Research Paper

The effect of platelet gel-containing culture medium on the viability and expression of PAX6 and RPE65 genes in human retinal pigment epithelial cells

Maryam Amin[1], Masoud Soleimani[1*], Mojgan Rezaie Kanavi[2], Reihane Ghasemitarei[3]

1. Department of Hematology, School of Medicine, Tarbiyat Modares University, Tehran, Iran
2. Ocular Tissue Engineering Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
3. Department of Physiology, School of Medicine, Shahed University, Tehran, Iran

*** Corresponding author e-mail: solei_m@modares.ac.ir**

Citation: Amin M, Soleimani M, Rezaie Kanavi M, Ghasemitarei R. The effect of platelet gel-containing culture medium on the viability and expression of PAX6 and RPE65 genes in human retinal pigment epithelial cells. Daneshvar Medicine 2020; 28(4):1-9.

Abstract

Background and Objective: Degradation of human retinal pigment epithelium (hRPE) during some disorders such as aging is associated with severe impairment of ocular optical receptor function. Cellular and tissue transplantation of RPE layer is one of the treatment options that has been considered in recent years. The use of platelet gel has shown beneficial effects on the growth of various cultured cells.This study was conducted to investigate the effects of three different concentrations of platelet gel on the viability and the expression of PAX6 and RPE65 genes of cultivated RPE cells.

Materials and Methods: hRPE cells extracted from the human eye were cultured in plates containing platelet gel (PL) of different concentrations (10%, 20%, and 30%). Cells viability was tested by MTT test and the expression RPE65 and PAX6 genes were analyzed by using real time PCR. The number of expression changes of each gene in different treatments compared to the control and according to the internal GAPDH gene was calculated according to the 2-ΔΔCt method and the results were compared with each other in a bar chart.

Results: After 7 days, cultivated hRPE cells in culture media containing 30% PL showed a high rate of viability in comparison with those cultured in 10% PL ($P<0.05$). RPE65 gene expressions in cell cultures treated with 20% and 30% PL were higher than controls ($P<0.05$). However, there was no significant difference in the expression of PAX6 gene between the cell cultures treated with 20% and 30% platelet gels.

Conclusion: our results showed that using platelet gels in hRPE cell cultures can improve cell viability and identity, which can be promising for optimizing future clinical cell therapy strategies.

Keywords: PAX6, PRE65, Platelet gel, Retinal Pigmented Epithelium (RPE), PCR

Received: 9 June 2020
Last revised: 23 Sep 2020
Accepted: 10 Oct 2020

مقاله پژوهشی

بررسی تأثیر استفاده از محیط کشت حاوی ژل پلاکتی در سلامت سلولی و بیان ژن‌های PAX6 و RPE65 در سلول‌های رنگ‌دانه دار شبکیه انسان

نویسندگان: مریم امین[۱]، مسعود سلیمانی[۱*]، مژگان رضایی کنویی[۲]، ریحانه قاسمی طرئی[۳]

۱. گروه هماتولوژی آزمایشگاهی و بانک خون، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۲. مرکز تحقیقات مهندسی بافت چشم، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
۳. گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران

*نویسنده مسئول: مسعود سلیمانی **Email: solei_m@modares.ac.ir**

دریافت: ۱۳۹۹/۰۳/۲۰
آخرین اصلاح‌ها: ۱۳۹۹/۰۷/۰۲
پذیرش: ۱۳۹۹/۰۷/۱۹

چکیده

مقدمه و هدف: تخریب اپیتلیوم رنگ‌دانه دار شبکیه انسان (hRPE) در خلال برخی اختلالات از جمله افزایش سن با تضعیف شدید در عملکرد گیرنده‌های نوری چشم همراه است. پیوند سلولی و بافتی لایه RPE از گزینه‌های درمانی است که در سال‌های اخیر مورد توجه قرار گرفته است. استفاده از ژل پلاکتی تأثیرات مفیدی بر رشد سلول‌های مختلف کشت داده شده نشان داده است. این مطالعه به منظور بررسی تأثیر سه غلظت مختلف ژل پلاکتی بر زنده ماندن و بیان ژن‌های PAX6 و RPE65 سلول‌های اپیتلیال رنگی شبکیه انسانی کشت شده (hRPE) انجام شد.

مواد و روش ها: سلول های hRPE استخراج شده از چشم انسان در صفحات حاوی ژل پلاکت (PL) با غلظت‌های مختلف (۱۰٪، ۲۰٪ و ۳۰٪) کشت داده شدند. زنده ماندن سلول‌ها با آزمون MTT مورد آزمایش قرار گرفت و بیان ژن های RPE65 و PAX6 با استفاده از روش Real-PCR انجام شد. نتایج با نمونه کنترل کشت داده شده در FBS مقایسه گردید. میزان تغییرات بیان هر ژن در تیمارهای مختلف نسبت به کنترل و با توجه به ژن داخلی GAPDH بر طبق روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ مقایسه شد و نتایج به دست آمده در قالب نمودار ستونی با یکدیگر مقایسه شدند.

نتایج: هفت روز پس از شروع کشت عملکرد و رشد سلول های RPE بصورت معنی داری ($P<0/05$) در ژل ۳۰٪ پلاکتی بالاتر از ژل پلاکتی ۱۰٪ بود. بیان ژن RPE65 نیز در کشت های تیمار شده با ژل ۲۰ و ۳۰٪ بصورت معنی داری ($P<0/05$) بیشتر از کشت های حاوی ژل سرم گاوی بود، اما تفاوت آماری از نظر بیان ژن PAX6 بین نمونه های کشت داده شده در درصد های مختلف از ژل مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری: مطالعه حاضر نشان داد که استفاده از ژل پلاکتی سبب بهبود ماندگاری و حفظ ماهیت سلول‌های RPE کشت داده شده می‌شود. نتایج این مطالعه برای بهینه سازی برنامه ریزی سلول درمانی در آینده امیدوارکننده است.

واژه های کلیدی: PAX6، RPE65، ژل پلاکتی، اپیتلیوم رنگدانه دار شبکیه، PCR

مقدمه

فتورسپتورهای مخروطی و استوانه‌ای، بر روی یک لایه اپیتلیوم رنگدانه‌دار (Retinal Pigment Epithelium, RPE) واقع شده‌اند (۱). سلول‌های RPE با داشتن میکروویلی‌های تخصص یافته با فتورسپتورها در ارتباط بوده و سلول‌های بینایی شبکیه را از طریق رگ‌های خونی شبکه کوروئید غذادهی و حمایت می‌کنند (۲،۳). علاوه بر این رنگ‌دانه موجود در این سلول‌ها کار جذب نور پخش شده در چشم را نیز انجام می‌دهد (٤). اعمال دیگری از جمله کمک به بازسازی فتورسپتورها و حفاظت از آن‌ها در برابر رادیکال‌های آزاد نیز به این سلول‌ها نسبت داده شده است (٥،٦).

افزایش سن می‌تواند سلامت و عملکرد این لایه سلولی را تحت تأثیر قرار دهد به نحوی که گاهی صدمات غیر قابل جبران در لایه RPE ایجاد می‌گردد (۷). لایه RPE مسن سالانه در حدود ٪۳ سلول های خود را از دست می‌دهد که این مسئله می‌تواند سبب افزایش بار متابولیکی بر سایر سلول‌ها شود (۷). این تغییرات در قالب بیماری‌های چشمی همچون دژنراسیون وابسته به سن ماکولا (Age-related Macular Degeneration, AMD) مشاهده می‌گردد (۸). بیماری AMD بسیار شایع بوده و با تأثیرگذاری چشمگیر بر کیفیت زندگی افراد هزینه‌های بسیاری بر جوامع تحمیل کرده است (۹).

از میان گزینه‌های درمانی پیشنهاد شده در درمان بیماری AMD، سلول درمانی یا پیوند سلول‌های اتولوگ و همولوگ تأثیرات مفید قابل قبولی را همراه با افزایش کیفیت بینایی افراد نشان داده است (۱۲-۱۰). از جمله چالش‌های موجود در این روش‌های درمانی استفاده از محیط کشت مناسبی است که قابلیت لازم برای رشد مناسب این سلول‌ها را فراهم کند. پلاکت‌ها در بدن با داشتن فاکتورهای مختلف از جمله فاکتور رشد پلاکتی در ترمیم بافت های آسیب دیده نقش ایفا می‌کنند (۱۳). تأثیر مفید این فاکتورها در درمان زخم‌های فشاری و زخم‌های دیابتی نشان داده شده است (١٤،١٥). این اثرات موجب شده که مواد حاصل از پلاکت‌ها در قالب ژل پلاکتی به وفور در کشت سلول مورد استفاده قرار گیرند.

ژل پلاکتی حاوی میزان بالایی از پلاکت است که علاوه بر ساخت فاکتور رشد پلاکتی، تعداد زیادی پروتئین از جمله TGF[1]،EGF[2]،IGF[3]،PAF[4] و سایتوکاین‌های مختلف ساخته و به محیط کشت آزاد می کند (١٦،١٧). این فاکتورها با تعدیل عملکرد سیستم ایمنی و نیز بهبود فرایند رشد و ترمیم زخم، کارایی روش‌های درمانی پیوند بافت و پیوند سلول را افزایش می دهند (١٨،١٩). مطالعات اخیر عمدتاً معطوف به استفاده از محیط کشت‌های حاوی سرم گاو (FBS) بوده‌اند و بنابراین با توجه به موارد گفته شده نیاز به مطالعاتی است که تأثیرات استفاده از ژل‌های پلاکتی به عنوان جایگزین بالقوه‌ای برای سایر محیط‌های کشت در تکثیر سلول‌های چشمی انجام شود. مطالعه حاضر توانایی رشد و عملکردهای بیولوژیک و متابولیک سلول‌های RPE را در غلظت‌های مختلف ژل پلاکتی مورد بررسی قرار می‌دهد.

مواد و روش ها

گلوب چشم اهدا شده از نوزادان فوت شده زیر یک سالی (٦ الی ٨ ماهه) که حداکثر ٢٤ ساعت از تاریخ فوتشان گذشته بود تحت شرایط استریل از بانک چشم جمهوری اسلامی ایران به آزمایشگاه مرکز تحقیقات چشم دانشگاه شهید بهشتی منتقل گردید. این مطالعه مطابق با تأییدیه کمیته اخلاق مرکز تحقیقات چشم دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی و دانشگاه تربیت مدرس تهران به شماره نامه ۵۲/۱۸۳۳ د انجام شده است.

جداسازی سلول‌های رنگ‌دانه دار و کشت سلول‌ها

بطور خلاصه در زیر هود میکروبیولوژی و بصورت استریل، با استفاده از تیغ جراحی شکافی در ناحیه قدامی چشم ایجاد شده و محتویات درون چشم تخلیه شد. سپس

[1] Tumor growth factor
[2] Epidermal growth factor
[3] Insulin-like grow factor
[4] Platelet activated factor

کره چشم کاملاً باز شده و لایه سفید رنگ مرکزی که شامل سلول های عصبی شبکیه بود برداشته شد. لایه قهوه‌ای رنگ زیرین که شامل لایه سلول های RPE و شبکه عروقی چشم یعنی مشیمیه بود با بافر PBS 1X شست و شو شده و از صلبیه جدا شد. این لایه به تکه‌هایی در ابعاد کوچک قطعه قطعه شدند و لوله حاوی ml ۵-۳ آنزیم دیسپاز (۱/۱ واحد بر میلی لیتر، Gibco، آلمان) که با گذشتن از فیلتر µm 2/0 استریل شده بود، منتقل شد. این مخلوط بافت و آنزیم، به مدت ۵۰ دقیقه اینکوبه (۳۷°C، CO2 ۵٪، O2 ۹۵٪) گردید. پس از این مرحله مخلوط حاصل به مدت ۵ دقیقه با دور ۳۰۰×g سانتریفیوژ (Ependorf، آلمان) شده و رسوب بدست آمده در فلاسک‌های $۲۵cm^2$ حاوی DMEM/F12 و نیز ۲۰٪ FBS کشت داده شدند. کشت های سلول RPE معمولاً هر ۵-۳ روز یک بار با محیط FBS 10٪ تعویض محیط شدند و سلول ها پس از پر کردن ۹۰٪-۸۰٪ از سطح مورد کشت، در سطحی معادل ۳ برابر سطح اولیه پاساژ داده شدند. کشت های حاصله از پاساژ های ۵-۳ جهت انجام آزمایش های بعدی مورد استفاده واقع شدند.

تهیه ژل پلاکتی و تیمار سلول‌ها

به منظور تهیه پلاسمای غنی از پلاکت از نمونه خون اهدایی یک داوطلب استفاده شد که در دمای ۲۵ درجه به مدت ۱۰ دقیقه با دور rpm ۸۸۰ سانتریفیوژ شده بود. محدوده تعداد پلاکت نمونه ها پس از جدا شدن و مخلوط کردن این نمونه های نرمال بین L/۲۰۰۰۰۰ تا L/۲۵۰۰۰۰ بود. پلاسمای غنی از پلاکت در سه غلظت متفاوت (۱۰٪، ۲۰٪ و ۳۰٪) به چاهک‌های یک پلیت ۹۶ خانه اضافه شده و به هر چاهک ترومبین به منظور فعال کردن پلاکت و نیز مخلوطی از ۱۰۰۰ سلول RPE کشت شده که قبلاً در ژل حاوی DMEM مخلوط و به مدت یک ساعت اینکوبه شده بودند اضافه گشت و در اینکوباتور حاوی ۵ درصد CO_2 در دمای ۳۷ درجه کشت داده شدند. از ژل ۲۰٪ FBS به عنوان نمونه کنترل و برای مقایسه با ژل‌های پلاکتی استفاده شد. نمونه ها پس از ۲٤، ٤۸، ۷۲ ساعت از لحاظ رشد سلول های RPE با میکروسکوپ نوری معکوس بررسی شده و پس از ۷ روز تیمار در انکوباتور جهت استخراج RNA مورد استفاده قرار گرفتند. شمارش سلول‌ها با استفاده از لام نئوبار انجام می‌گرفت. در نهایت تعداد به دست آمده در $۱۰^۵$ و ضریب رقت هنگام مخلوط کردن سلول با محیط کشت ضرب شد.

ایمونوسیتوشیمی (Immunocytochemistry, ICC)

به منظور بررسی وجود سلول‌های RPE از بیان مارکرهای RPE65 (اختصاصی سلول‌های RPE) و سایتوکراتین (مارکر سلول‌های اپیتلیال) استفاده گردید. بدین منظور در هر خانه از یک پلیت ٢٤ خانه که قبلاً به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه توسط PBS پوشش دار شده بود یک لامل استریل قرار داده شده و ml ۱ محیط FBS ۱۰٪ حاوی $۱×۱۰^۵$ سلول RPE در پاساژهای سه تا ۵ اضافه می شد. پلیت حاوی سلول‌ها در دمای ۳۷ درجه کشت گردید. پس از گذشت هفت روز از شروع کشت، محیط رویی هر خانه تخلیه شده و توسط ۰/۵ میلی لیتر PBS شستشو داده می شد. سپس ۰/۵ میلی لیتر متانول سرد (۱۰°C-) (Merck، آلمان) به هر خانه اضافه شده و پس از ۵ دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق لامل ها خشک شدند. با شستشوی مجدد لامل ها توسط PBS، ۰/۵ میلی لیتر آلبومین گاوی (Merck، آلمان) به عنوان محلول بلاکینگ به هر خانه افزوده شده و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق انکوباسیون انجام شد. پس از شست و شوی مجدد، ۰/۵ میلی لیتر آنتی بادی اولیه مربوط به شناساگرهای RPE65 (Rabbit polyclonal antibody) و Cytokeratin 8/18 (Mouse monoclonal antibody) (هر دو آنتی بادی SANTA CRUZ ، آمریکا) به هر خانه افزوده شده و ٦۰ دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق انجام گرفت. پس از شست و شوی مجدد به مدت ۵ دقیقه، ۰/۵ میلی لیتر محلول آنتی بادی های ثانویه شامل آنتی بادی های کونژوگه با Fluorescein isothiocyanate (FITC) (Donkey anti-goat IgG-FITC conjugated، Goat anti-rabbit IgG-FITC conjugated و Goat anti-mouse IgG-FITC conjugated) (همگی Santa Cruz ، آمریکا) به هر خانه اضافه شده و ٤۵ دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق و در تاریکی انجام شد. در نهایت پس از شست و شوی مجدد و افزودن ۰/۵ میلی لیتر محلول DAPI/PBS به هر خانه و ۱۰ دقیقه

انکوباسیون در تاریکی اسلاید ها آماده‌سازی شده و عکس برداری با میکروسکوپ فلورسانس انجام شد.

بررسی سلامت سلول‌ها با استفاده از تست MTT

به منظور ارزیابی عملکرد سلول‌ها، در یک پلیت ۹۶ خانه، به هر چاهک که از قبل با مخلوط ۲۰۰ میکرولیتری از ژل‌های پلاکتی و یا FBS همراه با هزار سلول از لایه رنگ‌دانه دار شبکیه پر شده و به مدت ۱، ۳ یا ۷ روز اینکوبه شده بود، به میزان ده درصد از حجم اولیه 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-di-phen yltetrazolium bromide (MTT) (Sigma-Aldrich، آلمان) اضافه شد. محیط کشت پس از این مرحله چهار ساعت اینکوبه شده و پس از این زمان محیط کشت و MTT تخلیه شده و به هر چاهک ۱۰۰ میکرو لیتر DMSO اضافه شد. در آخرین مرحله جذب در هر چاهک با استفاده از روش الایزا در طول موج ۵۴۰ نانومتر خوانده شد (از دو چاهک حاوی DMSO به عنوان بلانک استفاده شد).

سنتز cDNA و PCR

در مطالعه حاضر بیان دو ژن RPE65 و PAX6 به عنوان ژن‌های با اهمیت در سلول‌های RPE مورد بررسی قرار گرفته است. PAX6 یک فاکتور رونویسی است که در رشد و تکامل ساختارهای چشمی نقش داشته و جهش در ژن سازنده آن در برخی اختلالات بینایی مشاهده میگردد (۲۰، ۲۱). جهت سنجش کمی بیان ژن های RPE65,PAX6 و GAPDH از طریق Real-Time PCR، پس از طراحی پرایمرها به منظور تهیه cDNA از mRNA های استخراج شده از سلول های RPE از روش Oligo-dT و مسترمیکس Master plus SYBR Green، (آلمان) استفاده شد. روش PCR مورد استفاده در این مطالعه شامل یک سیکل ۶۰ ثانیه ای اولیه به منظور دناتوره سازی در دمای ۹۵ درجه، ۴۰ سیکل تکثیری با شروع در دمای ۹۵ درجه، ۱۵ ثانیه در دمای ۵۸ درجه و ۱۲ ثانیه در دمای ۷۲ درجه و ایجاد منحنی ذوب با شروع در دمای ۹۵ درجه و ۱۵ ثانیه در دمای ۶۵ درجه و سپس افزایش مجدد به دمای ۹۵ درجه و سپس سیکل خنک سازی به دمای ۴۰ درجه بود. برای هر یک از دو ژن مطالعه در هر یک از شرایط تحت مطالعه (غلظت‌های ژل پلاکتی متفاوت و نیز در سرم جنین گاوی)، منحنی های استاندارد تهیه شده و بیان هر یک از دو ژن با استفاده از بیان ژن GAPDH نرمالیزه شد. با استفاده از شیب به دست آمده از منحنی استاندارد، کارایی یا Efficiency مربوط به عملکرد پرایمر برای هر ژن محاسبه گردید.

آنالیز داده ها

Threshold cycle یا Crossing point به دست آمده برای هر ژن در تست های مربوط به تیمارهای مختلف در نرم افزار Relative Gene Expression Quantitation (BioRad) وارد شد و میزان تغییرات بیان هر ژن در تیمار های مختلف نسبت به کنترل و با توجه به ژن داخلی GAPDH بر طبق روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ محاسبه شد و نتایج به دست آمده در قالب نمودار ستونی با یکدیگر مقایسه شدند. مقدار $P<0.05$ از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

بررسی مورفولوژیک و ایمونوسیتوشیمی سلول‌های RPE

بررسی مورفولوژیک سلول‌های کشت داده شده نشان دهنده افزایش تعداد و نیز افزایش طول این سلول‌ها در کشت‌های مختلف مورد استفاده بود (شکل ۱). در مطالعه حاضر برای اثبات هویت سلول های موجود در کشت، دو فاکتور RPE65 و Cytokeratin 8/18 که به ترتیب اختصاصی سلول‌های RPE و سلول‌های اپیتلیال بودند از طریق ایمونوسیتوشیمی مورد بررسی قرار گرفتند. اختصاصی بودن پیوند آنتی بادی-آنتی ژن با در نظر گرفتن نمونه های کنترل (بدون آنتی بادی اولیه) مورد تائید قرار گرفت، همچنین میزان اتوفلوروسنس سلول ها با نمونه های بدون آنتی بادی به عنوان کنترل مورد سنجش قرار گرفت (شکل ۲). استفاده از این روش وجود و سلامت سلول‌های RPE را در کشت سلول‌های انجام شده به اثبات رسانید (شکل ۳).

بررسی زنده مانی سلول‌ها (تست MTT)

با توجه به شکل ٤ مقایسه میزان زنده مانی سلول های RPE کشت داده شده در غلظت های مختلف ژل پلاکتی توسط آزمون غیر پارامتری کروسکال والیس تفاوت معنی داری را در روزهای اول، سوم و هفتم پس از شروع کشت در مقایسه با سلول‌های کشت داده شده در FBS ۲۰ ٪ نشان نداد و تن‌ها میزان زنده مانی سلول ها در ژل پلاکتی

۳۰٪ در مقایسه با ژل پلاکتی ۱۰٪ در روز هفتم افزایش معنی داری (P< ۰/۰۵) را نشان داد.

بررسی بیان ژن های PAX6 و RPE65

بیان دو ژن RPE65 و PAX6 در سلول‌های کشت داده شده در ژل‌های ۱۰٪، ۲۰٪ و ۳۰٪ در مقایسه با میزان بیان این ژن ها در کشت حاوی FBS ۲۰ ٪ توسط t test مقایسه شد (شکل ۵). در دو ژل پلاکتی ۲۰ و ۳۰ درصد افزایش معنی داری (P<۰۵) در بیان ژن RPE65 در مقایسه با کشت سلول‌ها در FBS ۲۰ ٪ مشاهده گردید. با این حال هیچگونه تغییر معنی داری در بیان ژن PAX6 در غلظت های مختلف ژل پلاکتی مشاهده نشد.

بحث

خصوصیات و ویژگی های سلول های RPE به طور کامل و با جزئیات در گزارشات متعدد مورد مطالعه و بررسی قرار گرفته است (۱،۶،۷). بر اساس این منابع، این سلول ها دارای قابلیت استفاده کلینیکی در درمان بیماری های شبکیه و نیز بیماری های درگیر کننده لایه RPE مانند AMD بوده و از این جهت مورد توجه محققان قرار گرفته‌اند. روش‌های متعددی برای جداسازی سلول‌ها از چشم و نیز کشت آن‌ها در محیط های مختلف ابداع و مورد آزمایش و مقایسه قرار گرفته است. از این میان افزایش رشد و چسبندگی سلول‌های RPE در کشت‌های بیولوژیکی مانند کشت‌های حاوی پلی لاکتیک اسید و نیز کلاژن تیپ ٤ بدرستی بیانگر این امر می‌باشد که استفاده از ترکیبات زیستی در کشت سلول‌های بنیادی چشم مؤثر بوده و لذا می تواند کاندیدی برای جایگزینی سرم جنین گاوی باشد (۲۲،۲۳). از آنجاکه استفاده از FBS در طی کشت و تکثیر تمایز سلول‌ها با خطر انتقال عفونت‌های ویروسی و میکروبی و بیماری پریون و به دلیل داشتن پروتئین‌های گاوی در انسان با پاسخ ایمنی همراه بوده است جایگزینی کشت‌های مرسوم در درمان اختلالات ذکر شده می‌تواند موفقیت درمان را افزایش دهد (۲٤،۲۵).

در مطالعه حاضر از ترومبین جهت تحرک و فعال‌سازی پلاکت‌ها استفاده شده است. جهت اطمینان از اثر ترومبین در فعال کردن پلاکت‌ها میزان ترومبین ثابت در نظر گرفته شد. مطالعات قبلی نشان داده‌اند که غلظت‌های بالای ترومبین (۱٤۲ اکی والان بر میلی لیتر) دارای اثر فوری و قابل ملاحظه ای در افزایش غلظت فاکتورهای رشد پلاکتی از جمله: BFGF[1]، TGF- β [2] و PDGF-B[3] است (۲٦). لذا جهت ایجاد بهترین شرایط برای ژن پلاکتی، در این تحقیق سعی بر آن شده تا در کلیه پاساژها و درصدهای مختلف مقدار ترومبین ثابت در نظر گرفته شود تا اثر همپوشانی ژل بر سلول ها در غلظت های مختلف و مقایسه آن با سرم جنین گاوی بطور یکسانی بررسی گردد. در کنار این نکته، داده‌های بدست آمده از مطالعه حاضر نشان داد که اثر ژل پلاکتی در پیشبرد رشد، قوی‌تر از اثر تحریکی محیط کشت سلولی حاوی FBS می‌باشد و نیز تغییرات غلظت ژل پلاکتی در رشد و تمایز سلول‌ها تأثیرگذار می‌باشد. در این راستا مطالعه هانیس ورد و همکاران نیز در سال ۲۰۰۲ نشان داد که تکثیر و تمایز سلول‌های مزانشیمی وابسته به غلظت پلاکت می‌باشد (۲۷).

در مطالعه حاضر بیان مارکرهای اختصاصی RPE65 و cytokeratin 8/18 در سلول‌های کشت داده شده در حضور ژل پلاکتی در غلظت‌های مختلف نشان داد که این سلول‌ها ویژگی ایمونوفنوتیپیک خود را در محیط کشت حاوی ژل پلاکتی حفظ می‌کنند. نتایج نهایی مطالعه حاضر نشان دهنده تفاوت معنادار در بیان ژن RPE65 در سه غلظت نسبت به کنترل می‌باشد، اما تفاوت آماری معنادار در بیان ژن PAX6 بین نمونه‌های کشت داده شده در درصدهای مختلفی از ژل مشاهده نشد. با پذیرفتن این نتیجه می‌توان دریافت که استفاده از ژل پلاکتی نه تنها می‌تواند کمک زیادی در کاهش انتقال آلودگی با پاتوژن‌های گاوی و پاسخ ایمنی ناشی از آن کند بلکه ضمن کاهش هزینه‌های کشت سلول با حذف FBS، یک منبع اتولوگ، ایمن و ارزان قیمت را فراهم می‌کند که رشد بیشتر سلول‌های RPE را نیز امکان‌پذیر می‌کند. با این حال، مطالعات بیشتری مورد نیاز است تا مکانیسم تأثیرات پلاکت بر رشد بیشتر سلول‌های RPE در مقایسه با FBS روشن شده و فاکتورهای پلاکتی مسئول این تغییرات شناخته شوند.

[1] Basic fibroblast growth factor
[2] Tumor growth factor beta
[3] Platelet drived growth factor

نتیجه گیری

ژل پلاکتی نه تنها قادر است بعنوان جایگزین FBS در نگهداری سلول‌های زنده بکار رود بلکه نقش حمایتی مهمی در رشد سلول های چشمی از جمله سلول‌های RPE ایفا می‌نماید. بن ابراین جایگزینی FBS با این محصول پلاکتی احتمالاً راهی ایمن‌تر و جدید در سلول درمانی بیماری‌های چشمی فراهم خواهد کرد.

جدای از نقش حفاظتی ژل پلاکتی همولوگ بعنوان بستر مناسب در حفظ و نگهداری سلول‌های چشم، ژل پلاکتی می تواند بصورت اتولوگ از بیمار جدا گردیده و بکار رود. بنابراین استفاده از این محصول بصورت اتولوگ خطر رد پیوند سلول‌های زنده در سلول درمانی را کاهش خواهد داد.

منابع

1. Mitchell P, Liew G, Gopinath B, Wong TY. Age-related macular degeneration. Lancet 2018;392(10153):1147-1159.

2. Binder S, Stolba U, Krebs I, Kellner L, Jahn C, Feichtinger H, et al. Transplantation of autologous retinal pigment epithelium in eyes with foveal neovascularization resulting from age-related macular degeneration: A pilot study. American Journal of Ophthalmology 2002;133(2):215-25.

3. Varey AH, Rennel ES, Qiu Y, Bevan HS, Perrin RM, Raffy S, et al. VEGF 165 b, An antiangiogenic VEGF-A isoform, binds and inhibits bevacizumab treatment in experimental colorectal carcinoma: balance of pro- and antiangiogenic VEGF-A isoforms has implications for therapy. British Journal of Cancer 2008;98(8):1366-79.

4. Arnhold S, Heiduschka P, Klein H, Absenger Y, Basnaoglu S, Kreppel F, et al. Adenovirally transduced bone marrow stromal cells differentiate into pigment epithelial cells and induce rescue effects in RCS rats. Investigative Ophthalmology and Visual Science 2006;47(9):4121-9.

5. Atmaca-Sonmez P, Li Y, Yamauchi Y, Schanie CL, Ildstad ST, Kaplan HJ, et al. Systemically transferred hematopoietic stem cells home to the subretinal space and express RPE-65 in a mouse model of retinal pigment epithelium damage. Experimental Eye Research 2006;83(5):1295-302.

6. Bates DO, Cui TG, Doughty JM, Winkler M, Sugiono M, Shields JD, et al. VEGF165b, an inhibitory splice variant of vascular endothelial growth factor, is down-regulated in renal cell carcinoma. Cancer Research 2002;62(14):4123-31.

7. Sussane Binder BVS, Ilse Krebs, Carl Glittenberg. Transplantation of the RPE in AMD. Progress in Retinal and Eye Research 2007;26:516-54.

8. Rashid A, Bhatia SK, Mazzitello KI, Chrenek MA, Zhang Q, Boatright JH, et al. RPE Cell and Sheet Properties in Normal and Diseased Eyes. Advances in Experimental Medicine and Biology 2016;854:757-63.

9. Gheorghe A, Mahdi L, Musat O. Age-related macular degeneration. Romanian Journal of Ophthalmology 2015;59(2):74-7.

10. Sharma R, Khristov V, Rising A, Jha BS, Dejene R, Hotaling N, et al. Clinical-grade stem cell-derived retinal pigment epithelium patch rescues retinal degeneration in rodents and pigs. Science Translational Medicine 2019;11(475).

11. Carl Sheridan,Yamini Krishna, Rachel Williams, Sharon Mason, David

Wong,Heinrich Heimann,David Kent &Ian Grierson . Transplantation in the treatment of age-related macular degeneration: past, present and future directions. Expert Review of Ophthalmology 2007;2:497-511

12. Schaumberg DA, Christen WG, Buring JE, Glynn RJ, Rifai N, Ridker PM. High-sensitivity C-reactive protein, other markers of inflammation, and the incidence of macular degeneration in women. Archives of ophthalmology (Chicago, Ill : 1960) 2007;125(3):300-5.

13. Ramaswamy Reddy SH, Reddy R, Babu NC, Ashok GN. Stem-cell therapy and platelet-rich plasma in regenerative medicines: A review on pros and cons of the technologies. Journal of oral and maxillofacial pathology : JOMFP 2018;22(3):367-74.

14. Chong RS, Osborne A, Conceicao R, Martin KR. Platelet-Derived Growth Factor Preserves Retinal Synapses in a Rat Model of Ocular Hypertension. Investigative ophthalmology & visual science 2016;57(3):842-52.

15. Del Pino-Sedeño T, Trujillo-Martín MM, Andia I, et al. Platelet-rich plasma for the treatment of diabetic foot ulcers: A meta-analysis. Wound Repair Regen 2019;27(2):170-182.

16. Harrison P, Cramer EM. Platelet alpha-granules. Blood reviews. 1993;7(1):52-62.

17. Gruber R, Karreth F, Frommlet F, Fischer MB, Watzek G. Platelets are mitogenic for periosteum-derived cells. Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society 2003;21(5):941-8.

18. Kinzebach S, Dietz L, Kluter H, Thierse HJ, Bieback K. Functional and differential proteomic analyses to identify platelet derived factors affecting ex vivo expansion of mesenchymal stromal cells. BMC cell biology 2013;14:48.

19. Piccin A, Rebulla P, Pupella S, Tagnin M, Marano G, Di Pierro AM, et al. Impressive tissue regeneration of severe oral mucositis post stem cell transplantation using cord blood platelet gel. Transfusion 2017;57(9):2220-4.

20. Li S, Goldowitz D, Swanson DJ. The requirement of pax6 for postnatal eye development: evidence from experimental mouse chimeras. Investigative ophthalmology & visual science 2007;48(7):3292-300.

21. Fernald RD. Eyes: variety, development and evolution. Brain, behavior and evolution 2004;64(3):141-7.

22. McUsic AC, Lamba DA, Reh TA. Guiding the morphogenesis of dissociated newborn mouse retinal cells and hES cell-derived retinal cells by soft lithography-patterned microchannel PLGA scaffolds. Biomaterials 2012;33(5):1396-405.

23. Fronk AH, Vargis E. Methods for culturing retinal pigment epithelial cells: a review of current protocols and future recommendations. Journal of tissue engineering 2016;7:2041731416650838.

24. Selvaggi TA, Walker RE, Fleisher TA. Development of antibodies to fetal calf serum with arthus-like reactions in human immunodeficiency virus-infected patients given syngeneic lymphocyte infusions. Blood 1997;89(3):776-9.

25. Doerr HW, Cinatl J, Sturmer M, Rabenau HF. Prions and orthopedic surgery. Infection 2003;31(3):163-71.

26. Martineau I, Lacoste E, Gagnon G. Effects of calcium and thrombin on growth factor release from platelet concentrates: kinetics and regulation of endothelial cell proliferation. Biomaterials 2004;25(18):4489-502.

27. Haynesworth SE, Kadiyala S, Liang L, Bruder SP. Mitogenic Sttimulation of Human Mesenchymal Stem Cells By Platelet Releasate Suggests a Mechanism for Enhancement of Bone repair by Platelet Concentrate. Transactions of the 48th Annual Meeting, Orthopaedic Research Society 272002.