ISSN: 2538-5887; Pathobiology Research. 2019;22(2):103-111

A Review on Cell Sheet Engineering Using Temperature Responsive Culture Dishes for Tissue Engineering Applications

ARTICLE INFO

Article Type
Original Research

Authors
Mohseni Vadeghani E.[1] *MA,*
Khorshidi S.[1] *MSc*
Karkhaneh A.*[1] *PhD*

How to cite this article
Mohseni Vadeghani E, Khorshidi S, Karkhaneh A. A Review on Cell Sheet Engineering Using Temperature Responsive Culture Dishes for Tissue Engineering Applications. Pathobiology Research .2019;22(2):103-111.

[1]Biomaterials Department, Biomedical Engineering Faculty, Amirkabir University of Technology, Tehran, Iran

Correspondence
Address: Amirkabir University of Technology, No. 424, Hafez Str-eet, Tehran, Iran. Postal Code: 1591634-311
Phone: +98 (21) 64542497
Fax: +98 (21) 66468186
a.karkhaneh@aut.ac.ir

Article History
Received: November 12, 2018
Accepted: March 9, 2019
ePublished: June 20, 2019

ABSTRACT

Functional disorder in different tissues is a consequence of cell damage in a part of a tissue that can occur because of diseases, traumas, or accidents. Organ transplantation has so far been the only treatment approach for these damages; however, transplantation therapies have been greatly limited by the serious shortage of donors or immune rejection. One of the alternative approaches is tissue engineering that recently has attracted the tremendous attentions of many researchers. Cell sheet engineering is a technology that can construct bioengineered sheet-like tissues without the need of using scaffolds and it is called "scaffold-free tissue engineering". Cells are cultured at 370C on the surfaces grafted with the temperature responsive polymer "poly (N-isopropylacrylamide)". Then, the cell sheet is harvested with a simple reduced-temperature treatment up to 200C and transplanted directly onto the injured surface without sutures or glues. In the present article, researches and experiments in the field of cell sheet engineering have been paid attention. Moreover, the advantages and challenges of this method have been discussed.

Keywords Tissue Engineering; Poly (n-isopropylacrylamide); Temperature responsive polymer

CITATION LINKS

[1] Biomimetic materials for tissue ... [2] Cell sheet ... [3] Measurement of Centripetal Migration of Normal Corneal ... [4] Sex chromatin of donor corneal epithelium ... [5] The X, Y, Z hypothesis of corneal epithelial ... [6] Fyodorov-Zuevkeratoprosthesis implantation: Long-term ... [7] Novel materials to enhance corneal epithelial cell ... [8] Simultaneous graft copolymerization of 2-hydroxyethyl methacrylate ... [9] A self-crosslinking tri-component hydrogel based on ... [10] Bone marrow ... [11] Replacement of an avulsed phalanx with ... [12] The restoration of full-thickness cartilage defects with mesenchymal stem ... [13] Blood vessels engineered from ... [14] Tissue-engineered autologous bladders for ... [15] Ocular surface reconstruction using autologous rabbit oral mucosal epithelial sheets fabricated ... [16] Application of the cell sheet technique in ... [17] Regenerative medicine of cornea by cell sheet engineering using ... [18] Cell delivery in regenerative medicine: The cell ... [19] Temperature-responsive polymer modified surface ... [20] Responsive systems for cell ... [21] Three-dimensional cardiac tissue fabrication ... [22] Rapid cell sheet detachment from Poly ... [23] Thermo-Responsive Culture Dishes Allow the Intact Harvest of Multilayered ... [24] Functional bioengineered corneal epithelial sheet ... [25] Urothelium regeneration using viable cultured ... [26] Human periodontal ligament cell sheets can regenerate ...[27] Fabrication of pulsatile cardiac tissue grafts ... [28] Novel approach for achieving double... [29] The use of patterned dual thermoresponsive surfaces ... [30] Cell sheet engineering: Recreating tissues without ... [31] Latest status of the clinical and industrial applications of cell sheet ... [32] The effect of scaffold degradation rate on three-dimensional ... [33] Development of PLGA-coated β-TCP ... [34] Cell-Sheet Engineering Using ... [35] Construction of three-dimensional vascularized cardiac ... [36] Nanostructured designs of biomedical materials: Applications of cell sheet ... [37] Recent development of temperature-responsive cell culture surface using ... [38] Fabrication of thermoresponsive polymer ... [39] Comb-type grafted hydrogels of PNIPAM and PDMAEMA with ... [40] Rapid Deswelling Response of Poly ... [41] Fabrication of functional three-dimensional ... [42] Corneal reconstruction with tissue-engineered ... [43] Cultured Autologous Oral Mucosal Epithelial ... [44] Ultrathin poly(N-isopropylacrylamide) grafted ... [45] Polysurgery of cell sheet grafts overcomes diffusion ... [46] Dynamic sealing of lung air leaks by the transplantation ... [47] Bladder reconstruction using scaffold-less autologous smooth ... [48] Cementum-periodontal ligament complex ... [49] Periodontal regeneration with multi-layered ...

Copyright© 2019, TMU Press. This open-access article is published under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License which permits Share (copy and redistribute the material in any medium or format) and Adapt (remix, transform, and build upon the material) under the Attribution-NonCommercial terms.

مروری بر روش مهندسی لایه سلولی با استفاده از ظروف کشت حساس به دما به‌منظور کاربردهای مهندسی بافت

الهام محسنی‌وادقانی MA
گروه بیومتریال، دانشکده مهندسی پزشکی، دانشگاه صنعتی امیرکبیر، تهران، ایران
ساجده خورشیدی MSc
گروه بیومتریال، دانشکده مهندسی پزشکی، دانشگاه صنعتی امیرکبیر، تهران، ایران
اکبر کارخانه* PhD
گروه بیومتریال، دانشکده مهندسی پزشکی، دانشگاه صنعتی امیرکبیر، تهران، ایران

چکیده
اختلال عملکرد در بافت‌های مختلف در نتیجه آسیب سلول‌های یک قسمت از بافت است که می‌تواند به‌دلیل بیماری‌ها، ضربه‌های شدید یا تصادفات به وجود آید. تاکنون تنها راه درمان این‌گونه آسیب‌ها، پیوند عضو بوده است، حال آن که این راه به‌دلیل پس‌زده‌شدن بافت پیوندی یا کمبود بافت‌های اهدایی عمدتاً با سختی‌هایی همراه است. یکی از روش‌های جایگزین، مهندسی بافت است که امروزه بسیار مورد توجه محققان قرار گرفته است. مهندسی لایه سلولی روشی است که قادر به ایجاد بافت مهندسی لایه‌ای‌شکل بدون نیاز به داربست است و در اصطلاح به آن "مهندسی بافت فاقد داربست" گفته می‌شود. سلول‌ها روی ظروف حساس به دما که پایه اصلی آنها پلیمر پلی‌ان‌ایزوپروپیل‌اکریل‌آمید (PNIPAM) است در دمای ۳۷°C کشت داده می‌شوند. سپس با کاهش دما تا ۲۰°C، لایه سلولی از روی سطح جدا می‌شود و بدون نیاز به بخیه یا چسب در ناحیه بافت هدف قرار می‌گیرد. در این مقاله مطالعات و آزمایشات انجام‌شده در حوزه مهندسی لایه سلولی بررسی شد. همچنین مزیت‌ها و مشکلات این روش مورد ارزیابی قرار گرفت.

کلیدواژه‌ها: مهندسی لایه سلولی، پلی‌ان‌ایزو پروپیل اکریل آمید، پلیمر حساس به دما

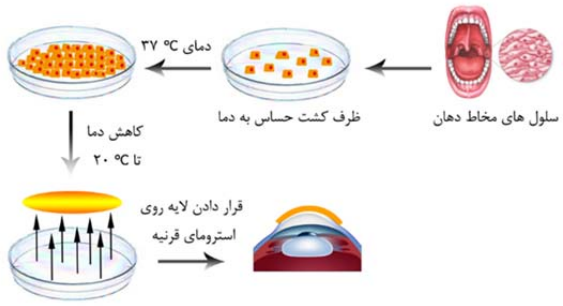
تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۸/۲۱
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۲/۱۸
*نویسنده مسئول: a.karkhaneh@aut.ac.ir

مقدمه
در ۱۰ تا ۱۵ سال اخیر پزشکی ترمیمی و مهندسی بافت بسیار مورد توجه بوده است. محصولاتی با استفاده از روش مهندسی بافت سنتی که قرارگیری سلول‌ها درون داربست‌های تخریب‌شونده است، توانسته‌اند به مرحله کلینیکی راه پیدا کنند. این محصولات کاربردهای زیادی در حوزه‌های استخوان، غضروف، مثانه و رگ‌های خونی داشته‌اند. بنابراین این نتایج، ضروری‌بودن پزشکی ترمیمی با استفاده از رویکردهایی برای انتقال سلولی را نشان می‌دهند[1].
مهندسی لایه سلولی که در آن سلول‌های کشت‌داده‌شده به‌صورت سالم به همراه ECM تولیدشده به دست می‌آیند، با استفاده از ظروف کشت حساس به دما گسترش یافته است و می‌تواند در حوزه مهندسی بافت بسیار مفید واقع شود. مهندسی لایه سلولی تاکنون برای بافت‌هایی مانند قرنیه، عضله صاف اسکلتی و لیگامان لثه که می‌توانند به‌صورت یک بافت دوبعدی تلقی شوند، نتایج موفقیت‌آمیزی را در برداشته است[2].
اختلال عملکرد در اپیتلیوم قرنیه به‌دلیل آسیب‌هایی از قبیل سوختگی‌های شیمیایی و گرمایی، بیماری‌های مختلفی مانند سندروم استونس- جانسون و ضربه شدید به وجود می‌آید. این‌گونه آسیب‌ها و بیماری‌ها موجب ازبین‌رفتن کامل سلول‌های بنیادی اپیتلیوم قرنیه که در قسمت لیمبال قرار دارد، می‌شود که نهایتاً کمبود این سلول‌ها، منجر به کدری قرنیه و کمبود حدت بینایی می‌شود[3-5].
از اولین روش‌های درمان این آسیب‌ها می‌توان به پیوند قرنیه در کاربردهای بالینی اشاره کرد. اما به‌طور کلی دو مشکل اساسی برای پیوند اعضا وجود دارد که شامل تعداد کم اهداکننده و احتمال پس‌زدن از طرف بافت میزبان و واکنش سیستم ایمنی هستند[6].
از روش‌های دیگر ترمیمی بافت قرنیه، استفاده از کاشتنی‌های پزشکی است که می‌تواند به‌عنوان جایگزین در لایه‌های مختلف چشم استفاده شود. برای ساخت این‌گونه کاشتنی‌ها از مواد و روش‌های مختلفی بهره برده‌اند. پلیمرها به‌دلیل خواص مشابه با اکثر بافت‌های بدن از بهترین گزینه‌ها برای ساخت این‌گونه کاشتنی‌ها محسوب می‌شوند. روش‌های پلیمریزاسیون متفاوتی نیز برای سنتز آنها تاکنون استفاده شده و پیشرفت‌های عظیمی در حوزه جایگزین‌های چشمی داشته است[7-9].
بعد از آن در حوزه پزشکی ترمیمی، مهندسی بافت مطرح شد که با استفاده از بیومواد جدید به‌عنوان داربست توانست برای بازسازی بافت استخوان، غضروف، رگ‌های خونی و مثانه موثر باشد[10-14].
در ادامه به معرفی روش مهندسی لایه سلولی، مزیت‌ها، چالش‌ها و مطالعات انجام‌شده در این حوزه خواهیم پرداخت.

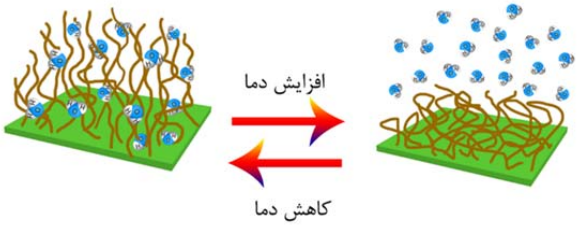
مهندسی لایه سلولی
"مهندسی لایه سلولی" روشی است که برای اولین بار در سال ۱۹۹۳ مطرح شد که از مزیت‌های مهم آن نسبت به مهندسی بافت مرسوم، این است که در آن از هیچ‌گونه حامل یا داربست بیولوژیکی استفاده نمی‌شود و در اصطلاح به آن "مهندسی بافت فاقد داربست" گفته می‌شود[15].
در این روش معمولاً از خود فرد سلول گرفته می‌شود و روی ظروف کشت حساس به دما در دمای ۳۷°C کشت داده می‌شود. سپس با کاهش دما تا ۲۰°C به‌مدت ۳۰دقیقه، لایه سلولی به همراه ماتریکس خارج سلولی از روی سطح جدا شده و در محل آسیب قرار داده می‌شود[16].
در خصوص مهندسی لایه سلولی برای بافت قرنیه، برای کسانی که بیماری‌شان مربوط به یک چشم است از سلول‌های بنیادی موجود در قسمت لیمبوس چشم سالم به‌عنوان منبع سلولی استفاده می‌شود و برای بیماری‌های مربوط به هر دو چشم، از سلول‌های بنیادی اپیتلیال گرفته‌شده از مخاط فرد، به‌عنوان منبع سلولی استفاده می‌شود. لایه سلولی بعد از جدایش از روی سطح ظرف کشت حساس به دما بعد از ۵دقیقه روی سطح استروما کاملاً می‌چسبد بدون اینکه نیاز به بخیه‌زدن داشته باشد، یک سطح صاف و تمیز را به وجود می‌آورد. نتایج روی بیماران نشان داده است که بهبودی شفافیت قرنیه و حصول حدت بینایی پس از تقریباً یک سال حاصل می‌شود. این روش نسبت به بافت مهندسی‌شده به‌وسیله ژل‌های فیبرینی و غشای آمنیوتیک برای قرنیه شفافیت بیشتری را ایجاد می‌کند[17].
علاوه بر درمان بیماری‌هایی که موجب ازبین‌رفتن اپیتلیوم قرنیه می‌شود، از این روش می‌توان بعد از عمل‌های انعکاسی چشم نیز استفاده کرد تا کدری روی قرنیه ایجاد نشود و بافت آسیب‌دیده سریع‌تر ترمیم شود[18]. شکل ۱ مراحل روش مهندسی لایه سلولی به‌منظور ترمیم لایه اپیتلیوم قرنیه را نشان می‌دهد.

ظروف کشت حساس به دما
پایه اصلی روش مهندسی لایه سلولی، پلیمر پلی‌ان‌ایزوپروپیل‌اکریل آمید (PNIPAm) است که یک پلیمر

حساس به دما است و به‌وسیله پیوندهای کووالانسی روی ظرف کشت پیوند داده می‌شود. پلیمر PNIPAm یک پلیمر هوشمند است که تغییرات حلالیت/غیرحلالیت را پایین‌تر و بالاتر از دمای حلالیت بحرانی خود که ۳۲°C است نشان می‌دهد. زنجیره‌های پلیمری PNIPAm هیدراته می‌شوند تا یک ساختار بسط‌یافته را در کمتر از دمای بحرانی تشکیل دهند. همچنین زنجیره‌ها یک ساختار به‌هم‌پیوسته و فشرده را بالاتر از دمای بحرانی تشکیل می‌دهند که به‌واسطه دهیدراته‌شدن زنجیره‌ها اتفاق می‌افتد. این پدیده گذار در محلول آبی PNIPAm بیشتر به تغییرات تطبیقی زنجیره پلیمری از تغییرات هیدراسیونی گروه‌های جانبی ایزوپروپیل بستگی دارد[19]. شکل ۲ روند هیدراته و دهیدراته‌شدن این لایه پلیمری را نشان می‌دهد.



شکل ۱) مراحل روش مهندسی لایه سلولی با استفاده از سلول‌های مخاط دهان به‌منظور بازسازی لایه اپیتلیوم قرنیه



شکل ۲) هیدراته و دهیدراته‌شدن لایه پلیمری PNIPAAm با کاهش و افزایش دما

در طول کشت سلولی، سلول‌ها مولکول‌های ECM را ترشح می‌کنند و ارتباطات سلول- سلول را به وجود می‌آورند. در جداسازی سلول‌ها به‌وسیله آنزیم تریپسین، ECM و ارتباطات سلول- سلول کاملاً تخریب می‌شوند، در مقابل، در ظروف حساس به دما، با کاهش دما لایه‌های سلولی به همراه ECM کاملاً بدون آسیب از سطح جدا می‌شوند. در دمای ۳۷°C، سطح ظروف آبگریز است و سلول‌ها به‌راحتی می‌چسبند، پخش می‌شوند و تکثیر می‌یابند مانند زمانی که روی ظروف پلی‌استایرنی هستند. هنگامی که دما به کمتر از ۳۲°C کاهش می‌یابد سطح پلیمر آبدوست و متورم می‌شود و یک لایه آبی بین سطح ظرف و لایه سلولی به وجود می‌آید و این اجازه را می‌دهد که لایه سلولی بدون نیاز به آنزیم جدا شود. عدم استفاده از آنزیم‌هایی مانند پروتئاز و تریپسین موجب می‌شود پروتئین‌های سطح سلولی مانند کانال‌های یونی، گیرنده‌های فاکتور رشد و پروتئین‌های ارتباطی سلول- سلول سالم بمانند[17, 20].

به‌طور کلی هنگام جداسازی لایه سلولی از سطح، این لایه ابتدا از لبه‌ها جدا می‌شود و به تدریج این جدایش به قسمت میانی منتقل می‌شود و احتمالاً دلیل آن این است که آب بین لایه سلولی و ظرف از لبه‌ها نفوذ می‌کند. هنگامی که لایه سلولی از سطح جدا می‌شود به‌دلیل ارتباطات قوی بین سلولی، این لایه بسیار تمایل دارد که جمع شود و حالت انقباضی پیدا می‌کند. استفاده از یک غشای متخلخل یا غشای کیتین از این امر جلوگیری خواهد کرد. بعد از جدایش لازم است که سریعاً لایه سلولی به یک ظرف کشت دیگر انتقال پیدا کند تا از جمع‌شدگی آن جلوگیری شود[21, 22].

انواع مهندسی لایه سلولی

به‌طور کلی بافت‌ها و ارگان‌های مختلفی را با استفاده از مهندسی لایه سلولی با سه روش مختلف می‌توان بازسازی کرد:

۱) یک لایه سلولی از یک نوع سلول به‌طور مستقیم روی بافت میزبان قرار می‌گیرد (مانند ترمیم پوست، قرنیه، لیگامان لثه و مثانه) [23-26].

۲) چند لایه سلولی از یک نوع سلول به‌صورت سه‌بعدی روی قسمت بافت میزبان قرار می‌گیرد (مانند ترمیم بافت قلب) [27].

۳) چند لایه سلولی از چند نوع سلول به‌صورت لایه‌ای روی یکدیگر قرار می‌گیرند (مانند ترمیم بافت کبد و کلیه) [28].

همچنین می‌توان دو نوع سلول مختلف را در ظروف دارای قسمت‌های مشخص که حساس به دما هستند کشت داد که برای ترمیم بافت‌های کبد و کلیه استفاده می‌شود[29].

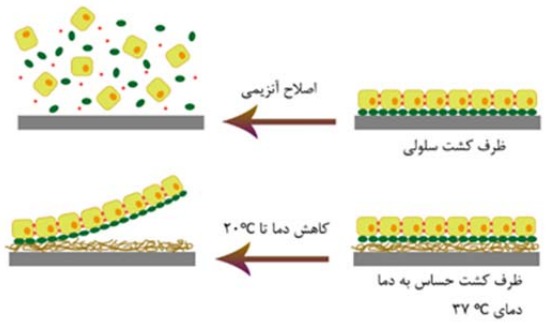
مزیت‌های مهندسی لایه سلولی بر پایه ظروف کشت حساس به دما

۱) سالم‌ماندن سلول‌ها

استفاده از آنزیم‌هایی مانند تریپسین و دیسپاز برای جداسازی لایه سلولی موجب می‌شود مولکول‌های ماتریس خارج سلولی تخریب شوند و اجازه جدایش بدون آسیب سلول داده نمی‌شود. همچنین پروتئین‌های سطح سلولی تخریب می‌شوند که موجب کاهش شکل تمایزی سلول و عملکرد سلول‌ها برای تزریق می‌شود. به همین دلیل کنترل اندازه، شکل و محل سلول‌های تزریقی مشکل است. استفاده از ظروف حساس به دما باعث می‌شود ورقه‌های سلولی سالم به همراه ECM از سطح جدا شوند و بدون نیاز به چسب فیبرین یا بخیه‌زدن، به‌طور مستقیم روی بافت میزبان قرار گیرند. برداشت سلول‌ها به‌وسیله این ظروف، ارتباطات سلول- سلول و سلول- ECM را حفظ می‌کند که برای بازسازی بافت عملکردی نیاز است[30, 31].

یک مثال مناسب برای اثبات مزیت مهندسی لایه سلولی نسبت به تزریق سلولی مستقیم، بازسازی عضله صاف است، زیرا عضله صاف اندام‌های توخالی بدن را پوشش می‌دهد و نکته مهم در بازسازی این بافت این است که سلول‌ها باید به‌طور دقیق با یکدیگر ارتباط داشته باشند و یک بافت یکدست و به‌هم‌پیوسته را تشکیل دهند. کشت سلول‌های عضلانی صاف با استفاده از ظروف کشت حساس به دما به تشکیل یک لایه سلول به‌هم‌پیوسته می‌انجامد که با قراردادن دو یا پنج لایه سلول می‌توان به ساختار بافت عضله صاف رسید. بعد از پیوند زیرجلدی، ساختار لایه‌های سلولی به همراه ECM روی سطح لایه بازال، بعد از ۵دقیقه به محل کاشت به‌صورت پایدار می‌چسبد. یک هفته بعد از پیوند، در محل قسمتی از بافت که برداشته شده بود لایه‌های عضله صاف به‌صورت کاملاً به‌هم‌پیوسته حضور دارند. این در حالی است که وقتی سلول‌های صاف عضلانی به‌صورت سوسپانسیون به محل تزریق می‌شوند مناطقی با کمبود سلول‌ها و سلول‌های بدون ارتباط با یکدیگر دیده می‌شوند. در روش مهندسی لایه سلولی این سلول‌ها کاملاً با

یکدیگر در ارتباط هستند و یک بافت یکپارچه را تشکیل می‌دهند[30]. شکل ۳ سالم‌ماندن اجزای سلولی را در روش مهندسی لایه سلولی با استفاده از ظروف کشت حساس به دما نسبت به اصلاح آنزیمی به‌خوبی نشان می‌دهد.



شکل ۳) جداسازی سالم لایه سلولی از روی سطح پلیمر PNIPAAm با کاهش دما در مقایسه با اصلاح آنزیمی

۲) عدم استفاده از داربست‌های تخریب‌شونده

پلیمرها با ساختارهای مختلف برای انواع سلول‌ها به‌عنوان داربست برای کشت سلولی استفاده می‌شوند. اما استفاده از این داربست‌ها عوارضی نیز دارند که شامل این موارد هستند: الف) به محض تخریب، فضاهایی که قبلاً با داربست پلیمری پر شده بود اغلب با مقادیر زیادی از ECM تشکیل‌شده پر می‌شود، بنابرین برای بازساخت ساختارهای سلولی پراکنده مانند غضروف یا استخوان، ساختارهای تولیدشده ممکن است به بافت‌های طبیعی شبیه باشند، اما در شرایطی که به ساختارهای متراکم سلولی مانند قلب یا کلیه نیاز داریم، اغلب بافت تشکیل‌شده شبیه به بافت اصلی نیست و ممکن است موجب تصلب بافت شود، ب) در ساختارهای بزرگ اغلب مشاهده شده که سلول‌ها در حاشیه‌های داربست سالم هستند و به بافت محلی شبیه‌اند اما سلول‌ها در مرکز ساختار یک هسته نکروتیک را تشکیل می‌دهند، پ) هنوز بزرگ‌ترین مشکل استفاده از روش‌های بر پایه داربست، پاسخ‌های التهابی قوی است که به محض تخریب داربست اتفاق می‌افتد و دیده شده که ماکروفاژهای فعال‌شده به سطح داربست حمله می‌کنند. درواقع حتی اگر پلیمرهای تخریب‌شونده که به‌عنوان داربست استفاده می‌شوند غیرسمی و از نظر مکانیکی غیرتهاجمی باشند، تاثیرات ناشی از تخریب آنها عملکردشان را با محدودیت مواجه می‌کند[30].

در طول فرآیند ترمیم زخم، ماکروفاژها و نوتروفیل‌ها به‌دلیل حضور داربست به محل کاشت مهاجرت می‌کنند و این پاسخ التهابی میزبان می‌تواند به سلول‌های پیوندشده آسیب وارد کند و بافت مهندسی‌شده کاشته‌شده را با شکست مواجه کند. در خصوص استفاده از پلیمرهای طبیعی به‌عنوان داربست، مانند کلاژن یا ژل فیبرین، روند تخریب آنها شبیه به پاسخ‌های ترمیم زخم است و در نتیجه آن مهاجرت سلول‌های التهابی به محل کاشت و داخل داربست اتفاق می‌افتد. پلی‌لاکتیک‌اسید (PLA) و پلی‌گلایکولیک‌اسید (PGA) که پلیمرهای سنتزی هستند نیز اغلب به‌عنوان داربست استفاده می‌شوند به‌دلیل این که می‌توانند طبق فرآیندهای متابولیکی طبیعی از بدن حذف شوند. اما استفاده از این پلیمرها نیز به‌دلیل ساختار اسیدی آنها می‌تواند آسیب قابل توجهی در محل کاشت ایجاد کند. مشاهده شده است که تخریب سریع پلی‌لاکتیک‌گلایکولیک‌اسید (PLGA) به‌دلیل ایجاد محیط اسیدی، اثرات منفی در محل کاشت داربست به وجود آورده است. این محیط اسیدی از ورود سلول‌ها به داربست و یکپارچه‌شدن آنها با داربست جلوگیری می‌کند و میزان زنده‌مانی سلول‌ها را کاهش می‌دهد. ۱۴ روز بعد از کاشت داربست PLGA به همراه سلول‌های صاف عضلانی، کاهش میزان زنده‌مانی سلول‌ها، مهاجرت و فعالیت ماکروفاژها و التهاب طولانی‌مدت در طول فرآیند تخریب مشاهده می‌شود که می‌تواند برای مهاجرت و رشد سلولی در داربست اختلال ایجاد کند[30, 32, 33].

۳) حفظ ارتباطات سلولی

در تزریق سلولی به‌صورت مرسوم، سلول‌ها در حالت سوسپانسیونی قرار دارند که بدون ارتباطات مناسب با یکدیگر و ساختار ECM هستند، هنگامی که بافت آسیب‌دیده است سلول‌های تزریقی نمی‌توانند به‌خوبی به محل آسیب‌دیده میزبان بچسبند اما در مقابل لایه سلولی به‌دلیل تولید ECM می‌تواند به محل مورد نظر و حتی محل زخم به‌خوبی بچسبد و سطح را با کمترین میزان ازدست‌دادن سلول بپوشاند[16].

۴) عدم استفاده از نخ بخیه

استفاده از نخ‌های بخیه پلی‌استری مانند PLA و PGA در برخی عمل‌های جراحی مانند قرنیه به سبب ایجاد پاسخ التهابی قابل توجه ممنوع شده است. در روش مهندسی لایه سلولی نیاز به استفاده از نخ بخیه یا چسب بافتی نیست[30].

۵) سهولت پیوند لایه سلولی

لایه‌های سلولی جداشده به‌راحتی قابل حمل، غیرشکننده و قابل پیوند بدون نیاز به حامل هستند. در مطالعات زیادی برای ترمیم بافت اپیتلیوم قرنیه، از سلول‌های لیمبال قرنیه سالم خود فرد استفاده شده است. بعد از کشت مناسب روی ظروف کشت حساس به دما، با کاهش دما لایه سلولی تشکیل‌شده از روی سطح جدا می‌شود و به‌راحتی و بدون نیاز به حامل خارجی یا نخ بخیه روی سطح استرومای قرنیه قرار می‌گیرد و می‌چسبد[2, 34].

۶) امکان استفاده برای تعداد زیادی بیمار

با گرفتن سلول‌های بنیادی از یک اهداکننده و روش کشت مناسب روی ظروف کشت حساس به دما می‌توان برای بیش از ۲۰ بیمار لایه سلولی به‌منظور بازسازی بافت‌های آسیب‌دیده تهیه کرد[19].

چالش‌های روش مهندسی لایه سلولی

۱) در روش مهندسی لایه سلولی مانند مهندسی بافت محدودیت منابع سلولی وجود دارد. یکی از روش‌ها استفاده از سلول‌های خود فرد است که سیستم ایمنی را نیز تحریک نخواهد کرد که تا به حال از سلول‌های مخاطی دهانی فرد برای ترمیم قرنیه استفاده شده است. همچنین از دیگر روش‌ها، تمایز سلول‌های بنیادی جنینی به انواع رده‌های سلولی دیگر است. در اکثر مطالعات صورت‌گرفته کلینیکی از سلول‌های مخاطی دهان استفاده شده است زیرا نحوه برداشت این نوع سلول‌ها نسبتاً غیرتهاجمی و آسان است که از این سلول‌ها برای بازسازی بافت اپیتلیوم قرنیه استفاده شده اما تاکنون به‌دلیل کمبود منابع سلولی و چالش برانگیز بودن استخراج سلولی از دیگر بافت‌های بدن انسان، مهندسی لایه سلولی با استفاده از سلول‌های خود فرد برای بازسازی بافت‌های دیگر بدن انسان به‌صورت کلینیکی صورت نگرفته و در مرحله حیوانی متوقف شده است[30].

۲) یک لایه سلولی تهیه‌شده با روش مهندسی لایه سلولی بسیار نازک است بنابراین برای تولید لایه‌های با ضخامت بیشتر، آنها معمولاً لایه به لایه روی هم قرار می‌گیرند. بنابراین نکروز بافت می‌تواند بین لایه‌ها بر اثر کمبود تغذیه و هیپوکسی اتفاق بیفتد و همچنین بعد از کاشت داخل بدن ایسکمی می‌تواند مانع زنده‌مانی

سلول‌ها شود. طبق مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۵، محققان توانستند با استفاده از سلول‌های قلبی، اندوتلیال و ظروف کشت حساس به دما، به بافت چندلایه و سه‌بعدی برسند که رگ‌زایی بین لایه‌ها اتفاق می‌افتد و مشکل هیپوکسی و غذارسانی برای سلول‌ها حل می‌شود. ازاین‌رو می‌توان گفت برای رفع این چالش بزرگ، تحقیقات در حال انجام است[16, 35].

۳) یکی از مشکلات این روش، جمع‌شدن لایه سلولی بعد از جداشدن از روی سطح پلیمر است. این موضوع برای بافت‌های نسبتاً دوبعدی مانند بافت اپیتلیوم قرنیه بسیار حائز اهمیت است زیرا لازم است که یک سطح صاف روی استرومای قرنیه قرار بگیرد و بچسبد تا بتواند شفافیت قرنیه را بازسازی کند. روش‌هایی برای حل این مشکل ارایه شده است. یکی از این روش‌ها استفاده از غشاهای حمایت‌کننده سخت از جنس کیتین، پلی‌اتیلن‌گلایکول (PEG) و پلی‌وینیلیدن‌فلورید (PVDF) است که بعد از جداسازی، لایه سلولی به این غشاها منتقل شده و سپس در محل آسیب قرار می‌گیرد. همچنین استفاده از یک کنترل‌کننده مکانیکی به‌عنوان حمل‌کننده و جداکننده لایه سلولی می‌تواند موثر باشد[36].

عوامل موثر روی کارآمدبودن لایه سلولی

۱) ضخامت لایه پلیمر: ضخامت لایه پلیمری که روی سطح پیوند می‌خورد از اهمیت بسیاری برخوردار است. اگر این میزان کمتر از ۲۰نانومتر (۱/۴میکروگرم بر سانتی‌متر مربع) باشد سلول‌ها از چسبندگی بسیارخوبی برخوردار هستند زیرا گروه‌های عاملی به طرف سطح کشیده می‌شوند و سطح پلیمر آبگریز می‌شود اما با کاهش دما سلول‌ها از روی سطح جدا نمی‌شوند زیرا پلیمر میزان آبدوستی مناسب را پیدا نمی‌کند. همچنین اگر ضخامت لایه پلیمری بیشتر از ۳۰نانومتر (۲میکروگرم بر سانتی‌متر مربع) باشد به‌دلیل اینکه سطح به شدت آبدوست می‌شود، چسبندگی مناسب سلولی مشاهده نمی‌شود و درواقع اگر لایه پلیمری ضخیم باشد، در بیرونی‌ترین قسمت، زنجیره‌های پلیمر تحرک زیادی خواهند داشت. بنابرین بهترین ضخامتی که لایه پلیمری می‌تواند روی سطح داشته باشد بین ۲۰ تا ۳۰نانومتر است[17, 36, 37].

۲) میزان کاهش دما به‌منظور جداسازی سلول‌ها: به‌طور کلی گفته شد برای جداسازی لایه سلولی لازم است دما به زیر دمای حلالیت بحرانی برسد، اما باید توجه داشت که سلول‌های متفاوت، واکنش‌های یکسانی به این کاهش دما نشان نمی‌دهند، به‌عنوان مثال سلول‌های اندوتلیال در ۲۰°C و سلول‌های هپاتوسیت در ۱۰°C حداکثر میزان جداسازی را از خود نشان می‌دهند[36].

۳) نحوه پلیمریزاسیون PNIPAm روی سطح: روش‌های پلیمریزاسیون متفاوتی برای پیوند PNIPAm روی سطح وجود دارد که شامل تابش باریکه الکترونی، تابش پلاسما، تابش UV، پلیمریزاسیون رادیکالی انتقال اتمی و پلیمریزاسیون انتقال به زنجیر افزایشی- جدایشی برگشت‌پذیر، که با توجه به نوع سلول‌ها و شرایط آزمایشگاهی مطلوب است که موثرترین روش انتخاب شود[37, 38].

۴) زمان جداسازی کامل لایه سلولی از سطح: این زمان بسیار قابل اهمیت است و در حالت معمول بین ۲۰-۳۰دقیقه طول می‌کشد که ممکن است در این زمان لایه سلولی عملکرد بیولوژیکی خود را از دست بدهد. در ادامه به روش‌هایی برای سرعت‌بخشیدن به جداسازی لایه سلولی پرداخته می‌شود[19].

روش‌هایی برای تسریع عمل برداشت لایه سلولی

۱) پیوند پلیمر PNIPAm روی غشای متخلخل: در این روش یک زیرلایه با قابلیت نفوذپذیری بالای آب به کار برده می‌شود تا مولکول‌های آب به مرز میان لایه سلولی و پلیمر نفوذ کنند و عمل هیدراسیون لایه پلیمری را سرعت بخشند. پلیمر PNIPAAm به‌صورت کووالانسی به‌وسیله تابش تفنگ الکترونی روی غشای متخلخل پیوند می‌شود. در دمای ۳۷°C سلول‌ها بدون هیچ مشکلی روی غشا می‌چسبند و تکثیر می‌شوند (در صورتی که قطر تخلخل‌ها کمتر از سلول باشد). با کاهش دما تا ۲۰°C، لایه سلولی به‌راحتی از سطح جدا می‌شود و درواقع این جداشدن سریع‌تر از حالتی است که پلیمر روی پلی‌استایرن پیوند شده و این به‌دلیل نفوذ آب به درون تخلخل‌ها است که هیدراسیون سریع‌تر انجام می‌شود. درواقع می‌توان گفت در این روش، نفوذ آب علاوه بر اطراف از زیر نیز اتفاق می‌افتد و به همین دلیل هیدراسیون زودتر انجام می‌گیرد[22].

۲) پیوند کوپلیمر PNIPAm با PEG روی غشای متخلخل: این روش موجب شد تا پلیمر سریع‌تر نسبت به دما واکنش نشان دهد، درواقع زنجیره‌های PEG کانال‌هایی را برای عبور مولکول‌های آب ایجاد کردند تا هیدراسیون و در نتیجه جداشدن لایه سلولی سریع‌تر اتفاق بیفتد[39, 40].

۳) استفاده از یک کنترل‌کننده: لایه سلولی ممکن است حین برداشت جمع شود و حالت صاف‌بودن خودش را از دست بدهد. برای برداشت یک لایه سلولی صاف یا ساخت یک بافت سه‌بعدی از یک کنترل‌کننده استفاده می‌شود. این کنترل‌کننده شامل یک هیدروژل حمایت‌کننده، یک قالب سیلیکونی و یک پیستون است که درواقع لایه سلولی در تماس با هیدروژل قرار می‌گیرد و از روی سطح بلند می‌شود. با کاهش دما تا ۲۰°C و استفاده از این کنترل‌کننده یک لایه سلولی صاف و بدون جمع‌شدگی به دست می‌آید که بسیار نازک است و سطح بیشتری نسبت به لایه‌های سلولی دارد که خودشان از روی سطح بلند می‌شوند. این لایه سلولی می‌تواند روی یک ظرف کشت دیگری قرار بگیرد یا برای ساخت بافت سه‌بعدی لایه‌های سلولی مرتباً روی یکدیگر قرار گیرند[19, 41].

مروری بر مطالعات تجربی

محققان از اولین سال‌های دستیابی به روش مهندسی لایه سلولی با استفاده از ظروف کشت حساس به دما، به بررسی نحوه جدایش لایه‌های سلولی از روی سطح پلیمر، ضخامت بهینه پلیمر و چگونگی تسریع این عمل پرداخته‌اند و اکثر مطالعات در مرحله برون‌تنی انجام شده است.

در مطالعات متعددی نشان داده شد که لایه سلولی کشت داده‌شده روی پلیمر PNIPAm با کاهش دما از ۳۷°C تا ۲۰°C به‌راحتی از روی سطح جدا می‌شود و با حفظ ساختار ECM و ارتباطات بین سلولی برای کاشت در محل بافت آسیب‌دیده بسیار مناسب است. برای بازسازی بافت قرنیه از سلول‌های بنیادی لیمبال قرنیه و سلول‌های مخاط دهان استفاده شده است که نتایج موفقیت‌آمیزی را در بر داشته است[24, 42].

طی مطالعه انجام‌شده در سال ۲۰۱۲ و استفاده از روش لایه سلولی به‌منظور ترمیم بافت اپیتلیوم قرنیه، بعد از پیوند لایه روی قرنیه به‌صورت کلینیکی، نتایج موفقیت‌آمیز شامل بازگشت شفافیت قرنیه، بازگشت حدت بینایی، عدم ایجاد زخم، عدم ایجاد التهاب و عدم نیاز به بخیه روی ۲۶ قرنیه مشاهده شد[43].

همچنین در مطالعاتی دیگر نشان داده شده است که برای تسریع عمل برداشت لایه سلولی از روی سطح پلیمر می‌توان از روش‌های

متعددی مانند استفاده از یک غشای متخلخل یا کوپلیمرکردن PNIPAm با پلی‌اتیلن‌اکساید استفاده کرد. این روش‌ها موجب می‌شود تا مولکول‌های آب سریع‌تر به داخل پلیمر نفوذ کنند و متورم شوند[22, 40].

در سال ۲۰۰۴ *آکیاما* و همکاران به این مهم دست یافتند که ضخامت لایه پلیمری می‌تواند در نحوه جدایش لایه سلولی از سطح بسیار موثر باشد و ضخامت بهینه لایه پلیمری را ۲۰ تا ۳۰نانومتر اعلام کردند[44].

علاوه بر بافت قرنیه، بافت قلب از جمله بافت‌هایی است که مهندسی لایه سلولی توانسته برای بازسازی آن بسیار موفق عمل کند. محققان توانستند با استفاده از ظروف کشت حساس به دما و سلول‌های کاردیومایوسیت موش و سلول‌های اندوتلیال به یک بافت چهار لایه قلبی دست پیدا کنند که بعد از کاشت توانایی تپش خودبه‌خودی را پیدا می‌کند. همچنین در سال ۲۰۱۴ برای رفع مشکل هیپوکسی و تغذیه‌رسانی به بافت قلبی ساخته‌شده با استفاده از روش مهندسی لایه سلولی آزمایش‌هایی در زمینه رگ‌زایی بین لایه‌ها انجام شد که نتایج موفقیت‌آمیزی را در پی داشت[27, 35, 45].

از پلیمر PNIPAm به‌عنوان سطح حساس به دما و سلول‌های هپاتوسیت و اندوتلیال به‌منظور ساخت بافت چندلایه‌ای کبد استفاده شده است که توانسته بعد از کاشت، عملکردی‌بودن به‌عنوان بافت کبد را از خود نشان دهد[28]. همچنین مهندسی لایه سلولی به‌منظور بازسازی بافت ریه و جلوگیری از نشت هوا از ریه مورد آزمایش قرار گرفته است. برای جلوگیری از نشت هوا از ریه به‌صورت مرسوم از چسب‌های فیبرینی استفاده می‌شود که نتایج، شبیه‌بودن بافت نهایی به بافت ریه و عملکردی‌بودن آن را نشان می‌دهد که جایگزینی مناسب برای چسب‌های فیبرینی است[46].

در سال ۲۰۱۴ آزمایشی صورت گرفت که در آن از سلول‌های صاف عضلانی مثانه خرگوش برای کشت روی پلیمر حساس به دمای PNIPAm استفاده شد و بعد از جدایش سلولی در همان محل کاشته شد. بعد از ۱۲ ماه پیگیری، عملکردی و شبیه‌بودن به بافت اصلی برای بافت کاشته‌شده مشاهده شد[47].

یکی دیگر از بافت‌هایی که روش مهندسی لایه سلولی برای آن موفقیت‌آمیز بوده است، بافت لیگامان لثه است که در تحقیقات متعددی از سلول‌های لیگامان لثه برای کشت روی ظروف حساس به دما استفاده شده است. بافت ایجادشده بعد از کاشت در محل توانسته موجب به‌هم‌پیوسته‌شدن استخوان و سیمان لثه که با لیف‌های کلاژن در ارتباط است، شود و شبیه به بافت اصلی عمل کند[48, 49].

مطالعات تجربی انجام‌شده به‌صورت خلاصه با تفکیک رویکرد، بافت هدف، نوع سلول مورد آزمایش و نتایج در جدول ۱ ذکر شده است.

جدول ۱) مطالعات تجربی انجام‌شده با استفاده از روش مهندسی لایه سلولی و ظروف کشت حساس به دما بر پایه PNIPAAm

رویکرد	بافت هدف	نوع سلول	نتایج
استفاده از ظروف کشت حساس به دما برای دستیابی به لایه سلولی اپیتلیال قرنیه	قرنیه	سلول‌های بنیادی لیمبال قرنیه	جدایش لایه سلولی به‌صورت سالم بدون نیاز به آنزیم، قرارگرفتن لایه سلولی روی استرومای قرنیه بدون نیاز به حامل و بخیه‌زدن[24]
استفاده از سلول‌های خود فرد و ظروف کشت حساس به دما به‌منظور بازسازی قرنیه	قرنیه	اپیتلیال مخاط دهان انسانی	نتایج موفقیت‌آمیز کلینیکی روی ۴ بیمار، بازگشت شفافیت قرنیه و حدت بینایی برای آنها[42]
استفاده از سلول‌های خود فرد و ظروف کشت حساس به دما به‌عنوان جایگزینی برای پیوند قرنیه	قرنیه	اپیتلیال مخاط دهان انسانی	نتایج موفقیت‌آمیز کلینیکی روی ۲۶ بیمار، بازگشت شفافیت قرنیه و حدت بینایی برای آنها، بدون ایجاد جای زخم و التهاب[43]
استفاده از ظروف کشت حساس به دما و سلول‌های خود حیوان برای بازسازی سطح قرنیه	قرنیه	اپیتلیال مخاط دهان خرگوش	جداسازی لایه سلولی از سطح پلیمر و قرارگیری مناسب آن روی قرنیه و بازگشت شفافیت قرنیه[15]
مقایسه دو ضخامت مختلف برای پلیمر پیوندشده روی سطح پلی‌استایرن	-	اندوتلیال سرخرگ گاوی	اهمیت بهینه‌بودن ضخامت پلیمر در چسبندگی مناسب سلولی و برداشت موفقیت‌آمیز لایه سلولی[44]
استفاده از کوپلیمر PNIPAAm و پلی‌اتیلن‌اکساید به‌منظور تسریع عملیات deswelling و جدایش لایه سلولی	-	-	تسریع deswelling هنگام کاهش دما به‌دلیل حضور زنجیره‌های پلی‌اتیلن‌اکساید آبدوست به‌عنوان کانال‌هایی برای حضور مولکول‌های آب[40]
پیوند پلیمر PNIPAAm روی یک غشای متخلخل به‌منظور تسریع در عمل جدایش لایه سلولی	-	اندوتلیال سرخرگ گاوی	تسریع عمل آبدارشدن لایه پلیمری به‌دلیل نفوذ مولکول‌های آب به مرز میان لایه سلولی و پلیمر[22]
استفاده از چندین لایه سلولی متفاوت برای دستیابی به یک بافت سه‌بعدی دارای عروق	قلب	فیبروبلاست، مایوبلاست، کاردیومایوسیت و اندوتلیال	ساخت بافت قلبی سه‌بعدی با استفاده از چندین لایه سلولی و رگ‌زایی موفقیت‌آمیز بین لایه‌ها[35]
استفاده از روش مهندسی لایه سلولی به‌منظور ساخت بافت قلبی دارای عروق و جلوگیری از هیپوکسی	قلب	کاردیومایوسیت موش	ساخت یک بافت سه لایه ضخیم یک‌میلی‌متری دارای عروق، دارای نتایج موفقیت‌آمیز بعد از کاشت برای جلوگیری از هیپوکسی[45]
استفاده از ظروف کشت حساس به دما به‌منظور ساخت بافت قلبی چهار لایه دارای تپش و بررسی تپش‌های الکتریکی در این بافت	قلب	کاردیومایوسیت جنینی موش	وجود تپش خودبه‌خودی در بافت چهار لایه ایجادشده در آزمایشگاه، مشاهده تپش خودبه‌خودی بعد از سه هفته کاشت در بدن موش[27]
استفاده از ظروف کشت حساس به دما و کشت دو لایه سلولی مختلف به‌منظور مهندسی بافت کبد	کبد	هپاتوسیت موش و اندوتلیال سرخرگی انسان	نتایج موفقیت‌آمیز کشت دو لایه، عملکردی‌بودن بافت تشکیل‌شده به‌عنوان بافت کبد[28]
استفاده از ظروف کشت حساس به دما برای ساخت بافت ریه به‌منظور جلوگیری از نشت هوا از ریه	ریه	سلول‌های ریه و فیبروبلاست پوست	ساخت موفقیت‌آمیز یک محافظ برای جلوگیری از نشت هوا از ریه، جایگزینی مناسب برای چسب فیبرینی[46]
استفاده از ظروف کشت حساس به دما برای بازسازی بافت مثانه با استفاده از سلول‌های خود فرد	مثانه	سلول‌های صاف عضلانی مثانه خرگوش	عملکردی‌بودن بافت پیوندشده و شبیه‌بودن به بافت مثانه بعد از ۱۲ هفته پیگیری بعد از کاشت در بدن خرگوش[47]
استفاده از چندین لایه سلولی به‌منظور بازسازی لیگامان لثه	لیگامان لثه	سلول‌های لیگامان لثه انسان	دستیابی به بافت چندین لایه و معدنی‌شده و جدایش مناسب از سطح با استفاده از روش مهندسی لایه سلولی[48]
استفاده از روش مهندسی لایه سلولی به‌منظور ساخت بافت چندلایه و بازسازی بافت لیگامان لثه	لیگامان لثه	سلول‌های لیگامان لثه سگ	به‌هم‌پیوسته‌شدن استخوان و سیمان جدید در ارتباط با لیف‌های کلاژن بعد از کاشت بافت ایجادشده در محل بدن حیوان[49]

بحث

یکی از اصلی‌ترین مشکلات مهندسی بافت مرسوم، چالش‌های مربوط به حضور داربست به‌عنوان یک ماده خارجی است. چگونگی سرکوب سیستم ایمنی، یکپارچه‌شدن داربست با بافت‌های اطراف، نحوه تخریب داربست، مواد حاصل از تخریب داربست و زنده‌مانی سلول‌ها در تمامی نواحی یک داربست سه‌بعدی از جمله مواردی است که سال‌هاست محققان برای ورود مهندسی بافت به حوزه‌های درمان کلینیکی در حال تحقیق و بررسی روی آنها هستند. ازاین‌رو می‌توان گفت مهندسی لایه سلولی به‌دلیل عدم نیاز به یک داربست خارجی پتانسیل غلبه بر تمامی این چالش‌ها را دارد.

در حالی که مهندسی لایه سلولی می‌تواند بر برخی از کاستی‌های مهندسی بافت مرسوم غلبه کند اما همچنان مشکلاتی وجود دارد که نیاز به مطالعات بیشتر دارد. یکی از ارکان اصلی برای ساخت لایه‌های سلولی موفقیت‌آمیز، سلول‌ها هستند که دستیابی به یک منبع سلولی مناسب از جمله چالش‌های اساسی در این حوزه و به‌طور کلی مهندسی بافت است. سلول‌های مخاطی دهان، سلول‌های لیمبال قرنیه و همچنین مایوبلاست‌های اسکلتی از جمله سلول‌هایی بوده‌اند که در مطالعات و آزمایش‌های مهندسی لایه سلولی مورد استفاده قرار گرفته‌اند اما برای ورود این روش به مرحله کلینیکی لازم است به منابع سلولی در دسترس‌تری راه پیدا شود.

از سوی دیگر روش مهندسی لایه سلولی در صورتی می‌تواند در ساخت بافت‌های سه‌بعدی موفق عمل کند که بتوان برای زنده‌مانی سلول‌ها و رگ‌زایی در روش لایه به لایه سلولی و ساخت بافت‌های سه‌بعدی به نتایج قابل توجهی رسید.

در انتها می‌توان گفت مهندسی لایه سلولی یکی از بهترین روش‌هایی است که تاکنون به‌منظور بازسازی بافت‌های دوبعدی از قبیل اپیتلیوم قرنیه، عضله صاف اسکلتی و لیگامان لثه مطرح و پیگیری شده است. قرنیه بافت دوبعدی فاقد عروق است و به نظر می‌رسد لایه‌های سلولی تهیه‌شده با رویکرد مهندسی لایه سلولی بتوانند جایگزین مناسبی برای اپیتلیوم ازدست‌رفته یا آسیب‌دیده قرینه باشد. تغییر پلیمر مصرفی برای تهیه زیرلایه سلولی، روش ساخت زیرلایه سلولی، اصلاح سطحی زیرلایه و بهبود روش‌های جداسازی لایه سلولی از زیرلایه می‌تواند سبب افزایش کارآیی و بازده درمانی لایه سلولی مهندسی‌شده، شود.

از محدودیت‌های مطالعه حاضر می‌توان به کمبود منابع سلولی، عدم رگ‌زایی مناسب در بافت‌های سه‌بعدی و کمبود اکسیژن و غذارسانی کافی به سلول‌هایی که در مرکز لایه‌های سلولی قرار گرفته‌اند، اشاره کرد.

پیشنهاد می‌شود از رویکردهایی مانند اصلاح سطح زیرلایه، استفاده از یک کنترل‌کننده برای برداشت سریع لایه سلولی و استفاده از پلیمرهای حساس به دمای دیگر نیز برای مطالعات آینده استفاده شود.

نتیجه‌گیری

به‌طور کلی می‌توان گفت تا به امروز مهندسی بافت توانسته پیشرفت‌های زیادی در حوزه پزشکی ترمیمی به‌منظور ترمیم و بازسازی بافت‌های ازدست‌رفته و آسیب‌دیده داشته باشد. مهندسی لایه سلولی، مهندسی بافت فاقد داربست نامیده می‌شود و با استفاده از این روش می‌توان بدون حضور یک داربست خارجی، بافت‌های دوبعدی آسیب‌دیده را ترمیم کرد. این روش تاکنون برای ترمیم بافت‌های اپیتلیوم قرنیه، لیگامان لثه و عضله صاف اسکلتی بسیار موفقیت‌آمیز بوده است و امید به آن است که این روش بتواند برای بافت‌های با ضخامت بیشتر نیز کارآمد واقع شود.

تشکر و قدردانی: موردی از سوی نویسندگان گزارش نشده است.
تاییدیه‌اخلاقی: موردی از سوی نویسندگان گزارش نشده است.
تعارض منافع: موردی از سوی نویسندگان گزارش نشده است.
سهم نویسندگان: الهام محسنی وادقانی (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر اصلی (۵۰%)؛ ساجده خورشیدی (نویسنده دوم)، روش‌شناس/پژوهشگر کمکی (۳۰%)؛ اکبر کارخانه (نویسنده سوم)، پژوهشگر کمکی/نگارنده بحث (۲۰%)
منابع مالی: موردی از سوی نویسندگان گزارش نشده است.

منابع

1- Ma P. Biomimetic materials for tissue engineering. Adv Drug Deliv Rev. 2008;60(2):184-98.
2- Yamato M, Okano T. Cell sheet engineering. Materialstoday. 2004;7(5):42-7.
3- Buck RC. Measurement of Centripetal Migration of Normal Corneal Epithelial Cells in the Mouse. Ophthalmol Vis Sci. 1985;26(9):1296-9.
4- Kinoshita S, Friend J, Thoft RA. Sex chromatin of donor corneal epithelium in rabbits. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1981;21(3):434-41.
5- Thoft RA, Friend J. The X, Y, Z hypothesis of corneal epithelial maintenance. Investig Ophthalmol Vis Sci. 1983;24(10):1442-3.
6- Ghaffariyeh A, Honarpisheh N, Karkhaneh A, Abudi R, Moroz ZI, Peyman A, et al. Fyodorov-Zuevkeratoprosthesis implantation: Long-term results in patients with multiple failed corneal grafts. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 2011;249(1):93-101.
7- Karkhaneh A, Mirzadeh H, Ghaffariyeh A, Ebrahimi A, Honarpisheh N, Hosseinzadeh M, et al. Novel materials to enhance corneal epithelial cell migration on keratoprosthesis. Br J Ophthalmol. 2011;95(3):405-9.
8- Karkhaneh A, Mirzadeh H, Ghaffariyeh A.R. Simultaneous graft copolymerization of 2-hydroxyethyl methacrylate and acrylic acid onto polydimethylsiloxane surfaces using a two-step plasma treatment. J Appl Polym Sci. 2007;105(4):2208-17.
9- Khorshidi S, Karkhaneh A. A self-crosslinking tri-component hydrogel based on functionalized polysaccharides and gelatin for tissue engineering applications. Mater Lett. 2016;164:468-71.
10- Thomas ED, Storb R, Clift RA, Fefer A, Johnson FL, Neiman PE, et al. Bone marrow transplantation. New Engl J Med. 1975;292(17):895-902.
11- Vacanati CA, Bonassar LJ, Vacanati MP, Shufflebarger J. Replacement of an avulsed phalanx with tissue-engineered bone. N Engl J Med. 2001;344(20):1511-4.
12- Qi Y, Zhao T, Xu K, Dai T, Yan W. The restoration of full-thickness cartilage defects with mesenchymal stem cells (MSCs) loaded and cross-linked bilayer collagen scaffolds on rabbit model. Mol Biol Rep. 2012;39(2):1231-7.
13- Poh M, Boyer M, Solan A, Dahl SL, Pedrotty D, Banik SS, et al. Blood vessels engineered from human cells. Lancet. 2005;365(9477):2122-4.
14- Atala A, Bauer SB, Soker S, Yoo JJ, Retik AB.Tissue-engineered autologous bladders for patients needing cystoplasty. Lancet. 2006;367(9518):1241-6.
15- Hayashida Y, Nishida K, Yamato M, Watanabe K, Maeda N, Watanabe H, et al. Ocular surface

reconstruction using autologous rabbit oral mucosal epithelial sheets fabricated ex vivo on a temperature-responsive culture surface. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2005;46(5):1632-9.
16- Chen G, Qi Y, Niu L, Di T, Zhong J, Fang T. Application of the cell sheet technique in tissue engineering. Biomed Rep. 2015;3(6):749-57.
17- Umemoto T, Yamato M, Nishida K, Okano T. Regenerative medicine of cornea by cell sheet engineering using temperature-responsive culture surfaces. Chin Sci Bull. 2013;58(35):4349-56.
18- Yang J, Yamato M, Nishida K, Ohki T, Kanzaki M, Sekine H, et al. Cell delivery in regenerative medicine: The cell sheet engineering approach. J Control Release. 2006;116(2):193-203.
19- Tang Zh, Akiyama Y, Okano T. Temperature-responsive polymer modified surface for cell sheet engineering. Polym. 2012;4(3);1478-98.
20- Patel NG, Zhang G. Responsive systems for cell sheet detachment. Organogenesis. 2013;9(2):93-100.
21- Masuda S, Shimizu T. Three-dimensional cardiac tissue fabrication based on cell sheet technology. Adv Drug Deliv Rev. 2016;96:103-9.
22- Kwon OH, Kikuchi A, Yamato M, Sakurai Y, Okano T. Rapid cell sheet detachment from Poly (N-isopropylacrylamide)-grafted porous cell culture membranes. J. Biomed Mater Res. 1999;50(1):82-9.
23- Yamato M, Utsumi M, Kushida A, Konno C, Kikuchi A, Okano T. Thermo-Responsive Culture Dishes Allow the Intact Harvest of Multilayered Keratinocyte Sheets without Dispase by Reducing Temperature. Tissue Eng. 2001;7(4):473-80.
24- Nishida K, Yamato M, Hayashida Y, Watanabe K, Maeda N, Watanabe H, et al. Functional bioengineered corneal epithelial sheet grafts from corneal stem cells expanded ex vivo on a temperature-responsive cell culture surface. Transplantation. 2004;77(3):379-85.
25- Shiroyanagi Y, Yamato M, Yamazaki Y, Toma H, Okano T. Urothelium regeneration using viable cultured urothelial cell sheets grafted on demucosalized gastric flaps. BJU Int. 2004;93(7):1069-75.
26- Hasegawa M, Yamato M, Kikuchi A, Okano T, Ishikawa I. Human periodontal ligament cell sheets can regenerate periodontal ligament tissue in an athymic rat model. Tissue Eng. 2005;11(3-4):469-78.
27- Shimizu T, Yamato M, Isoi Y, Akutsu T, Setomaru T, Abe K, Kikuchi A, Umezu M, Okano T. Fabrication of pulsatile cardiac tissue grafts using a novel 3-dimensional cell sheet manipulation technique and temperature-responsive cell culture surfaces. Circ Res. 2002;90(3):e40.
28- Harimoto M, Yamato M, Hirose M, Takahashi C, Isoi Y, Kikuchi A, et al. Novel approach for achieving double-layered cell sheets co-culture: overlaying endothelial cell sheets onto monolayer hepatocytes utilizing temperature-responsive culture dishes. J Biomed Mater Res. 2002;62(3):464-70.
29- Tsuda Y, Kikuchi A, Yamato M, Nakao A, Sakurai Y, Umezu M, Okano T. The use of patterned dual thermoresponsive surfaces for the collective recovery as co-cultured cell sheets. Biomaterials. 2005;26(14):1885-93.
30- Yang J, Yamato M, Kohno C, Nishimoto A, Sekine H, Fukai F, et al. Cell sheet engineering: Recreating tissues without biodegradable scaffolds. Biomaterials. 2005;26(33):6415-22.
31- Egami M, Haraguchi Y, Shimizu T, Yamato M, Okano T. Latest status of the clinical and industrial applications of cell sheet engineering and regenerative medicine. Arch Pharm Res. 2014;37(1):96-106.
32- Sung HJ, Meredith C, Johnson C, Galis ZS. The effect of scaffold degradation rate on three-dimensional cell growth and angiogenesis. Biomaterials. 2004;25(26):5735-42.
33- Khojasteh A, Fahimipour F, Eslaminejad MB, Jafarian M, Jahangir S, Bastami F, et al. Development of PLGA-coated β-TCP scaffolds containing VEGF for bone tissue engineering. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl. 2016;69:780-8.
34- Yang J, Yamato M, Okano T. Cell-Sheet Engineering Using Intelligent Surfaces. MRS Bull. 2005;30(3):189-93.
35- Sakaguchi K, Shimizu T, Okano T. Construction of three-dimensional vascularized cardiac tissue with cell sheet engineering. J Control Release. 2014;205:83-8.
36- Kikuchi A, Okano T. Nanostructured designs of biomedical materials: Applications of cell sheet engineering to functional regenerative tissues and organs. J Control Release. 2005;101(1-3)|:69-84.
37- Tang Z, Akiyama Y, Okano T. Recent development of temperature-responsive cell culture surface using Poly(N-isopropylacrylamide). J Polym Sci. 2014;52(14):917-26.
38- Li L, Zhu Y, Li B, Gao C. Fabrication of thermoresponsive polymer gradients for study of cell adhesion and detachment. Langmuir. 2008;24(23):13632-9.
39- Chen SQ, Li JM, Pan TT, Li PY, He W. Comb-type grafted hydrogels of PNIPAM and PDMAEMA with reversed network-graft architectures from controlled radical polymerizations. Polymers. 2016;8(38):1-16.
40- Kaneko Y, Nakamura S, Sakai K, Aoyagi T, Kikuchi A, Sakurai Y, et al. Rapid Deswelling Response of Poly(N-isopropylacrylamide)Hydrogels by the Formation of Water Release Channels Using Poly(ethylene oxide) Graft Chains. Macromol. 1998;31(18):6099-105.
41- Haraguchi Y, Shimizu T, Sasagawa T, Sekine H, Sakaguchi K, Kikuchi T, et al. Fabrication of functional three-dimensional tissues by stacking cell sheets in vitro. Nat Protoc. 2012;7(5):850-8.
42- Nishida K, Yamato M, Hayashida Y, Watanabe K, Yamamoto K, Adachi E, et al. Corneal reconstruction with tissue-engineered cell sheets composed of autologous oral mucosal epithelium. N Engl J Med. 2004;351(12):1187-96.
43- Burillon C, Huot L, Justin V, Nataf S, Chapuis F, Decullier E, et al. Cultured Autologous Oral Mucosal Epithelial Cell Sheet (CAOMECS) transplantation for the treatment of corneal limbal epithelial stem cell deficiency. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2012;53(3):1325-31.
44- Akiyama Y, Kikuchi A, Yamato M, Okano T. Ultrathin poly(N-isopropylacrylamide) grafted layer on polystyrene surfaces for cell adhesion/detachment control. Langmuir. 2004;20(13):5506-11.
45- Shimizu T, Sekine H, Yang J, Isoi Y, Yamato M, Kikuchi A, et al. Polysurgery of cell sheet grafts overcomes diffusion limits to produce thick, vascularized myocardial tissues. FASEB J. 2006;20(6):708-10.
46- Kanzaki M, Yamato M, Yang J, Sekine H, Kohno C, Takagi R, et al. Dynamic sealing of lung air leaks by the transplantation of tissue engineered cell sheets. Biomaterials. 2007;28(29):4294-302.

47- Talab SS, Kajbafzadeh AM, Elmi A, Tourchi A, Sabetkish S, Sabetkish N, et al. Bladder reconstruction using scaffold-less autologous smooth muscle cell sheet engineering: Early histological outcomes for autoaugmentation cystoplasty. BJU Int. 2014;114(6):937-45.
48- Flores MG, Hasegawa M, Yamato M, Takagi R, Okano T, Ishikawa I. Cementum-periodontal ligament complex regeneration using the cell sheet technique. J Periodontal Res. 2008;43(3):364-71.
49- Iwata T, Yamato M, Tsuchioka H, Takagi R, Mukobata S, Washio K,et al. Periodontal regeneration with multi-layered periodontal ligament-derived cell sheets in a canine model. Biomaterials. 2009;30(14):2716-23.