مجله دیابت و لیپید ایران. تابستان ۱۳۸۹؛ دوره ۹ (شماره ۴) ۳۱۵-۳۰۳

تهیه مرکب زیستی جهت کاربرد در چاپ سلولی: مقایسه دو روش کشت سه بعدی قطره معلق و لوله مخروطی در چاپ زیستی

علی محمد شریفی[۱]، رعنا ایمانی*[۲]، حسین فخر زاده[۳]، شهریار حجتی امامی[۲]، پریسا رهنما مشتاق[۲]

چکیده

مقدمه: هدف نهایی مهندسی بافت، طراحی و ساخت بافت‌های بدن و کمک به ترمیم و جایگزینی بافت‌های آسیب دیده بدن است. تکنیک‌های مهندسی بافت چه به صورت سنتی و چه نوین، تلاش دارند تا بافت‌هایی با ویژگی‌های مشابه بافت‌های طبیعی بسازند؛ از این رو زیست شبیه‌سازی به عنوان یکی از زمینه‌های مطرح در مهندسی بافت، مورد توجه است. درک آنچه درون بدن در هنگام شکل‌گیری و تکامل بافت‌ها و اندام‌ها به خصوص در مرحله جنینی اتفاق می‌افتد، می‌تواند در مطالعات مهندسی بافت مفید باشد. مطالعات نشان داده که فرآیند خود مجتمع شوندگی توده‌های سلولی سه بعدی، می‌تواند خصوصیات عملکردی و ساختاری بافت‌های طبیعی بدن را بیشتر شبیه‌سازی کند. از این رو استفاده از توده‌های سلولی، به عنوان واحدهای ساختاری بافت‌ها، به جای سلول‌های مجزا، در تحقیقات مهندسی بافت پیشنهاد شده است. هدف از این مطالعه تهیه توده‌های سلولی مطلوب جهت کاربرد در مهندسی بافت بود.

روش‌ها: از دو روش کشت سه بعدی Hanging Drop (HD) و Conical Tube (CT) جهت تولید توده‌های سلولی بهره گرفته شد. با تغییر چگالی اولیه سلولی و زمان پیش کشت، ابعاد توده‌ها، زیست‌پذیری و قابلیت تکثیر و قابلیت گسترش بافتی توده‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: بر طبق نتایج، هر دو روش به عنوان روش‌های آزمایشگاهی در دسترس، جهت تهیه توده‌های سلولی مناسب می‌باشند. ابعاد توده‌ها و میزان زنده بودن سلول‌ها توسط چگالی اولیه سلولی و زمان پیش - کشت قابل کنترل است، هر چند تغییر ابعاد در روش HD، خطی‌تر از روش CT است. در روش HD، یکنواختی ابعاد توده‌های به دست آمده و همچنین شکل کروی آنها در مقایسه با روش CT قابل توجه بوده است. در هر دو روش، توده‌های با چگالی سلولی کمتر، خواص همچسبی کمتری را نشان داده و در برهمکنش با محیط تمایل بیشتری به چسبندگی، گسترش و در نتیجه تکثیر سلولی دارند.

نتیجه‌گیری: روش HD قادر به تولید توده‌هایی با ویژگی‌های مطلوب‌تر جهت کاربرد به عنوان واحدهای ساختاری در مطالعات مهندسی بافت است.

واژگان کلیدی: مهندسی بافت، توده‌های سلولی، کشت سه بعدی، خود مجتمع شوندگی، گسترش بافتی

۱- مرکز تحقیقات علوم داروئی رازی، مرکز تحقیقات سلولی ملکولی و دانشکده فارماکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی ایران
۲- آزمایشگاه مهندسی بافت، دانشکده مهندسی پزشکی، دانشگاه صنعتی امیرکبیر
۳- مرکز تحقیقات غدد درون‌ریز و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی تهران

* ***نشانی***: تهران، خیابان حافظ، روبروی سمیه، دانشگاه صنعتی امیرکبیر، دانشکده مهندسی پزشکی، آزمایشگاه مهندسی بافت، تلفن: ٦٤٥٤٢٣٨٣ - ٠٢١، نمابر: ٦٦٤٦٨١٨٦ - ٠٢١، پست الکترونیک: rimani_bmi@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۸۹/۰۱/۲۰ **تاریخ درخواست اصلاح:** ۸۹/۰۲/۲۰ **تاریخ پذیرش:** ۸۹/۰۲/۲۸

[Downloaded from ijdld.tums.ac.ir on 2025-02-07]

مقدمه

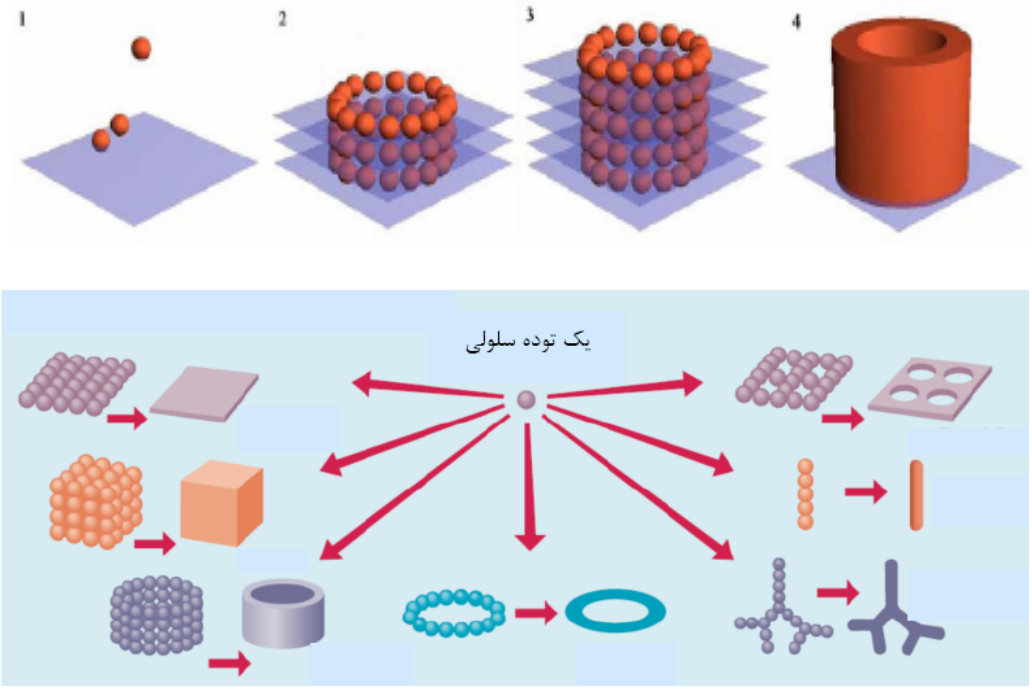
هدف نهایی مهندسی بافت، طراحی و ساخت بافت‌های شبه طبیعی، جهت کمک به ترمیم و جایگزینی بافت‌های آسیب دیده بدن است [۱]. آنچه در مراحل اولیه توسعه مهندسی بافت مورد توجه قرار گرفت، طراحی و استفاده از مواد مختلف جهت ساخت داربست‌های مورد نیاز به عنوان بستری جهت قرارگیری سلول‌ها و رشد آنها بود؛ در نتیجه تلاش‌های چندانی جهت شبیه سازی بافت‌های طبیعی بدن صورت نگرفت [۲]. در ادامه، جنبه‌های نوینی از مهندسی بافت با هدف تقلید از فرآیند طبیعی بدن برای ساخت بافت‌ها در محیط خارج از بدن در قالب "مهندسی بافت بر پایه سلول" مورد توجه قرار گرفت [۳]. از این جهت مطالعات اخیر به سمت فهم دقیق‌تر از زیست شناسی تکاملی و فرآیند شکل‌گیری بافت‌ها در بدن پیش رفته است. با اثبات ضرورت همراهی علوم مهندسی بافت با زیست شناسی تکاملی، تلاش مهندسان بافت به سمت ایجاد محیطی مناسب و شبه طبیعی برای زیست شبیه‌سازی هر چه بیشتر برهمکنش‌های سلول- سلول و سلول ماتریس خارج سلولی بوده است [۴،۳]. فرآیند Self-Assembling که از آن تحت عنوان "خود مجتمع شوندگی" نیز یاد می‌شود، از بنیادی‌ترین سازوکارها در شکل‌گیری بافت‌ها و اندام‌های پیچیده در بدن و به خصوص در مراحل رشد جنینی می‌باشد. این فرآیند در طول مراحل شکل‌گیری بافت‌های جنینی، در نتیجه برهمکنش‌های سلول- سلول، اتفاق می‌افتد و در پی آن توده‌های سلولی و بافتی با فنوتیپ معین ایجاد می‌شوند که در مراحل بعد تبدیل به بافت‌ها در ابعاد بزرگ‌تر می‌گردند. از این جهت توده‌های سلولی می‌توانند رفتارهای طبیعی سلول‌ها و عملکرد آنها را در طول شکل‌گیری بافت‌ها چه به لحاظ ساختاری و چه عملکردی شبیه‌سازی کنند [۶]. در نتیجه، مطالعات اخیر پژوهشگران، استفاده از توده‌های سلولی به جای سلول‌های مجزا را به عنوان واحدهای ساختاری و ساختمانی بافت نهایی توصیه نموده‌اند [۴،۷]. فکر استفاده از توده‌های سلولی در مطالعات نوین مهندسی بافت مانند "فناوری چاپ زیستی اندام‌ها و ارگان‌های بدن" بیشتر مورد توجه قرار گرفته است (شکل ۱) [۶].

فناوری چاپ زیستی، به عنوان زیر مجموعه‌ای از روش‌های نمونه سازی سریع[۲] است که با کمک چاپگرهای معمول تجاری، قابلیت ایجاد ساختارهای سلولی و در نهایت ارگان‌ها و اندام‌ها، به صورت شکل‌دهی هم زمان داربست و سلول در قالب سه بعدی را داراست. در این روش، به کمک رایانه و چاپگر اصلاح شده جهت کاربردهای سلولی، سلول‌های مناسب و همچنین بستر رشد یا همان داربست در مکان دقیق و از پیش طراحی شده به صورت لایه‌های متوالی روی هم قرار می‌گیرند (شکل ۱- بالا). چشم‌انداز آینده و هدف آتی فناوری چاپ زیستی، ساخت بافت‌ها و اندام‌های پیچیده دارای شاخه‌های عروقی مانند کلیه، قلب، کبد از طریق چینش لایه به لایه سلول و بستر کشت سلولی می‌باشد، اما گام‌های اولیه مطالعات به ایجاد ساختارهای ساده و ابتدایی که می‌توانند الگوی ساخت بافت‌های پیچیده‌تر باشند پرداخته‌اند [۶].

فناوری چاپ زیستی، مانند سایر فناوری‌های معمول چاپ، نیازمند مشارکت سه بخش می‌باشد: چاپگر زیستی[۳]، جوهر زیستی[۴] و کاغذ زیستی[۵] [۷]. توده‌های سلولی[۶] به عنوان "جوهرزیستی" در این فناوری بکار می‌روند. مزایای استفاده از توده‌های سلولی به عنوان جوهر زیستی شامل تسریع بلوغ بافتی و کاهش زمان شکل‌گیری ساختار نهایی، افزایش موضعی چگالی سلولی، امکان ایجاد ساختارهای پیچیده‌تر با استفاده از توده‌های چند سلولی و آسیب کمتر سلول‌ها در طول فرآیند انتقال سلول بر بستر می‌گردد؛ برای مثال در اثر فشار و دمای بالای ناشی از فرآیند چاپ در حین عبور سلول‌ها از نازل (nozzle) چاپگر و در نهایت شبیه‌سازی هرچه بیشتر جنبه‌های ساختاری و عملکردی فرآیند شکل‌گیری بافت، می‌باشد [۷،۸،۵]. از این رو ساخت توده‌های سلولی به عنوان جوهر زیستی، بخشی از تحقیقات روش چاپ زیستی اندام‌ها و ارگان‌ها می‌باشد.

1- Rapid Prototyping
2- Bioprinter
3- Bioink
4- Biopaper
5- Cell Aggregate

[Downloaded from ijdld.tums.ac.ir on 2025-02-07]



شکل ۱- بالا: مراحل ایجاد ساختارهای بافتی سه بعدی بر مبنای چاپ زیستی لایه‌های متوالی سلول- هیدروژل
پایین: ایجاد ساختارهای بافتی مختلف در نتیجه اتصال توده‌های سلولی در چیدمان‌های متفاوت

جهت تهیه توده‌های زیستی، نیاز به روش‌های کشت سه بعدی است. تا کنون روش‌های متفاوتی برای این منظور مورد استفاده قرار گرفته‌اند به طوری که بکار بردن روشی مناسب جهت تولید انبوه توده‌های سلولی با ابعاد یکنواخت و کنترل شده، چگالی بالای سلولی، با حداقل آسیب سلولی که در شرایط آزمایشگاهی قابل دسترس باشد، بخش قابل توجهی از مطالعات را به خود اختصاص داده است [۹].

هدف از این مطالعه، تهیه توده‌های سلولی به عنوان جوهر زیستی مناسب جهت کاربرد در چاپ زیستی با تکیه بر جنبه‌های سلولی می‌باشد. جهت نیل به این هدف از دو روش کشت سه بعدی ساده و آزمایشگاهی، Hanging Drop (HD) و Conical Tube(CT) استفاده شده و توده‌های به دست آمده جهت انتخاب نمونه بهینه مورد ارزیابی قرار گرفتند.

روش‌ها

کشت سلول

رده سلولی تخمدان موش چینی[۷](CHO) تهیه شده از انستیتو پاستور ایران، درون محیط کشت RPMI1640 حاوی ۱۰٪ سرم جنین گاوی و ۱٪ پنسیلین/ استرپتومایسین به روش استاندارد کشت داده شد. پس از ۲ روز قرارگیری در شرایط انکوباتور حاوی ۵٪ CO_2 در دمای ۳۷ °C، سلول‌ها توسط آنزیم تریپسین از کف پلیت جدا شده و پس از شستشو با بافر فسفات، سوسپانسیون سلولی یکنواختی تهیه شد. شمارش تعداد سلول‌ها در سوسپانسیون با روش فلوسایتومتری انجام شد. سلول‌ها در هر ۴۸ ساعت یک بار پاساژ داده شدند (یک به سه) (تمام مواد مورد استفاده در کار کشت و پاساژ سلول‌ها از کمپانی Gibco تهیه شد).

7- Chinese Hamster Ovary(CHO)

[Downloaded from ijdld.tums.ac.ir on 2025-02-07]

آماده‌سازی توده‌های سلولی

در روش HD، سوسپانسیون سلولی آماده شده توسط پایپتورهای ۸ کاناله به صورت قطراتی به حجم ۲۰ میکرولیتر به درون درب پلیت‌های کشت ۱۵ سانتیمتری منتقل شد؛ به طوری که درون قطره‌ها به ترتیب تعداد ۵، ۱۰، ۲۵۰، ۵۰ هزار سلول قرار گرفت (شکل۲). درب پلیت به آرامی به روی آن برگردانده شد و در نهایت پلیت‌ها به انکوباتور با شرایط یاد شده منتقل شدند. نمونه‌ها به ترتیب با کد HD5، HD10، HD25 و HD50 نام‌گذاری شدند.

در روش CT، سوسپانسیون سلولی به حجم µl ۲۰۰ به درون میکرو تیوب‌هایی از جنس پلی پروپیلن به ظرفیت µl ۲۰۰ میکرو لیتر منتقل شده، پس از سانتریفیوژ با دور۲۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه، میکروتیوب‌ها به انکوباتور منتقل شدند و جهت فراهم‌سازی شرایط تنفس درب آنها به حالت نیمه باز قرار گرفتند. تعداد سلول‌ها درون میکروتیوب‌ها مشابه روش قبل ۵، ۱۰، ۲۵ و ۵۰ هزار بوده و نمونه‌ها به ترتیب تحت عنوان CT5، CT10، CT25 و CT50 نامیده شدند. در مرحله پیش کشت، جهت تشکیل توده‌های سلولی، نمونه‌های هر دو روش به مدت معین حداکثر تا ۵ روز درون انکوباتور قرار گرفتند (شکل ۲).

بررسی ابعاد توده‌های سلولی

جهت بررسی ابعاد توده‌های تشکیل شده وابسته به چگالی سلولی اولیه و زمان پیش کشت، توده‌های به دست آمده از هر دو روش در فاصله زمانی ۵ روز به طور مداوم، توسط میکروسکوپ نوری معکوس(Olympus) مجهز به دوربین عکس برداری (Sony Digital Camera) مورد مشاهده قرار گرفته و تصاویر گرفته شده با نرم افزار آنالیز(Motic Image Proplus)، مورد بررسی قرار گرفته و ابعاد توده‌ها محاسبه شد.

بررسی میزان زنده بودن توده‌های سلولی

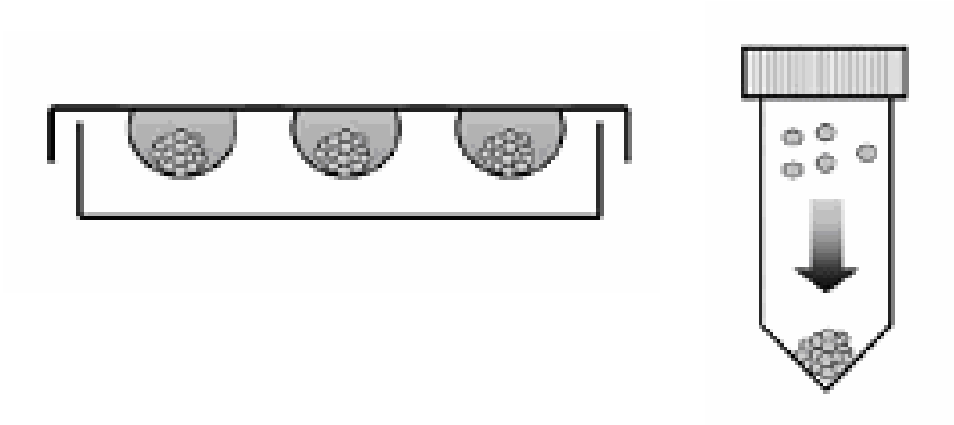
در طول مرحله پیش کشت، توده‌های به دست آمده در زمان‌های ۱، ۲، ۳، ٤ و۵ روز، از محیط خود خارج شدند. پس از شستشو با بافر فسفات، سلول‌های تشکیل دهنده توده سلولی توسط ml ۱ محلول رقیق ۰/۱٪ تریپسین همراه با عمل پیپتاژ از هم جدا شده و توسط رنگ‌آمیزی تریپان بلو، میزان درصد زنده بودن سلول‌های تشکیل دهند توده معین شد.

بررسی برهمکنش توده‌های سلولی- بستر

در این بخش، میزان توانایی گسترش بافتی توده‌ها و همچنین تکثیر سلولی در برهمکنش با بسترهای مناسب کشت با قابلیت چسبندگی سلولی- مانند داربست‌های مورد استفاده در مهندسی بافت- مورد ارزیابی قرار گرفت. جهت مقایسه برهمکنش سلول-سلول در مقابل سلول-سطح که معرف ویژگی "هم چسبی[8]" در مقابل "چسبندگی به بستر[9]" توده‌هاست، توده‌های سلولی به دست آمده از هر دو روش، در روز سوم مرحله پیش کشت از محیط خود خارج شده و پس از شستشو با بافر فسفات روی سطح پتری دیش cm ۳ قرار گرفتند. پس از افزودن mL۲ محیط کشت کامل، پلیت‌ها به مدت ۳ روز درون انکوباتور قرار گرفتند. در طی برهمکنش بین سلول‌ها و سطح، توده شروع به چسبیدن به سطح و جدا شدن سلول‌ها از توده به سمت چسبیدن روی سطح می‌نماید. این عمل در ابتدا از سلول‌های مرزی شروع شده و سبب توسعه توده روی سطح می‌گردد. میزان توسعه سلولی توده‌ها در طول مدت کشت روی بستر از طریق اندازه‌گیری نسبت شعاع گسترش سلولی (R_e) به شعاع توده اولیه (Ri) پس از ۳ روز از طریق تصاویر گرفته شده با میکروسکوپ نوری مورد ارزیابی قرار گرفت. پارامتر "توسعه توده سلولی" (R_e/R_i) از طریق اندازه‌گیری شعاع گسترش روی تصاویر به دست آمده برای هریک از توده‌ها محاسبه شد.

8- Cohesivity
9- Adhesivity

[Downloaded from ijdld.tums.ac.ir on 2025-02-07]



شکل۲- شمایی از روش HD (چپ) و CT (راست)

جهت بررسی دقیق‌تر میزان توانایی سلول‌های تشکیل‌دهنده توده در برهمکنش با سطح کشت و همچنین تخمین میزان رشد و تکثیر سلول‌ها در این مرحله و حفظ عملکرد سلولی، اصول آزمون MTT مورد استفاده قرار گرفت. به طور خلاصه سوسپانسیون سلولی پس از تهیه به میزان µl ۲۰۰، به یک پلیت ۹۶ چاهکی منتقل شد به طوری که هرچاهک شامل تعداد معینی سلول باشد. تعداد سلول‌های قرار گرفته درون هر ردیف پلیت بین ۵-۵۰ هزار متغیر بود. پس از ۲ ساعت قرارگیری پلیت در درون انکوباتور، پس از چسبیدن سلول‌ها به سطح چاهک، µl ۲۰ محلول ماده MTT به چاهک‌ها اضافه شده، ۲ ساعت درون انکوباتور نگهداری شد. با خروج محیط کشت و افزودن حلال DMSO، میزان جذب رنگ در هر چاهک حاوی توده توسط دستگاه الایزا ریدر تحت طول موج nm ۵۹۰ خوانده شد و میزان عدد جذب بر حسب تعداد معین سلول‌ها درون چاهک‌ها به دست آمد. نمودار استاندارد میزان جذب بر حسب تعداد سلول زنده بر حسب داده‌های به دست آمده رسم شد. در ادامه توده‌های سلولی به دست آمده از هر دو روش پس از طی ۳ روز مرحله پیش کشت به پلیت ۹۶ چاهکی منتقل شدند. پلیت به مدت ۳ روز به انکوباتور منتقل شد. سپس به هرچاهک µl ۲۰ رنگ MTT افزوده شد و پس از ٤ ساعت انکوباسیون، میزان عدد جذب توسط الایزا ریدر به دست آمد. با استفاده نمودار استاندارد تهیه شده، تعداد سلول‌های موجود در هر چاهک تخمین زده شد. مقایسه تعداد نهایی سلول‌های موجود در چاهک‌ها با تعداد سلول‌های اولیه سازنده توده سلولی پس از گذراندن مرحله پیش کشت و کشت، تحت عنوان فاکتور تکثیر سلولی بین نمونه‌های مختلف مورد مقایسه و بررسی قرار گرفت. فاکتور تکثیر، دلالت بر میزان توانایی توده‌های سلولی در چسبندگی، توسعه و تکثیر سلولی در بر همکنش با سطح کشت دارد.

یافته‌ها

آماده‌سازی توده‌های سلولی

روش HD، روشی ساده است که از دیر باز در تحقیقات سلول‌های بنیادی جهت تشکیل جسم جنینی از سلول‌های بنیادی جنینی مورد استفاده بوده است. در این روش سلول‌ها درون قطره‌ای با حجم معین به صورت آویخته قرار می‌گیرند. بر اثر نیروی کشش سطحی، قطره شکل خود را درحالت آویخته حفظ می‌کند و سلول‌ها بر اثر نیروی وزن به انتهای قطره رسوب کرده و در مرز قطره با هوا مجتمع می‌گردند (شکل۲). به دلیل اینکه سطحی برای چسبیدن سلول در دسترس نیست، به مرور زمان، سلول‌ها با هم برهمکنش داشته و به هم چسبیده، توده‌ای فشرده را تشکیل می‌دهند. شکل کروی و آویخته قطره سبب تسهیل شکل‌گیری توده‌های کروی می‌گردد. با تغییر تعداد سلول قرار گرفته درون قطره اولیه، می‌توان تعداد سلول مجتمع شونده به صورت توده را کنترل نمود.

در روش CT که زیر مجموعه روش‌های شکل‌دهی توده تحت اعمال نیروهای خارجی است [۹]، سلول‌های قرار

[Downloaded from ijdld.tums.ac.ir on 2025-02-07]

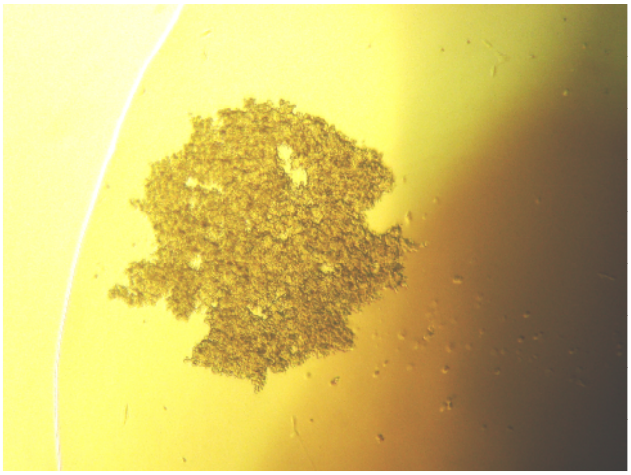
گرفته درون میکروتیوب با بکارگیری نیروی سانتریفیوژ به انتهای میکروتیوب فشرده شده، تجمع می‌یابند. به دلیل جنس ماده سازنده میکروتیوب، سلول‌ها قادر به چسبیدن به سطح نیستند؛ ازاین رو به هم چسبیده و تشکیل توده می‌دهند. فضای کروی انتهای میکروتیوب، سبب ایجاد شرایط مناسب برای تشکیل توده‌های کروی می‌گردد. توده تشکیل شده در فضای انتهای میکروتیوب معلق می‌ماند (شکل۲).

سرعت تشکیل توده سلولی در هر دو روش وابسته به میزان برهمکنش سلول‌ها با هم و مجتمع شوندگی آنهاست که خود تابعی از چگالی سلولی اولیه است. در این مطالعه، اولین توده‌های مجزای قابل تشخیص در روش HD، از روز دوم مشاهده شد؛ در روش CT، در روز اول تجمعات سلولی قابل مشاهده بود؛ اما سلول‌های مجتمع شونده، تشکیل ذرات ریز پر سلول غیر واحدی را دادند که از روز سوم به بعد تبدیل به ساختار واحد قابل تشخیص به عنوان توده مجزا شدند. در مقایسه با روش CT، شکل توده‌های به دست آمده در روش HD کروی‌تر و منظم‌تر بوده، با گذشت زمان مرزهای توده متراکم‌تر و منظم‌تر شدند. شکل نهایی توده‌های به دست آمده از روش CT کاملاً کروی شکل نبوده و گاه زواید سلولی در مرز آن قابل مشاهده بود (شکل ۳). از آنجایی که در روش CT از نیروی سانتریفیوژ برای مجتمع سازی سلول‌ها استفاده شده است، تجمعات سلولی زودتر مشاهده می‌شود اما از آنجا که شکل توده و یکنواختی ابعاد جهت کاربرد، اهمیت ویژه‌ای دارد، توده‌های CT پیش از سه روز قابل استفاده نیستند؛ از این رو روش HD، با فراهم‌آوری فضایی محدود و نیروهای بین سطحی چسبیدن سلول‌ها به هم را ترغیب می‌کند و توده واحد در زمان کوتاه‌تری قابل استفاده می‌شود.

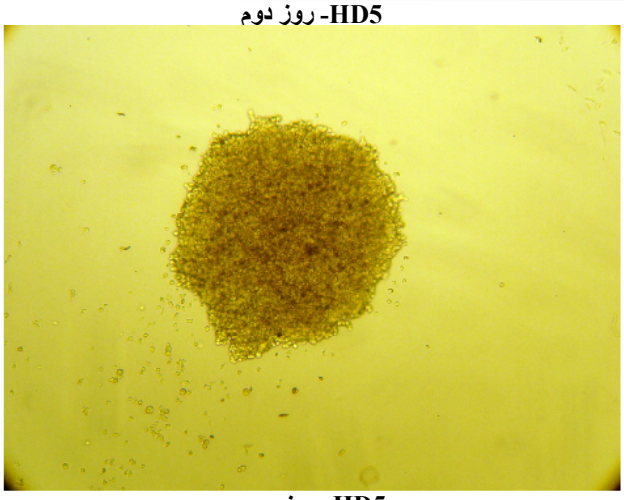
ابعاد و زیست‌پذیری توده‌های سلولی

یکی از شاخص‌های مهم در مورد توده‌های سلولی، ابعاد آنهاست. کنترل ابعاد توده به جهت تغذیه سلول‌ها ضروری است. در توده‌های بزرگ، معمولاً مواد غذایی کافی در دسترس سلول‌های درونی قرار نگرفته و سلول‌ها در این بخش دچار نکروز می‌شوند. بنابراین ابعاد توده توسط قابلیت نفوذ مواد غذایی و همچنین خروج مواد زاید محدود می‌شود. ابعاد بهینه توده‌ها می‌تواند نسبت به نوع سلول کمی متغیر باشد اما در مطالعات انجام شده عموماً بیشینه شعاع نفوذ در حدود ۵۰۰ میکرون گزارش شده است [۱۱].

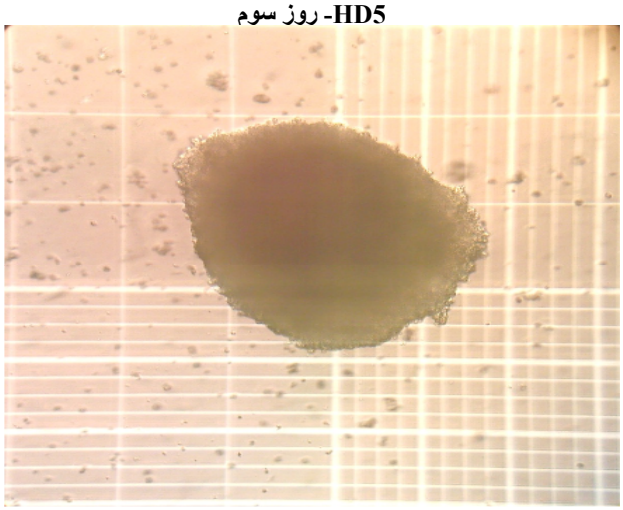
[Downloaded from ijdld.tums.ac.ir on 2025-02-07]



HD5- روز دوم



HD5- روز سوم



CT10- روز سوم

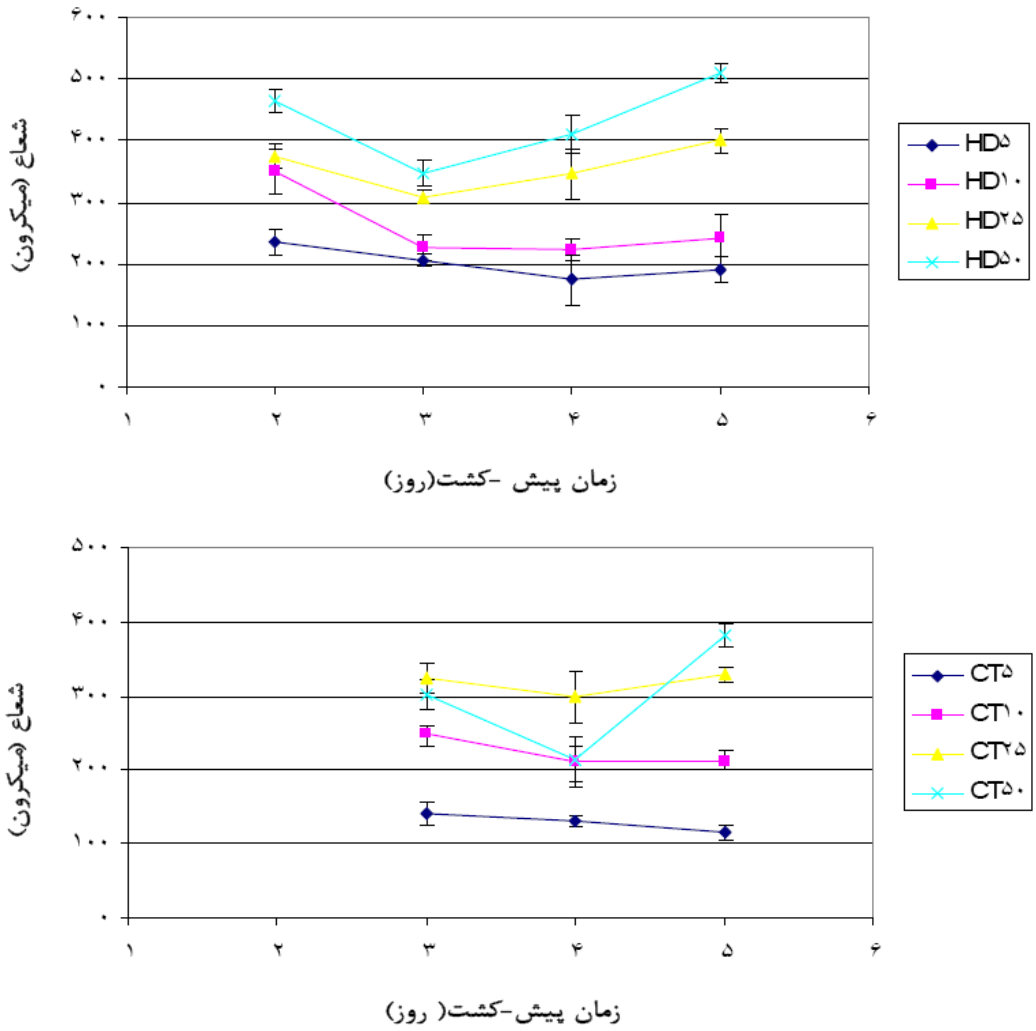
شکل۳- توده های سلولی به دست آمده از دو روش در زمان های پیش کشت مختلف

علاوه بر تغذیه سلولی و زنده ماندن آنها، ابعاد توده جهت کاربرد آن در فناوری‌های بر پایه انتقال توده‌ها بر بستر توسط ابزارهای انتقال دهنده مانند نازل‌های (nozzle) دستگاه چاپگر نیز محدود می‌گردد. ازاین رو در تهیه توده‌های سلولی، کنترل ابعاد نهایی توده و یکنواختی آنها حائز اهمیت است. واضح است که با افزایش چگالی اولیه سلول‌ها، ابعاد توده نهایی حاصل افزایش می‌یابد اما این افزایش خطی نمی‌باشد.

توده‌های به دست آمده از روش CT در مقایسه با HD در شرایط یکسان زمان پیش کشت و چگالی سلولی اولیه،

[Downloaded from ijdld.tums.ac.ir on 2025-02-07]

ابعاد کوچک‌تری دارند. چرا که روشی که قادر به متمرکز کردن سلول‌ها در چگالی بالای سلولی باشد، بالقوه شکل‌گیری توده‌ها را آسان می‌کند، بخصوص در سلول‌هایی که نوعاً تمایلی به تجمع یافتن ندارند. سانتریفیوژ تحت دور مناسب در روش CT، عمل تجمع سلول‌ها را تسریع نموده و در نتیجه سرعت شکل‌گیری توده افزایش یافته است. روند تغییرات ابعاد توده‌ها با زمان در ابتدا روندی کاهشی و سپس افزایشی دارد (شکل ٤).



شکل۴- روند تغییرات شعاع توده‌های سلولی با زمان

حداقل شعاع توده برای نمونه‌های HD_{50} و HD_{25} در روز سوم و برای نمونه‌های CT5، CT25، CT10، HD10 و HD5، در روز چهارم قابل مشاهده است. نمونه CT5 تا روز پنجم روند کاهشی را حفظ نموده است. روند افزایش ابعاد توده‌های HD با افزایش چگالی سلولی اولیه خطی‌تر می‌باشد. کاهش ابعاد توده تشکیل شونده در نتیجه برهمکنش بیشتر سلول‌ها و ایجاد اتصالات قوی‌تر بین آنهاست. روند کاهش ابعاد توده تشکیل شونده تا جایی ادامه می‌یابد که توده‌ای منسجم ایجاد شود و این در صورتی است که شرایط تغذیه و تنفس سلول‌ها نیز فراهم بوده و سلول‌های تشکیل دهنده توده زنده باشند. در صورت عدم دسترسی به مواد غذایی و اکسیژن کافی و بروز مرگ سلولی در بخش مرکزی توده سلولی، اتصالات ایجاد شده ضعیف شده و سلول‌ها در بخش‌های مرکزی از هم جدا می‌شوند. این امر سبب از دست رفتن انسجام توده و در نتیجه افزایش مجدد ابعاد توده می‌گردد. عامل دوم که

[Downloaded from ijdld.tums.ac.ir on 2025-02-07]

می‌تواند افزایش ابعاد توده را در پی داشته باشد، رشد و تکثیر سلول‌ها در لایه مرزی خارجی توده است [۱۰].

با بررسی میزان زنده بودن توده‌های سلولی بر حسب زمان پیش کشت (جدول۱)، مشاهده شد افزایش ابعاد توده با کاهش چشم‌گیر میزان زنده بودن همراه بوده است و این دلالت بر این دارد که نقش کمبود مواد غذایی و اکسیژن در از دست رفتن انسجام توده و افزایش آن بارزتر از عامل تکثیر سلول‌ها در لایه مرزی خارج توده می‌باشد. بررسی میزان زنده بودن توده‌های سلول همچنین نشان داد که با کاهش چگالی سلولی و در نتیجه آن ابعاد توده تشکیل شده، میزان زنده بودن افزایش می‌یابد؛ زیرا دسترسی سلول‌ها در توده‌های کوچک‌تر و کم سلول به مواد غذایی و اکسیژن آسان‌تر است به طوری که در هر دو روش، میزان زنده بودن توده‌هایی با چگالی سلولی ۵۰۰۰ سلول در هر قطره، تا روز پنجم بسیار قابل قبول است.

جدول۱- میزان متوسط درصد زنده بودن سلول ها در توده

کد نمونه	روز دوم	روز سوم	روز چهارم	روز پنجم
HD۵	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۹۰
HD۱۰	۱۰۰	۹۷	۸۸	۷۰
HD۲۵	۹۸	۹۳	۶۷	۵۵
HD۵۰	۹۳	۸۲	۵۶	۳۰
CT۵	۱۰۰	۱۰۰	۹۰	۸۸
CT۱۰	۱۰۰	۹۲	۸۰	۷۶
CT۲۵	۷۰	۶۶	۶۰	۵۰
CT۵۰	۶۵	۵۰	۴۵	۲۳

در مقایسه بین دو روش، مشاهده شد که تحت شرایط یکسان، چگالی سلولی و زمان پیش کشت، میزان زنده بودن توده‌های به دست آمده از روش CT کمتراست.

در روش‌های مختلف کشت سه بعدی، برای تهیه توده‌های سلولی، میزان محیط کشت و مواد غذایی و همچنین اکسیژن در دسترس سلول‌ها متفاوت است. در روش HD میزان ماده غذایی در دسترس سلول‌ها محدود به حجم قطره است. در این روش قطراتی در حدود ۱۵-۳۰ µL معمول‌تر هستند چرا که حجم قطره کمتر از این مقدار معمولاً در اثر تبخیر دچار خشکی در طول مرحله انکوباسیون می‌گردد و از طرفی این حجم برای تغذیه سلول‌ها با این چگالی نیز کافی نیست. قطراتی با حجم بیش از ۳۰ نیز هنگام برگرداندن درب پلیت، دچار آسیب می شوند و شکل خود را از دست داده و یا بر اثر نیروی وزن، از سطح آویخته جدا می شوند.

میزان چگالی سلولی بارگذاری شده در هر قطره، وابسته به حجم محدود آن باید کنترل شده باشد. علاوه بر مسأله تغذیه، نکته دیگر تامین اکسیژن کافی برای سلول‌هاست. در روش HD، توده‌ها در مرز قطره و هوا شکل می‌گیرند و این سبب می‌شود که دسترسی کافی به اکسیژن وجود داشته باشد اما در روش CT توده در انتهای فضای بسته و محدود میکرو تیوب مجتمع شده و شکل می‌گیرد و مسلماً دسترسی به اکسیژن محدودتر است، گرچه محیط کشت بیشتری در دسترس سلول‌ها است. استفاده از میکروتیوب‌هایی با زاویه انتهایی بازتر، می‌تواند تا حدی مشکل را مرتفع سازد؛ اما استفاده از میکروتیوب‌هایی با زاویه بسته‌تر و فضای انتهایی محدودتر، خود عامل مساعدی برای نزدیک‌سازی و برهمکنش بیشتر سلول‌ها در فضای محدودتر است و منجر به تشکیل سریع‌تر توده‌های با ابعاد کوچک‌تر می‌گردد. مقایسه میزان زنده بودن توده‌ها در دو روش، حاکی از اهمیت مسأله دسترسی به اکسیژن بوده و احتمالاً مرگ بیشتر سلول‌ها ناشی از هیپوکسی می‌باشد.

[Downloaded from ijdld.tums.ac.ir on 2025-02-07]

برهمکنش توده‌های سلولی- بستر

در روند توسعه مهندسی بافت، چه بر پایه داربست‌های جامد و چه بر پایه سلول، آنچه همواره مورد توجه محققان بوده است، نیازبه برهمکنش مناسب و کافی سلول‌ها با بستر کشت یا همان داربست سلولی است که خود گام اول در تشکیل ماتریس خارج سلولی و تشکیل بافت نهایی در مراحل بعد است [۱۲]. از این رو مسأله چسبندگی سلولی به سطح و اصلاح سطوح جهت تسریع چسبندگی، همواره مورد بحث بوده است. سلول‌های تشکیل دهنده توده، وقتی در تماس با بسترهایی مانند داربست‌ها قرار می‌گیرند، درگیر فرآیند رقابتی بین برهم کنش سلول- سلول و سلول- بستر می‌گردند که در نتیجه غلبه تمایل سلول به سطح نسبت به تمایل سلول به سلول، سلول‌ها می‌توانند به بستر بچسبند یا در نقطه مقابل هیچ چسبندگی اتفاق نیفتد [۱۲]. مطالعات نشان داده که در صورتی که چسبندگی بین سلول‌های توده بسیار زیاد باشد، سلول‌ها به سطح نمی‌چسبند و در نتیجه نمی‌توانند روی بستر و یا در فضای سه بعدی پخش شوند. در این صورت یا هیچ حرکت و مهاجرت سلولی اتفاق نمی‌افتد و یا سرعت این فرآیند تحت تاثیر قرار گرفته و کاهش می‌یابد [۵،۱۳].

در این مطالعه سعی برآن بوده است که در بررسی برهمکنش توده‌های سلولی، میزان توانایی توده‌های سلولی تهیه شده به روش‌های مختلف و با ویژگی‌های مختلف، در چسبیدن به سطح بستر در مرحله اولیه و همچنین توسعه و رشد و تکثیر سلولی در مراحل بعد مورد ارزیابی و مقایسه قرار گیرد. علاوه بر این، سرعت گسترش سلولی نیز یکی دیگر از جنبه‌های مورد بررسی بوده است. طبق مشاهدات توسط میکروسکوپ نوری، توده‌های سلولی قرار گرفته بر روی بستر کشت در ابتدا به سطح چسبیده و سپس سلول‌های توده از مرز شروع به گسترش روی سطح نمودند به طوری که مورفولوژی این سلول‌ها از حالت گرد به حالت دوکی تغییر نمود. با گذشت زمان کشت، شعاع گسترش سلول افزایش و تراکم توده در بخش مرکزی کاهش یافت. داده‌های به دست آمده از آنالیز تصاویر گرفته شده از توده‌ها پس از ۱ و ٤ روز از کشت، روی بستر در جدول ۲ خلاصه شده است.

جدول۲- پارامتر توسعه برای توده های سلولی در زمان های مختلف کشت

کد نمونه	روز اول	روز چهارم
HD۵	۳/۰۰	۶/۷۷
HD۱۰	۲/۷۳	۳/۴۰
HD۲۵	۲/۰۳	۲/۴۰
HD۵۰	۱/۰۰	۱/۰۰
CT۵	۱/۱۰	۳/۷۰
CT۱۰	۱/۰۰	۱/۲۰
CT۲۵	۱/۰۰	۱/۰۰
CT۵۰	۱/۰۰	۱/۰۰

نتایج دلالت بر این دارند که پارامتر گسترش محاسبه شده برای HD5 و CT5، نسبت به سایر نمونه ها بسیار چشم گیرتر بوده است. در مقایسه بین دو روش، توده های به دست آمده از روش HD دارای توانایی بیشتری جهت چسبیدن به سطح بستر توسعه سلولی هستند و گسترش سلولی برای اکثر نمونه های HD نیز با سرعت بیشتری اتفاق می افتد. با افزایش چگالی سلولی و ابعاد توده، این توانایی کاهش می یابد به طوری که همان طور که داده‌ها نشان می دهند، نمونه‌هایی با چگالی سلولی اولیه ۵۰۰۰۰ در هر دو روش در زمان مطالعه تا ٤ روز چسبندگی و توسعه چندانی از خود نشان ندادند(CT50 CT25 و HD50).

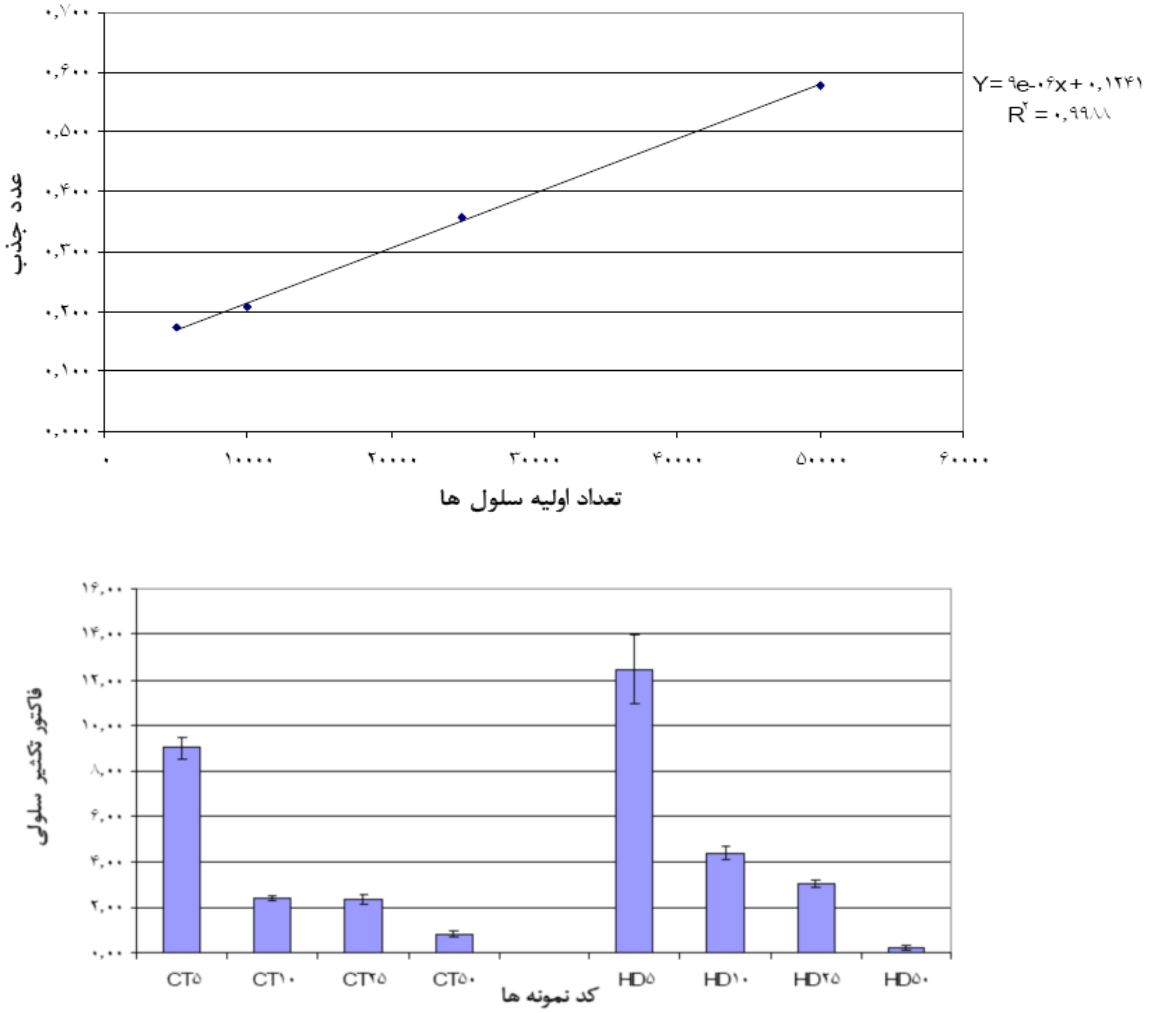
برای مطالعه بیشتر از آزمون MTT کمک گرفته شد. این آزمون عموماً برای مطالعه میزان سمیت سلولی مورد استفاده

[Downloaded from ijdld.tums.ac.ir on 2025-02-07]

قرار می‌گیرد. در حقیقت این آزمون تخمینی برای تعداد سلول‌های زنده و فعال و در نتیجه میزان زنده بودن، توسط اندازه‌گیری میزان جذب نور نسبت به نمونه شاهد است. باتوجه به نمودار استاندار به دست آمده (شکل۵)، رابطه خطی با دقت بالا بین تعداد سلول‌ها و میزان جذب وجود دارد. داده‌های آزمون بر روی توده‌های سلولی در مرحله بعد آزمون، به صورت نمودار در شکل۵ نیز آورده شده است.

از داده‌های حاصل از این آزمون و مقایسه آنها با نمودار مرجع می‌توان تعداد نهایی سلول‌های زنده موجود در هر چاهک را محاسبه و با مقایسه آن با چگالی سلولی اولیه، میزان تکثیر تعداد سلول‌ها در مجموع زمان پیش کشت و کشت (٦ روز) را تخمین زد.

همان طور که درنمودار شکل۵ مشاهده می‌شود، میزان تکثیر و توسعه سلولی در توده‌هایی با چگالی اولیه سلولی کمتر بارز است. مقایسه این داده‌ها با داده‌های به دست آمده از بررسی میزان زنده بودن و میزان گسترش سلولی روی سطح، می‌تواند روند کاهشی را تصدیق کند چرا که توده‌های با چگالی سلولی بالاتر، میزان زنده بودن کمتری را در زمان یکسان نشان می‌دهند و هم چنین توانایی چسبندگی این توده‌ها و گسترش سلولی آنها بر روی سطح کشت کمتراست. مرتبه افزایش تعداد سلول‌های نهایی در نمونه‌های CT5 و HD5 به ترتیب ۹ و ۱۲/٤٤ است که در مقایسه با سایر نمونه‌ها بسیار چشم‌گیر است و این نشان از توانایی در برهمکنش با سطح و رشد و تکثیر سلولی دارد. مقادیر به دست آمده برای نمونه‌های CT50 وHD50، کمتر از ۱ بوده و این امر نشانگر درصد مرگ و میر بالای سلول‌ها در این توده‌ها در مراحل پیش کشت و کشت است.



شکل۵- (بالا) نمودار استاندارد (پایین) تخمین مرتبه تکثیر سلولی توده‌ها در طول مرحله کشت

[Downloaded from ijdld.tums.ac.ir on 2025-02-07]

بحث

با توجه به اهمیت توده‌های سلولی در مطالعات اخیر مهندسی بافت به عنوان واحدهای ساختاری تشکیل دهنده بافت‌ها، استفاده از یک روش مناسب آزمایشگاهی که بتواند توده‌های سلولی مورد نیاز با ویژگی‌های بهینه برای کاربرد در این زمینه را فراهم کند، در مطالعات مرتبط با مهندسی بافت ضروری به نظر می‌رسد؛ چنانچه فناوری‌های نوین مهندسی بافت مانند چاپ زیستی از توده‌های سلولی به جای سوسپانسیون‌های سلولی استفاده نموده و در مقایسه با آن، موفقیت‌های بیشتری را در شبیه‌سازی عملکرد و شرایط بافت‌های طبیعی بدن گزارش نموده‌اند.

در این مطالعه با مقایسه دو روش آزمایشگاهی ساده و در دسترس (CT وHD)، سعی بر ارزیابی روش‌ها در توانایی تهیه توده‌هایی یکنواخت و با قابلیت کنترل پذیری ابعادی، زیست‌پذیری قابل قبول و برهمکنش مناسب با بسترهای کشت شده است. علاوه بر این، بهینه‌سازی پارامترهای موثر مانند چگالی سلولی اولیه و زمان پیش کشت، علاوه بر نوع روش، مورد توجه قرار گرفته است. با توجه به داده‌های حاصل از این مطالعه، ابعاد مناسب توده‌های به دست آمده درمطالعه ما در همان محدوده ذکر شده توسط سایر مطالعات می‌باشد و روش HD کنترل‌پذیری بهتری نسبت به لحاظ ابعاد توده‌های به دست آمده فراهم می‌کند. هرچند این روش نیازمند دقت بیشتر در جابه جایی پلیت‌های کشت حین قطره‌گذاری و انتقال به انکوباتور است. همچنین دسترسی به توده‌های نهایی در روش لوله مخروطی، در مرحله جمع‌آوری توده‌ها آسان‌تر است. نتایج حاکی است که توده‌های به دست آمده از روش CT، در شرایط یکسان زمان و چگالی سلولی اولیه، ابعاد کوچک‌تری دارند و فشردگی و بر همکنش سلول- سلول، بیشتر است و در نتیجه سرعت توسعه سلولی بر روی بستر کشت کمتر است. اما کنترل‌پذیری ابعاد توده در روش قطره معلق، بیشتر است. به طور کلی، توده‌های سلولی سه بعدی در برهمکنش با محیط و سطوح مناسب چسبنده سلولی مانند داربست‌ها قادر به چسبیدن و تکثیر و توسعه سلولی هستند و این امر در توده‌هایی با ابعاد کوچک‌تر و چگالی سلولی اولیه کمتر، به طور چشم‌گیری قابل مشاهده است. در نهایت هر دو روش، روش‌های کاربردی جهت تهیه توده‌های سلولی می‌باشند اما روش قطره معلق، قادر به تولید توده‌هایی با ویژگی‌های مطلوب‌تر است.

سپاسگزاری

پژوهش حاضر با حمایت مالی مرکز تحقیقات غدد و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام شده است. پژوهشگران مطالعه حاضر بر خود لازم می دانند از جناب آقای دکتر باقر لاریجانی ریاست محترم این مرکز تشکر نمایند.

مأخذ

1. Niklason L, Langer R. Prospects for Organ and Tissue Replacement. *Journal of American Medical Association* 2001; 285: 573- 76.
2. Bonassar L, Vacanti C. Tissue engineering: the first decade and beyond. *Journal of Cellular Biochemistry Supplements* 1998; 30: 297–303.
3. Ingber DE, Mow VC, Butler D, Niklason L, Huard J, Mao J, Yannas I, et al. Tissue Engineering and Developmental Biology: Going Biomimetic. *Tissue Engineering* 2006; 12:3265-83.
4. Mironov V, Visconti RP, Kasyanov V, Forgacs G, Drake CJ. Markwald R. Organ printing: Tissue spheroids as building blocks. *Biomaterials* 2009; 30: 2164–2174.
5. Tsang V L, Bhatia S. Three-dimensional tissue fabrication. *Advance Drug Delivery* 2004; 56: 1635-47.
6. Mironow V, Markwald R, Forgacs G. Organ printing: Self Assembling Cell Aggregate as Bioink. *Science & Medicine* 2003; 9: 69-71.
7. Jakab K, Neagu A, Mironow V, Forgacs G. Organ printing: Fiction or science. *Biorheology* 2004; 41: 371–375.
8. Jakab K, Neagu A, Mironow V, Markwald R, Forgacs Gabor. Engineering biological structures of prescribed shape using self-assembling multicellular systems. *PNAS* 2004; 101: 2864–69.
9. Boland T, Mironov V, Gutowska A, Roth E, Markwald R. Cell and Organ Printing 2: Fusion of Cell Aggregates in Three-Dimensional Gels. *The Anatomical Record Part A* 2003; 272: 497–502.
10. Lin RZ, Chang HY. Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for

[Downloaded from ijdld.tums.ac.ir on 2025-02-07]

biomedical research. *Biotechnology Journal* 2008; 3: 1172–84.
11. Nakamura M, Kobayashi A,Takagi F, Watanabe A, Hiruma Y, Ohuchi K, et al. Biocompatible Inkjet Printing Technique for Designed Seeding of Individual Living Cells. *Tissue Engineering* 2005; 11:1658- 66.
12. Ryan P L, Foty R A, Kohn J, Steinberg M S. Tissue spreading on implantable substrate is a competitive outcome of cell-cell vs. cell-substratum adhesivity. *PNAS* 2001; 98:4323-27.
13. Rago A P., Dean D M., Morgan J. Controlling Cell Position in Complex Heterotypic 3D Microtissues by Tissue Fusion. *Biotechnology and Bioengineering* 2009; 102: 1231-41.

[Downloaded from ijdld.tums.ac.ir on 2025-02-07]