Archive of SID

Design of Polycaprolactone Nanofibrous Scaffold as Suitable Substrate for Limbal Stem Cells for Corneal Epithelial Regeneration

Daryabari H, MD*; Baradaran Rafii AR, MD; Biazar E, PhD; Heydari Keshel S, PhD; Shams M, MD

Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
** Corresponding Author: shdarya50@yahoo.com*

Purpose: To develop a nanofibrous polycaprolacton (PCL) substrate for limbal stem cell (LSC) expansion that can serve as a potential alternative substrate to replace human amniotic membrane.
Methods: The human Limbal stem cells (LSCs) were used to evaluate the biocompatibility of substrates (nanofibrous scaffold, and human amniotic membrane) regarding cellular phenotypic profile, viability, proliferation, and attachment ability.
Results: Biocompatibility results indicated that the substrates were highly biocompatible, as LSCs could favorably attach and proliferate on the nanofibrous surface. Microscopic figures showed that the human LSCs were firmly anchored to the substrates and were able to retain a normal corneal stem cell phenotype. Microscopic analyses illustrated that cells infiltrated the nanofibers and successfully formed a three-dimensional corneal epithelium, which was viable for two weeks. Immunocytochemistry (ICC) and real time–PCR results revealed no change in the expression profile of LSCs grown on nanofibrous substrate when compared to those grown on human amniotic membrane.
Conclusion: Electrospun nanofibrous PCL substrate provides not only a milieu supporting LSCs expansion, but also serves as a useful alternative carrier for ocular surface tissue engineering and could be used as an alternative substrate to human amniotic membrane.

Keywords: Cornea, Epithelial Cells, Limbal Stem Cell, Nanofibrous Scaffold, Polycaprolactone

- Bina J Ophthalmol 2016; 21 (3): 199-207. **Received:** 28 December 2015 **Accepted:** 12 February 2016

طراحی داربست نانوفیبری پلی‌کاپرولاکتون (PCL) به عنوان بستری مناسب برای سلول‌های بنیادی لیمبال جهت بازسازی اپی‌تلیال قرنیه چشم

دکتر سیدهاشم دریاباری[1]*، دکتر علیرضا برادران رفیعی[2]، دکتر اسماعیل بی‌آزار[3]، دکتر سعید حیدری کشل[4] و دکتر مجید شمس[5]

هدف: طراحی داربست نانوفیبری پلی‌کاپرولاکتون برای کشت، تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی لیمبوس که می‌تواند یک جایگزین برای غشای آمنیوتیک انسانی باشد.
روش پژوهش: سلول‌های بنیادی لیمبوس انسان جهت ارزیابی زیست‌سازگاری (شبکه نانوفیبری، غشای آمنیوتیک انسانی) بر اساس فنوتیپ، قابلیت زنده ماندن، تکثیر و توانایی چسبندگی استفاده شده‌اند.
یافته‌ها: نتایج زیست‌سازگاری بر این نکته دلالت داشت که همه بسترها از سازگاری بافتی بالایی برخوردار بودند. تجزیه و تحلیل میکروسکوپی نشان داد که سلول‌ها به داخل نانوفیبرها نفوذ یافته و به طور قابل توجهی باعث تشکیل ساختار سه‌بعدی سلول‌های اپی‌تلیوم قرنیه شدند که در دو هفته، ماندگاری زیستی خوبی را نشان دادند.. نتایج ایمونوسایتوشیمی و Real Time PCR تفاوتی بین بیان رشد سلول‌های بنیادی قرنیه روی بسترهای نانوفیبری و رشد روی غشای آمنیوتیک را نشان نداد.
نتیجه‌گیری: بسترهای پلیمری نانوفیبری الکتروریسی شده یک محیط حمایتی برای سلول‌های بنیادی لیمبوس و هم‌چنین حامل جایگزین مناسب به جای غشای آمنیوتیک برای تولید بافت سطحی چشم می‌باشند.

www.SID.ir

Archive of SID

• مجله چشم‌پزشکی بینا ۱۳۹۵؛ دوره ۲۱، شماره ۳: ۲۰۷-۱۹۹.

• **پاسخ‌گو:** دکتر سیدهاشم دریابارى (e-mail: shdarya50@yahoo.com)
۱- استادیار- چشم‌پزشک- دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌اله- تهران- ایران
۲- استاد- چشم‌پزشک- مرکز تحقیقات مهندسی بافت چشم- دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی- تهران- ایران
۳- استادیار- دکترای مهندسی پزشکی- گروه مهندسی پزشکی- دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن- تنکابن- ایران
۴- استادیار- دکترای پروتئومیکس- دانشگاه علوم پزشکی تهران- تهران- ایران
۵- فلوشیب قرنیه- چشم‌پزشک- مرکز تحقیقات چشم دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی- تهران- ایران
تهران- پاسداران- بوستان نهم- خیابان پایدارفرد (خیابان امیر ابراهیمی)- پلاک ۲۳- مرکز تحقیقات چشم

دریافت مقاله: ۷ دی ۱۳۹۴
تایید مقاله: ۲۳ بهمن ۱۳۹۴

مقدمه

جهت حفظ بینایی طبیعی تولید مجدد سلول‌های اپی‌تلیال قرنیه حایز اهمیت است. منبع سلول‌ها در منطقه سلول‌های اپی‌تلیال لیمبوس در محیط قرنیه می‌باشد[۱و۲]. درمان با پیوند لیمبوس برای بیماری‌های سطحی چشم و آسیبی که باعث نقص سلول‌های بنیادی لیمبوس می‌شود، توسعه یافته است[۳-۵]. در بعضی از شرایط، سلامت بافت لیمبال باقی‌مانده ممکن است محدود باشد. از بین رفتن سلول‌های بنیادی لیمبوس جز تظاهرات پاتولوژیک بسیاری از بیماری‌های سطحی چشم از قبیل: سندرم استیون جانسون، سوختگی‌های شیمیایی و حرارتی، تومورهای سطحی چشم، شرایط ایمونولوژیک، آسیب اشعه‌درمانی و بعضی از سندرم‌های ارثی می‌باشد[۶]. کشت سلولی و توسعه سلول‌های بنیادی اتولوگ از چشم مقابل به طور فزاینده جهت جلوگیری از مشکلات ناشی از خطر دفع پیوند ایمونولوژیک که در پیوند آلوگرفت ایجاد می‌شود، مورد استفاده قرار می‌گیرد[۷و۸]. یکی از مشکلات عمده همراه با درمان سلول‌های بنیادی، نبودن حامل مناسب برای انتقال سلول‌های بنیادی در بافت آسیب‌دیده موردنظر می‌باشد. به همین علت مواد و بسترهای متفاوتی برای این انتقال مورد آزمایش قرار گرفتند[۹-۱۴]. برای درمان آسیب شدید سطح چشم و نقص سلول‌های بنیادی لیمبوس، حامل‌های متعددی برای کشت سلول‌های بنیادی لیمبوس و برای انتقال آن‌ها به چشم گیرنده از قبیل چسب فیبرینی، اسفنج‌های کلاژنی یا پلی‌مری[۱۵]، پلی‌مری‌های سنتتیک[۱۶] و غشای آمنیوتیک انسانی[۱۷] آزمایش شدند. در این بین غشای آمنیوتیک انسانی بستر بالینی استاندارد برای ترمیم سطح چشم به دلیل خواص ضدالتهابی و ضداسکار و ضد تولید عروق را دارا است[۱۷]. اما با تمامی مزیت‌ها، محدودیت‌هایی شامل: استحکام مکانیکی پایین، نیمه شفاف بودن و خطر انتقال بیماری‌هایی از قبیل HIV، هپاتیت B و C و سیفیلیس در استفاده از غشای آمنیوتیک وجود دارد. یکی از عوامل کلیدی در مهندسی بافت، ایجاد شبکه سه‌بعدی با ویژگی‌های مناسبی از قبیل: سرعت تخریب، تخلخل بالا و منافذ به هم پیوسته است. به طور شایع، شبکه‌های پلی‌مری زیست تخریب‌پذیر توسط روش‌های متعددی ساخته می‌شود[۱۸و۱۹]. در بافت‌های طبیعی سلول‌ها به وسیله ماتریکس خارج سلولی احاطه می‌شوند که دارای ساختمان فیزیکی با اندازه‌ای نانومتری تا میکرومتری هستند. بنابراین یک نانو ساختار متخلخل با سطح بسیار وسیع برای جایگزینی ماتریکس خارج سلولی طبیعی مورد نیاز می‌باشد. برای شبیه‌سازی ماتریکس خارج سلولی بسیاری از گروه‌های تحقیقاتی برای ساختن شبکه نانوفیبری با بهره‌گیری از روش‌هایی همچون الکترواسپینینگ تلاش کردند[۲۰-۲۴]. یکی از مواد پلی‌مری پرکاربرد در مهندسی بافت، پلی‌کاپرولاکتون (PCL) می‌باشد که یک پلی‌استر زیست‌سازگار و تخریب‌پذیر با ویژگی‌های مکانیکی مناسب است[۲۵و۲۶]. تحقیقات بسیاری روی پلی‌کاپرولاکتون به دلیل مزایایی از قبیل زیست تخریب‌پذیر بودن، هزینه‌های پایین و استفاده آسان آن انجام شده است. پلی‌کاپرولاکتون یک پلی‌استر بدون قطعات فعال زیستی (که ممکن است باعث محدودیت در شرایط درون بافتی شود) است[۲۵و۲۶]. برای تولید داربست‌های سه‌بعدی از این پلی‌مرها روش‌های متعددی وجود دارد که الکتروریسی یکی از مهم‌ترین روش‌ها برای تولید داربست‌های نانوفیبری می‌باشد. روند الکتروریسی می‌تواند باعث تولید نانوفیبرهایی با قطر بین ۱۰ تا هزاران نانومتر با تخلخل مناسب شود. ساختمان سه‌بعدی مواد نانوفیبری دارای سطح بسیار وسیعی است، نانوفیبرها می‌توانند شبیه به ساختارهای پروتیین ماتریکس خارج سلولی که باعث حمایت از رشد سلولی و عملکرد آن می‌شود، عمل کنند[۲۷-۳۳]. در این مطالعه، داربست‌های نانوفیبری پلی‌کاپرولاکتون به روش الکتروریسی ساخته شدند. این نمونه‌ها توسط میکروسکوپ الکترونی مورد ارزیابی قرار گرفته و سپس این نانوفیبرهای پلیمری و هم‌چنین غشای آمنیوتیک به وسیله سلول‌های بنیادی لیمبوس انسانی در حضور سلول‌های USSC آغشته به میتومایسین- C به

www.SID.ir

Archive of SID

عنوان لایه تغذیه‌ای و محیط هورمونی اپی‌تلیال کمکی (SHEM)، کشت داده شدند و مورد ارزیابی‌های مختلف سلولی، میکروسکوپی و بررسی نشانگرهای تمایزی قرار گرفتند.

روش پژوهش

آماده کردن مواد و داربست‌ها

پلی‌کاپرولاکتون با وزن مولکولی ۸۰،۰۰۰، اسید استیک و سیستم حلال اسید فورمیک برای پلی‌کاپرولاکتون از شرکت;(St. Louis, MO) Sigma-Aldrich تهیه شد. دستگاه الکتروریسی که در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفت از شرکت نانو مقیاس آسیا (تهران-ایران) فراهم شد. پلی‌کاپرولاکتون در غلظت معینی در اسید استیک- اسید فورمیک حل شد (درصد VOL ۷۰:۳۰) سپس محلول پلی‌کاپرولاکتون (W/V ٪۱۲) در سرنگ‌های شیشه‌ای که به وسیله یک پمپ کنترل و به یک منبع با ولتاژ بالا که از طریق یک سیم به نوک سوزن سرنگ متصل است، قرار داده شد. در این شرایط یک میدان الکتریکی قوی بین محلول پلیمری PCL و جمع‌کننده ایجاد می‌گردد. هنگامی که میدان الکتریکی به دلیل افزایش ولتاژ به مرحله بحرانی خود می‌رسد، نیروی دافعه‌ی الکترواستاتیک بر کشش سطحی محلول پلیمر غلبه کرده و یک جت باردار از سیال مخروطی شکل تایلور ایجاد می‌شود. محلول از سرنگ 5^{cc} با قطر سوزن ۱۵ میلی‌متر و سرعت جریان مایع یک میلی‌لیتر در ساعت الکتروریسی می‌شود. ولتاژ بالا (۲۰kV) به نوک سوزن منتقل می‌شود. نانوفیبرهای پلی‌کاپرولاکتون (PCL) الکتروریسی شده باید به طور دقیق از جمع‌کننده‌ها جدا شده و در محیط خلا به مدت دو روز در دمای اتاق خشک شود تا مولکول‌های حلال به طور کامل جدا شوند. مشخصات سطحی فیبرها به وسیله میکروسکوپ الکترونی (Czech, VEGA, Tscan, SEM) مورد بررسی قرار می‌گیرند.

ارزیابی سلولی

همه کشت‌های سلولی مورد استفاده از (Grand Island, My)Invitrogen Gibco تهیه شده بودند. مواد شیمیایی از شرکت سیگما آلدریچ تهیه شدند. سیتوکین موشی، آنتی‌بادی ضدسایتوکراتین k۳ و k۱۲: آنتی‌بادی موشی ضد کانکسین ۴۳ انسانی، آنتی‌بادی P_{63} و FITC و سایر آنتی‌بادی‌ها از ABcam تهیه شدند(UK, Cambridje, ABcam) . محیط کشت شامل (4,6 DAPI) diamidino- 2- Phenylindole بود که از سیگما آلدریچ تهیه شد. نمونه‌ها توسط الکل ۷۰ درصد به مدت ۵ دقیقه و در معرض اشعه UV برای ده دقیقه ضدعفونی شدند و سرانجام سه بار با محلول بافری فسفات (PBS) شستشو شدند. سلول‌های بنیادی لیمبوس توسط بیوپسی لیمبوس تهیه و روی سلول‌های USSC تغذیه‌کننده کشت داده و سپس به غشای آمنیوتیک و بسترهای نانو فیبری منتقل شدند، برای تهیه سلول‌های USSC تغذیه‌کننده، سلول‌های USSC با ۴ میکروگرم در میلی‌متر میتومایسین C برای دو ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و همراه با CO2 ۵ درصد تریپسینه شده و پس از آن به محیط کشت انتقال داده شدند ($2/2\times 10^{5}$ cell/cm2). حاشیه (ریم) لیمبوس انسانی که بعد از پیوند قرنیه مورد استفاده قرار نمی‌گرفت، توسط بانک چشم ایران جمع آوری شده و در محلول PBS که محتوای پنی‌سیلین ۱۰۰ واحد در میلی‌متر، جنتامایسین ۵۰ میکروگرم و آمفوتریسین B ۲/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر است شستشو داده می‌شد. پس از برداشتن دقیق اپی‌تلیوم قرنیه، عنبیه، صلبیه اضافی، ملتحمه و بافت زیر ملتحمه با استفاده از میکروسکوپ جراحی، حاشیه لیمبال در معرض دیسپاز ۲ در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و مقدار CO2 ۵ درصد به مدت سه ساعت قرار داده شد. اپی‌تلیوم برداشته شده، به وسیله تریپسین ۰/۲۵ درصد و EDTA ۰/۰۲ درصد به مدت ۵ دقیقه به سلول‌های مجزا تبدیل شدند. سپس سلول‌ها در RPM ۱۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه Pelleted شده و دوباره در SHEM معلق شدند. SHEM شامل مقدار حجم مساوی از Ham's F12, DMEM که با سرم جنین گاو ۵ درصد، انسولین ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر، ترانسفرین ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر، عامل رشد اپی‌درمال ۲/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر، توکسین A با ۸/۴ نانوگرم در میلی‌لیتر ، DMSO ۰/۵ درصد، هیدروکورتیزون ۰/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر، جنتامایسین ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، آمفوتریپسین B ۱/۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر و hede 5Mm بود. سلول‌های بنیادی لیمبال با تراکم 10^{4} سلول در سانتی‌متر مربع روی بستر محتوای لایه USSCS قرار گرفته، محیط کشت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و هوا ۹۵ درصد CO2 ۵ درصد قرار داده شدند. محیط کشت هر سه تا چهار روز تغییر یافت. پس از ایجاد تراکم به حدود ۷۰ تا ۸۰ درصد، $USSC_S$ خارج شده و سلول‌های بنیادی لیمبال کشت داده شده به روی سطح نانوفیبری و غشای آمنیوتیک منتقل شدند. آزمایش‌های فلوسایتومتری برای ارزیابی نشانگرهای (مارکر) سطحی سلول‌های بنیادی مورد استفاده قرار گرفتند. مخلوط سلولی را از فیلتر نایلونی عبور داده و به هر لوله مقدار ۱۰۰ میکروگرم از این مخلوط سلولی در کنار آنتی‌بادی‌های

www.SID.ir

Archive of SID

زیر اضافه شد.

Anti CD۱۰۵، Anti CD ۹۰، Anti CD ۳۴، Anti CD ۴۵، Anti ۷۳ CD و Anti CD ۳۱.

لوله‌ها به مدت ۴۵ دقیقه در ۴ درجه سانتی‌گراد و در اتاق تاریک نگه‌داری شدند و پس از شستشو، سلول‌ها در ۱۰۰ میکرولیتر محلول یک درصد پارافورم آلائید قرار داده شدند و آزمایش فلوسایتومتری روی آن‌ها انجام گرفت. سلول‌های بنیادی لیمبال با تراکم 10^4 سلول روی غشای آمنیوتیک و نانو فیبرPCL کشت داده شده و پس از ۳، ۷، ۱۵روز مورد ارزیابی از نظر تکثیر و رشد سلولی با آنالیز MTT قرار گرفتند.

بیان ژنی

تمام RNA با کیت استخراج RNA (Fermentas International Burlington Canada) از سلول استخراج شدند. نمونه‌های RNA در معرض DNase قرار گرفتند تا ناخالصی‌های DNA موجود در نمونه از بین برود. مقدار RNA به وسیله اسپکتروفتومتری (Nano Drop; Thermo. Wilmington) تعیین شد. برای رونوشت‌برداری معکوس ۲ میکروگرم از کل RNA با کیت سنتز Revert Aid- first strand cDNA (Fermentas International Burlington Canada) مورد استفاده قرار گرفت. واکنش real time PCR با SYBR Premix Extaqt^m (TAKARA Bio. Ink Japan) که در آن TAqFAST DNA پلیمر ازSYBR Geent استفاده می‌شود، انجام شد تا DNA دو رشته‌ای شناسایی شود.

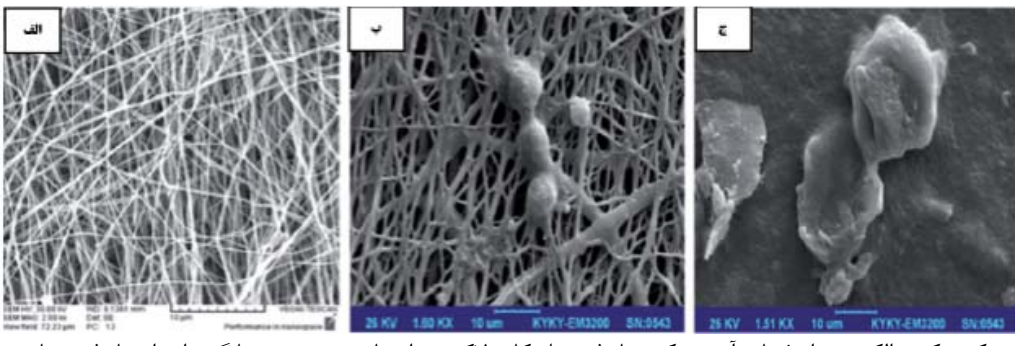
واکنش بر اساس برنامه زیر انجام شد:

۵ دقیقه در ۴۵ درجه سانتی‌گراد برای فعال‌سازی آنزیم‌ها، سپس ۲۰ ثانیه در ۹۵ درجه برای باز شدن (دناتوراسیون) اولیه دو رشته DNA و ۴۰ ثانیه در دمای Annealing و ۱ دقیقه در دمای ۷۲ درجه (مرحله (Extention) که این مراحل یا چرخه ۴۰ مرتبه تکرار شد و سپس مرحله Extention نهایی در ۷۲ درجه صورت گرفت. مرحله نهایی شامل تجزیه و تحلیل منحنی ذوب در طول مراحل دناتوره شدن (در °۹۵. ۱۵ ثانیه) که با مرحله Annealing (۴۰ درجه و ۱ دقیقه) مرحله صعودی تا °۹۵ (با افزایش پلکانی ۰/۳ درجه سانتی‌گراد) دنبال شده است. سطح‌های mRNA برای ژن‌های مورد آزمایش تعیین شد و در مقابل ژن B Housekeeping Actin انسانی Normalize شده و اطلاعات به صورت log۱۰ بیان شد. تحلیل‌های آماری با استفاده از ANOVA صورت گرفت. مقدار P کم‌تر از ۵ درصد معنی‌دار در نظر گرفته شد. سطح ژن‌های مورد آزمایش در نمونه‌های مختلف با آزمایش Fisher L SD مقایسه گردید.

ایمنوسایتوشیمی

سلول‌های بنیادی لیمبوس پس از ۱۵ روز کشت روی غشاء آمنیوتیک و داربست نانوفیبر با پارافرمالدیید ۴ درصد به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق ثابت شدند. سپس با سرم آلبومین گاوی ۳ درصد و تریتون X۱۰۰. ۰/۳ درصد به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق، مسدودن کردن (Blocking) انجام شد. پس از آن، سلول‌ها در دمای اتاق به مدت ۲ ساعت با آنتی‌بادی اولیه به میزان ۱/۱۰۰ k۳، ۱/۱۰۰ k۱۲، ۱/۱۰۰ ABCG۲، ۱/۲۵ P۶۳ رقیق‌سازی و انکوبه شدند. بعد از رنگ‌آمیزی، به آنتی‌بادی ثانویه مناسب سلول با محیط کشت حاوی Dapi ثابت شدند.

تصویر ۱، تصاویر میکروسکوپ الکترونی از غشای آمنیوتیک و نانوفیبر پلی‌کاپرولاکتون را نشان می‌دهد. میانگین اندازه نانوفیبرها حدود ۱۰۰ نانومتر می‌باشد. یک کلونی مخروطی شکل کوچک زیر میکروسکوپ الکترونی مشاهده می‌شود. نمونه کشت سلولی روی نانوفیبرها چسبندگی مناسبی را نشان می‌دهد که نشان‌دهنده قابلیت سازگاری زیستی و هم‌چنین چسبندگی سلولی این پلیمر می‌باشد.



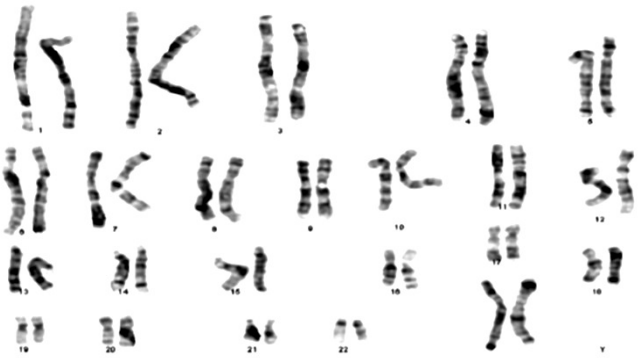
تصویر ۱- تصاویر میکروسکوپ الکترونی از غشای آمنیوتیک و نانوفیبر پلی‌کاپرولاکتون را نشان می‌دهد. میانگین اندازه نانوفیبرها حدود ۱۰۰ نانومتر می‌باشد. تصویر الف: داربست نانوفیبری، ب: کشت سلول‌های بنیادی روی داربست نانوفیبری، ج: کشت سلول‌های بنیادی روی غشای آمنیوتیک.

www.SID.ir

Archive of SID

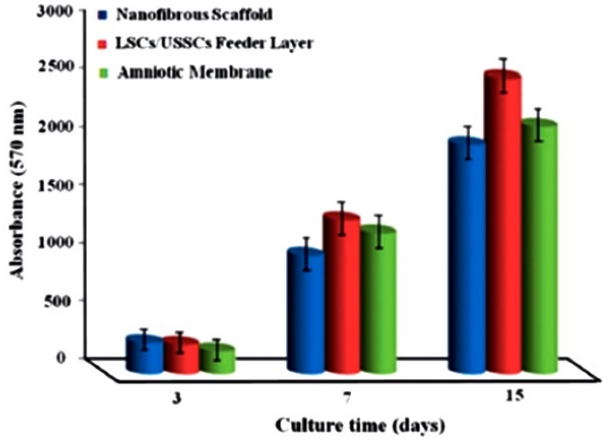
تصویر ۲، نتایج آنالیز MTT را برای نمونه‌ها نمایش می‌دهد که نتایج یک زیست‌پذیری و قابلیت زنده ماندن بالایی برای تمام نمونه‌ها را نشان می‌دهد. علاوه بر این، قابلیت زیست‌سازگاری بین نانوفیبرها و غشا آمنیوتیک مشابه بود. هم‌چنین نمونه نانوفیبر باعث تکثیر بیش‌تر سلول‌های بنیادی لیمبوس شدند.

بررسی کاریوتیپ روی سلول‌های بنیادی لیمبوس (LSC_S) در پاساژ ۲ انجام شد. بعد از ۱۵ روز کشت، کاریوتایپ سلول‌های بنیادی که روی داربست نانوفیبری PCL (پلی‌کاپرولاکتون Polycaprolactone) کشت داده شده بودند، ۴۶xx طبیعی بود که بیان‌کننده این مطلب است که سلول‌های ارزیابی‌شده، کاریوتیپ کروموزومی طبیعی داشتند (تصویر ۳): ایمنوفنوتایپ سلول‌های بنیادی لیمبوس کشت داده شده روی این داربست از طریق فلوسایتومتری بررسی شد. همه سلول‌ها برای آنتی‌ژن‌های سطحی CD_{73}، CD_{90}، CD_{44} و CD_{105} مثبت بودند. برعکس برای آنتی‌ژن‌های سطحی CD_{34}، CD_{31}، CD_{45} منفی بودند (تصویر ۴)

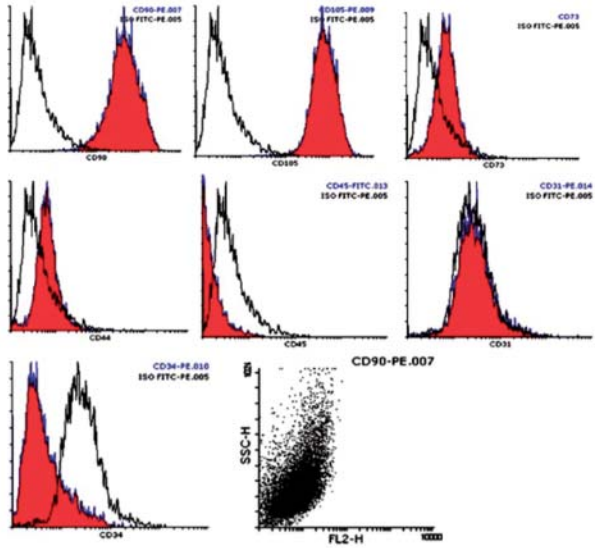


تصویر ۳- نتایج بررسی کاریوتایپ سلول‌های بنیادی لیمبال کشت داده شده روی سطوح نانوفیبری پلی‌کاپرولاکتون . همه سلول‌های بنیادی در روز ۱۵، کاریوتایپ ۴۶XX طبیعی را نشان می‌دهند.

هم‌چنین یک تحلیل ایمنوسیتوشیمی برای مارکرهای P۶۳، $ABCG_2$، $KRT_{3/12}$ مورد تحلیل و بررسی قرار گرفت. GAPDM به عنوان کنترل داخلی استفاده شد. سطح بیان ژنی P۶۳ و ABCG۳ در تمام نمونه‌ها یکسان و مشابه بود اما داربست نانوفیبری همانند لایه تغذیه‌کننده USSC بیان ژنی $KRT_{3/12}$ را نداشتند در حالی (جدول ۲) که بیانگر بنیادی ماندن سلول‌ها طی کشت می‌باشد.



تصویر ۲- نتایج بررسی MTT برای نمونه نانوفیبری، نانوفیبرها همراه با سلول‌های بنیادی و لبه سلولی مغذی و نمونه غشای آمنیوتیک.



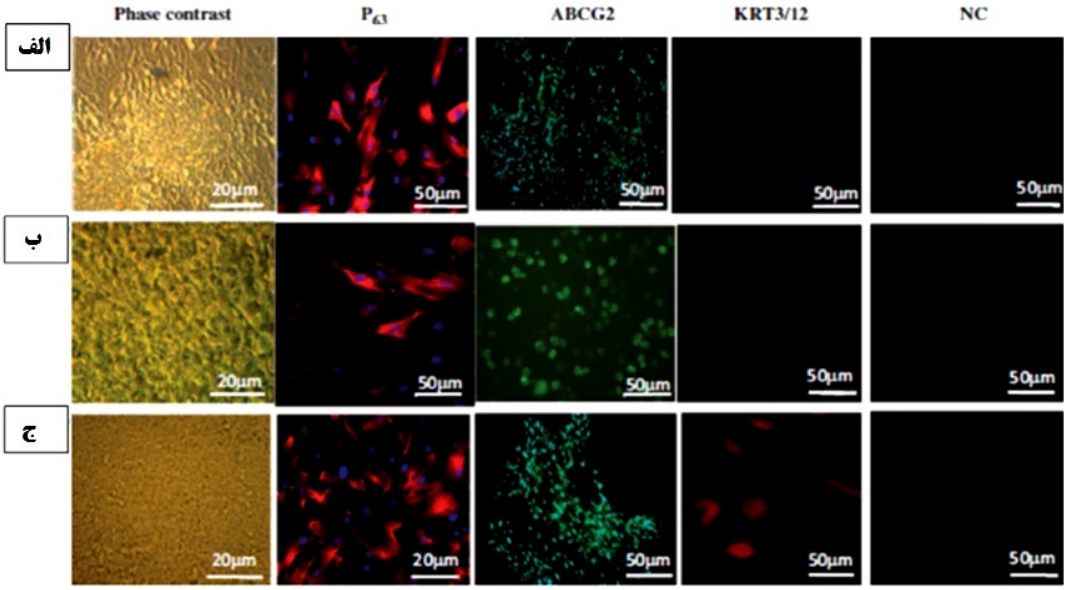
تصویر ۴- آزمایش فلوسایتومتری سلول‌های بنیادی لیمبال برای نشانگرهای سطحی. همه سلول‌ها برای آنتی‌ژن‌های سطحی CD_{73}، CD_{90}، CD_{44} و CD_{105} مثبت بودند. برعکس برای آنتی‌ژن‌های سطحی CD_{34}، CD_{31}، CD_{45} منفی بودند.

که این بیان ژنی در غشاء آمنیوتیک بعد از ۱۵ روز کشت بالا بود (تصاویر ۵ و۶). بالاترین بیان ژنی $ABCG_2$ مربوط به روز هفتم در گروه غشا آمنیوتیک/ سلول‌های بنیادی لیمبوس (AM /LSC_S) بود. اگر چه بیان $ABCG_2$ در داربست نانوفیبری تقریباً شبیه لایه USSC بود. بیان مثبت $ABCG_2$، نشانه ارزشمندی از رشد سلول‌های

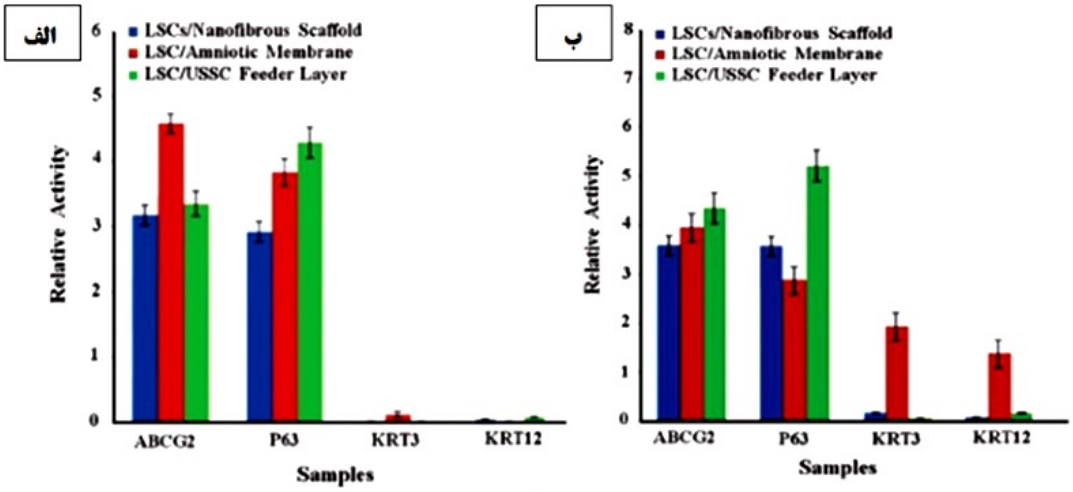
www.SID.ir

Archive of SID

بنیادی است. در روز ۱۵ کشت، سطح بیان ژن ABCG۲ در محیط کشت USSC /LSCs بالاترین مقدار بود. در روز ۱۵ سطح بیان ABCG۲ در تمام گروه‌ها افزایش داشت که بدین معنی است که سلول‌های بنیادی هنوز در مرحله غیرتمایزی می‌باشند (یعنی هنوز سلول‌های بنیادی لیمبوس به سلول‌های اپی‌تلیال قرنیه تمایز پیدا نکردند که این مزیت خوبی محسوب می‌شود). ژن P۶۳ نشانه‌ای از سلول‌های بنیادی لیمبوس است. در روز هفتم مقدار بیان ژنی P۶۳ در گروه USSC /LSCS بالاترین بود. در روز ۱۵ یک افزایش بیان ژنی P۶۳ در گروه USSC /LSCS وجود داشت در حالی که در گروه AM /LSCs کاهش بیان ژنی P۶۳ مشاهده شد. هم‌چنین در گروه داربست نانوفیبر/ LSCS نیز افزایش بیان ژنی مشاهده شد. بیان ژن KRT۳ و KRT۱۲ نشانه‌ای از وجود سلول‌های اپی‌تلیال تمایز یافته می‌باشند که این نشانگرها در روز ۷ و ۱۵ منفی بودند اما در گروه AM /LSCs افزایش بیان سایتوکراتین ۱۲ و ۳ نشان‌دهنده شروع مرحله تمایز در سلول‌های بنیادی لیمبوس که روی غشاء آمنیوتیک کشت داده شدند، بود.



تصویر ۵- ایمنوسیتوشیمی KRT۳/۱۲، ABCG۲، P۶۳ و کنترل منفی NC برای سلول‌های بنیادی لیمبال بعد از کشت روی لایه تغذیه دهنده USSC (الف) ، داربست نانوفیبری (ب) و غشای آمنیوتیک (ج).



تصویر ۶- سطح بیان KRT۳/۱۲، ABCG۲، P۶۳ در غشای آمنیوتیک، لایه تغذیه‌دهنده USSC و داربست نانوفیبری پلیمری بعد از ۷ (الف) و ۱۵ روز(ب) .

www.SID.ir

Archive of SID

یکی از مشکلات سلول‌درمانی، عدم توانایی شکلی منسجم و هم‌چنین بستری مناسب برای انتقال است که استفاده از داربست‌ها یکی از روش‌ها می‌باشد. در حوزه بازسازی بافت چشمی نیز چنین مشکلاتی وجود دارد که تلاش می‌شود با بهره‌گیری از داربست‌ها و بسترهای هوشمند حل شوند. بهره‌گیری از سلول‌های بنیادی در حل معضلات چشمی می‌تواند راهکار نوینی را ارایه دهد. استفاده از انواع سلول‌های بنیادی در دستور کار محققان زیادی قرار گرفته است که با بهره‌گیری از داربست و سلول بتوانند فرایند بازسازی بافت‌های آسیب‌دیده چشمی را تسریع بخشند. هولان و همکاران نشان دادند که داربست پلیمری پلی‌آمیدی و کشت سلول‌های بنیادی لیمبال توانایی بازسازی بافت اپی‌تلیال قرنیه چشم را خواهد داشت[۳۴و۳۵]. تاندون و همکاران و هم‌چنین گروه شارما نیز بستری از جنس پلی‌کاپرولاکتون و سلول‌های بنیادی را برای بازسازی بافت اپی‌تلیال قرنیه چشم به کار بردند که این بستر پلیمری نیز ویژگی‌های مطلوبی را نشان داد[۲۴و۳۶]. در مطالعه گروه ما، نانوفیبرهای پلی‌کاپرولاکتونی، طراحی و عملکرد این نوع داربست در تمایز سلول‌های بنیادی لیمبال با کمک سلوهای مغذی USSC بررسی شدند که نتایج خوبی از این مطالعه حاصل گردید. در مقایسه با نتایج گروه‌های پیشین، بررسی‌های بیش‌تری مانند ارزیابی چسبندگی و رشد سلولی، بیان ژنی و هم‌چنین بهره‌گیری از سلول‌های مغذی صورت گرفت که نتایج بیانگر این مطلب است که داربست نانوفیبری و سلول‌های مغذی توانایی تمایزی بیش‌تری را نسبت به بکارگیری نانوفیبرهای پلیمری به عنوان داربست نشان می‌دهند.

نتیجه‌گیری

مطالعه ما نشان داد که LSCS در محیط In vitro بستر نانوفیبری، توانایی تکثیر و تمایز را نشان می‌دهد. این سلول‌ها پس از کشت روی محیط تغذیه‌کننده USSC و انتقال آن به محیط داربست نانوفیبری PCL، مشخصات و تظاهرات بنیادی بودن سلول‌ها را حفظ می‌نمایند. به نظر می‌رسد این سیستم کشت، برای کاربرد بالینی کشت سلول‌های بنیادی لیمبوس مفید باشد.

جدول ۱- نشانگرهای سطحی سلول بنیادی برای سلول‌های بنیادی لیمبال

Surface markers	CD105	CD90	CD44	CD34	CD45	CD31	CD73
USSC feeder layer/LSCs	+	+	+	–	–	–	+
Amniotic membrane	+	+	+	–	–	–	+
Nanofibrous PCL	+	+	+	–	–	–	+

جدول ۲- توالی‌های پرایمر

Primers	Sequence (5′—>3′)	Tm
KRT-3	F: TCTCTTCGCCAAGCTCCTTAC	60
222bp	R: GAGATGCTCTTGTTGCCGC	
KRT-12	F: AGGACTGGGTGCTGGTTATG	59
342bp	R: GCTGAAATGATCTTATTCCTGAGGT	
ABCG2	F: ACTGAGATTGAGAGACGCGG	61
258bp	R: TCTGGAGAGTTTTTATCTTTTCAGC	
GAPDH	F: GATGCCCCCATGTTCGTCATG	60
	R: GGGTGTCGCTGTTGAAGTCAG	
P63	F: TGAAACTTCACGGTGTGCCA	60
	R: GCTGGAAAACCTCTGGACTGA	

www.SID.ir

Archive of SID

منابع

1. Klyce SD, Beuerman RW. Structure and function of the cornea. In: Kaufman HE, Barron BA, McDonald MB,
1. Waltman SR, editors. The cornea. New York, Edinburgh, London, Melbourne: Churchill Livingstone; 1988.
2. Ang LPK, Tan DTH, Beuerman RW, Lavker RM. Ocula surface epithelial stem cells: implications for ocular surface homeostasis. In: Pflugfelder SC, Beuerman RW, Stern ME editors. Dry eye and ocular surface disorders. New York Marcel Dekker; 2004.
3. Kenyon KR, Tseng SC. Limbal autograft transplantation fo ocular surface disorders. Ophthalmology 1989;96:709–722.
4. Biazar E. Use of umbilical cord and cord blood-derived stem cells for tissue repair and regeneration. Expert Opin. Biol. Th. 2013;13:1653-1662.
5. Kenyon KR. Limbal autograft transplantation for chemical and thermal burns. Dev Ophthalmol 1989;18:53–58.
6. Sangwan VS. Limbal stem cells in health and disease Biosci Rep 2001;21:385–405.
7. Tsai RJ, Li LM, Chen JK. Reconstruction of damage corneas by transplantation of autologous limbal epithelia cells. N Engl J Med 2000;343:86–93.
8. Tseng SC, Tsai RJ. Limbal transplantation for ocular surface reconstruction – a review. Fortschr Ophthalmol 1991;88:236–242.
9. Biazar E, Baradaran AR, Heidari S, et al. Oriented nanofibrous silk as a natural scaffold for ocular epithelial Regeneration. *J Biomaterials Science, Polymer Edition* 2015;26:1139-1151.
10. Baradaran AR, Biazar E, Heidari S. Cellular Response of Limbal Stem Cells on PHBV/Gelatin Nanofibrous Scaffold for Ocular Epithelial Regeneration. *Int J Polym Mater Polym Biomater* 2015;64:879-887.
11. Biazar E. Polyhydroxyalkanoates as potential biomaterials for neural tissue regeneration. *Int J Polym Mater Po* 2014;63:898-908.
12. Baradaran AR, Biazar E, Heidari S. Cellular response of limbal stem cells on poly(Hydroxybuthyrate-co-Hydroxyvalerate) porous scaffolds for ocular surface bioengineering. *Int J Polym Mater Polym Biomater* 2015;64:815-821.
13. Baradaran AR, Biazar E, Heidari S. Cellular Response of Stem Cells on Nanofibrous Scaffold for Ocular Surface Bioengineering. *ASAIO J* 2015;61:605-612.
14. Heidari S, Rostampour M, Khosropour G, Bandbon A, Baradaran AR and Biazar E. Derivation of epithelial-like cells from eyelid fat-derived stem cells in thermosensitive hydrogel. *J Biomate Sci Polym Ed* 2016;27:339–350
15. Schwab IR, Johnson NT, Harkim DG. Inherent risks associated with manufacture of bioengineered ocular surface tissue. *Arch Ophthalmol* 2006;124:1734–1740.
16. Deshpande P, Ramachandran C, Sefat F, Mariappan I, Johnson C, McKean R, et al. Simplifying corneal surface regeneration using a biodegradable synthetic membrane and limbal tissue explants. *Biomaterials* 2013;34:5088–5106.
17. Tsai RJ, Li LM, Chen JK. Reconstruction of dam aged cornea by transplantation of autologous limbal epithelial cells. *N Engl J Med* 2000;343:86–93.
18. Choi SM, Singh D, Kumar A, et al. Porous three-dimensional PVA/gelatin sponge for skin tissue engineering. *Int J Polym Mater Polym Biomater* 2013;62:384–389.
19. Zhang W, Wang P, Wang Y, et al. Development of a cross-linked polysaccharide of Ligusticum wallichii – squid skin collagen scaffold fabrication; and property studies for tissue-engineering applications. *Int J Polym Mater Polym Biomater* 2013;63: 65–68.
20. Hartgerink JD, Beniash E, Stupp SI. Peptide-amphiphile nanofibers: a versatile scaffold for the preparation of selfassembling materials. *Proc Natl Acad Sci* 2002;99: 5133–5138.
21. Fong H, Weidong L, Wang CS, Vaia RA. Generation of electrospun fibers of nylon 6; and nylon 6-montmorillonite nanocomposite. *Polymer* 2002;43:775–780.
22. Redenti S, Tao S, Yang J, et al. Retinal tissue engineering using mouse retinal progenitor cells and a novel biodegradable, thin-film poly(e-caprolactone) nanowire scaffold. *J Ocul Biol Dis Infor* 2008;1:19–29.
23. Zhang H, Migneco F, Lin CY, et al. Chemically conjugated bone morphogenetic protein-2 on three-dimensional polycaprolactone scaffolds stimulates osteogenic activity in bone marrow stromal cells. *Tissue Eng Part A* 2010;16:3441–3448.
24. Sharma S, Mohanty S, Gupta D, et al. Cellular response of limbal epithelial cells on electrospun poly-E-caprolactone nanofibrous scaffolds for ocular surface bioengineering: a preliminary in vitro study. Mol Vis. 2011; 17: 2898–2910.
25. Hosseinkazemi H, Biazar E, Bonakdar S, et al. Modification of PCL electrospun nanofibrous mat with calendula officinalis extract for improved interaction with cells. *Int J Polym Mater Po* 2015;64:459-464.
26. Sahebalzamani A, Biazar E. Modification of poly caprolactone nanofibrous mat by laminin protein and Its cellular study. *J Biomater Tiss Eng* 2014; 4:423-42926.
27. Majdi A, Biazar E, Heidari S. Fabrication and comparison of electro-spun PHBV nanofiber and normal film and its cellular study. *Orient J Chem* 2011;27:523–528.
28. Biazar E, Zhang Z, Heidari S. Cellular orientation on micro-patterned biocompatible PHBV film. *J Paramed Sci* 2010;1:74–77.
29. Rezaei-Tavirani M, Biazar E, Ai J, et al. Fabrication of collagen-coated poly(beta-hydroxy butyratecobeta-hydroxyvalerate) nanofiber by chemical; and physical methods. *Orient J Chem* 2011;27:385–395.
30. Ai J, Heidari SK, Ghorbani F, et al. Fabrication of coated-collagen electrospun PHBV nanofiber film by plasma method; and its cellular study. *J Nanomater* 2011;2011:1–7.
31. Biazar E, Heidari SK. Chitosan-cross-linked nanofibrous PHBV nerve guide for rat for sciatic nerve regeneration across a defect bridge. *ASAIO J* 2013;59:651–659.
32. Biazar E, Heidari SK. A nanofibrous PHBV tube with

www.SID.ir

Archive of SID

Schwann cell as artificial nerve graft contributing to rat sciatic nerve regeneration across a 30-mm defect bridge. *Cell Commun Adhes* 2013;20:41–49.

33. Montazeri M, Rashidi N, Biazar E, et al. Compatibility of cardiac muscle cells on coated-gelatin electro-spun polyhydroxybutyrate-valerate nano fibrous film. *Bio Sci Biotech Res ASIA* 2011;8:515–521.
34. Holan V, Javorkova E. Mesenchymal stem cells, nanofiber scaffolds and ocular surface reconstruction. *Stem Cell Rev and Rep* 2013;9:609-619.
35. Holan V, Javorkova E, Trosan P. The growth and delivery of mesenchymal and limbal stem cells using copolymer polyamide 6/12 nanofiber scaffolds. *Methods Mol Boil* 2013;1014:187-199.
36. Tandon R, Singh H, Mohanty S, et al. Ex-vivo cultivation of limbal epithelial cells and corneal stromal cells on electrospun plasma treated poly- -caprolactone scaffolds for ocular surface reconstruction. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 2014;55:5181.

www.SID.ir