی و عصبی استفاده شده است که یکی از عوامل پرخطر به دلیل احتمال ایجاد بیماری‌های پریونی می‌باشد [۲]. در بررسی دیگری که توسط Ansselin و همکارانش انجام شده است، سلول‌های شوان را توانسته‌اند از اعصاب محیطی موش کشت دهند و به تعداد و خلوص قابل قبولی دست یافته‌اند که تقریباً مشابه مطالعه حاضر است، ولی در مطالعه ذکر شده نیز سرم جنین گاوی مورد استفاده قرار گرفته است [۳]. در مطالعه‌ای که توسط Terenghi و همکارانش انجام شده، بررسی مورفولوژیک سلول‌های شوان اعصاب محیطی در ۱۰ نمونه انجام گرفته است که همانند مطالعه حاضر از رنگ آمیزی با آنتی بادی S100 برای این بررسی استفاده شده است [۶]. در مطالعه انجام شده توسط Stute و همکاران اثر سرم انسانی با غلظت‌های مختلف در مقایسه با FBS (۱۰ درصد) بر روی کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSC) به دست آمده از ۱۰ بیمار بررسی شد. نتیجه نشان داد سرم انسانی با غلظت ۱۰ درصد اثری مشابه با FBS (۱۰ درصد) دارد و روش مطالعه حاضر را تایید می‌نماید [۸]. در مطالعه دیگری جهت کشت سلول‌های Preadipocyte

References:

- [1] Lopez TJ, De Vries GH. Isolation and serum-free culture of primary Schwann cells from human fetal peripheral nerve. *Exp Neurol* 1999; 158(1): 1-8.
- [2] Firouzi M, Moshayedi P, Saberi H, Mobasheri H, Abolhassani F, Jahanzad I, et al. Transplantation of Schwann cells to subarachnoid space induces repair in contused rat spinal cord. *Neurosci Lett* 2006; 402(1-2): 66-70.
- [3] Ansselin AD, Corbeil SD, Davey DF. Successfully culturing Schwann cells from adult peripheral nerve. *Acta Chir Austriaca* 30: 15-9.
- [4] Hedayatpour A, Sobhani A, Bayati V, Abdolvahhabi MA, Shokrgozar MA, Barbarestani M. A method for isolation and cultivation of adult Schwann cells for nerve conduit. *Arch Iran Med* 2007; 10(4): 474-80.
- [5] Saravanan K, Büsow H, Weiler N, Gieselmann V, Franken S. A spontaneously immortalized Schwann cell line to study the molecular aspects of metachromatic leukodystrophy. *J Neurosci Methods* 2007; 161(2): 223-33.
- [6] Terenghi G, Calder JS, Birch R, Hall SM. A morphological study of Schwann cells and axonal regeneration in chronically transected human peripheral nerves. *J Hand Surg Br* 1998; 23(5): 583-7.
- [7] Guest JD, Hesse D, Schnell L, Schwab ME, Bunge MB, Bunge RP. Influence of IN-1 antibody and acidic FGF-fibrin glue on the response of injured corticospinal tract axons to human Schwann cell grafts. *J Neurosci Res* 1997; 50(5): 888-905.
- [8] Stute N, Holtz K, Bubenheim M, Lange C, Blake F, Zander AR. Autologous serum for isolation and expansion of human mesenchymal stem cells for clinical use. *Exp Hematol* 2004; 32(12): 1212-25.
- [9] Koellensperger E, von Heimburg D, Markowicz M, Pallua N. Human serum from platelet-poor plasma for the culture of primary human preadipocytes. *Stem Cells* 2006; 24(5): 1218-25.