

Studying the Morphology and Growth of Human Retinal Pigment Epithelial Cells on a Thin Layer of Alginate and Alginate/Gelatin as a Culture Substrate

Hoda Shams Najafabadi¹, Zahra-Soheila Soheili^{2*}, Shahla Mohammad Ganji²

- 1- M.Sc. Student, Department of Basic Sciences, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran
- 2- Assistant Professor, Department of Basic Sciences, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran

*Corresponding Address: P.O.Code: 1417863171, Department of Basic Sciences, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Shahrak-e Pajooresh, km 15, Tehran-Karaj Highway, Tehran, Iran
Email: soheili@nigeb.ac.ir

Received: 04/Nov/2013, Accepted: 22/Dec/2013

Abstract

Objective: Human retinal pigment epithelium (hRPE) is a cell monolayer located in the outer part of the retina that is in contact with photoreceptors. In many diseases RPE cells damage. One way for treating this disease is the implantation of intact instead of damaged cells. For this reason different types of substrates have been used for cell cultivation. This study has used alginate and a blend of alginate/gelatin (A/G) to study RPE cell growth.

Methods: We prepared alginate solutions in concentrations of 1% and 2% (w/v) in water and DMEM/F12. The solutions were infused into each well of 6-well micro plates until a uniform culture substrate that had a 1 mm thickness was generated. Passage-4 hRPE cells were cultivated on the substrate and the cell characteristics studied. hRPE cells did not adhere to alginate in DMEM/F12 and did not exhibit interaction with alginate substrate. For this reason A/G solutions at concentrations of 1% and 2% (w/v) in water were prepared. We prepared A/G blends at weight ratios of: 20:80, 30:70, 40:60, 50:50, 60:40, 70:30, and 80:20. These blends were infused into each well of 6-well plates until the appropriate 1 mm thickness of A/G was achieved. Isolated hRPE cells were cultured on synthetic substrate after which we studied the cells' characteristics.

Result: hRPE cell generated adhesive colonies on the A/G substrate. In all studied combinations of A/G, the diffused hRPE cells formed a monolayer under the substrate sheets. However the A/G 20:80 ratio had cell growth in the upper face of the substrate. hRPE survived indefinitely on A/G substrate. After the cells were re-cultured on polystyrene, they showed general morphological features of normal hRPE cells.

Conclusion: The A/G blend at a 20:80 ratio was chosen to be used for future studies.

Keywords: Tissue engineering, Human retinal pigment epithelium cell, Substrate, Alginate and gelatin

Modares Journal of Medical Sciences: *Pathobiology*, Vol 16, No 3, Autumn 2013, Pages: 81-93

بررسی ریخت‌شناسی و رشد سلول‌های اپیتلیالی رنگدانه‌دار شبکه‌ی انسان بر لایه‌های نازک از آلزینات و ترکیب آلزینات/ژلاتین به عنوان بستر

هدی شمس نجف‌آبادی^۱، زهرا سهیلا سهیلی^{۲*}، شهلا محمدگنجی^۲

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، بخش زیست فنآوری علوم پایه، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فنآوری، تهران، ایران

۲- استادیار، بخش زیست فنآوری علوم پایه، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فنآوری، تهران، ایران

*آدرس نویسنده مسئول: تهران، کدپستی: ۱۴۱۷۸۶۳۱۷۱، کیلومتر ۱۷ اتوبان تهران کرج، بلوار پژوهش، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فنآوری، بخش زیست فنآوری علوم پایه

Email: soheili@nigeb.ac.ir

پذیرش مقاله: ۹۲/۱۰/۰۱

دریافت مقاله: ۹۲/۰۸/۱۳

چکیده

هدف: سلول‌های رنگدانه‌دار شبکه‌ی انسان به صورت تک لایه در انتهای شبکه‌ی در ارتباط مستقیم با گیرنده‌های نوری قرار گرفته‌اند. در خیلی از بیماری‌ها این سلول‌ها آسیب می‌بینند. یکی از راه‌های درمان این بیماری‌ها جایگزین کردن سلول‌های سالم به جای سلول آسیب دیده است. به این منظور از بسترهای مختلفی برای کشت سلول استفاده شده که در بررسی حاضر از بین این بسترها ترکیبی از آلزینات و ترکیبی از آلزینات/ژلاتین برای مطالعه رشد این سلول‌ها استفاده شد.

مواد و روش‌ها: از آلزینات سدیم محلول‌های ۱ و ۲ درصد در آب و DMEM/F12 تهیه و در هر خانه از ظرف‌های ۶ خانه ریخته شد تا بستر یکنواخت یک میلی‌متری تشکیل شد. سلول‌های اپیتلیالی رنگدانه‌دار پاساژ ۴ روی بستر کشت داده شدند و ریخت‌شناسی سلول‌ها بررسی شد. سلول‌ها به بستر آلزینات در DMEM/F12 نمی‌چسبند و اندر کشت مناسبی با بسترهای آلزینات ندارند، به همین دلیل از آلزینات و ژلاتین محلول‌های ۱ درصد و ۲ درصد در آب دوبار تقطیر با نسبت‌های ۲۰ به ۸۰، ۳۰ به ۷۰، ۴۰ به ۶۰، ۵۰ به ۵۰، ۶۰ به ۴۰، ۷۰ به ۳۰، ۸۰ به ۲۰، ۹۰ به ۱۰ در هر خانه از ظرف ۶ خانه ریخته شده تا بستر یک میلی‌متری از آلزینات/ژلاتین ایجاد شد. سلول‌ها بر سطح بستر کشت داده شده و ویژگی‌های آن‌ها مطالعه شد.

نتایج: سلول‌های رنگدانه‌ای شبکه‌ی انسان روی بسترهای آلزینات/ژلاتین به صورت کلونی‌هایی چسبیده بودند. در همه بسترها با نسبت‌های مختلف آلزینات/ژلاتین سلول‌ها از غشا عبور کرده و تک لایه‌ای از سلول را در زیر بستر تشکیل می‌دهند. به جز بستر ۲ درصد با نسبت آلزینات/ژلاتین ۲۰ به ۸۰ که رشد سلول‌ها را بر سطح بستر نشان می‌دهد. سلول‌ها تا مدت نامحدود بر بستر آلزینات/ژلاتین زنده می‌مانند و بعد از کشت دوباره بر سطح پلیت ریخت‌شناسی اولیه خود را حفظ می‌کردند.

نتیجه‌گیری: بستر آلزینات/ژلاتین ۲ درصد با نسبت ۲۰ به ۸۰ برای کشت سلول‌های رنگدانه‌ای شبکه‌ی انسان در مطالعات بعدی مناسب است.

کلیدواژگان: مهندسی بافت، سلول‌های رنگدانه‌دار شبکه‌ی انسان، بستر، آلزینات، ژلاتین

مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب‌شناسی زیستی، دوره ۱۶، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۲، صفحات: ۸۱-۹۳

چشم انسان در قسمت داخلی از سه لایه تشکیل شده است؛ داخلی‌ترین لایه شبکیه (Retinal) نام دارد که از دو نوع سلول عصبی و اپیتلیالی تشکیل شده است. سلول‌های اپیتلیالی رنگدانه‌دار (Retinal Pigment Epithelium: RPE) به صورت تک لایه در انتهای شبکیه در ارتباط مستقیم با سلول‌های گیرنده نور قرار گرفته‌اند که وظیفه آن‌ها محافظت و پشتیبانی از این سلول‌ها است [۱].

در بسیاری از بیماری‌های شایع مثل رتینیت پیگمنتوزا (Retinitis Pigmentosa) و تخریب وابسته به سن ماکولا (Age-Related Macular Degeneration) سلول‌های RPE آسیب می‌بینند. یکی از راه‌های درمان این بیماری‌ها جاگزین کردن سلول‌های سالم به جای سلول‌های آسیب دیده است. برای انتقال سلول‌های سالم به بافت آسیب دیده از بسترهای متفاوتی برای کشت سلول استفاده می‌شود [۲].

مهندسی بافت (Tissue Engineering) به دنبال استفاده از داربست‌ها (Scaffold) برای ایجاد بافت قابل انتقال و دارای عملکرد لازم به جای بافت آسیب دیده و به عنوان یک راه‌کار درمانی است. داربست‌ها ساختارهای سه بعدی را ایجاد می‌کند که سلول می‌تواند به آن متصل شود و به دنبال آن بافت ایجاد شود. سلول‌ها در کشت‌های معمول در محیط دو بعدی غیر فیزیولوژیکی رشد می‌کنند ولی بسترها ساختارهای سه بعدی شبیه ماتریکس خارج سلولی را ایجاد می‌کنند که برای ایجاد بافت‌هایی دارای عملکرد مناسب و قابل پیوند استفاده می‌شود [۳] برای ساختن داربست از مواد مصنوعی متنوعی استفاده می‌شود از جمله این مواد می‌توان از نایلون، تفلون، داکرون، پلی‌گلیکولیک اسید [۴] و پلی‌متیل متا کریلات (Polymethyl Methacrylate) [۵] ... نام برد. از آنجایی که یکی از نقش‌های اساسی بستر ایجاد شرایطی مناسب برای اتصال و رشد سلول است، بهتر است از پلیمرهای طبیعی از جمله کتوزان (Chitosan) [۶]، کلاژن (Collagen) [۷]، هیالورونان (Hyaluronan) [۸]، ژلاتین (Gelatin) [۹]، آلژینات

کشت سلول‌های رنگدانه‌دار شبکیه انسان در بستر آلژینات

(Alginate) [۱۰] و ... استفاده شود که توانایی تجزیه‌پذیری و زیست‌سازگاری دارند [۱۱].

در مهندسی بافت از آلژینات به عنوان بستر مناسب برای سلول استفاده می‌شود به این دلیل که آلژینات سمی نیست و قدرت تجزیه زیست‌شناختی (Biological) دارد، زیست‌سازگار است، توانایی در برگرفتن سلول‌های زنده را داراست و قابلیت ایجاد ساختار سه بعدی مناسب به عنوان داربست در اشکال مختلف برای کشت سلول را دارد [۱۲]. آلژینات سلول‌ها را در خود ثابت و بدون حرکت نگه می‌دارد و سلول‌ها در بستر آلژینات می‌توانند به فعالیت طبیعی بیوشیمیایی خود ادامه دهند. از طرفی بستر آلژینات بعد از انتقال به بیمار پاسخ ایمنی ایجاد نمی‌کند به همین دلیل کاربردهای بالینی و بیوتکنولوژی فراوانی دارد [۱۳]. در علوم پزشکی از آلژینات برای پیوند سلول (Cell Transplantation)، درمان زخم (Wound Dressing) و تحویل دارو (Drug Delivery) استفاده می‌شود [۱۴].

آلژینات به عنوان پلی‌ساکارید خطی است که از دیواره سلولی جلبک‌های قهوه‌ای استخراج می‌شود و از زیرواحدهای مانورونیک اسید و گلوکورونیک اسید تشکیل شده است. تعداد و نحوه قرار گرفتن این توالی‌ها در زنجیره پلیمر به منبعی که آلژینات از آن استخراج می‌شود بستگی دارد که با کمک یون‌های دو ظرفیتی و سه ظرفیتی به صورت ژل در می‌آید [۱۵].

معمولاً سلول‌های پستانداران و پلی‌ساکاریدها اندرکنش مناسبی با هم ندارند. از طرفی آلژینات دارای بار منفی است و به همین دلیل نمی‌تواند پروتئین‌های سطح سلول را جذب کند و سلول‌ها بر سطح آن رشد مناسب ندارند [۱۶]. به همین دلیل در این تحقیق از ترکیبی از ژلاتین و آلژینات برای تهیه بستر استفاده شده است. ژلاتین پلیمری طبیعی است که از هیدرولیز کلاژن به دست می‌آید که پروتئینی رایج در پستانداران است و از اسید آمینه‌های گلیسین، پرولین و هیدروکسی پرولین تشکیل شده که مانند آلژینات تجزیه‌پذیر و زیست‌سازگار است و در سلول درمانی، تحویل دارو، درمان زخم و مهندسی بافت کاربرد فراوان دارد [۱۷].

میلی لیتر آب دوبار تقطیر شسته شد و به کمک ۲ میلی لیتر محیط کشت DMEM/F12 به مدت ۴ ساعت در انکوباتور متعادل سازی شد.

جداسازی و کشت و پاساژ سلول‌های RPE

کره چشم از نوزادان فوت شده زیر یک سال که حداکثر ۲۴ ساعت از فوت آن‌ها گذشته بود، در بسته‌بندی‌هایی بر سطح گازهای استریل از بانک چشم جمهوری اسلامی ایران به آزمایشگاه بیوشیمی پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک انتقال داده شد. تشریح با کمک چشم غیر مسلح انجام می‌شود، کره چشم از بسته‌بندی‌ها خارج شده به پتری دیش انتقال داده شد، بافت چربی اطراف کره چشم به طور کامل جدا شد و به وسیله تیغ‌های جراحی در قسمت قدامی چشم نزدیک عنیبه برش ایجاد شد تا قسمت قدامی چشم جدا شود و محتویات چشم از این محل خارج شود. برش‌های طولی به سمت انتهایی چشم ایجاد شد تا کره چشم کاملاً باز شود. سلول‌های عصبی که لایه‌ای شیری رنگ را تشکیل می‌دهند کاملاً برداشته شد و لایه‌ای قهوه‌ای رنگ حاوی سلول‌های RPE چند بار با PBS (Phosphate Buffered Saline) شستشو داده شد تا سلول‌های عصبی کاملاً جدا شود. این لایه از صلیبه جدا شد و با کمک تیغ‌های جراحی تکه تکه شد و به فالتون حاوی ۲ میلی لیتر آنزیم دیسپاز (Dispase Enzyme) (Gibco، آلمان) با فعالیت آنزیمی ۱ واحد/ میلی لیتر (۱/۱ گرم آنزیم در ۱ میلی لیتر از محیط کشت DMEM/F12 حل شده) انتقال یافت و به مدت ۵۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO₂ در انکوباتور قرار داده شد. بعد از گذشت این زمان فالتون به مدت ۵ دقیقه در ۳۰۰ g و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شده و رسوب حاوی سلول‌های RPE به فلاسک حاوی DMEM/F12 دارای ۲۰ درصد سرم جنین گاو (Fetal Bovine Serum: FBS) انتقال داده شد. سلول‌ها هر ۳ الی ۴ روز یک بار با کمک DMEM/F12 دارای ۱۰ درصد FBS تعویض محیط شدند. پس از آن که سلول‌ها ۸۰ الی ۹۰ درصد از فلاسک را پر

در این تحقیق از آلزینات و ژلاتین برای ساختن بستر کشت سلولی استفاده شد و سلول‌های RPE بر سطح آن کشت داده شد و میزان رشد و زنده ماندن سلول‌ها بر سطح بستر بررسی شد تا در مطالعات بعدی بتوان از بستری مناسب برای کشت سلول‌های RPE به منظور انتقال سلول‌های سالم به بافت آسیب دیده و در مدل‌های حیوانی استفاده کرد.

مواد و روش‌ها

تهیه بستری آلزینات

محلول‌هایی از آلزینات سدیم ۱ درصد و ۲ درصد در آب دو بار تقطیر و محیط کشت Dulbecco's) DMEM/F12 (Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12 (Gibco، آلمان) تهیه شد و به مقدار ۹۴۰ میکرولیتر از آن در ظرف‌های ۶ خانه (Nunc، دانمارک) ریخته شد و بستری یک میلی متری کف پلیت تشکیل شد به مدت ۱۰ دقیقه پلیت در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و به کمک ۲ میلی لیتر کلرید کلسیم ۱۰۰ میلی مولار (Merck، آلمان) به مدت ۱۰ دقیقه پلیمریزه شد. به کمک ۲ میلی لیتر آب دوبار تقطیر شسته شد و به کمک ۲ میلی لیتر محیط کشت DMEM/F12 به مدت ۴ ساعت در انکوباتور متعادل سازی شد.

تهیه بستر آلزینات / ژلاتین

محلول‌هایی از آلزینات سدیم ۱ درصد و ۲ درصد در آب دوبار تقطیر و ژلاتین (Merck، آلمان) ۲ درصد در آب دوبار تقطیر تهیه شد. محلول‌هایی با نسبت‌های ۲۰ به ۸۰، ۳۰ به ۷۰، ۴۰ به ۶۰، ۵۰ به ۵۰، ۶۰ به ۴۰، ۷۰ به ۳۰، ۸۰ به ۲۰، ۹۰ به ۱۰ آلزینات / ژلاتین تهیه و به مقدار ۹۴۰ میکرولیتر از آن در هر خانه از طرف‌های ۶ خانه ریخته شد تا بستری یک میلی متری تشکیل شد. پلیت به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و به کمک ۲ میلی لیتر کلرید کلسیم ۱۰۰ میلی مولار به مدت ۲۰ دقیقه پلیمریزه شد؛ سپس به کمک ۲

کشت سلول‌های رنگدانه‌دار شبکه‌ای انسان در بستر آلژینات

کلونی‌ها تشکیل شده از محلول رویی کشت جمع‌آوری و بر سطح پلی‌استرین کشت داده شدند (این فرآیند را کشت دوباره می‌نامند) و زنده ماندن کلونی‌ها روی بستر بررسی شد. برای این منظور در هر خانه از ظرف ۶ خانه FBS بدون محیط کشت DMEM/F12 ریخته و ظروف به مدت ۲ ساعت داخل انکوباتور قرار داده شد و از سطح بستر ۵۰ میکرولیتر محیط کشت که حاوی کلونی‌های RPE بود، برداشته شد و به هر خانه از خانه‌های ظروف شش خانه‌ای اضافه شد به گونه‌ای که که ۲ میلی‌لیتر محیط کشت DMEM/F12 همراه ۱۰ درصد FBS حاصل شود. تغییرات ریخت‌شناسی سلول‌ها ۱، ۳، ۵ و ۷ روز بعد از کشت دوباره با کمک میکروسکوپ فاز کتراست Axiovert25 ZEISS، آلمان) بررسی شد.

بررسی اثر بستر آلژینات / ژلاتین بر میزان رشد

سلول‌های RPE با کمک آزمون MTT

بسترهای آلژینات / ژلاتین با نسبت ۲۰ به ۸۰ کف پلیت‌های ۱۲ خانه (Nunc، دانمارک) تشکیل شد و سلول‌ها در دو حالت بر سطح پلیت از جنس پلی‌استرین و بر سطح بستر در DMEM/F12 به همراه ۱۰ درصد FBS کشت داده شد و از هر حالت ۳ تکرار گذاشته شد. بعد از گذشت ۴۸ ساعت از کشت سلول‌ها، محلول MTT (-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-3-(2,5-diphenyl-tetrazolium bromide) (Sigma، آلمان) به صورت ۵ میلی‌گرم / میلی‌لیتر تهیه شد و به کمک فیلتور ۲ درصد میکرومتر استریل شد و به هر خانه به صورت ۱۰ درصد نسبت به محیط کشت به سلول‌ها اضافه شد. سپس ۱۶ ساعت بعد از انکوباسیون، ۱ میلی‌لیتر از محلول سدیم دودسیل سولفات اسیدی (SDS ۱۰ درصد در HCL ۱ درصد) (Merck، آلمان) اضافه شد و ۱۸ ساعت بعد از انکوباسیون، مقادیر ۲۰۰ میکرولیتر به ظرف ۹۶ خانه (Nunc، دانمارک) انتقال داده شد و جذب آن توسط دستگاه قرائت‌گر الیزا (ELISA Reader) در طول موج ۵۸۰ نانومتر خوانده شد.

کردند، محیط فلاسک خالی و با کمک PBS شستشو داده شد. پس از آن با کمک ترپسین به مدت ۴۵ ثانیه سلول‌ها کنده شد و به فالکون حاوی ۳ میلی‌لیتر از DMEM/F12 دارای ۱۰ درصد FBS (Gibco، آلمان) انتقال داده شد؛ سپس به مدت ۵ دقیقه در ۳۰۰ g سانتریفوژ شده و رسوب به فلاسک‌های حاوی DMEM/F12 دارای ۱۰ درصد FBS انتقال داده شد.

کشت سلول‌های RPE بر سطح بستر

یک فلاسک با جمعیت مناسب از سلول‌های پاساژ ۴ برای این منظور استفاده شد. این سلول‌ها ترپسین شده، رسوب سلولی در ۱ میلی‌لیتر از DMEM/F12 سوسپانسیون شده و به منظور شمارش به ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی یکنواخت در یک ویال مقدار ۹۰ میکرولیتر رنگ تریپان بلو (Trypan Blue) (Merck، آلمان) اضافه شد؛ سپس ۱۰ میکرولیتر از آن روی لام هموسایتومتر (Boeco، آلمان) برده شد و تعداد سلول‌ها در ۴ مربع ۱۶ خانه‌ای لام با کمک میکروسکوپ نوری (Carl Zeiss، آلمان) شمارش شد. سپس با کمک فرمول تعداد سلول‌ها در یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون سلولی محاسبه شد.

$$10^4 \times \text{عکس ضرب رقت} \times 4 = \text{مجموع سلول‌های ۴ مربع} = \text{تعداد سلول‌ها در هر میلی‌لیتر}$$

به هر خانه از ظرف ۶ خانه ۲۰۰ هزار سلول اضافه شد. به گونه‌ای که در هر خانه ۲ میلی‌لیتر از DMEM/F12 به صورت ۱۰ درصد FBS وجود داشت.

بررسی ریخت‌شناسی سلول‌ها روی بستر

در روزهای بعد سلول‌های روی بستر با کمک میکروسکوپ فاز کتراست (Axiovert25 ZEISS، آلمان) بررسی شد و تغییرات ریخت‌شناسی و میزان چسبندگی آن‌ها به بستر آلژینات و آلژینات / ژلاتین نسبت به پلی‌استرین مشاهده و گزارش شد.

بررسی میزان زنده ماندن سلول‌ها بر سطح بستر

۱، ۳، ۷ و ۹ روز بعد از کشت سلول‌ها بر سطح بستر،

تجزیه و تحلیل آماری

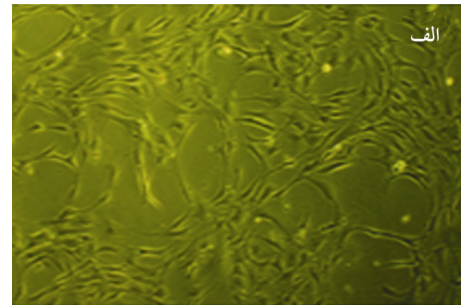
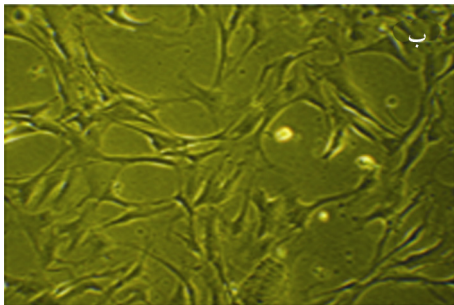
تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با کمک نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۷ انجام شد. آزمون‌ها به صورت سه بار تکرار بوده است و مقادیر میانگین و انحراف معیار از میانگین برای تخمین میزان رشد سلول‌ها بر سطح بستر و حالت کنترل استفاده شده است. برای مقایسه معنی‌دار بودن تفاوت دو گروه از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (One-way Analysis of Variance: ANOVA) استفاده شد. مقادیر P کمتر از ۰/۰۵ با فاصله

اطمینان ۹۵ درصد از لحاظ آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد (P-value = ۰/۰۰۰۹۵).

نتایج

بررسی ریخت‌شناسی سلول‌ها بر بستر پلی‌استیرن

سلول‌های RPE به صورت کشیده و چسبیده به کف پلیت شکل گرفتند (شکل ۱).



شکل ۱ سلول‌های RPE بر سطح پلیت به صورت کشیده و چسبیده؛ (الف) بزرگنمایی $\times 100$ ، (ب) بزرگنمایی $\times 200$

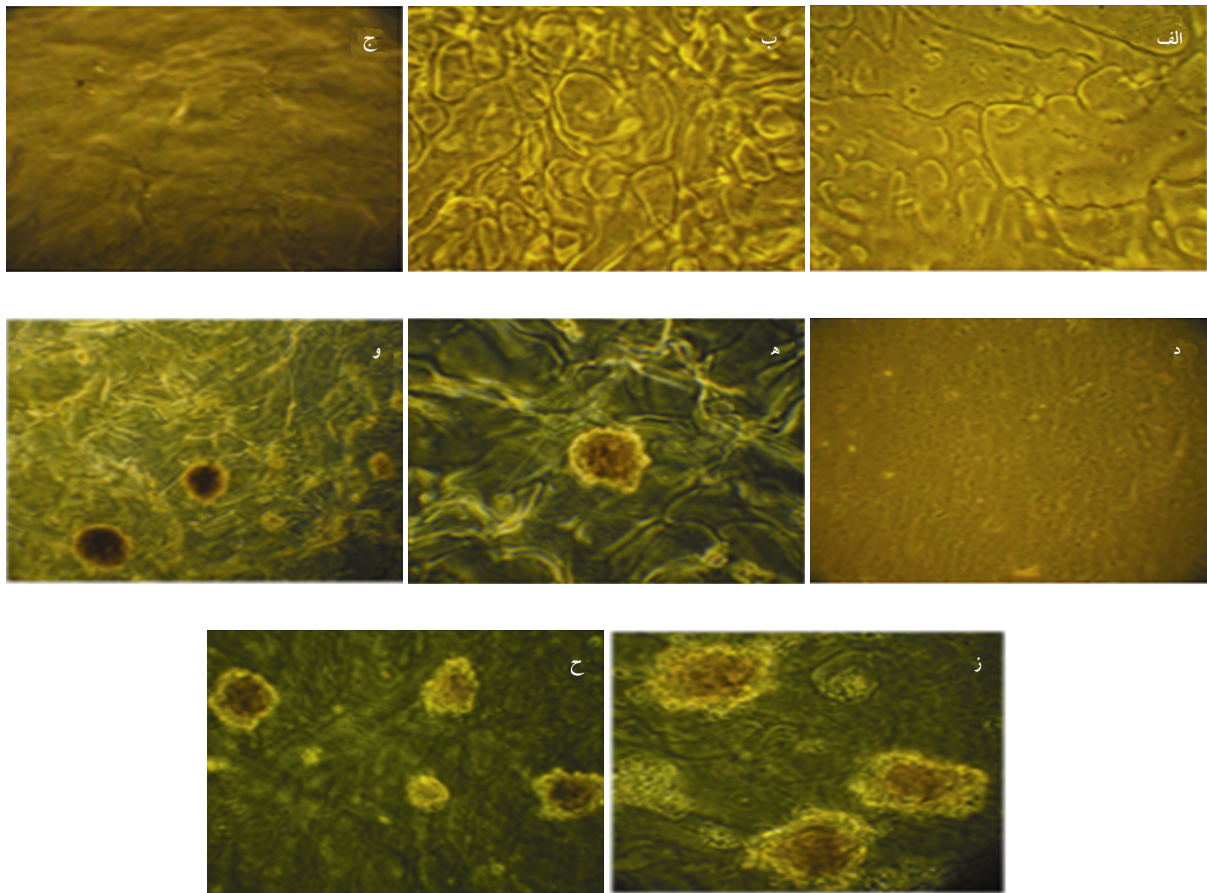
ریخت‌شناسی سلول‌ها بر بستر آلژینات

بررسی‌های میکروسکوپی بسترها نشان داد که بسترهای آلژینات در DMEM/F12 یکنواخت‌تر از بسترهای آلژینات در آب دوبار تقطیر بودند. سلول‌های RPE بر سطح بستر آلژینات در آب به صورت کلونی‌های چسبیده به بستر دیده شدند اما سلول‌ها بر سطح بستر آلژینات در DMEM/F12 به صورت کلونی‌های معلق دیده شدند. به همین دلیل برای ادامه مطالعات از روش انحلال آلژینات در آب برای تهیه بسترها استفاده شد که توانسته بود کلونی‌ها را به صورت متصل و غیر متحرک نگه دارد (شکل ۲). از آنجایی که سلول‌ها اندرکنش مناسبی با بستر آلژینات نداشتند و بسترهای آلژینات به صورت یکنواخت شکل نمی‌گرفت، ترکیبی از آلژینات و ژلاتین برای ساختن بستر بررسی شد.

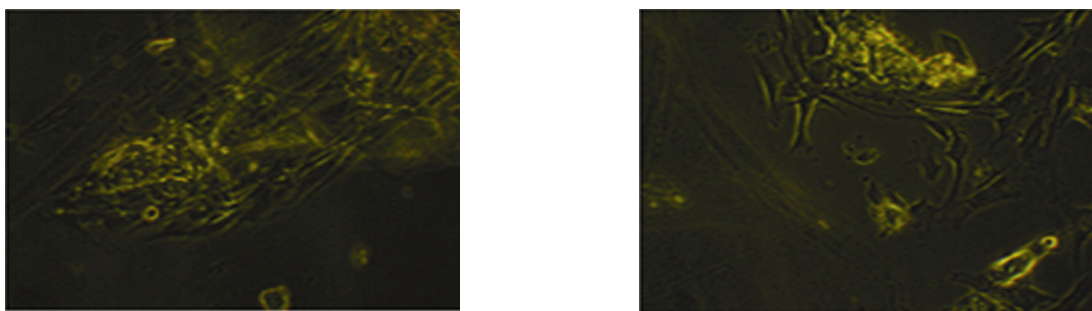
ریخت‌شناسی سلول‌ها بر بسترهای آلژینات / ژلاتین

بسترهای ۱ درصد آلژینات / ژلاتین سست بود و رفته رفته در محیط کشت حل و تکه تکه شد و سلول‌ها از این منافذ عبور کرده و به کف پلیت مهاجرت کردند (شکل ۳). بسترهای ۲ درصد آلژینات / ژلاتین سست نبود و تکه تکه نشد. بسترهای با نسبت ۳۰ به ۷۰، ۴۰ به ۶۰، ۵۰ به ۵۰، ۶۰ به ۴۰، ۷۰ به ۳۰، ۸۰ به ۲۰ آلژینات / ژلاتین بستر کامل کف پلیت را نمی‌پوشاند و از طرفی سلول‌ها از بستر عبور کرده و به کف پلیت چسبیدند. تنها در بستر با نسبت ۲۰ به ۸۰ آلژینات / ژلاتین بستر یکنواختی تشکیل شد که سلول‌ها از بستر رد نمی‌شدند (شکل ۴).

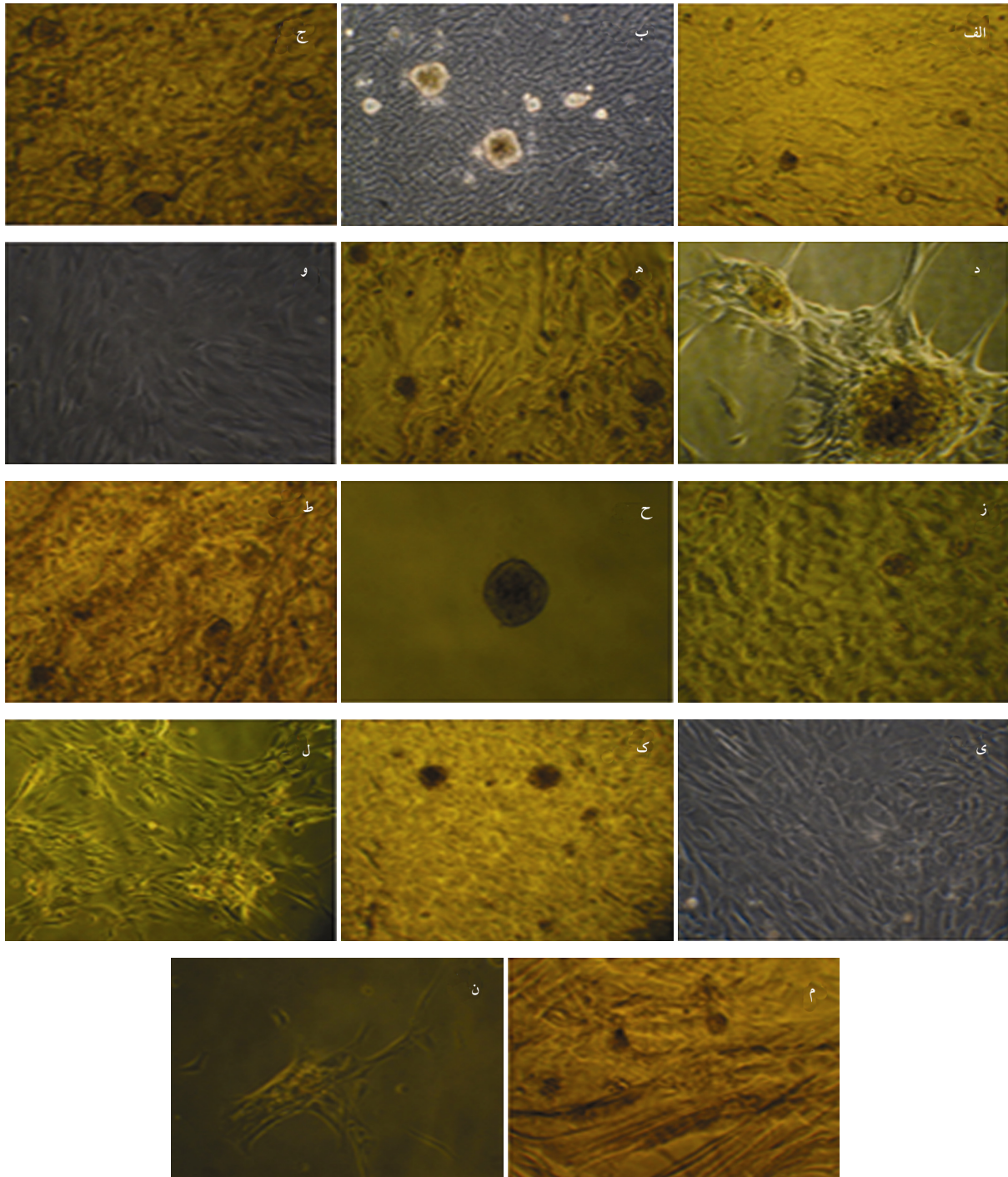
کشت سلول‌های رنگدانه‌دار شبکه‌دار انسان در بستر آلژینات



شکل ۲ تصاویر میکروسکوپی از بسترهای آلژینات و سلول‌های RPE پاساژ ۴ بر بستر آلژینات؛ (الف) بستر ۱ درصد آلژینات در آب دوبار تقطیر، (ب) بستر ۲ درصد آلژینات در آب دوبار تقطیر، (ج) بستر ۱ درصد آلژینات در DMEM/F12، (د) بستر ۲ درصد آلژینات در DMEM/F12، (ه) کلونی‌های چسبیده بر سطح بستر ۱ درصد آلژینات در آب دوبار تقطیر، (و) کلونی‌های چسبیده به بستر ۲ درصد آلژینات در آب دوبار تقطیر، (ز) کلونی‌های معلق بر بستر ۱ درصد آلژینات در DMEM/F12، (ح) کلونی‌های معلق بستر ۲ درصد آلژینات در DMEM/F12، بزرگمایی تصاویر ۳۲۰× است.

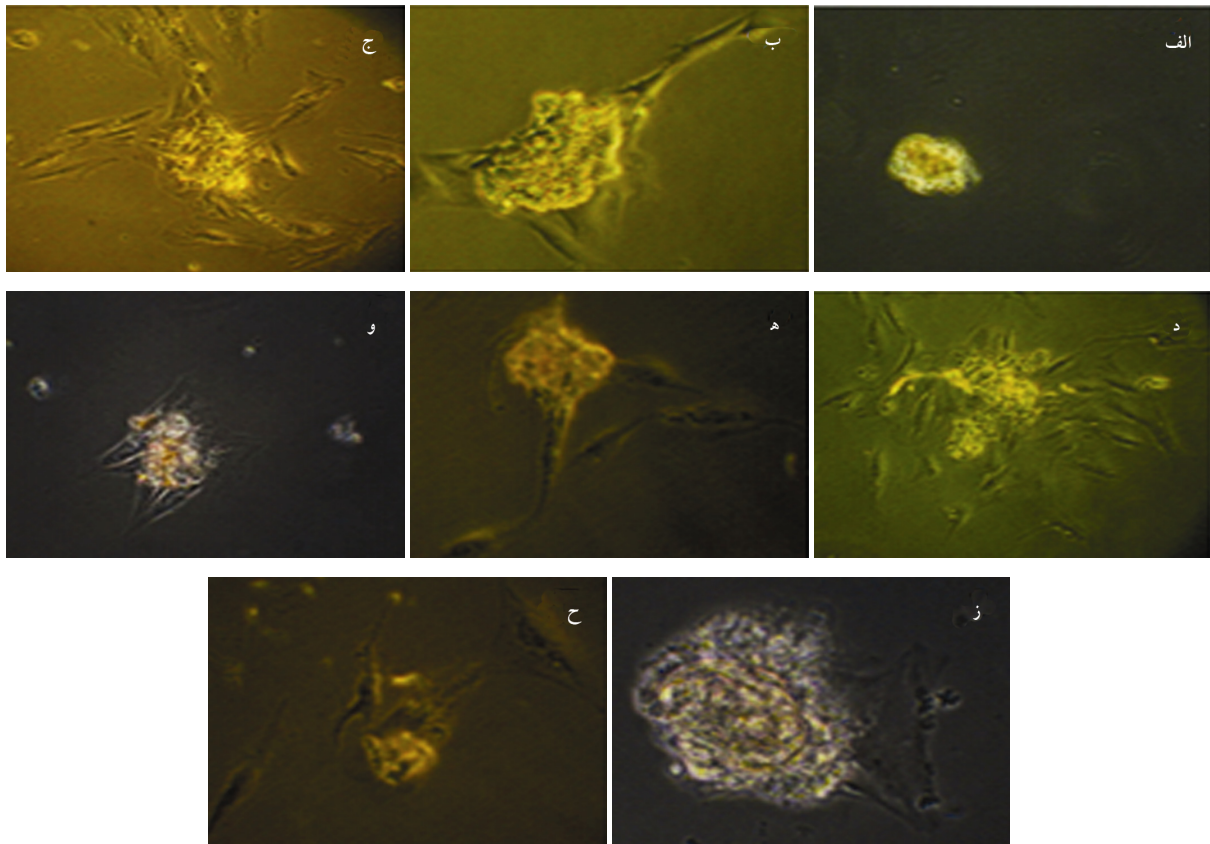


شکل ۳ سلول‌ها و بستر ۱ درصد آلژینات/ژلاتین ۵ روز بعد از کشت؛ بسترها با نسبت‌های مختلف از هم گسسته شده و سلول‌ها بر کف پلیت می‌چسبند. بزرگمایی تصاویر ۲۰۰× است.

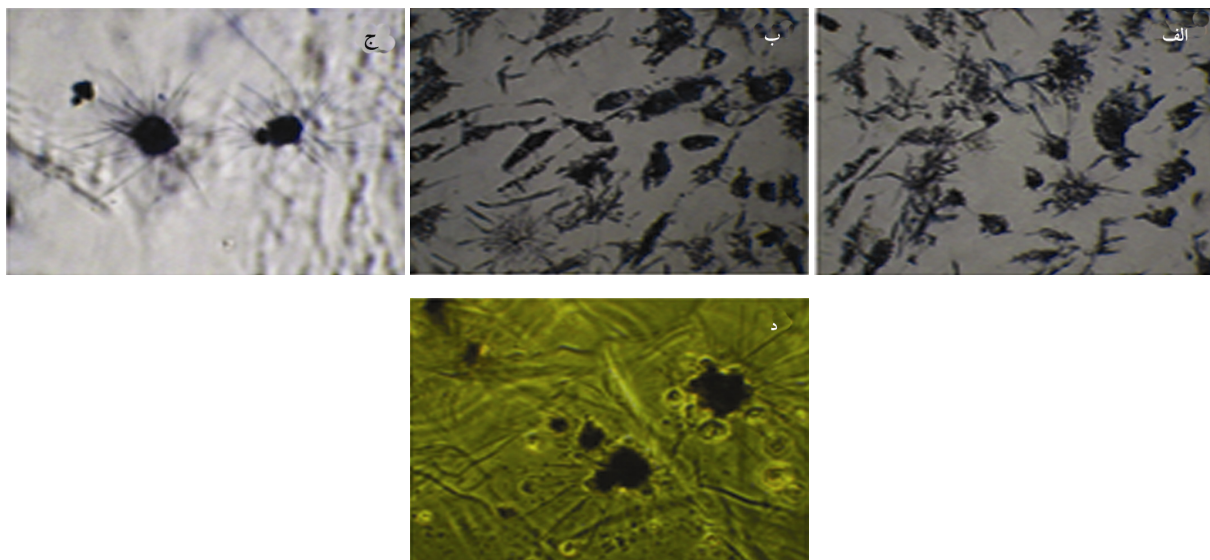


شکل ۴ کلونی‌های RPE پاساژ ۴ که از نوزاد دو ماهه گرفته شده بر بستر آلژینات و سلول‌های عبور کرده از بستر؛ (الف و ب) به ترتیب کلونی‌های چسبیده و معلق بر سطح بستر ۲ درصد آلژینات/ژلاتین با نسبت ۲۰ به ۸۰ را نشان می‌دهد. (ج و د) به ترتیب کلونی‌ها بر سطح بستر و سلول‌های عبور کرده از بستر آلژینات/ژلاتین با نسبت ۳۰ به ۷۰ را نشان می‌دهد. (ه و و) به ترتیب کلونی‌ها بر سطح بستر و سلول‌های عبور کرده از بستر آلژینات/ژلاتین با نسبت ۴۰ به ۶۰ را نشان می‌دهد. (ز، ح) به ترتیب کلونی‌ها بر سطح بستر و سلول‌های عبور کرده از بستر آلژینات/ژلاتین با نسبت ۵۰ به ۵۰ را نشان می‌دهد. (ط، ی) به ترتیب کلونی‌ها بر سطح بستر و سلول‌های عبور کرده از بستر آلژینات/ژلاتین با نسبت ۶۰ به ۴۰ را نشان می‌دهد. (ک، ل) به ترتیب کلونی‌ها بر سطح بستر و سلول‌های عبور کرده از بستر آلژینات/ژلاتین با نسبت ۷۰ به ۳۰ را نشان می‌دهد. (م، ن) به ترتیب کلونی‌ها بر سطح بستر و سلول‌های عبور کرده از بستر آلژینات/ژلاتین با نسبت ۸۰ به ۲۰ را نشان می‌دهد. بزرگنمایی تصاویرها $\times 200$ است.

کشت سلول‌های رنگدانه‌دار شبکیه انسان در بستر آلژینات



شکل ۵ فرآیند کشت دوباره کلونی‌ها از بستر آلژینات بر سطح پلیت؛ (الف، ب، ج، د) به ترتیب فرآیند کشت دوباره را نشان می‌دهد که با گذشت ۱، ۳، ۵ و ۷ روز سلول‌ها از کلونی رها شده و به سطح پلی‌استیرن می‌چسبند. (ه، و، ز، ح) کشت دوباره سلول‌ها از کلونی‌هایی که به ترتیب ۱، ۳، ۷ و ۹ روز بر سطح آلژینات کشت داده شده بودند را نشان می‌دهد، سلول‌ها حتی در روز ۹ بعد از کشت بر سطح آلژینات زنده مانده‌اند. بزرگنمایی تصاویر $\times 320$ است.



شکل ۶ تشکیل بلورهای فورمازان توسط سلول‌های RPE زنده در مجاورت MTT؛ (الف، ب) تشکیل بلورهای فورمازان توسط سلول‌های RPE در سطح پلی‌استیرن را نشان می‌دهند. (ج، د) تشکیل بلورهای فورمازان توسط کلونی‌های RPE در سطح بستر آلژینات/ژلاتین را نشان می‌دهند. بزرگنمایی تصاویر $\times 200$ است.

بررسی کشت دوباره کلونی‌ها

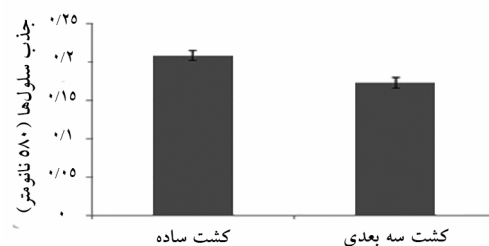
کلونی‌هایی که از این بسترها جدا شده و کشت دوباره داده شدند بعد از چند روز از همدیگر جدا و بر سطح ظرف پخش شدند و ریخت‌شناسی معمولی خود را که قبل از کشت بر سطح آلژینات داشتند را ظاهر کردند؛ این نشان داد که این کلونی‌ها ۱، ۳، ۷ و ۹ روز بعد از کشت بر سطح آلژینات هنوز زنده بودند و بستر آلژینات باعث مرگ آن‌ها نشده بود و بستری مناسب برای رشد سلول‌ها محسوب شد (شکل ۵).

بررسی بستر آلژینات/ ژلاتین بر میزان رشد

سلول‌های RPE با کمک آزمون MTT

سلول‌ها بر سطح بستر ۲ درصد با نسبت ۲۰ به ۸۰ آلژینات/ژلاتین به صورت کلونی‌هایی در آمدند. در مجاورت MTT سلول‌های زنده قادرند رنگ زرد MTT را به بلورهای فورمازان (Formazan) تبدیل کنند که این بلورها به صورت بنفش قابل مشاهده‌اند.

بعد از انکوباسیون سلول‌ها در مجاورت SDS-HCL بلورهای فورمازان در محلول حل شده و میزان جذب با تعداد سلول‌های زنده ارتباط مستقیم دارد.



شکل ۷ بررسی تأثیر کشت سه بعدی سلول‌ها نسبت به کشت ساده بر رشد سلول‌های RPE با کمک آزمون MTT؛ این آزمون ۳ بار تکرار شده است. نتایج کمی برای کشت ساده 0.172 ± 0.025 و برای کشت سه بعدی 0.208 ± 0.024 است.

بحث

سلول‌های RPE بر بستر پلی‌استیرن به صورت کشیده و

چسبیده به سطح‌اند اما بر بستری از آلژینات سلول‌های RPE به شکل کلونی دیده شدند. گروبر (Gruber) و همکارانش ریخت‌شناسی سلول‌های دیسک (The Human Annulus Cell from the Intervertebral Disc) را بر بستر آلژینات بررسی کردند و نشان دادند که سلول‌ها بر بستر آلژینات به شکل کلونی‌های چسبیده در می‌آیند [۱۸]. کاندیلو (Candiello) و همکارانش سلول‌های بنیادی جنینی موش را بر سطح بستر آلژینات کشت دادند و نشان دادند که این سلول‌ها بر سطح بستر آلژینات کلونی‌هایی را تشکیل می‌دهند که می‌توانند مهاجرت کنند و به هم پیوندند و کلونی‌های بزرگ‌تری که شبیه بافت (Tissue Like) هستند را تشکیل دهند [۱۹].

گائو (Guo) و همکارانش نشان دادند که سلول‌های فیبروبلاست بر سطح پلیت از هم جدا شده و گسترده می‌شوند؛ اما بر سطح بستر به هم متصل شده و ساختارهای شبیه بافت ایجاد می‌کنند [۲۰].

بسترهای ساخته شده از درصد‌های مختلف از آلژینات در آب و DMEM/F12 ویژگی‌های مختلفی را نشان دادند. بسترهای ساخته شده از آلژینات در DMEM/F12 یکنواخت‌تر و مسطح‌تر از آلژینات ساخته شده در آب دوبار تقطیر بود.

سلول‌ها بر بستر آلژینات ۱ درصد و ۲ درصد ساخته شده از آب مقطر به صورت کلونی‌های بزرگ چسبیده در آمدند و بر سطح بستر ۱ درصد، ۲ درصد آلژینات ساخته شده از DMEM/F12 کلونی‌ها و تک سلولی‌های گرد معلق که کمتر چسبیده‌اند، دیده شدند.

مطالعات نشان می‌دهد که سلول‌های جانوری تمایل کمی به اندرکنش با بسترهای آلژینات دارند. به همین دلیل در این مطالعه از بسترهایی از ترکیب آلژینات و ژلاتین با نسبت‌های مختلف نیز استفاده شد.

بسترهایی که از ترکیب آلژینات و ژلاتین ۱ درصد استفاده شد از هم گسسته شدند؛ به همین دلیل از بسترهایی با ترکیب آلژینات و ژلاتین ۲ درصد استفاده شد. از بین نسبت‌های

کشت سلول‌های رنگدانه‌دار شبکیه انسان در بستر آلژینات

بستر آلژینات رشد این سلول‌ها را نسبت به حالت کنترل کاهش نمی‌دهد [۲۳].

این مطالعه نشان داد که از بستر ساخته شده از آلژینات/ژلاتین می‌توان کلونی‌هایی از سلول‌های RPE ایجاد کرد تا در قدم‌های بعدی از آن‌ها برای انتقال به بافت آسیب دیده استفاده شود. همان طور که تونسوبون (Tonsomboon) و همکارانش نشان دادند که از بستر آلژینات/ژلاتین در مهندسی بافت می‌توان برای پیوند قرنیه استفاده کرد [۲۴]. کاندیلو و همکارانش از بستر آلژینات برای تمایز سلول‌های بنیادی به سمت سلول‌های انسولین‌ساز پانکراس و پیوند آن به بافت آسیب دیده استفاده کردند [۲۵]. یاماموتو (Yamamoto) و همکارانش نشان دادند که بستر آلژینات برای پیوند بافت عروقی به عنوان یک روش سلول درمانی بسیار کارآمد است [۲۶].

تشکر و قدردانی

این مقاله با کمک و حمایت مالی ستاد توسعه پژوهش و کاربرد سلول‌های بنیادی معاونت علمی و فناوری ریاست جمهوری ایران برای طرح مصوب بیوایمپلنت شبکیه انجام شده است و بدین وسیله از ستاد توسعه پژوهش و کاربرد سلول‌های بنیادی معاونت علمی و فناوری ریاست جمهوری ایران، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، مرکز تحقیقات چشم بیمارستان لبافی نژاد دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی و بانک چشم جمهوری اسلامی ایران بابت حمایت‌های مادی و معنوی تشکر و قدردانی انجام می‌شود.

مختلف آلژینات و ژلاتین تنها نسبت ۲۰ به ۸۰ کامل کف پلیت را می‌پوشاند و سلول‌ها از آن عبور نمی‌کردند؛ به همین دلیل برای کشت‌های بعدی از این ترکیب برای کشت سلول‌های RPE استفاده شد. روزلینی (Rosellini) و همکارانش بسترهایی با نسبت‌های مختلف از آلژینات و ژلاتین ساختند و سلول‌های میوبلاست را بر آن کشت دادند و به این نتیجه رسیدند که از بین نسبت‌های مختلف آلژینات و ژلاتین تنها در نسبت ۲۰ به ۸۰ سلول‌ها رشد مناسبی دارند و از این نسبت برای مطالعات مهندسی بافت استفاده کردند [۲۱].

کلونی‌هایی که از این بسترها جدا شده و کشت دوباره داده شده‌اند همه بعد از چند روز از همدیگر جدا شده و بر سطح ظرف پخش شده و ریخت‌شناسی معمولی خود را که قبل از کشت بر سطح آلژینات داشتند را حفظ کردند و این نشان داد که این کلونی‌ها ۱، ۳، ۷ و ۹ روز بعد از کشت بر سطح آلژینات و آلژینات/ژلاتین زنده و عملکردی بودند و بستر باعث مرگ آن‌ها نشده است. پس آلژینات و ژلاتین خاصیت سمی برای سلول‌ها نداشته و بستری مناسب برای رشد سلول‌های رنگدانه‌دار اپیتلیالی شبکیه است. با کمک آزمون MTT نشان داده شد که رشد سلول بر بستر آلژینات تفاوت چشمگیری در مقایسه با رشد سلول در حالت کنترل ندارد. وانگ (Wang) و همکارانش سلول‌های مغز استخوان را روی بستر آلژینات کشت دادند و به این نتیجه رسیدند که بستر آلژینات رشد سلول را کاهش نمی‌دهد [۲۲].

ژیا (Xia) و همکارانش سلول‌های پیوندی مغز استخوان را بر بستر آلژینات و ژلاتین کشت دادند و به این نتیجه رسیدند که

منابع

- [1] Khandhadia S, Cipriani V, Yates JR, Lotery AJ. Age-related macular degeneration and the complement system. *Immunobiology* 2012; 217(2): 127-46.
- [2] Radtke ND, Aramant RB, Seiler MJ, Petry HM, Pidwell D. Vision change after sheet transplant

of fetal retina with retinal pigment epithelium to a patient with retinitis pigmentosa. *Arch Ophthalmol* 2004; 122(8): 1159-65.

- [3] Silva EA, Mooney DJ. Synthetic extracellular matrices for tissue engineering and regeneration. *Curr Top Dev Biol* 2004; 64: 181-205

- [4] Fischbach C, Spruss T, Weiser B, Neubauer M, Becker C, Hacker M, Göpferich A, Blunk T. Generation of mature fat pads in vitro and in vivo utilizing 3-D long-term culture of 3T3-L1 preadipocytes. *Exp Cell Res* 2004; 300(1): 54-64.
- [5] Lou X, Munro S, Wang S. Drug release characteristics of phase separation PHEMA sponge materials. *Biomaterials* 2004; 25(20): 5071-80.
- [6] García Cruz DM, Coutinho DF, Costa Martinez E, Mano JF, Gómez Ribelles JL, Salmerón Sánchez M. Blending polysaccharides with biodegradable polymers. II. Structure and biological response of chitosan/polycaprolactone blends. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2008; 87(2): 544-54.
- [7] von Heimburg D, Zachariah S, Heschel I, Kühling H, Schoof H, Hafemann B, Pallua N. Human preadipocytes seeded on freeze-dried collagen scaffolds investigated in vitro and in vivo. *Biomaterials* 2001; 22(5): 429-38.
- [8] Pike DB, Cai S, Pomraning KR, Firpo MA, Fisher RJ, Shu XZ, Prestwich GD, Peattie RA. Heparin-regulated release of growth factors in vitro and angiogenic response in vivo to implanted hyaluronan hydrogels containing VEGF and bFGF. *Biomaterials* 2006; 27(30): 5242-51.
- [9] Dragusin DM, Vlierberghe SV, Dubrue P, Dierick M, Hoorebeke LV, Declercq HA, Cornelissen MM, Stancu IC. Novel gelatin-PHEMA porous scaffolds for tissue engineering applications. *Soft Matter* 2012; 8(37): 9589-602.
- [10] Stancu IC, Dragusin DM, Vasile E, Trusca R, Antoniac I, Vasilescu DS. P Porous calcium alginate-gelatin interpenetrated matrix and its biomineralization potential. *J Mater Sci Mater Med* 2011; 22(3): 451-60.
- [11] Jordan SW, Chaikof EL. Novel thromboresistant materials. *J Vasc Surg* 2007; 45 Suppl A: A104-15.
- [12] Matthew IR, Browne RM, Frame JW, Millar BG. Subperiosteal behaviour of alginate and cellulose wound dressing materials. *Biomaterials* 1995; 16(4): 275-8.
- [13] Park JK, Chang HN. Microencapsulation of microbial cells. *Biotechnol Adv* 2000; 18(4): 303-19.
- [14] Tønnesen HH, Karlsen J. Alginate in drug delivery systems. *Drug Dev Ind Pharm* 2002; 28(6): 621-30.
- [15] Dhoot NO, Tobias CA, Fischer I, Wheatley MA. Peptide-modified alginate surfaces as a growth permissive substrate for neurite outgrowth. *J Biomed Mater Res A* 2004; 71(2): 191-200.
- [16] Rowley JA, Madlambayan G, Mooney DJ. Alginate hydrogels as synthetic extracellular matrix materials. *Biomaterials* 1999; 20(1): 45-53.
- [17] Boanini E, Rubini K, Panzavolta S, Bigi A. Chemico-physical characterization of gelatin films modified with oxidized alginate. *Acta Biomater* 2010; 6(2): 383-8.
- [18] Gruber HE, Hanley EN. Human disc cells in monolayer vs 3D culture: cell shape, division and matrix formation. *BMC* 2000; 1(1): 1471-4.
- [19] Candiello J, Singh SS, Task K, Kumta PN, Banerjee I. Early differentiation patterning of

- mouse embryonic stem cells in response to variations in alginate substrate stiffness. *J Biol Eng* 2013; 7(1): 9.
- [20] Guo WH, Frey MT, Burnham NA, Wang YL. Substrate rigidity regulates the formation and maintenance of tissues. *Biophys J* 2006; 90(6): 2213-20.
- [21] Rosellini E, Cristallini C, Barbani N, Vozzi G, Giusti P. Preparation and characterization of alginate/gelatin blend films for cardiac tissue engineering. *J Biomed Mater Res A* 2009; 91(2): 447-53.
- [22] Wang L, Shelton RM, Cooper PR, Lawson M, Triffitt JT, Barralet JE. Evaluation of sodium alginate for bone marrow cell tissue engineering. *Biomaterials* 2003; 24(20): 3475-81.
- [23] Xia Y, Mei F, Duan Y, Gao Y, Xiong Z, Zhang T, Zhang H. Bone tissue engineering using bone marrow stromal cells and an injectable sodium alginate/gelatin scaffold. *J Biomed Mater Res A* 2012; 100(4): 1044-50.
- [24] Tonsomboon K, Oyen ML. Composite electrospun gelatin fiber-alginate gel scaffolds for mechanically robust tissue engineered cornea. *J Mech Behav Biomed Mater* 2013; 21: 185-94.
- [25] Candiello JE, Jaramillo M, Goh SK, Banerjee I. Role of substrates in diabetes therapy: stem cell differentiation and islet transplantation. *Crit Rev Biomed Eng* 2011; 39(6): 535-55.
- [26] Yamamoto M, James D, Li H, Butler J, Rafii S, Rabbany S. Generation of stable co-cultures of vascular cells in a honeycomb alginate scaffold. *Tissue Eng Part A* 2010; 16(1): 299-308.