

Original article

The effect of N-acetyl-cysteine on limbal stem cell senescence cultivated on the human amniotic membrane

Elaheh Emadi¹, Nadia Boroumand², Daryoush Hamidi Alamdari^{3*} 

1. Cellular and Molecular Research Center, Sabzevar University of Medical Sciences, Sabzevar, 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

Article Info.

Received: 11- Dec- 2025

Accepted: 14- Mar- 2026

Abstract

Background and Aims: In limbal stem cell deficiency disease, limbal stem cells (LSCs) are unable to replace lost epithelial cells. This causes reduced eyesight and blindness. In recent years, the use of cultured LSCs for transplantation has been considered, but their proliferative potency declines during culture due to a premature-stress-induced senescence. For this purpose, the antioxidant effect of N-acetyl-cysteine on the aging process of cultured LSCs was surveyed.

Materials and Methods: LSCs were cultivated on the amniotic membrane in three groups: the test group treated with N-acetyl-cysteine, the positive control group treated with H₂O₂, and the untreated group as a control. The presence and proliferation of LSCs during culture were assessed by hematoxylin-eosin staining and the expression of Δ NP63 α specific marker, by immunofluorescent assay. The effect of N-acetyl-cysteine on the senescence process of expanded LSCs was evaluated by measuring beta-galactosidase activity.

Results: The presence of cells and the proliferation of LSCs during culture were confirmed by hematoxylin-eosin and immunofluorescent staining, respectively. Cells treated with N-acetyl-cysteine in short-term treatment and long-term treatment significantly presented a lower level of beta-galactosidase, which confirms the effective role of N-acetyl-cysteine in delaying the senescence of cultured LSCs.

Conclusion: Treating LSCs with N-acetyl-cysteine during the culture process could be effective in delaying the senescence of LSCs, which could be valuable for long-term cornea restoration.

Keywords: Limbal stem cells, N-acetyl-cysteine, Oxidative stress, Senescence

* **Corresponding Author:** Daryoush Hamidi Alamdari. Department of Clinical Biochemistry, Faculty of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran E-mail: hamidiad@mums.ac.ir

How to Cite: Emadi E, Boroumand N, Hamidi Alamdari D. The effect of N-acetyl-cysteine on limbal stem cell senescence cultivated on the human amniotic membrane. Journal of Student Research Committee Sabzevar University of Medical Sciences, 2026;31(1): 61-72



بررسی اثر N-استیل-سیستئین بر روند پیری سلول‌های بنیادی لیمبال کشت‌شده بر روی پرده آمینوتیک انسانی

الهه عمادی^۱، نادیا برومند^۲، داریوش حمیدی علمداری^{۳*}

۱. استادیار پزشکی مولکولی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، سبزوار، ایران.

۲. کارشناسی ارشد بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران.

۳. استاد بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران.

اطلاعات مقاله

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۹/۲۰ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۱۲/۲۸

چکیده

مقدمه و اهداف: در بیماری نقص سلول‌های بنیادی لیمبال، سلول‌های بنیادی لیمبال (LSCs) قادر به جایگزین کردن سلول‌های ایتلیال از دست‌رفته نمی‌باشند. این امر موجب کاهش دید چشم و نابینایی می‌شود. در سال‌های اخیر استفاده از LSCs کشت داده‌شده برای پیوند مورد توجه قرار گرفته است اما پتانسیل تکثیری آن‌ها طی کشت به علت پیری ناشی از استرس اکسیداتیو کاهش می‌یابد. بدین منظور اثر آنتی‌اکسیدانی N-استیل-سیستئین بر روند پیری LSCs کشت‌شده موردسنجش قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: LSCs در سه گروه، گروه آزمایش تحت تیمار با N-استیل-سیستئین، گروه کنترل مثبت تحت تیمار با هیدروژن پراکسید و گروه بدون تیمار به عنوان کنترل، بر روی پرده آمینوتیک کشت داده شدند. روند حفظ و تکثیر LSCs طی کشت با رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-اُوزین و بررسی بیان مارکر اختصاصی $\Delta NP63\alpha$ با روش ایمونوفلورسنت موردبررسی قرار گرفت. اثر آنتی‌اکسیدانی N-استیل-سیستئین در فرایند پیری سلول‌ها با سنجش فعالیت آنزیم بتاگالاکتوزیداز اندازه‌گیری شد.

نتایج: حضور سلولی و تکثیر LSCs طی کشت به ترتیب با رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-اُوزین و ایمونوفلورسنت تاییدگردید. سلول‌های تیمار شده با N-استیل-سیستئین در تیمار کوتاه‌مدت و تیمار بلندمدت به طور معنی‌داری میزان کمتری از آنزیم بتاگالاکتوزیداز را نشان دادند که تأییدی بر نقش مؤثر N-استیل-سیستئین در تأخیر پیری سلولی است.

نتیجه‌گیری: تیمار LSCs طی روند کشت با N-استیل-سیستئین می‌تواند در به تأخیر انداختن پیری آن‌ها در شرایط کشت تأثیرگذار باشد که این امر در بازسازی قرینه حائز اهمیت است.

کلیدواژگان: -استیل-سیستئین، استرس اکسیداتیو، پیری سلولی، سلول‌های بنیادی لیمبال.

نویسنده مسئول: داریوش حمیدی علمداری، استاد، بیوشیمی بالینی، دانشکده علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران. پست الکترونیکی: hamidiad@mums.ac.ir

استناد به مقاله: الهه عمادی، نادیا برومند، داریوش حمیدی علمداری. بررسی اثر N-استیل-سیستئین بر روند پیری سلول‌های بنیادی لیمبال کشت‌شده بر روی پرده آمینوتیک انسانی، مجله کمیته تحقیقات دانشجویی دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، خرداد ۱۴۰۵، دوره ۳۱، شماره ۱، صفحات: ۶۱-۷۲.

مقدمه

امروزه یکی از کاربردهای اصلی سلول‌های بنیادی در حوزه بالین، استفاده از آن‌ها در درمان بیماری‌های صعب‌العلاج است. به همین دلیل یکی از مطرح‌ترین ایده‌ها در زمینه سلول‌های بنیادی، جداسازی و کشت آن‌ها جهت درمان بیماری‌های مختلف است. در این زمینه، درمان بیماری نقص سلول‌های بنیادی لیمبال (LSCD)^۱ قرنیه چشم به‌وسیله سلول‌های بنیادی لیمبال (LSCs)^۲ کشت داده‌شده بسیار موردتوجه قرار گرفته است (۱). عملکرد اصلی قرنیه (محافظت از چشم و شکست نور ورودی از محیط پیرامون به چشم) وابسته به عناصر شفافیت، تغذیه، تراوایی و فرآیند خود ترمیمی است و هر نوع اختلال در این عناصر، بینایی صحیح را مختل می‌کند (۲). در لایه سطحی قرنیه، سلول‌های اپیتلیالی با نیمه‌عمر ۷-۱۰ روزه با مسئولیت حفظ شفافیت و تمامیت قرنیه وجود دارند و به‌وسیله سلول‌های بنیادی بخش لیمبوس^۳ تجدید و ترمیم می‌شوند (۳-۵). اختلال و نقص در عملکرد این سلول‌ها باعث می‌شود سطح قرنیه توسط سلول‌های مشتق از بافت ملتحمه پوشیده شود و قرنیه شفافیت خود را از دست دهد. این شرایط تحت عنوان نقص سلول‌های بنیادی لیمبال (LSCD) نامیده می‌شود که در نتیجه آن دید بیمار به‌شدت کاهش‌یافته و حتی می‌تواند بیمار را نابینا کند (۶، ۷). به‌طور معمول، درمان LSCD با روش پیوند ناحیه لیمبال صورت می‌گیرد که با مشکلاتی از جمله عفونت چشم، افزایش خطر آب‌مروارید، افزایش فشار کره چشم، خونریزی، تورم، جداشدگی شبکیه و پس زدن پیوند همراه است (۶، ۸). به همین خاطر امروزه تلاش‌هایی در زمینه استفاده از LSCs کشت‌شده در آزمایشگاه به‌عنوان روش جایگزین صورت گرفته است (۹). اولین مورد از موفقیت

کلینیکی روش پیوند سلول‌های بنیادی لیمبال کشت‌شده در آزمایشگاه در سال ۱۹۹۷ توسط پلگرینی و همکارانش گزارش گردید (۱۰). در ادامه محققان بیشتری در این زمینه تلاش کردند تا این روش را بهبود بخشند (۵، ۱۱-۱۳).

مطالعات انجام‌شده بر روی سلول‌های بنیادی همواره بر اثر محیط، بر رشد و تکثیر این سلول‌ها تأکید کرده‌اند و پژوهش‌ها نشان داده‌اند که بهینه‌سازی شرایط و محیط کشت این سلول‌ها در محیط آزمایشگاهی گامی مهم در نتیجه‌بخش بودن استفاده از آن‌ها در درمان است. بررسی استفاده از ماتریکس‌های مختلف جهت شبیه‌سازی محیط غشای پایه و استرومای سلولی درون تنی در کشت آزمایشگاهی سلول‌های بنیادی، یک روش جهت بهینه‌سازی و بازگرداندن حمایت ریز محیط مناسب کشت این سلول‌ها است. استفاده موفق از پرده آمیوتیک انسان در پیوند چشم، سبب شده تا این بافت به‌عنوان یک ماتریکس مناسب جهت کشت سلول‌های بنیادی لیمبال موردتوجه قرار گیرد (۶، ۱۱، ۱۴، ۱۵). همچنین ثابت‌شده است که استفاده از چسب فیبرینی (FG)^۴ در کشت سلولی با به تأخیر انداختن رشد و مهاجرت سلول‌های اپیتلیال و پلاسمای غنی از پلاکت (PRP)^۵ با دارا بودن فاکتورهای رشد در پیوند LSC مفید می‌باشند (۱۶، ۱۷). بدین منظور، در این مطالعه بیوپسی‌های لیمبال آماده‌شده با استفاده از PRP-FG به غشای آمیوتیک انسانی سلول زدایی شده متصل و کشت داده شدند.

از جمله مشکلات استفاده بالینی سلول‌های بنیادی، کاهش مدت‌زمان کارایی آن‌ها در نتیجه القای پیری سلولی^۶ ناشی از استرس اکسیداتیو در طی مراحل کشت برون تنی و نیاز به پیوندهای مکرر است. به همین علت اعمال مداخلاتی در شرایط کشت این سلول‌ها که بتواند در حفظ پتانسیل تکثیری سلول‌ها و جلوگیری از پیری زودرس آن‌ها در طی

5. Platelet-rich plasma

6. Senescence

1. Limbal stem cell deficiency

2. Limbal stem cells

3. Limbus

4. Fibrin glue



در میلی لیتر) و پنی سیلین (۱/۵ میکروگرم در میلی لیتر) اضافه گردید.

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

۲۰۰ میلی لیتر خون وریدی در دور $g \times 2300$ به مدت ۸ دقیقه به منظور جداسازی گلبول های قرمز سانتریفیوژ گردید و سپس سانتریفیوژ پلاسمای غنی از پلاکت در $g \times 2000$ به مدت ۱۵ دقیقه برای رسوب پلاکت ها انجام شد. پلاسمای به دست آمده در دمای $70^{\circ}C$ درجه سانتی گراد منجمد و سپس در دمای $4^{\circ}C$ درجه سانتی گراد ذوب شد و به مدت ۵ دقیقه در $g \times 6500$ سانتریفیوژ گردید. پلاسمای رویی تا باقی ماندن ۷ میلی لیتر پلاسمای و فیبرینوژن رسوب شده (فیبرینوژن-PRP) حذف شد. ترومبین با افزودن ۱۰۰ میکرولیتر کلرید کلسیم ($CaCl_2$) ۱۰ درصد به ۱ میلی لیتر پلاسمای رویی حذف شده تهیه شد. چسب فیبرین-پلاسمای غنی از پلاکت (-PRP FG) با افزودن ۷ میلی لیتر ترومبین تهیه شده به ۷ میلی لیتر فیبرینوژن-PRP فراهم گردید (۲۰).

کشت explant سلول های لیמبال

پرده آمنیوتیک برش داده شده به ابعاد $1 \times 1 \text{ cm}^2$ بر روی کاغذ نیتروسلولزی در چاهک های پلیت کشت قرارداد شده. سپس قطعات کوچک لیمبوس تهیه شده از سمت اپیتلیال خود بر روی قطعات آمنیوتیک داخل پلیت کشت قرار داده شدند. از ترکیب PRP-FG به میزانی که کاملاً قطعات را پوشش دهد قطره قطره روی آن ها ریخته شد و ۳-۵ دقیقه به آن زمان داده شد. قطعات لیمبوس تثبیت شده بر روی پرده آمنیوتیک با ۲-۱ میلی لیتر سیترات به مدت ۲ دقیقه شستشو داده شدند. بعد از تخلیه کامل سیترات از پلیت ۰/۸ 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 $37^{\circ}C$ درجه سانتی گراد، رطوبت ۸۵ درصد و CO_2 ۵ درصد به مدت

پژوهش های برون تنی مؤثر باشند، ضروری است (۱۸). با توجه به این که یکی از مهم ترین عوامل تأثیرگذار در القای پیری سلولی استرس اکسیداتیو طی کشت برون تنی است. تیمار سلول ها با مواد آنتی اکسیدان نتایج اثربخشی در راستای به تأخیر انداختن این نوع پیری سلولی نشان داده است (۱۹)؛ بدین منظور در این پژوهش اثر آنتی اکسیدان N-استیل-سیستئین جهت به تأخیر انداختن پیری سلول های بنیادی لیمبال در طی روند کشت روی پرده آمنیوتیک مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش کار

آماده سازی نمونه برای کشت

این مطالعه با شماره IR. MUMS.fm.REC.1395.141 به تأیید کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی مشهد رسید. ۲۱ نمونه بافتی ناحیه لیمبوس قرنیه و مقداری از صلبیه چشم اهداکنندگان مرگ مغزی از بیمارستان تخصصی چشم خاتم الانبیاء مشهد به دست آمد. نمونه ها در سه گروه هفت تایی، گروه آزمایش تحت تیمار با N-استیل-سیستئین، گروه کنترل مثبت تحت تیمار با هیدروژن پراکسید و گروه بدون تیمار به عنوان گروه کنترل تقسیم شدند. ابتدا لایه ملتحمه، قسمت های اضافی صلبیه و قرنیه باقیمانده از روی ناحیه لیمبوس جدا گردیدند. در نهایت ریم لیمبوس پاکسازی شده به قطعات کوچک ($1/5 \times 1/5 \text{ mm}^2$) برای کشت تقسیم شد.

محیط کشت

به محیط کشت DMEM-F12 خریداری شده از شرکت Dacell، FBS (۱۰٪)، انسولین (۵ میکروگرم در میلی لیتر)، سم وبا^۱ (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)، گلو تاماکس (۴ میلی مولار)، آمفوتریسین B (۱/۲۵ میکروگرم

1. Cholera toxin

انجام شد. مقاطع زیر میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفتند.

تائید وجود سلول‌های بنیادی لیمبال به روش ایمونوفلورسنت

برای تائید حضور سلول‌های بنیادی لیمبال کشت‌شده از رنگ‌آمیزی ایمونوفلورسنت و آنتی‌بادی‌های مونوکلونال موشی Δ NP63 α (Santa Cruz) به عنوان نشانگر اختصاصی آن‌ها استفاده شد. explant‌های جدا شده از پرده آمینوتیک در پارافرمالدهید ۴ درصد به مدت ۱۵ دقیقه تثبیت شدند و متعاقباً در پارافین جاسازی شد. برش‌های ۵ میکرومتری با انکوبه در دمای ۸۰-۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه پارافین زدایی شدند. به منظور شفاف‌سازی لام‌های حاوی

برش‌ها سه مرتبه با زایلن شسته شدند. سپس با تیمار الکل درجه‌بندی‌شده هیدراته گردیدند. فرآیند بازبایی آنتی‌ژن^۱ با فروبردن مقاطع در بافر tris-EDTA با Tween ۰/۰۵ درصد (pH = 9.0) و حرارت دادن در آب ۹۸-۹۶ درجه سانتی‌گراد انجام شد. برش‌ها با Triton X-100 ۱ درصد نفوذپذیر شدند. سپس مکان‌های اتصال غیراختصاصی با BSA ۳ درصد و سرم بزی ۱۰ درصد غیراختصاصی به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد مسدود شد. سپس آنتی‌بادی مونوکلونال Δ NP63 α برای تشخیص LSC‌ها استفاده شد. مقاطع تحت یک میکروسکوپ فلورسانس (Nikon Eclipse E200، JAPAN) مورد بررسی قرار گرفتند. برای تشخیص سلول‌های Δ NP63 α مثبت، بخش لنفوم و سرطان پروستات به ترتیب به عنوان کنترل منفی و مثبت استفاده شد.

آزمون بتا-گالاکتوزیداز

آزمون بتا-گالاکتوزیداز برای ارزیابی پیری سلول انجام شد. به طور خلاصه، LSC‌های کشت‌شده روی پرده آمینوتیک با PBS شسته و در سیترات ۰/۱ مولار (pH ۴/۵) مجدداً معلق شدند. سلول‌ها توسط سونیکاسیون به مدت ۳-۵ ثانیه لیز

۱۴ روز انکوبه شد. گسترش سلول‌ها به طور متوالی در زیر میکروسکوپ معکوس بررسی گردید.

تیمار با N-استیل-سیستئین و پراکسید هیدروژن

تیمار سلول‌ها با N-استیل-سیستئین در دو گروه تیمار کوتاه مدت (از روز یازدهم کشت) و تیمار بلندمدت (از روز هفتم کشت) در غلظت‌های مختلف (۰/۱، ۰/۵، ۱، ۳ و ۵ میلی مولار) انجام گرفت. غلظتی از N-استیل-سیستئین که در آن سلول‌ها کمترین فعالیت بتا-گالاکتوزیدازی را داشتند به عنوان غلظت بهینه در نظر گرفته شد. تیمار سلول‌ها با پراکسید هیدروژن در دو گروه تیمار کوتاه مدت (از روز یازدهم کشت) و تیمار بلندمدت (از روز هفتم کشت) در غلظت‌های مختلف (۰، ۲۰، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰ و ۲۵۰ میکرو مولار) انجام گرفت. غلظتی از پراکسید هیدروژن که باعث ایجاد بالاترین فعالیت بتا-گالاکتوزیدازی شده بود به عنوان غلظت بهینه در نظر گرفته شد. تمام آزمون‌ها به صورت سه بار تکرار انجام گرفتند و نتایج به صورت $\text{Mean} \pm \text{SD}$ گزارش شدند. پس از تیمار سلول‌ها با غلظت‌های بهینه N-استیل-سیستئین و پراکسید هیدروژن، قطعات بافتی از پرده آمینوتیک جدا شده و پرده برای تائید رشد سلول‌های بنیادی لیمبال و برای بررسی پیری سلول‌های کشت‌شده بر روی پرده آمینوتیک به دو قسمت تقسیم شد.

رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین (H&E)

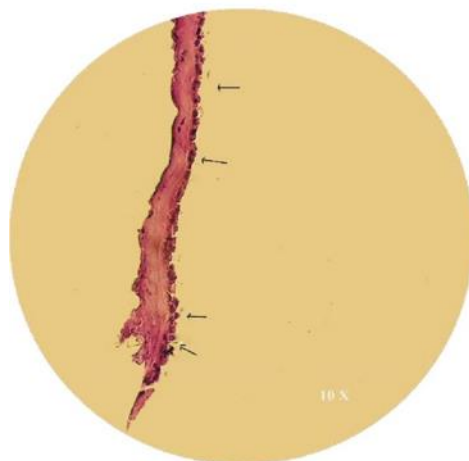
جهت تائید رشد سلول‌ها بر روی پرده آمینوتیک رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین انجام شد. به طور خلاصه، مقاطع هیدراته شده با محلول هماتوکسیلین به مدت ۳ تا ۵ دقیقه رنگ‌آمیزی شدند. پس از مرحله شستشو، بخش‌ها با اتانول ۷۰ درصد حاوی ۱ درصد هیدروکلراید به مدت ۵ ثانیه تیمار شدند. پس از مرحله شستشو، مقاطع با محلول ائوزین به مدت ۳-۵ دقیقه رنگ‌آمیزی شدند. پس از مرحله شستشو، فرآیندهای آبگیری، شفاف‌سازی و مونته کردن به طور معمول

value در نظر گرفته شد. کلیه آزمایش‌ها در سه تکرار مستقل انجام پذیرفت.

نتایج

تائید حضور و رشد سلول‌ها از قطعه بافتی بر روی پرده آمنیوتیک

جهت اطمینان از روش کشت و به‌منظور تائید رشد و مهاجرت سلول‌ها از قطعه بافتی به روی پرده آمنیوتیک، پس از ۱۴ روز کشت قطعات بافتی و چسب فیبرین از پرده آمنیوتیک جدا شدند و پرده آمنیوتیک با رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین موردبررسی قرار گرفت. پیکان‌ها در تصویر نشان‌دهنده سلول‌های کشت‌شده هستند که طی مدت‌زمان انکوباسیون از قطعه بافتی به سطح پرده آمنیوتیک مهاجرت کرده‌اند (شکل ۱).



شکل ۱. تائید مهاجرت سلول‌های ناحیه لیمبوس بر روی پرده آمنیوتیک. تصویر نشان‌دهنده حضور سلول‌های ناحیه لیمبوس بر روی پرده آمنیوتیک با رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین در روز چهاردهم کشت است (بزرگنمایی $\times 10$)

سلول‌هایی که هسته آن‌ها رنگ‌آمیزی شده است، به‌عنوان LSC شناسایی شدند. همان‌گونه که در شکل ۲ نشان داده شده است، فرآیند کشت به روش قطعه بافتی به‌درستی انجام‌شده و LSC‌ها از قطعه بافتی اولیه به سطح پرده آمنیوتیک مهاجرت کرده‌اند.

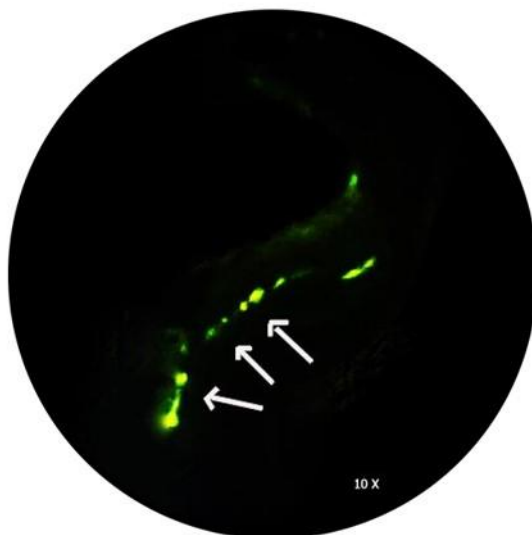
گردیدند. سپس لیزهای سلولی در $g \times 15000$ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ و سوپرناتانت با ONPG (۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر)، ۱ میلی‌مولار $MgCl_2$ و کوکتل مهارکننده‌های پروتئاز مخلوط شدند. پس از انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، ۲۰۰ میکرولیتر سدیم کربنات ۱ مولار به مخلوط اضافه و جذب نوری در طول موج ۴۲۰ نانومتر اندازه‌گیری شد و در هر میلی‌گرم پروتئین با استفاده از روش برادفورد گزارش شد.

آنالیز آماری

داده‌های حاصل از اندازه‌گیری‌ها به‌صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار ($Mean \pm SD$) گزارش شدند. برای مقایسه میانگین‌ها بین گروه‌های مختلف از آزمون تی مستقل (Unpaired T-test) با استفاده از نرم‌افزار آماری GraphPad Prism (نسخه ۶) استفاده شد. سطح معنی‌داری $P < 0.05$

نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی ایمونوفلورسنت

به‌منظور تائید موفقیت کشت سلول‌های بنیادی لیمبال بر روی پرده آمنیوتیک، از روش رنگ‌آمیزی ایمونوفلورسنت استفاده شد. $\Delta NP63\alpha$ به‌عنوان یک پروتئین هسته‌ای اختصاصی سلول‌های بنیادی لیمبال شناخته می‌شود و

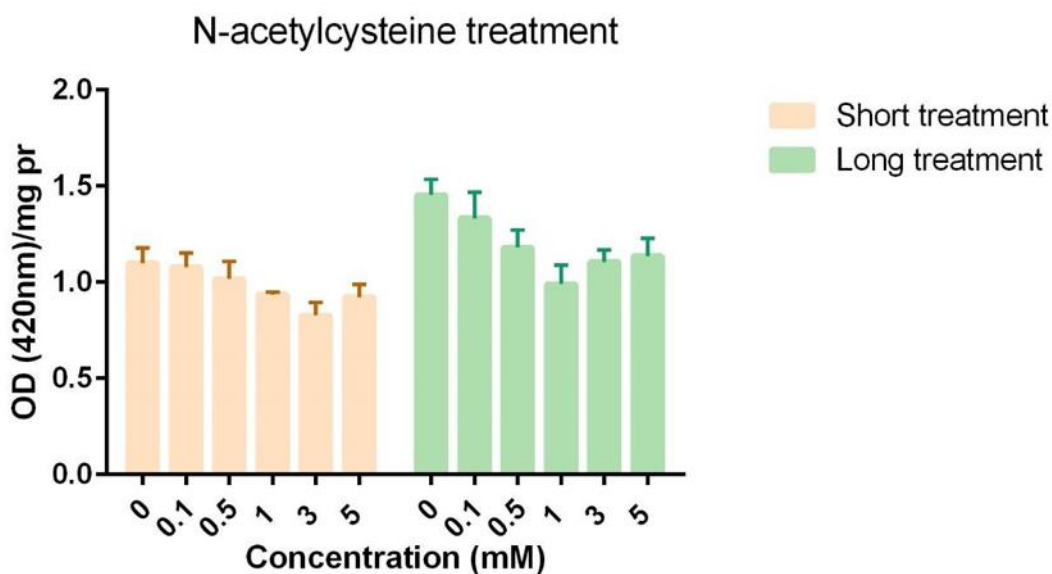


شکل ۲. رنگ آمیزی ایمونوفلورسنت پرده آمینوتیک در روز چهاردهم کشت سلول‌های ناحیه لیمبوس سلول‌های بنیادی لیمل کشت شده روی پرده آمینوتیک بیان کننده $\Delta NP63\alpha$ با بزرگنمایی $10 \times$ نشان داده شده‌اند. پیکان‌ها هسته سلول‌های بنیادی لیمل را نشان می‌دهند

بلندمدت از روز ۷ کشت تا روز ۱۴ کشت و تیمار کوتاه مدت از روز ۱۱ کشت تا روز ۱۴ کشت انجام شد. غلظت ۱ میلی مولار به عنوان غلظت بهینه برای تیمار بلندمدت و غلظت ۳ میلی مولار به عنوان غلظت بهینه برای تیمار کوتاه مدت در نظر گرفته شد (شکل ۳).

نتایج حاصل از تیمار سلول‌های کشت شده با N-استیل-سیستئین

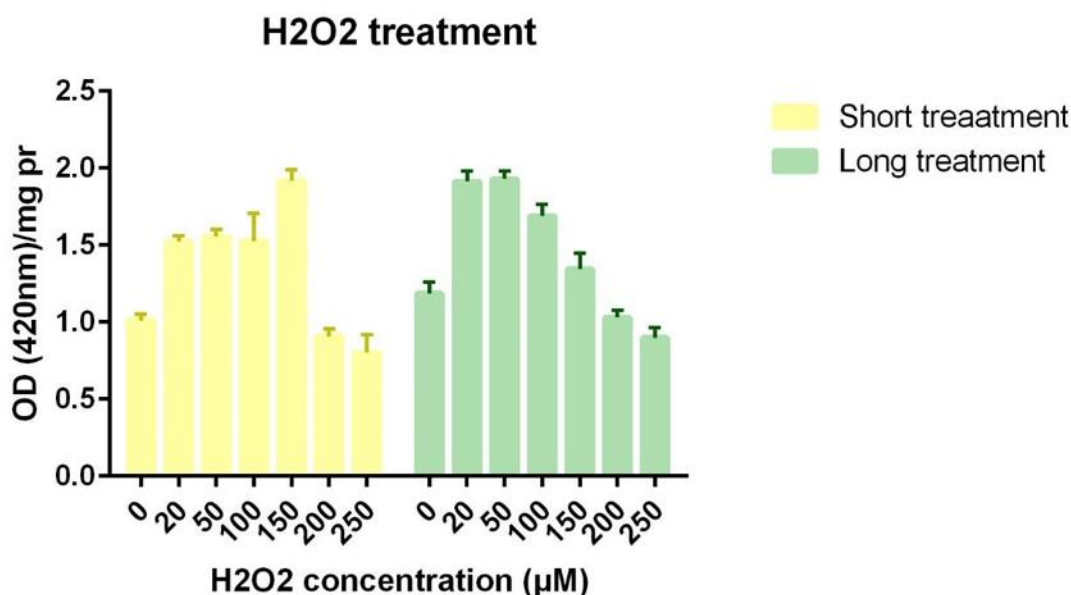
تیمار سلول‌ها به دو صورت تیمار کوتاه مدت و بلندمدت انجام گرفت. از آنجایی که سلول‌ها به طور میانگین از روز ۷ کشت شروع به مهاجرت بر روی پرده آمینوتیک می‌کنند تیمار



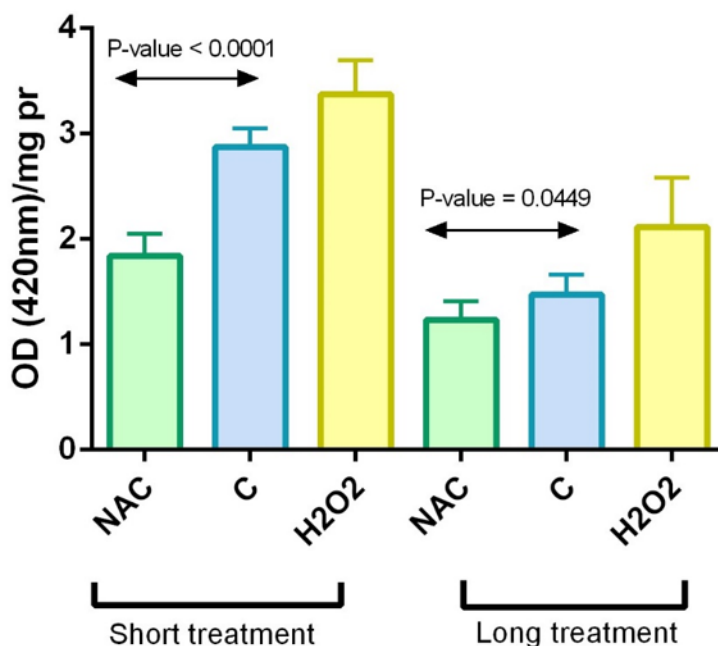
شکل ۳. تیمار کوتاه مدت و بلندمدت سلول‌های بنیادی لیمل با N-استیل-سیستئین. غلظت بهینه برای تیمار کوتاه مدت ۳ میلی مولار و برای تیمار بلندمدت ۱ میلی مولار در نظر گرفته شد. نتایج به صورت $Mean \pm SD$ نشان داده شده است

به عنوان غلظت بهینه برای تیمار بلندمدت و ۱۵۰ میکرومولار به عنوان غلظت بهینه برای تیمار کوتاه مدت در نظر گرفته شد (شکل ۴).

جهت تصدیق نتایج گروهی از سلول‌ها به عنوان کنترل مثبت به دو صورت کوتاه مدت و بلندمدت با هیدروژن پراکسید تیمار شدند. جهت تعیین غلظت بهینه غلظت‌های متفاوتی از هیدروژن پراکسید استفاده گردید و غلظت ۵۰ میکرومولار



شکل ۴. تیمار کوتاه مدت و بلندمدت سلول‌های بنیادی لیمبال با هیدروژن پراکسید. غلظت بهینه برای تیمار کوتاه مدت ۱۵۰ میکرومولار و برای تیمار بلندمدت ۵۰ میکرومولار در نظر گرفته شد. نتایج به صورت Mean $\pm$ SD نشان داده شده است



شکل ۵. مقایسه میزان آنزیم بتا گالاکتوزیداز در تیمار کوتاه مدت و بلند مدت. تیمار با N-استیل-سیستئین (NAC) میزان آنزیم بتا گالاکتوزیداز را در هر دو گروه به طور معنی داری کاهش داد. نتایج به صورت $\text{Mean} \pm \text{SD}$ نشان داده شده اند. مقادیر P-value به دست آمده برای تیمار کوتاه مدت ۰/۰۰۱ و برای تیمار بلند مدت ۰/۰۴ بود در مقایسه با گروه کنترل (C)

شکل ۵ مقایسه نتایج بین گروه های مختلف مورد مطالعه را نشان می دهد. با توجه به این که فعالیت بتا گالاکتوزیداز وابسته به پیری سلولی یکی از شاخص های شناخته شده پیری سلولی است، نتایج حاکی از آن است که تیمار با N-استیل سیستئین موجب کاهش معنی دار پیری سلولی در طول فرآیند کشت شده است. به طوری که فعالیت این آنزیم در هر دو تیمار کوتاه مدت و بلند مدت در مقایسه با گروه بدون تیمار به طور معنی داری کاهش یافته است (به ترتیب $p = 0/001$ و $p = 0/04$). علاوه بر این، شدت اثر مشاهده شده در تیمار کوتاه مدت به مراتب بیشتر از تیمار بلند مدت بوده که بیانگر اثربخشی بالاتر و زمان بهینه تیمار کوتاه مدت با N-استیل سیستئین در کاهش پیری سلولی است.

شکل ۵ مقایسه نتایج بین گروه های مختلف مورد مطالعه را نشان می دهد. با توجه به این که فعالیت بتا گالاکتوزیداز وابسته به پیری سلولی یکی از شاخص های شناخته شده پیری سلولی است، نتایج حاکی از آن است که تیمار با N-استیل سیستئین موجب کاهش معنی دار پیری سلولی در طول فرآیند کشت شده است. به طوری که فعالیت این آنزیم در هر دو تیمار کوتاه مدت و بلند مدت در مقایسه با گروه بدون تیمار به طور معنی داری کاهش یافته است (به ترتیب $p = 0/001$ و $p = 0/04$). علاوه بر این، شدت اثر مشاهده شده در تیمار کوتاه مدت به مراتب بیشتر از تیمار بلند مدت بوده که بیانگر اثربخشی بالاتر و زمان بهینه تیمار کوتاه مدت با N-استیل سیستئین در کاهش پیری سلولی است.

بحث

امروزه، علی رغم نگرانی ها و خطرات بالقوه استفاده از سلول های بنیادی، مانند احتمال سرطانی شدن یا متاستاز به بافته ای مختلف، کاربرد آن ها در درمان به طور روزافزون گسترش یافته است. یکی از نمونه های برجسته، استفاده از سلول های بنیادی لیمبال برای ترمیم ضایعات قرنیه است. درمان نقص سلول های بنیادی لیمبال با کشت سلول های اتولوگ از ناحیه لیمبوس بیمار، یکی از امیدوارکننده ترین مسیرهای درمان LSCD به شمار می رود. در این زمینه، توسعه دانش کشت سلول های بنیادی بالغ، از جمله سلول های بنیادی لیمبال، می تواند کیفیت درمان را بهبود بخشد، عوارض جانبی ناشی از پیوند عضو را کاهش دهد و روند درمان بیماران را تسریع کند. پیوند سلول های بنیادی اپیتلیال لیمبال، به عنوان یک روش درمانی برای نقص سلول های بنیادی لیمبال، تاکنون موفقیت تقریبی ۷۶ درصد را نشان

داده است (۱۱). در این نوع پیوند، مدت زمان پایداری سلول ها پس از عمل پیوند، به ویژگی ها و پتانسیل سلول های کشت داده شده بستگی دارد؛ بنابراین تحقیقات در زمینه بهینه سازی و معرفی بهترین روش های کشت سلول های بنیادی لیمبال همچنان ادامه دارد. یکی از عوامل تأثیرگذار در کشت کاربردی سلول های بنیادی لیمبال استفاده از بستری مناسب جهت مهاجرت سلول ها و شبیه سازی هرچه بیشتر شرایط آزمایشگاهی با ریز محیط طبیعی این سلول ها طی کشت برون تنی است. استفاده از پرده آمینوتیک به عنوان بستری مناسب به دلیل ویژگی هایی از جمله داشتن منشأ انسانی، پتانسیل منتشر کردن فاکتورهای رشد اپیدرمال، فاکتورهای رشد کراتینوسایت، فاکتورهای رشد هپاتوسیت، فاکتورهای رشد عصبی و فاکتورهای رشد فیبروبلاست بسیار مورد توجه قرار گرفته است (۲۱، ۲۲). در نتیجه پرده آمینوتیک پردازش شده تجاری در این مطالعه به عنوان بستری برای کشت آزمایشگاهی سلول های بنیادی لیمبال مورد استفاده قرار گرفت. از دیگر محصولات بیولوژیکی حمایت کننده رشد سلولی با منشأ انسانی، ترکیبی از فیبرینوژن و ترومبین تحت عنوان چسب فیبرین است و الحاق فاکتورهای رشد همچون پلاسمای غنی از پلاکت به آن، عملکردش را به عنوان داربست حمایت کننده برای رشد برون تنی سلول ها بهبود می بخشد (۲۳، ۲۴). استفاده از چسب فیبرین در عمل پیوند سلول های بنیادی لیمبال نیز موفقیت آمیز بوده است. چسب فیبرین به عنوان یک مانع فیزیکی در برابر مهاجرت سلول های اپیتلیال ملتحمه و یک محرک مهاجرت سلول های بنیادی لیمبال روی قرنیه عمل می کند (۲۵). بنابر مزایای استفاده از این ماده زیستی، مطالعاتی چسب فیبرین را در کشت آزمایشگاهی سلول های بنیادی لیمبال به عنوان بستری مغذی

به کار برده اند (۱۶، ۲۶). در این تحقیق از چسب فیبرین به همراه پلاسمای غنی از پلاکت به عنوان داربستی بر روی سلول ها استفاده شد. در واقع ایجاد این داربست سلولی بر روی سلول ها علاوه بر مغذی بودن باعث می شود سلول ها در عمق این داربست قرار گیرند تا فضایی مشابه با ریز محیط طبیعی سلول ها ایجاد شود. همچنین این امر سبب می شود که غلظت اکسیژنی که در تماس با سلول ها است کاهش یافته و خصوصیت بنیادین بودن این سلول ها تقویت شود.

برای انتقال سلول های بنیادی لیம்பال کشت شده به روی چشم نیاز به سلول هایی با تعداد بالا و پایداری زیاد پس از عمل پیوند است. از جمله عواملی که پایداری سلول و یا بافت را پس از پیوند تحت تأثیر قرار می دهد پیری سلولی زودرس القاء شده توسط استرس است (۲۷، ۲۸). شرایط آزمایشگاهی در القای پیری زودرس مؤثر هستند. غلظت های غیرطبیعی مواد مغذی، گونه های فعال اکسیژن و فاکتورهای رشد، حضور اکسیژن محیطی و همچنین عدم وجود ارتباط های درون تنی با سلول های اطراف و ماتریکس خارج سلولی از جمله مواردی هستند که در القای پیری سلولی در محیط کشت آزمایشگاهی نقش دارند (۳۱-۲۹). محققان به این نتیجه رسیده اند که بهینه کردن شرایط کشت از مهم ترین اولویتهای در حفظ پتانسیل تکثیری سلول و جلوگیری از پیری زودرس آن ها طی پژوهش های برون تنی است (۳۲-۳۴). برخلاف پیری تکثیری که پدیده ای اجتناب ناپذیر است، پیری زودرس القاشده توسط استرس تا حدی با مداخلات آنتی اکسیدانی قابل کنترل است (۳۵). N-استیل-سیستئین یک آنتی اکسیدان قوی است که به طور گسترده در بالین و آزمایشگاه استفاده می شود. مطالعاتی به نقش N-استیل-سیستئین در به تأخیر انداختن پیری سلولی اشاره کرده اند (۳۶). هاندلر و همکاران همچنین نشان دادند که تیمار سلول های اندوتلیال با N-استیل-سیستئین سبب کاهش تولید گونه های فعال اکسیژن و کاهش بیان مارکر پیری سلولی (آنزیم بتاگالاکتوزیداز) در سلول ها می شود (۳۷).

در این پژوهش، با توجه به این که سلول های لیம்பال به طور میانگین از روز هفتم کشت مهاجرت خود را از قطعه بافتی بر روی پرده آمینوتیک آغاز می کردند، تیمار بلندمدت سلول ها از روز هفتم تا روز چهاردهم کشت انجام شد. نتایج حاکی از آن بود که اثر N-استیل-سیستئین در بازه تیمار کوتاه مدت مطلوب تر از تیمار بلندمدت آن است. این تفاوت می تواند ناشی از آن باشد که در روز هفتم کشت، سلول ها در مراحل ابتدایی رشد و فعالیت متابولیک قرار داشته و میزان تولید گونه های فعال اکسیژن هنوز به سطح بالایی نرسیده است؛ در نتیجه، افزودن آنتی اکسیدان در این مرحله ممکن است نه تنها ضروری نباشد، بلکه با بر هم زدن تعادل اکسیدان-آنتی اکسیدان، نوعی استرس اکسیداتیو معکوس ایجاد کرده و به عنوان عاملی در القای پیری سلولی عمل کند.

نتیجه گیری

در این مطالعه، LSC ها که با استفاده از داربست PRP-FG بر روی غشای آمینوتیک تثبیت شده بودند، در طول دوره کشت با آنتی اکسیدان N-استیل-سیستئین تیمار شدند تا فنوتیپ جوانی آن ها حفظ شود. مهاجرت و تکثیر موفقیت آمیز LSC ها از طریق رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین و ایمونوفلورسانس برای نشانگر $\Delta NP63\alpha$ تأیید شد. داده های حاصل از رژیم درمانی آنتی اکسیدانی نشان داد که N-استیل-سیستئین فعالیت بتا-گالاکتوزیداز مرتبط با پیری را به طور قابل توجهی کاهش می دهد. به طور خلاصه، کاربرد ترکیبی داربست PRP-FG، غشای آمینوتیک و تیمار N-استیل-سیستئین از رشد و تکثیر قوی تر و کارآمدتر LSC ها در شرایط آزمایشگاهی پشتیبانی می کند، راهبردی که نویدبخش افزایش کاربرد بالینی بعدی آن ها در بازسازی قریه است.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از دانشگاه علوم پزشکی و خدمات درمانی مشهد بابت حمایت مالی با کد اخلاق:

همراه و همیار بوده‌اند. لازم به ذکر است که هیچ‌کدام از نویسندگان این مطالعه، افراد و یا دستگاه‌ها تعارض منافی برای انتشار این مقاله ندارند.

IR. MUMS.fm.REC.1395.141 کمال تشکر و قدردانی می‌نمایند. همچنین از مسئولان و کارکنان محترم کتابخانه آستان قدس رضوی، به‌ویژه تالار محققان، بسیار سپاسگزاریم که ما و دیگر پژوهشگران را در فراهم آوردن امکانات پژوهشی

References

- [1]. Bonnet C, González S, Deng SX. Ocular surface regeneration by limbal stem cells therapies: State of the art, challenges, and perspectives. *Stem Cells Transl Med*. 2023;12(11):714-9.
- [2]. Xia R, Lin L, Liu Z, Chen W. Nonsurgical Therapies for Preventing Corneal Scarring: A Systematic Review of the Past Decade. *J Ocul Pharmacol Ther*. 2025;41(10):557-72.
- [3]. Tang G, Chi M, Zhai Y, Peng R, Hong J. Corneal Epithelial Tissue Engineering Strategy Based on Cell Viability Optimization: A Review and Prospects. *Bioengineering*. 2025;12(11):1175.
- [4]. Maharana PK, Sharma N. Applied Anatomy and Physiology of the Cornea. *Mastering Corneal Surg*: CRC Press; 2024. p. 3-9.
- [5]. Chen K, Soleimani M, Koganti R, Cheraqpour K, Habeel S, Djalilian AR. Cell-based therapies for limbal stem cell deficiency: A literature review. *Ann. Eye Sci*. 2023;8:6.
- [6]. Kate A, Basu S. A review of the diagnosis and treatment of limbal stem cell deficiency. *Front. Med*. 2022;9:836009.
- [7]. Djalilian A, Holland E, Schwartz G. Limbal stem cell deficiency. In: *Office Corneal Procedures-E-Book: A Practical Guide*. 2024:196.
- [8]. Nischal KK, Zwingelberg S. Congenital Corneal Opacities. *Infantile Anterior Segment Disorders*: Springer; 2024. p. 85-165.
- [9]. Ang L, Tan D. Ocular surface stem cells and disease: current concepts and clinical applications. *Ann Acad Med Singap*. 2004;33(5):576-80.
- [10]. 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.
- [11]. Elhusseiny AM, Soleimani M, Eleiwa TK, ElSheikh RH, Frank CR, Naderan M, et al. Current and emerging therapies for limbal stem cell deficiency. *Stem Cells Transl. Med*. 2022;11(3):259-68.
- [12]. Tonti E, Manco GA, Spadea L, Zeppieri M. Focus on limbal stem cell deficiency and limbal cell transplantation. *World J Transplant*. 2023;13(6):321.
- [13]. Gui Y, He Y, Wang D, Wang S, Zhang Y. Advances in cell transplantation therapy for limbal stem cell deficiency. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2024;19(7):933-41.
- [14]. Anderson DF, Ellies P, Pires RT, Tseng SC. Amniotic membrane transplantation for partial limbal stem cell deficiency. *Br. J. Ophthalmol*. 2001;85(5):567-75.
- [15]. Chen S-Y, Mahabole M, Tseng SC. Optimization of ex vivo expansion of limbal epithelial progenitors by maintaining native niche cells on denuded amniotic membrane. *Transl. vis. sci. technol*. 2013;2(7):1.
- [16]. Shen Y, Le Q. The progress in techniques for culturing human limbal epithelial stem cells. *Hum. Cell*. 2023;36(1):1-14.
- [17]. عمادی ا، طاهرزاده د، علم دج. کشت و تکثیر سلولهای بنیادی واقع در لیمبوس قرنیه انسانی. *Med. J. Mashhad Univ. Med. Sci*. 2023;66(1).
- [18]. Asgari R, Mehran YZ, Weber HM, Weber M, Golestanha SA, Kazerooni SMH, et al. Management of oxidative stress for cell therapy through combinational approaches of stem cells, antioxidants, and photobiomodulation. *Eur. J. Pharm. Sci*. 2024;196:106715.
- [19]. Wu R, Liu S, Shen Z, Zhao Y, Hong J, Ma J. Corneal oxidative stress, inflammation, and senescence as key drivers of ocular pathology in a chronic graft-versus-host disease model. *BMC Ophthalmol*. 2025;25(1):379.
- [20]. 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. *Urol. J*. 2013;189(6):2125-9.
- [21]. Hu Z, Luo Y, Ni R, Hu Y, Yang F, Du T, et al. Biological importance of human amniotic membrane in tissue engineering and regenerative medicine. *Mater. Today Bio*. 2023;22:100790.
- [22]. Koizumi N, Fullwood NJ, Bairaktaris G, Inatomi T, Kinoshita S, Quantock AJ. Cultivation of corneal epithelial cells on intact and denuded human amniotic membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2000;41(9):2506-13.

- [23]. Sanz-Horta R, Matesanz A, Gallardo A, Reinecke H, Jorcano JL, Acedo P, et al. Technological advances in fibrin for tissue engineering. *J. Tissue Eng.* 2023;14:20417314231190288.
- [24]. Santiwatana S, Sasanakul W, Kadegasem P, Chuansumrit A. The effect of adding platelet-rich plasma to fibrin glue on release of platelet growth factors and its stability. *J Hematol Transfus Med.* 2018;28:443-8.
- [25]. Yeung A, Faraj L, McIntosh O, Dhillon V, Dua H. Fibrin glue inhibits migration of ocular surface epithelial cells. *Eye.* 2016;30(10):1389-94.
- [26]. Song L, Yang X, Cui H. Plasma fibrin membranes loaded with bone marrow mesenchymal stem cells and corneal epithelial cells promote corneal injury healing via attenuating inflammation and fibrosis after corneal burns. *Biomater. Sci.* 2023;11(17):5970-83.
- [27]. Herr LM, Schaffer ED, Fuchs KF, Datta A, Brosh Jr RM. Replication stress as a driver of cellular senescence and aging. *Commun. Biol.* 2024;7(1):616.
- [28]. Min R, Zhang D, He M, Chen J, Yi X, Zhuang Y. Stress-induced premature senescence in high five cell cultures: a principal factor in cell-density effects. *Bioresour. bioprocess.* 2024;11(1):107.
- [29]. Faraonio R. Oxidative stress and cell senescence process. *MDPI*; 2022. p. 1718.
- [30]. Bertelli PM, Pedrini E, Hughes D, McDonnell S, Pathak V, Peixoto E, et al. Long term high glucose exposure induces premature senescence in retinal endothelial cells. *Front. physiol.* 2022;13:929118.
- [31]. Huang W, Hickson LJ, Eirin A, Kirkland JL, Lerman LO. Cellular senescence: the good, the bad and the unknown. *Nat. Rev. Nephrol.* 2022;18(10):611-27.
- [32]. Wu J, Liu X, Liu Y, Su W, Zhuo Y. New Insights into the Role of Cellular Senescence and Its Therapeutic Implications in Ocular Diseases. *Bioengineering.* 2025;12(6):563.
- [33]. Edel MJ, Casellas HS, Osete JR, Nieto-Nicolau N, Arnalich-Montiel F, De Miguel MP, et al. An Optimized Method to Produce Human-Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Limbal Stem Cells Easily Adaptable for Clinical Use. *Stem Cells. Dev.* 2025;34(3-4):49-60.
- [34]. Yan R, Chen FY, Lindgren ES, Gao Q, Kuo Y-M, Robertson DM, et al. Optimized Protocol for Isolation and Culture of Primary Human Corneal Epithelial Cells. *Transl. Vis. Sci. Technol.* 2025;14(10):28.
- [35]. Varesi A, Chirumbolo S, Campagnoli LIM, Pierella E, Piccini GB, Carrara A, et al. The role of antioxidants in the interplay between oxidative stress and senescence. *Antioxidants.* 2022;11(7):1224.
- [36]. Breuss JM. premature senescence of endothelial cells upon chronic exposure to $\text{tNF}\alpha$ can be prevented by N-acetyl cysteine and plumericin.
- [37]. Haendeler J, Hoffmann Jr, Diehl JF, Vasa M, Spyridopoulos I, Zeiher AM, et al. Antioxidants inhibit nuclear export of telomerase reverse transcriptase and delay replicative senescence of endothelial cells. *Circ. Res.* 2004;94(6):768-75.