

مطالعه‌ی اثر پلیمر پلی‌هما به عنوان بستر کشت سلولی بر روی رشد و حفظ ماهیت سلول‌های پوششی رنگدانه‌دار شبکیه‌ی چشم

فاطمه ناظم رعایا^۱، دکتر زهرا سهیلا سهیلی^۲، راضیه حیدری^۱، دکتر عبدالخالق دیزجی^۲، دکتر حمید احمدیه^۳، دکتر شهرام سمیعی^۴، ابوزر باقری^۱

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: سلول‌های پوششی رنگدانه‌دار شبکیه، نقشی اساسی در عملکرد طبیعی شبکیه دارند. ژن تیروزیناز با ساخت ملانین موجب پیگمانته شدن این سلول‌ها می‌شود. پلیمر پلی‌هما (Polymer Poly-HEMA یا ۲-Hydroxyethyl methacrylate) جزء اصلی ساختار لنزهای تماسی است. در مطالعه‌ی حاضر، اثر پلیمر پلی‌هما به عنوان بستر کشت سلولی بر روی رشد و حفظ ماهیت سلول‌های پوششی رنگدانه‌دار شبکیه‌ی چشم انسان بررسی شد.

روش‌ها: سلول‌های پوششی رنگدانه‌دار شبکیه، در پاساژ ۵-۲ بر روی پلیمر پلی‌هما (۱۲ mg/ml) تحت محیط FBS (Fetal bovine serum) ۱۰ درصد + DMEM/F۱۲ (Dulbecco's modified Eagle's medium) کشت شدند. مورفولوژی، زنده بودن سلول‌ها، تکثیر و مرگ سلولی در یک دوره‌ی زمانی مشخص بررسی شد. بیان نشانگر تیروزیناز در این سلول‌ها، توسط تکنیک Real time PCR (Real time polymerase chain reaction) بررسی شد.

یافته‌ها: سلول‌های کشت شده بر روی پلیمر، تعداد زیادی کلونی تشکیل می‌دهند که توانایی بازایی در محیط پلی‌استیرین را دارند. سلول‌های زنده بر روی سطح پلیمر و پلی‌استیرین مشابه هستند و مرگ سلولی بر روی پلیمر و پلی‌استیرین قابل چشم‌پوشی است، اما تکثیر سلولی در نمونه‌های پلیمر خیلی کمتر از پلی‌استیرین است. بیان ۴۳۴/۶۵ برابری ژن تیروزیناز در سلول‌های کشت شده بر روی پلیمر نسبت به پلی‌استیرین دیده شد.

نتیجه‌گیری: پلی‌هما یک پلیمر آب‌گریز است. وقتی سلول‌های پوششی رنگدانه‌دار شبکیه، بر روی پلیمر کشت می‌شوند، قادر به چسبیدن به سطح پلیت سلولی نیستند و کلونی‌های بزرگ تشکیل می‌دهند. پلیمر، القاکننده‌ی مرگ سلولی در این سلول‌ها نیست و تکثیر نیز به علت ممانعت تماسی سلول‌ها و یا عدم نفوذ Anti-Brdu به داخل کلونی‌های متراکم، کمتر از گروه شاهد است. بیان بالای RPE۶۵ Cytokeratin, Tyrosinase نشان می‌دهد که پلیمر با حفظ ماهیت این سلول‌ها به ایجاد بیشتر رنگدانه‌ی ملانین کمک می‌کند.

واژگان کلیدی: سلول‌های پوششی رنگدانه‌دار شبکیه‌ی چشم، پلیمر پلی‌هما، تیروزیناز

ارجاع: ناظم رعایا فاطمه، سهیلا سهیلی زهرا، حیدری راضیه، دیزجی عبدالخالق، احمدیه حمید، سمیعی شهرام، باقری ابوزر. مطالعه‌ی اثر پلیمر پلی‌هما به عنوان بستر کشت سلولی بر روی رشد و حفظ ماهیت سلول‌های پوششی رنگدانه‌دار شبکیه‌ی چشم. مجله دانشکده

پزشکی اصفهان ۱۳۹۳؛ ۳۲ (۳۰۰): ۱۴۶۰-۱۴۴۴

۱- کارشناس ارشد، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران

۲- استادیار، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران

۳- استادیار، مرکز تحقیقات چشم، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

۴- استادیار، سازمان انتقال خون، تهران، ایران

مقدمه

سلول‌های پوششی رنگدانه‌دار شبکیه‌ی چشم، سلول‌های چند وجهی قطبی هستند که از میلیون‌ها پیگمان تیره تشکیل شده‌اند. این سلول‌های قطبی، مانند سایر سلول‌های اپیتلیالی و همه‌ی اجزای سلولی، در امتداد یک محور رأسی پایه‌ای در طول سلول جایابی کرده‌اند. اتصالات محکم که لازمه‌ی تشکیل سد خونی شبکیه است، انتشار قطبی کانال‌های یونی و گیرنده‌های غشایی را در سطوح رأسی پایه‌ای کناری سلول رنگدانه‌دار شبکیه‌ی چشم تضمین می‌کند (۱).

سلول‌های رنگدانه‌دار شبکیه‌ی چشم، سازنده‌ی فوتو پیگمان‌ها هستند و در بازسازی پیگمان‌ها دخالت دارند. حضور گرانول‌های ملانین در ناحیه‌ی رأسی سلول‌های پوششی رنگدانه‌دار شبکیه‌ی چشم (به نام ملانوزوم) این سلول‌ها را رنگدانه‌ای می‌کند.

لیپوفوشین گرانول‌های اتوفلورسنت زرد مایل به قهوه‌ای است که مخلوطی از لیپید و ترکیبات فلورسنت است که در طی متابولیسم قطعات خارجی گیرنده‌های نوری به عنوان محصول جانبی غیر قابل تجزیه، تولید می‌شود. مهم‌ترین ترکیبات فلورسنت آن (A2E N-retinylidene-N-retinylethanolamine) از مشتقات ویتامین A است که تجمع آن آپوپتوز را در سلول‌های پوششی رنگدانه‌دار شبکیه‌ی چشم القا می‌کند. تراکم لیپوفوشین یکی از اولین تغییرات وابسته به سن است و به نظر می‌رسد یک محصول متابولیک دفعی حاصل از قطعات خارجی گیرنده‌ی نوری سلول‌های استوانه‌ای است (۲-۵).

بسیاری از فعالیت‌های سنتز ملانین و بلوغ، به احتمال زیاد تا سن دو سالگی کامل می‌شود و تولید مدام آن در طول زندگی یک مسأله‌ی بحث برانگیز

است. با این حال، به نظر می‌رسد که تخریب اکسیژن فعال در لیزوزوم‌ها با سنتز ملانین در ارتباط است. به هر حال، محتوای ملانین سلول‌های پوششی رنگدانه‌دار شبکیه‌ی چشم، با افزایش سن کاهش می‌یابد که خود ناشی از تخریب ناشی از اکسیداسیون می‌باشد؛ یک سری تغییرات وابسته به سن، در ملانین رخ می‌دهد که منجر به کاهش فعالیت آن می‌شود (۶).

ملانین در توسعه و تکامل شبکیه‌ی عصبی و فعالیت‌هایی مانند تولید رادیکال آزاد، پیوند شدن به بسیاری از مواد شیمیایی و داروها، به دام انداختن رادیکال آزاد و ممانعت از فعالیت آنتی‌اکسیدانی (۶-۷)، جذب طول موج‌های مختلف نور و ممانعت از بازتاب نور نقش دارد.

این سلول‌ها گرانول نور را جذب می‌کنند و دید را بهبود می‌بخشند. همچنین در تبدیل Trans به Cis۱۱ (در سیکل ویتامین A) دخالت دارند. گیرنده‌های نوری قادر به ایزومریزاسیون کردن مجدد رتینال تمام ترانس (تشکیل شده پس از جذب فوتون) به رتینال Cis۱۱ هستند. جهت تحریک گیرنده‌های نوری، رتینال وارد سلول‌های پوششی رنگدانه‌دار شبکیه‌ی چشم می‌شود و به Cis۱۱ رتینال ایزومریزه می‌گردد و در نهایت، به گیرنده‌ی نوری باز می‌گردد. این روند چرخه‌ی رتینال نام دارد (۲).

نشانه‌گرهای سلول‌های پوششی رنگدانه‌دار شبکیه‌ی

چشم

سلول‌های پوششی رنگدانه‌دار شبکیه‌ی چشم، سلول‌های اپیتلیالی هستند که بیان نشانگر اختصاصی سلول‌های اپیتلیالی (سایتوکراتین ۸/۱۸) و نشانگر مخصوص سلول‌های رنگدانه‌دار شبکیه‌ی چشم (RPE۶۵) برای شناسایی این سلول‌ها به کار می‌رود.

زیادی آب (حدود ۴۵ درصد) را دارد. آب فضای بین مولکولی، شبکه‌ی پلیمر را پر می‌کند. توانایی هیدروژل در جذب آب به عنوان سود این ماده در لانه‌گزینی بافت نرم است (۱۱). این هیدروژل منفذدار، می‌تواند به عنوان ماده‌ی زیستی اسفنج مانند در پیوند سنتتیک در تعمیر غضروف استخوان و دیگر بافت‌ها به کار رود (۱۳-۱۲).

این هیدروژل در شکل غلیظ در ساختار لنز نرم به کار می‌رود. به نقل از Seidel و Malmonge این پلیمر اولین بار توسط Wichterle به عنوان محتوای لنز مطالعه شد. حل این پلیمر در آب، اجازه‌ی تشکیل ساختار منفذدار را می‌دهد که میزان منافذ آن بستگی به میزان رقت دارد (۱۴، ۱۲).

پلیمر پلی‌هما در ساختار لنز به صورت Copolymer به کار می‌رود که ژل را نازک‌تر و جذب آب را بیشتر می‌کند. در نتیجه، این پلیمر به علت Copolymer شدن در ساختار لنز، خاصیت آب‌دوستی پیدا می‌کند (۱۵، ۱۰). این Copolymer زمینه‌ی ساخت اپی‌نفرین و ملانین را فراهم می‌کند و در نتیجه، جاذب نور مرئی و ماورای بنفش است. ارزش پلی‌هما به علت ماده‌ی سنتزی لنز تماسی و لنز کریستالین مصنوعی است که باعث محافظت چشم افرادی است که لنز خود را از دست داده‌اند. این پلیمر به دلیل سازگاری زیستی، غیر سمی بودن و کاربرد آن در ساختار لنز، مورد توجه محققین قرار گرفته است (شکل ۱) (۱۶).

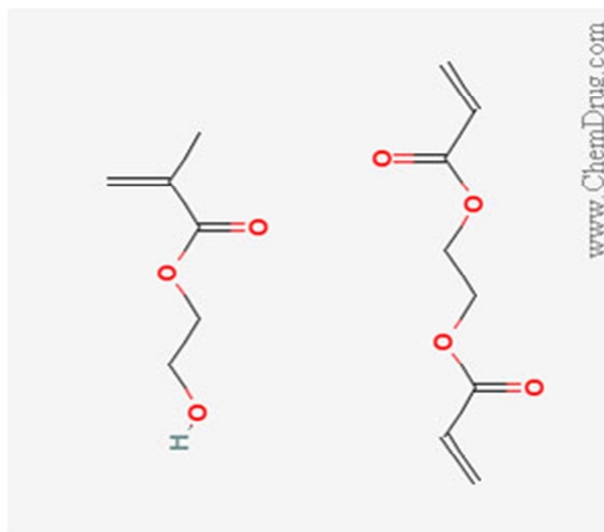
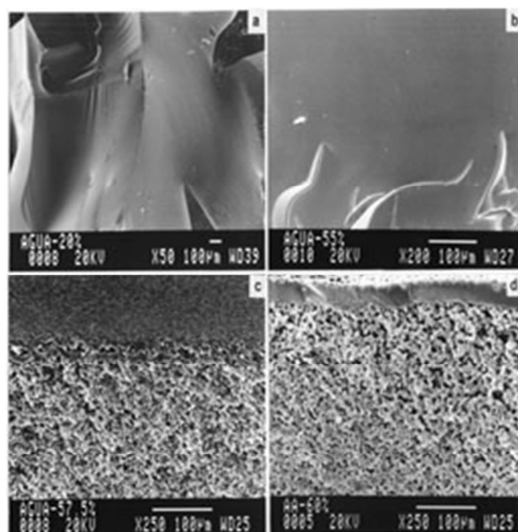
در این مطالعه، سلول‌های پوششی رنگدانه‌دار شبکیه‌ی چشم بر روی پلیمر پلی‌هما (به عنوان داربست سلولی) کشت داده شدند و FBS (Fetal Bovine Serum) به عنوان عامل رشد در

همچنین تیروزیناز به عنوان مونوفنول مونواکسیژناز شناخته شده است. این آنزیم با اکسیداسیون ترکیبات فنول‌دار (تیروزین و دوپامین) موجب ایجاد رنگدانه می‌گردد و در حیوانات و گیاهان با عمل اکسیداسیون خود، موجب تولید ملانین و دیگر پیگمان‌ها می‌شود که ایجاد کننده‌ی رنگ تیره در آن‌ها است (۷). در انسان این آنزیم توسط ژن TYR کد می‌شود. این ژن بر روی کروموزم ۱۱ قرار گرفته است و جهش در این ژن، باعث ایجاد آلبنیسم نوع ۱ می‌شود (۸). این آنزیم از نظر خصوصیت ساختاری توزیع در بافت و مکان سلولی در موجودات مختلف، متفاوت است. در انسان این آنزیم یک پروتئین درون غشایی است که به سمت ملانوزوم‌ها قرار می‌گیرد و سایت فعال آن در ملانوزوم است و قسمت کوچکی از پروتئین در سیتوپلاسم می‌آید (۹).

پلیمر پلی‌هما

پلیمر پلی‌هما (Poly-HEMA Polymer یا ۲-Hydroxyethyl methacrylate)، ماده‌ی غیر سمی استریل است که از واحدهای مونومری ۲-هیدروکسی اتیل متاکریلیت تشکیل شده است. پلیمر پلی‌هما دارای ساختار آب‌گریز است، در نتیجه سلول‌های آب‌دوست قادر به چسبیدن به سطح پلیمر نیستند و به صورت غیر چسبنده و معلق روی سطح این پلیمر قرار می‌گیرند. در واقع سلول‌ها در فضای سه بعدی محیط و پلیمر قرار می‌گیرند (۱۰).

شکل ساختاری این ماده، خصوصیت سطحی نشت‌ناپذیر واحدی به آن می‌دهد که مشابه به بافت زنده می‌شود. طبیعت ساختاری این هیدروژل، آب است که باعث خارج کردن واکنش‌های نامطلوب در حین تولید آن می‌شود. این پلیمر توانایی جذب مقدار



شکل ۱. نمای فیزیکی پلیمر پلی‌هما

خشک شود. به منظور استریل کردن، ظرف حاوی پلیمر به مدت ۳۰ دقیقه زیر نور ماورای بنفش قرار گرفت. در موقع استفاده از این پلیمر، سطح آن دو بار با PBS (Phosphate buffered saline) و یک بار با محیط DMEM/F۱۲ شستشو داده شد. بعد از این مراحل، امکان کشت سلول‌ها بر روی پلیمر فراهم شد.

جداسازی و کشت سلول‌های پوششی رنگدانه‌دار

شبکیه‌ی چشم

کره‌های چشم جدا شده از نوزادان فوت شده‌ی زیر یک سالی که حداکثر ۲۴ ساعت از تاریخ فوتشان گذشته بود، تحت شرایط استریل از بانک چشم جمهوری اسلامی ایران به آزمایشگاه بیوشیمی پژوهشکده‌ی ملی مهندسی ژنتیک و زیست فن‌آوری منتقل گردید.

پس از جداسازی بافت‌های چربی، لایه‌ی قهوه‌ای رنگ پیگمانته جدا شد و به تکه‌هایی در ابعاد کوچک قطعه قطعه گردید و به ۳-۵ ml محلول آنزیمی دیسپاز منتقل گردید (۱ ml از این آنزیم ۱/۱ واحد فعالیت دارد؛ برای تهیه‌ی ۱ ml آنزیم ۱ mg از پودر

اختیار آن‌ها قرار داده شد. سپس اثر پلیمر پلی‌هما به عنوان بستر کشت سلولی بر روی رشد سلول‌های پوششی رنگدانه‌دار شبکیه و نیز ساخت ملانین در نتیجه‌ی بیان ژن تیروزیناز در سلول‌های پوششی رنگدانه‌دار شبکیه‌ی کشت شده بر روی پلیمر پلی‌هما بررسی گردید.

روش‌ها

پلیمر پلی‌هما

محلول ۱۰x: ۱۲۰ mg پودر پلی‌هما وزن شد و در ۱ ml اتانول ۹۵ درصد حل شد تا غلظت ۱۲۰ mg/ml تهیه شود. سپس محلول در دستگاه Shaker در دمای ۶۵ °C به مدت ۸ ساعت و دور ۱۹۰ rpm قرار گرفت تا به طور کامل حل شود. حذف ناخالصی‌ها با سانتریفیوژ ۲۰ دقیقه‌ای در دور ۲۰۰۰ g انجام گردید. با توجه به حجم ظرف مورد نظر، ۱۲ mg/ml از محلول ۱x برداشته و در ظرف مورد نظر ریخته شد. ظرف مورد نظر در زیر هود روشن به مدت ۱۲ ساعت قرار گرفت تا پلیمر کامل

تعداد 1×10^4 سلول رنگدانه‌دار شبکیه‌ی چشم در پاساژ ۴، در هر حفره از پلیت ۲۴ خانه‌ی پوشیده شده با پلی‌هما همراه با محیط DMEM/F12 غنی شده با FBS ۱۰ درصد کشت داده شدند. سلول‌های کشت داده شده به مدت ۴۸ ساعت در دمای 37°C قرار گرفتند. پس از گذشت ۴۸ ساعت از کشت اولیه، به هر خانه $50 \mu\text{l}$ از ماده‌ی MTT اضافه شد و پلیت به مدت ۲۴ ساعت در دمای 37°C قرار گرفت. سپس $500 \mu\text{l}$ DMSO (Dimethyl sulfoxide) به هر خانه اضافه گردید و بعد از ۲-۱ ساعت انکوباسیون در 37°C با سرنگ انسولین پیتاژ شد. جذب نمونه‌ها در دو طول موج 580 nm خوانده شد.

الیزای تکثیر سلولی رنگدانه‌دار شبکیه‌ی چشم (Cell proliferation ELISA assay)

به منظور سنجش اثر پلیمر پلی‌هما بر رشد و تکثیر سلول‌های رنگدانه‌دار شبکیه‌ی چشم، آزمون الیزا (ELISA یا Enzyme-linked immunosorbent assay) جهت تکثیر سلولی بر روی این سلول‌ها انجام شد. سلول‌های رنگدانه‌دار شبکیه‌ی چشم بر روی چاهک پوشیده شده با پلیمر پلی‌هما تحت تأثیر محیط DMEM/F12 غنی شده با FBS ۱۰ درصد پاساژ ۴ کشت شدند و میزان تکثیر سلولی آن‌ها در مقایسه با تکثیر این سلول‌ها در محیط پلی‌استیرین مطابق با دستورالعمل کیت الیزا (شرکت Roche) مورد بررسی قرار گرفت.

الیزای تکثیر سلولی بعد از بازیابی کلونی‌ها از روی پلیمر

به منظور بررسی تکثیر سلولی بعد از بازیابی کلونی‌ها از روی پلیمر، ابتدا 1×10^4 سلول همراه با

در 1 ml محیط کشت DMEM/F12 حل شد). پس از گذشت زمان معین، فالكون حاوی محلول دیسپاز و قطعات بافتی به مدت ۵ دقیقه در 300 g و دمای 4°C سانتریفیوژ (Eppendorf centrifuge) شد. سپس مایع رویی حاوی آنزیم، تخلیه شد و رسوب حاوی سلول‌ها و تکه‌های بافتی در محیط DMEM/F12 محلول شدند و به فلاسک 25 cm^2 حاوی 1 ml FBS انتقال یافتند. حجم محیط درون فلاسک با DMEM/F12 حاوی آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین و استرپتومایسین به 5 ml رسانده شد تا محیط کشت ۲۰ درصد FBS فراهم گردد.

کشت سلول‌های پوششی رنگدانه‌دار شبکیه‌ی چشم بر روی سطح پلیمر پلی‌هما

بعد از تهیه‌ی پلیمر در ظروف کشت ۲۴ خانه‌ای و شستشوی سطح آن با PBS و محیط DMEM/F12، $10^5 \times 1$ سلول در هر خانه، تحت شرایط FBS ۱۰ درصد + DMEM/F12 کشت شد.

بازیابی سلول‌های پوششی رنگدانه‌دار شبکیه‌ی چشم از روی پلیمر پلی‌هما

به منظور بررسی وضعیت سلول‌های پوششی رنگدانه‌دار شبکیه‌ی چشم، بعد از کشت ۴۸ ساعته بر روی پلیمر پلی‌هما، سلول‌های معلق در محیط کشت توسط سمپلر از روی پلیمر جمع‌آوری شدند و بعد از سانتریفیوژ ۵ دقیقه‌ای در دور 1500 rpm ، سلول‌های رسوب داده شده بر روی سطح پلی‌استیرین (FBS ۱۰ درصد + DMEM/F12) کشت شدند.

MTT ۵- (۳-۴,۵-Dimethylthiazol-۲-yl)-۲-diphenyltetrazolium bromide)

این آزمایش نشان دهنده‌ی زنده بودن سلول‌ها است.

(بدون آنتی‌بادی اولیه جهت بررسی اتصال اختصاصی آنتی‌بادی ثانویه به آنتی‌بادی اولیه و بدون آنتی‌بادی اولیه و ثانویه جهت بررسی اتوفلورسانس سلول‌ها و زمینه) در نظر گرفته شدند.

ابتدا ظرف ۲۴ خانه، که هر خانه‌ی آن با پلیمر پلی‌هما پوشش‌دار شده بود، با اشعه‌ی ماورای بنفش استریل شد و $10^5 \times 1$ سلول همراه با محیط مورد نظر، به مدت ۴۸ ساعت در دمای 37°C قرار گرفت. سپس در ظرف ۲۴ خانه‌ی دیگری، قطعه‌ی لامل استریل قرار گرفت و با FBS حداقل به مدت ۱ ساعت در دمای 37°C پوشش‌دار شد. سپس در هر خانه، ۱ ml محیط FBS ۱۰ درصد حاوی سلول رنگدانه‌دار شبکیه‌ی چشم بازیابی شده از پاساژ مورد نظر کشت شد. این ظرف به مدت ۵ روز در دمای 37°C قرار گرفت و در روز پنجم سایر مراحل ایمونوسیتوشیمی مطابق دستورالعمل ارایه شده توسط شرکت Santa Cruz انجام شد.

به منظور بررسی گروه شاهد، همین شرایط برای سلول‌های پوششی رنگدانه‌دار شبکیه‌ی چشم بر روی پلی‌استیرین نیز فراهم گردید (رنگ‌آمیزی پروتئین با استفاده از آنتی‌بادی‌های اولیه و ثانویه و رنگ‌آمیزی هسته توسط DAPI یا Diamidino-۲-phenylindole -۴,۶- انجام شد) (جدول ۱).

استخراج RNA

به منظور بررسی بیان ژن Tyrosinase در سلول‌های رنگدانه‌دار شبکیه‌ی چشم کشت شده بر روی پلیمر پلی‌هما، استخراج RNA از سلول‌های کشت شده (از پاساژ ۵-۲) بر روی پلیمر پلی‌هما و پلی‌استیرین (به عنوان شاهد) توسط کیت Tripure انجام شد (از GAPDH یا

محیط‌های پیش‌گفته در خانه‌های پوشیده شده با پلیمر به مدت ۴۸ ساعت کشت داده شدند. سپس سلول‌ها بازیابی و بر روی پلی‌استیرین کشت داده شدند. بعد از ۲۴ ساعت مراحل الیزای تکثیر سلولی انجام شد.

الیزای مرگ سلولی (RPE cell death detection) (ELISA assay)

تعداد $10^4 \times 1$ سلول رنگدانه‌دار شبکیه‌ی چشم در پاساژ ۴، بر روی چاهک پوشیده شده با پلیمر پلی‌هما تحت تأثیر محیط DMEM/F۱۲ غنی شده با FBS ۱۰ درصد به مدت ۴۸ ساعت در دمای 37°C کشت شدند و میزان مرگ سلولی آن‌ها در مقایسه با مرگ سلولی این سلول‌ها در محیط پلی‌استیرین پس از گذشت ۴۸ ساعت از کشت اولیه، توسط کیت الیزا مورد بررسی قرار گرفت.

ایمونوسیتوشیمی (ICC) (Immunocytochemistry)

سلول‌های رنگدانه‌دار شبکیه‌ی چشم در پاساژهای ۳ و ۴ جهت بررسی بیان و وجود نشانگرهای RPE۶۵، سایتوکراتین در ظرف‌های ۲۴ خانه در محیط‌های حاوی FBS ۱۰ درصد کشت شدند و مورد بررسی قرار گرفتند. RPE۶۵ در اپیتلیال رنگدانه‌ای شبکیه یافت می‌شود و به صورت گرانول در سیتوپلاسم این سلول‌ها ذخیره می‌شود. سایتوکراتین در تمام سلول‌های پوششی ساده (تک لایه و قطبی) مثل سلول‌های پوششی رنگدانه‌دار شبکیه‌ی چشم وجود دارد و جزء خانواده‌ی فیلامنت‌های حد واسط است. این شبکه‌ی کراتینی، داخل سیتوپلاسم بافت‌های اپیتلیالی وجود دارد.

چندین حفره از ظرف ۲۴ خانه، به عنوان شاهد

هر واکنش، مخلوط نهایی تهیه شد (جدول ۲). پس از تهیه‌ی مخلوط نهایی و فیوژ کردن آن، مخلوط در حجم‌های ۹ μ l در ویال‌های ۰/۲۵ ml توزیع و به هر یک ۱ μ l از cDNA (Complementary DNA) موجود اضافه شد. پس از فیوژ کل حجم ۱۰ μ l در دستگاه Rotorgen قرار گرفت و طبق برنامه‌ی جدول ۳ PCR انجام شد.

یافته‌ها

تشکیل کلونی‌های سلولی

با توجه به این که پلیمر پلی‌هما آب‌گریز است، سلول‌های چسبنده‌ی رنگدانه‌دار شبکیه‌ی چشم قادر به چسبیدن بر روی آن نیستند. در نتیجه، سلول‌ها به یکدیگر متصل می‌شوند و کلونی تشکیل می‌دهند. از همان ساعت اولیه (دو ساعت اول پس از کشت) سلول‌ها به هم متصل شدند و کلونی‌های کوچک تشکیل دادند. با گذشت زمان کلونی‌های کوچک به یکدیگر متصل شدند و کلونی‌های بزرگ‌تر را تشکیل دادند؛ به طوری که با چشم غیر مسلح هم قابل دیدن بود (شکل ۲).

Glyceraldehyde ۳-phosphate dehydrogenase به عنوان House keeping gene استفاده شد).

طراحی پرایمر

به منظور بررسی بیان ژن تیروزیناز از پرایمر تیروزیناز شرکت کیاژن با کد شماره‌ی QT۰۰۰۷۳۶۴۰ استفاده شد. همچنین ژن GAPDH با سری پرایمری

ACAGTCAGCCGCATCTTC
CTCCGACCTTACCTTCC

با طول ۷۷ bp و دمای اتصال 62°C به عنوان House keeping به کار گرفته شد.

سنتز cDNA

سنتز cDNA با استفاده از کیت شرکت کیاژن انجام شد و پس از تنظیم مراحل برای هر یک از پرایمرها با Real time PCR (Real time polymerase chain reaction) ادامه یافت.

Real time PCR

سنجش کمی بیان ژن‌های مورد نظر توسط Real time PCR انجام شد. قبل از شروع کار، تمام مواد لازم به منظور استریل به مدت ۲۰ دقیقه در معرض نور ماورای بنفش قرار گرفت. سپس به ازای

جدول ۱. آنتی‌بادی‌های اولیه و ثانویه RPE۶۵ و Cytokeratin۸/۱۸

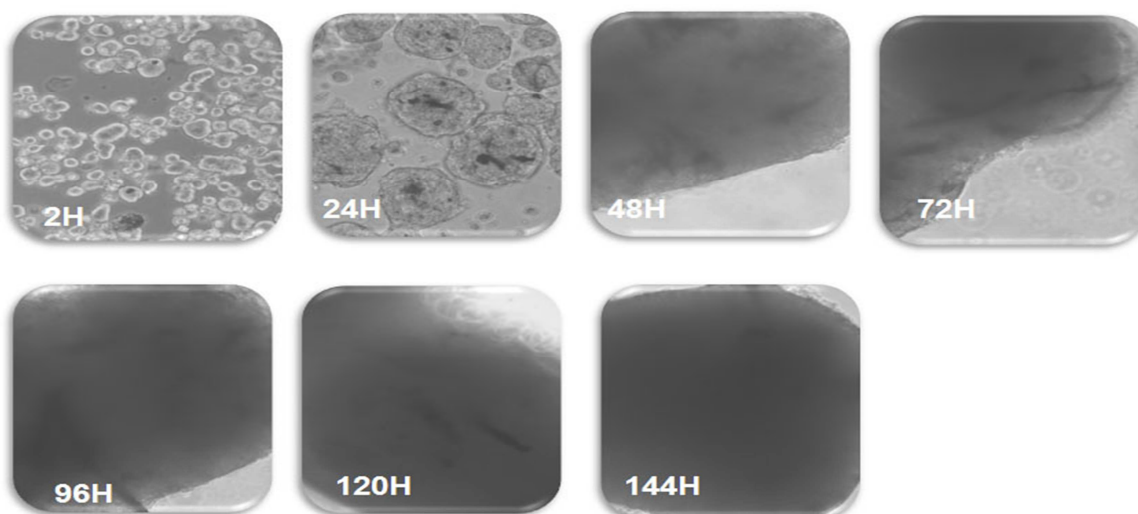
| اسم پروتئین | آنتی‌بادی اولیه | آنتی‌بادی ثانویه |
|-----------------|----------------------------|--|
| RPE۶۵ | Rabbit polyclonal antibody | (Santa Cruz USA) Goat anti-rabbit IgG-FITC |
| Cytokeratin۸/۱۸ | Mouse monoclonal antibody | (Santa Cruz USA) Goat anti-mouse IgG-FITC |

جدول ۲. دستور تهیه‌ی مواد نهایی Real time PCR (Real time polymerase chain reaction)

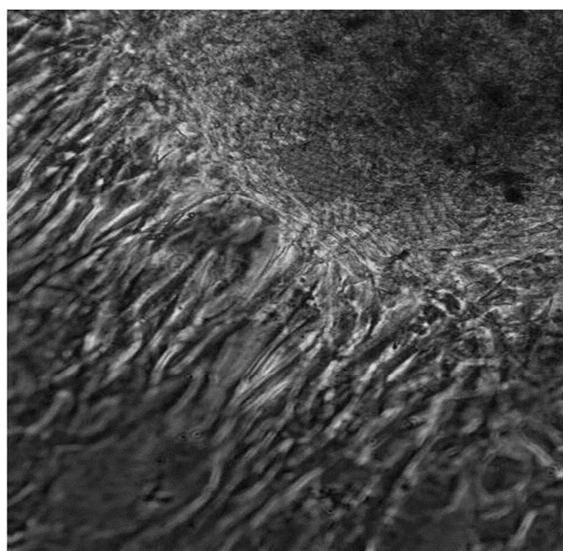
| اجزای سازنده | مقدار | مقدار نهایی (N tube) |
|------------------|-----------|----------------------|
| Master mix | ۲ μ l | ۲ N |
| Forward primer | ۱ μ l | ۱ N |
| Reverse prime | ۱ μ l | ۱ N |
| RNase free water | ۵ μ l | ۵ N |
| Total volume | ۹ μ l | ۹ N |

جدول ۳. پروفایل دمایی Real time PCR (Real time polymerase chain reaction) برای ژن‌های Tyrosinase و GAPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)

| GAPDH | Tyrosinase |
|--|--|
| توقف (ذوب): ۹۵C، ۱۰ دقیقه سیکل (۴۰ تکرار) | مرحله ۱: ۹۵C، ۱۰ ثانیه مرحله ۲: ۵۲C، ۲۵ ثانیه مرحله ۳: ۷۲C، ۲۵ ثانیه |
| ذوب (۷۲-۹۵) توقف ۵ ثانیه تا مرحله بعد | |



شکل ۲. بررسی مورفولوژی سلول‌های پوششی رنگدانه‌دار شبکیه بر روی پلیمر پلی‌هما در طی ۱۴۴ ساعت (۱۰۰x)

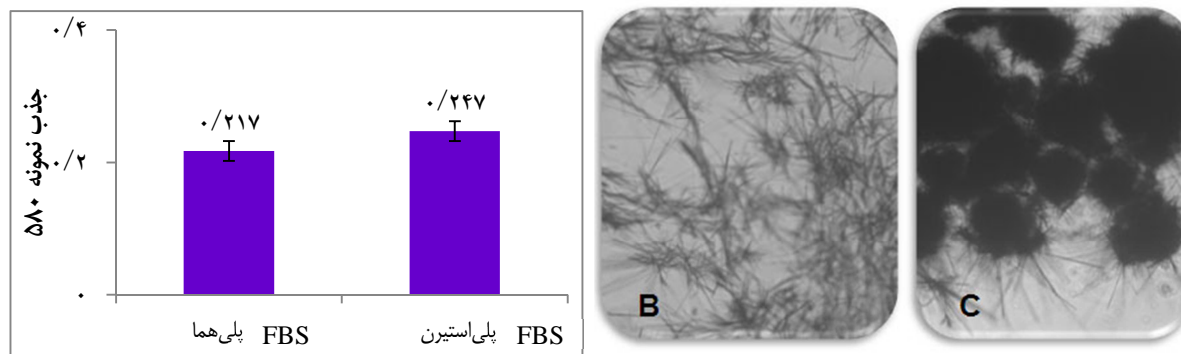


شکل ۳. کشت کلونی‌های سلول‌های پوششی رنگدانه‌دار شبکیه بر روی پلی‌استرین (۲۰۰x)

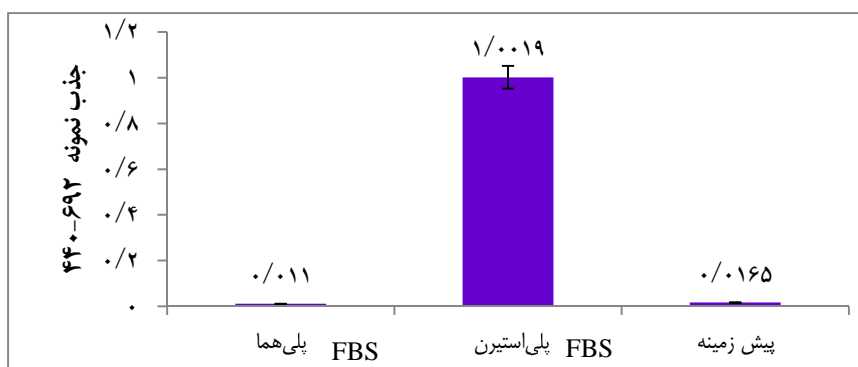
بازیابی سلول‌های کشت شده بر روی پلیمر نشان داد که سلول‌های پوششی رنگدانه‌دار شبکیه‌ی چشم کشت شده بر روی پلیمر، زنده هستند و توانایی بازگشت به حالت اولیه و تشکیل استتاله‌های بلند را دارند (شکل ۳).

MTT، تکثیر و مرگ سلولی

نتایج آزمایش MTT نشان داد که سلول‌های کشت شده بر روی پلیمر زنده هستند و مشابه با سلول‌های کشت شده بر سطح پلی‌استرین، قابلیت جذب MTT را دارند و اختلاف معنی‌داری بین این دو وجود ندارد (شکل ۴).



شکل ۴. بررسی نتایج آزمایش MTT در سلول‌های پوششی رنگدانه‌دار شبکه‌ای، A: نمودار الیزا حاصل از بررسی سلول‌های پوششی رنگدانه‌دار شبکه‌ای زنده بعد از ۴۸ ساعت کشت بر روی پلی‌استیرن و پلیمر پلی‌هما تحت محیط کشت DMEM/F۱۲ (Dulbecco's modified Eagle's medium) حاوی FBS (Fetal bovine serum) سرم ۱۰ درصد (این آزمایش ۶ بار تکرار گردید و اختلاف معنی‌دار آماری مشاهده نشد) ($P > 0.050$)



شکل ۵. نمودار الیزا حاصل از بررسی تکثیر سلول‌های پوششی رنگدانه‌دار شبکه‌ای (پاساژ ۴) بعد از ۴۸ ساعت کشت بر روی پلی‌استیرن و پلیمر پلی‌هما تحت محیط کشت DMEM/F۱۲ (Dulbecco's modified Eagle's medium) حاوی FBS (Fetal bovine serum) سرم ۱۰ درصد (این آزمایش ۳ بار تکرار گردید و اختلاف معنی‌دار آماری مشاهده شد) ($P < 0.050$)

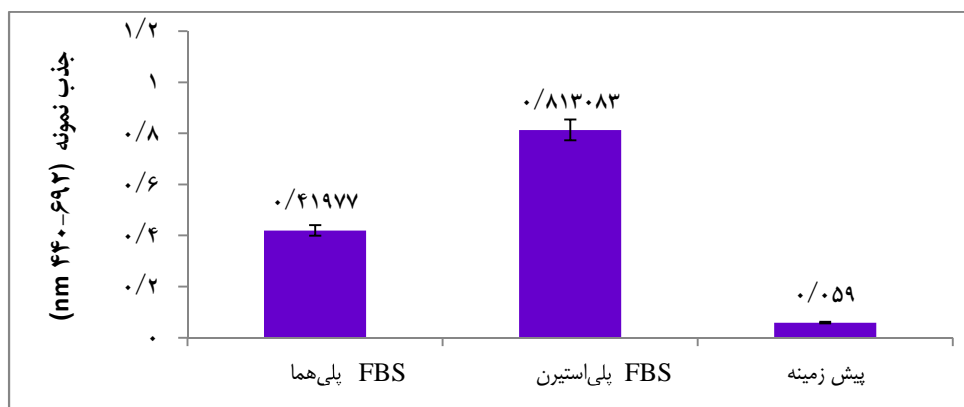
نتایج حاصل از الیزای مرگ سلولی نشان داد که پلیمر، عامل القای مرگ سلولی نبوده است (شکل ۷) و مرگ قابل ملاحظه‌ای در نمونه‌های کشت شده بر روی پلیمر پلی‌هما و سطح پلی‌استیرن مشاهده نشد.

ایمونوسیتوشیمی (ICC)

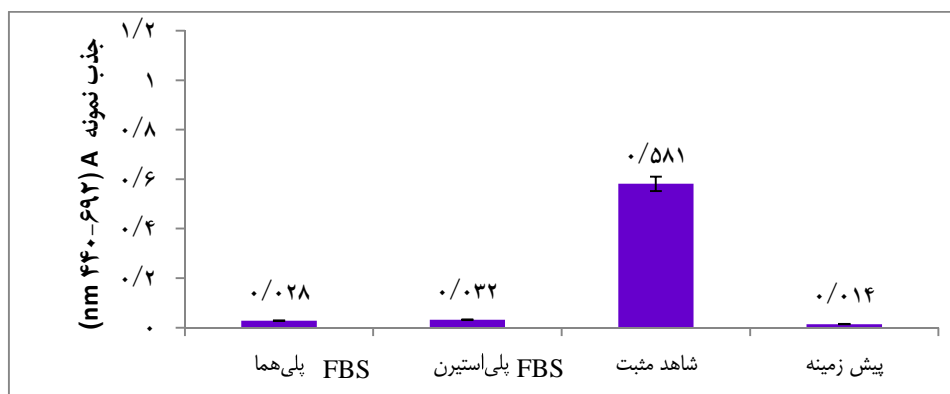
آزمایش ICC بیان پروتئین‌های سایتوکراتین و RPE۶۵ را در نمونه‌های کشت شده بر روی پلی‌هما نشان داد (شکل‌های ۸ و ۹).

نتایج تکثیر نشان داد که تکثیر سلولی در نمونه‌های کشت شده بر روی پلیمر کاهش یافته است و اختلاف معنی‌داری با نمونه‌های پلی‌استیرن مشاهده شد (شکل ۵).

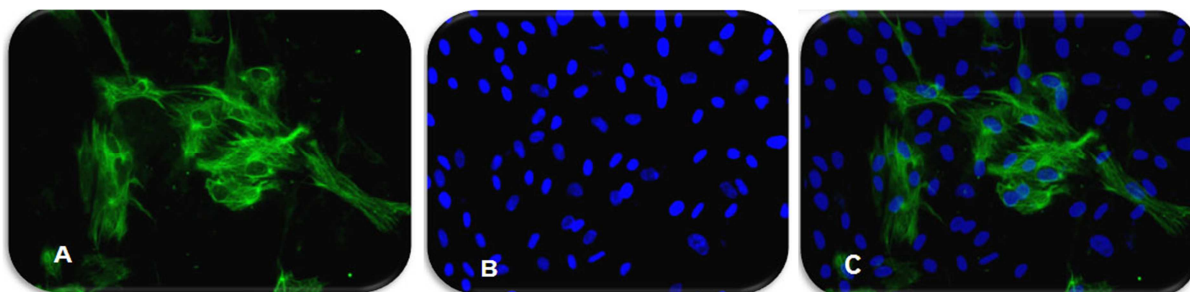
سلول‌ها بعد از کشت ۴۸ ساعته بر روی پلیمر بازیافت شدند. نتایج الیزا بعد از بازیابی سلول‌ها نشان داد که تکثیر سلولی در نمونه‌های پلیمر نسبت به قبل افزایش یافته است، اما هنوز اختلاف معنی‌داری با نمونه‌های پلی‌استیرن دارد (شکل ۶).



شکل ۶. نمودار الیزای حاصل از بررسی تکثیر سلول‌های پوششی رنگدانه‌دار شبکیه (پاساژ ۴) تحت محیط کشت DMEM/F۱۲ (Dulbecco's modified Eagle's medium) حاوی FBS (Fetal bovine serum) سرم ۱۰ درصد بعد از ۴۸ ساعت کشت بر روی پلیمر پلی‌هما و سپس بازیابی آن‌ها بر روی پلی‌استیرن (این آزمایش ۳ بار تکرار گردید و اختلاف معنی‌دار آماری مشاهده شد) ($P < 0.050$)



شکل ۷. نمودار الیزای حاصل از بررسی مرگ سلول‌های پوششی رنگدانه‌دار شبکیه (پاساژ ۴) بعد از ۴۸ ساعت کشت بر روی پلی‌استیرن و پلیمر پلی‌هما تحت محیط کشت DMEM/F۱۲ (Dulbecco's modified Eagle's medium) حاوی FBS (Fetal bovine serum) سرم ۱۰ درصد (این آزمایش ۳ بار تکرار گردید و اختلاف معنی‌دار آماری مشاهده نشد) ($P > 0.050$)



شکل ۸. بیان سیتوکراتین در سلول‌های پوششی رنگدانه‌دار شبکیه (پاساژ ۵) کشت داده شده بر روی پلیمر پلی‌هما تحت محیط غنی شده با ۱۰ درصد، A: FITC (Fluorescein isothiocyanate) ، B: FBS (Fetal bovine serum) و C: Merge DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) ($20\times$)

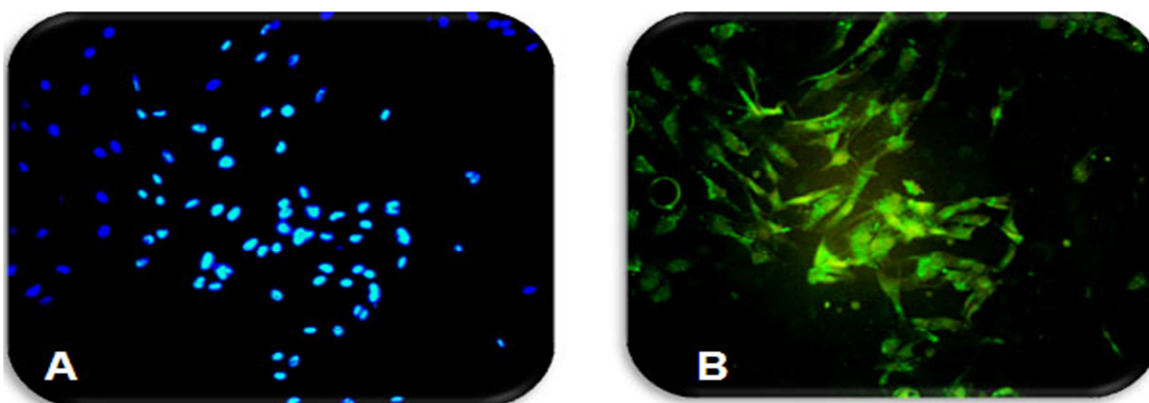
اختلالاتی همچون تخریب ماکولای وابسته به سن و موارد دیگری مرتبط است و جایگزینی اپیتلیوم رنگدانه‌ای چشم در چنین بیمارانی با نجات گیرنده‌های نوری و رفع مشکل همراه است. از این رو، کشت این سلول‌ها و مطالعه‌ی رفتار این سلول‌ها بر روی محیط‌های مختلف با هدف ایجاد دریچه‌هایی به منظور حفظ سلول‌های رنگدانه‌دار شبکیه و در نتیجه حفظ شبکیه و درمان بیماری صورت می‌گیرد.

Real time PCR

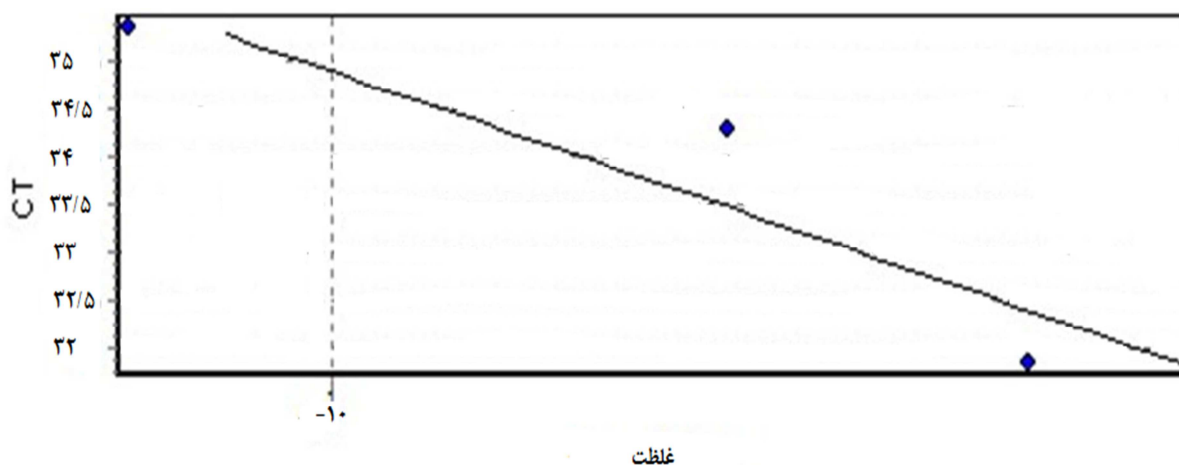
منحنی استاندارد ژن‌های Tyrosinase و GAPDH رسم شد (شکل‌های ۱۰ و ۱۱). سپس میزان بیان تیروزیناز در پلیمر، نسبت به سطح پلی‌استیرین سنجیده شد که گویای بیان بالای ژن تیروزیناز در سلول‌های کشت شده بر روی پلیمر، نسبت به پلی‌استیرین بود (شکل ۱۲).

بحث

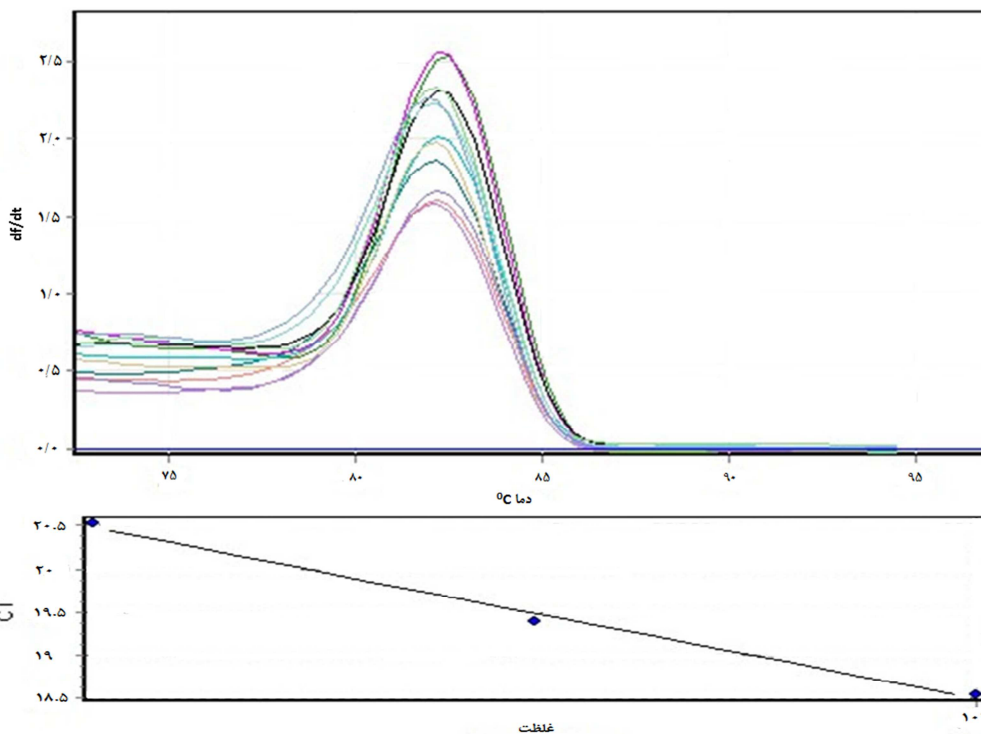
از دست رفتن عملکرد اپیتلیوم رنگدانه‌ای چشم با



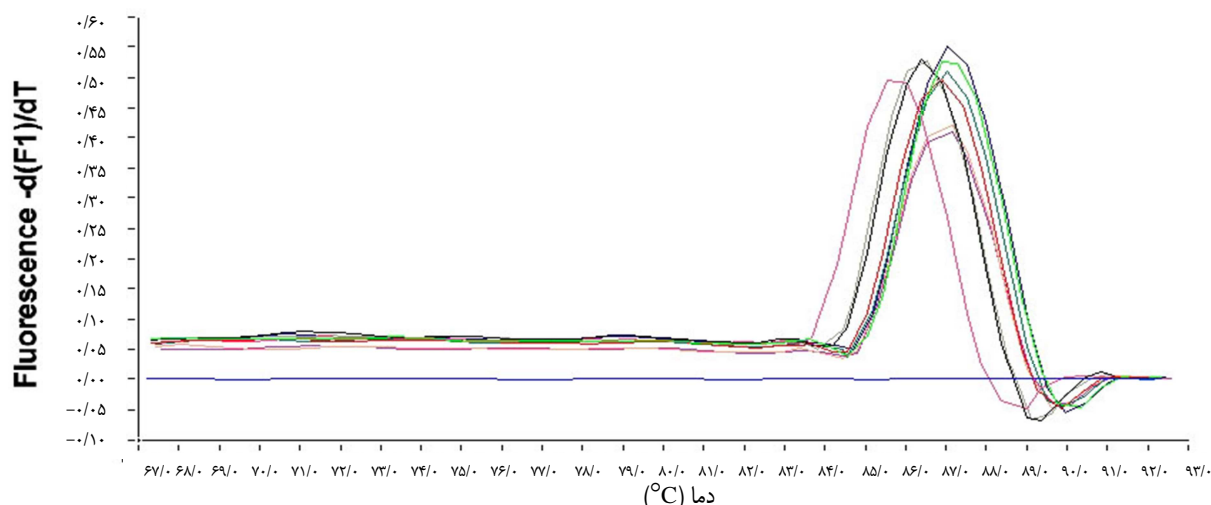
شکل ۹. بیان ژن RPE65 سلول‌های پوششی رنگدانه‌دار شبکیه (پاساژ ۳) کشت داده شده بر روی پلی‌هما تحت محیط FBS (Fetal bovine serum) ۱۰ درصد + DMEM/F۱۲ (۱۰۰x)، A: DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole)، B: FITC (Fluorescein isothiocyanate)



شکل ۱۰. منحنی استاندارد رسم شده برای ژن Tyrosinase (۹۸ درصد Efficiency، $M = -3.36$ ، $R = 0.99$)



Program: meltcurve Run By: Host
Run Date: Apr 23, 2011 15:25 Print Date: May 11, 2011



شکل ۱۱. منحنی استاندارد رسم شده برای ژن GAPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)

$$(R = 0.99, M = -3.29, \text{Efficiency} = 100\%)$$

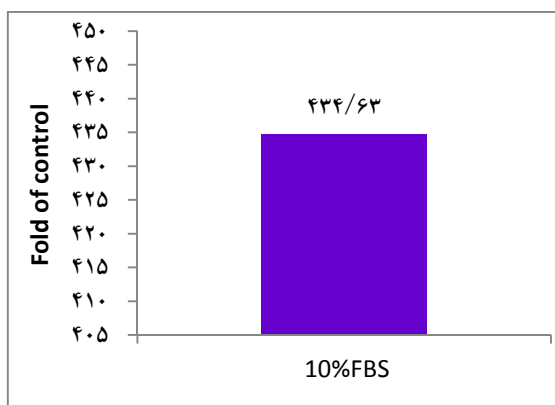
botyrat co Poly (Hydroxy membering hydroxyl related) مایع آمینوتیک و آلزینات انجام شده است (۱۷-۱۸).
به نقل از Packard و همکاران در اوایل دهه‌ی

کشت سلول‌های رنگدانه‌دار شبکه‌ای بر روی ماتریکس‌های مختلف از جمله کلاژن، لامینین، فیبرینوزن، Plain plastic petri plate، CryoPreCipitat membering artificial

(۱۲-۱۳). Glowacki و همکاران با کشت سلول‌های کندروسیت بر روی پلی‌هما نشان دادند که پلی‌هما موجب می‌شود که سلول‌های کندروسیت حالت گرد به خود بگیرند و در فضای سه بعدی واقع شوند (۲۰). پلی‌هما با ساختار اسفنج مانند خود قابلیت حمل به منظور آزادسازی کنترل شده داروهای ضد سرطان را دارد (۲۱). همچنین Kon و de Visser بازیابی استخوان‌های آسیب دیده بر روی پلیمر پلی‌هما را نشان دادند (۲۲).

بنابراین سلول‌های غضروف، استخوان، ملانوما و پوست بر روی آن‌ها کشت شده بودند؛ اما سلول‌های رنگدانه‌دار شبکیه بر روی آن‌ها کشت نشده بود. با توجه به کاربرد این پلیمر در لنزهای تماسی، اثر مستقیم پلیمر در حفظ ماهیت سلول‌های پوششی رنگدانه‌دار شبکیه بررسی نشده بود. از این رو، در پژوهش حاضر اثر پلیمر بر روی سلول‌های پوششی رنگدانه‌دار شبکیه بررسی شد.

پلیمر پلی‌هما دارای ساختار آب‌گریز است. در نتیجه، سلول‌های رنگدانه‌دار شبکیه‌ی چشم قادر به چسبیدن به سطح پلیمر نیستند و به صورت غیر چسبنده و معلق در محیط، روی سطح این پلیمر قرار می‌گیرند. در واقع سلول‌ها در فضای سه بعدی بین محیط و پلیمر قرار می‌گیرند (۱۶، ۱۰). سلول‌های پوششی رنگدانه‌دار شبکیه‌ی چشم به طور ذاتی توانایی چسبندگی دارند. به همین دلیل، وقتی در سطح پلی‌استیرن کشت داده می‌شوند، به سطح کف فلاسک می‌چسبند و مورفولوژی کشیده با استتالهی بلند پیدا می‌کنند. وقتی سلول‌های پوششی رنگدانه‌دار شبکیه‌ی چشم در سطح پلیمر پلی‌هما قرار می‌گیرند، پلیمر باعث می‌شود سطح چسبنده در اختیار آن‌ها



شکل ۱۲. میزان بیان ژن Tyrosinase در سلول‌های پوششی رنگدانه‌دار شبکیه بر روی پلیمر پلی‌هما (FBS ۱۰ درصد + ۱۲ DMEM/F نسبت به پلی‌استیرن)

Lim و Wichterle ۱۹۵۰ شروع به طراحی پلیمری برای مصارف پزشکی کردند و اولین لنزی را که حاوی پلی‌هما بود، کشف کردند. این پلیمر شرایط سازگار با داخل چشم را دارد و در تماس با سلول‌های چشم تغییر نمی‌کند؛ ارزان، در دسترس و قابل پذیرش برای بدن است و آلرژی ایجاد نمی‌کند (۱۹).

این پلیمر دارای محتوای آبی مشابه با سلول‌های زنده، نفوذپذیر نسبت به متابولیت‌ها و مقاوم نسبت به جذب توسط بدن با زیست سازگاری بسیار بالا و غیر ایمونوژنیک است و به راحتی به صورت اشکال و فرم‌های متفاوت قابل ساخت و قابل استریل شدن می‌باشد (۱۱).

ژل‌های آب‌دوست سه بعدی بر پایه‌ی پلی‌هما، به عنوان داربست‌هایی برای بازسازی بافت‌های نرم نظیر بافت عصبی، ماهیچه، تاندون و غیره طراحی می‌شوند. همچنین خصوصیات فیزیکی- شیمیایی این هیدروژل آب‌دوست، شباهت بسیاری به ماتریکس غضروف دارد. بنابراین، جهت کشت سلول‌های کندروسیت بر روی آن دارای کاربرد می‌باشد

نباشد و سلول‌ها به صورت معلق در فضای سه بعدی پلیمر و محیط قرار بگیرند. در نتیجه، به علت خصوصیت چسبندگی ذاتی سلول‌ها، سلول‌ها به یکدیگر می‌چسبند و کلونی‌های سلولی مشابه با بافت زیستی را تشکیل می‌دهند.

با گذشت زمان، کلونی‌ها به یکدیگر می‌چسبند و کلونی بزرگتری را تشکیل می‌دهند. به نظر می‌رسد عوامل رشد، زمینه‌ای را فراهم می‌آورند که با گذشت زمان کلونی‌ها بیشتر به یکدیگر متصل شوند و کلونی‌های واحد بزرگی را تشکیل دهند؛ به طوری که این کلونی‌ها با چشم غیر مسلح قابل دیدن و در فلاسک سلولی قابل شمارش هستند. کلونی‌های تشکیل شده، رنگ تیره (غیر قابل نفوذ نسبت به نور) به خود می‌گیرند که وجود این رنگ را می‌توان به تراکم سلولی موجود در کلونی‌ها و وجود رنگدانه‌ی ملانین در سلول‌های پوششی رنگدانه‌دار شبکیه‌ی چشم نسبت داد.

نتایج آزمایش MTT نشان دهنده‌ی سلول‌های زنده است. در حضور *FBS*، سلول‌های زنده‌ی موجود بر روی پلیمر با نمونه‌های کشت شده بر روی پلی‌استیرن تا حدودی برابری می‌کند. زنده بودن سلول‌ها با بازیابی مجدد آن‌ها از روی پلیمر پلی‌هما و کشت بر روی پلی‌استیرن نیز اثبات شد. با گذشت زمان، کلونی‌ها بزرگ‌تر و تراکم سلولی آن‌ها بیشتر می‌شود و بازیابی سلول‌ها مشکل‌تر به نظر می‌رسد.

مرگ سلولی در شرایطی که سلول‌های پوششی رنگدانه‌دار شبکیه‌ی چشم بر روی پلیمر پلی‌هما کشت داده شوند، بسیار کم و مانند پلی‌استیرن است. پس می‌توان نتیجه گرفت که پلیمر، عاملی برای مرگ سلولی نیست. تکثیر سلول‌های کشت شده بر روی

پلیمر نسبت به حالت پلی‌استیرن سنجیده شد. تکثیر بسیار کمی در حالت‌های پلیمر وجود دارد که با توجه به زنده بودن سلول‌ها و عدم مرگ آن‌ها در بازه زمانی مورد نظر دو فرضیه مطرح می‌شود:

۱- تشکیل کلونی‌های سلولی مشابه با بافت زیستی است و از قانون ممانعت تماسی در بافت پیروی می‌کند. در نتیجه، تماس سلول‌ها با یکدیگر سیگنال‌های عدم تکثیر سلولی را ایجاد می‌کند.

۲- به دلیل تراکم سلولی، *Anti-BrdU* قادر به نفوذ به داخل سلول‌ها در شرایط کلونی نیست. بنابراین تقسیم سلولی قابل ملاحظه‌ای دیده نمی‌شود. با توجه به این که بازه زمانی در آزمایش *MTT* و *BrdU* یکسان می‌باشد، مشخص نیست در این بازه زمانی چه اتفاقی افتاده است؛ اما آنچه واضح است، این است که بعد از ۴۸ ساعت، وقتی *MTT* و *BrdU* در اختیار سلول‌های پوششی رنگدانه‌دار شبکیه‌ی چشم قرار می‌گیرد، سلول‌هایی که *MTT* را دریافت می‌کنند، مشابه با نمونه‌ی پلی‌استیرن است. این در صورتی است که سلول‌ها در پلیمر قدرت تکثیر خیلی کمتر از نمونه‌ی پلی‌استیرن را نشان می‌دهند.

Klein و همکاران نشان دادند که تکثیر سلول‌های ملانوما بر روی پلیمر پلی‌هما، با سرعت پایین‌تری با همان دانسیته نسبت به پلی‌استیرن صورت می‌گیرد و در بین سلول‌ها، کلونی‌های پلی‌کاریوسیت‌ها را می‌توان دید (۱۰). همچنین *Glowacki* و همکاران تکثیر کاهش یافته را در بین سلول‌های کلونی کندروسیت نشان دادند (۲۰). با توجه به این که علاوه بر سلول‌های پوششی رنگدانه‌دار شبکیه، سلول‌های دیگر نیز کاهش تکثیر سلولی را نشان می‌دهند، فرضیه‌ی اول صحیح‌تر به نظر می‌رسد؛ اما

این مسأله اثبات نشده است.

نتایج حاصل از ایمنوسیتوشیمی کشت‌های رنگدانه‌دار شبکیه‌ی چشم بر روی پلیمر پلی‌هما، نشان داد که بیان پروتئین سایتوکراتین و RPE۶۵ که از نشانگرهای اختصاصی سلول‌های پوششی رنگدانه‌دار شبکیه‌ی چشم هستند، در شرایط کشت سلول‌های پوششی رنگدانه‌دار شبکیه‌ی چشم بر روی پلیمر، تا حدودی برابر با حالت پلی‌استیرن است.

تیروزیناز را به عنوان مونوفنول مونواکسیژناز می‌شناسند. این آنزیم با اکسیداسیون فنول مانند تیروزین و دوپامین موجب ایجاد رنگدانه می‌شود. در حیوانات و گیاهان با عمل اکسیداسیون خود، موجب تولید ملانین و دیگر پیگمان‌ها می‌شود که ایجاد کننده‌ی رنگ سیاه در آن‌ها است (۷). زمانی که FBS در شرایط کشت سلول بر روی پلیمر اضافه می‌شود، افزایش بیان (۲۴/۱۲۵ برابری) را نسبت به سلول‌های کشت شده بر روی پلی‌استیرن تحت محیط DMEM/F۱۲ نشان می‌دهد. بنابراین تأثیر همزمان پلیمر و FBS موجب می‌شود افزایش بیان صورت گیرد.

میزان بیان نشانگر در شرایط کشت سلول بر روی پلیمر تحت محیط DMEM/F۱۲ حاوی FBS نسبت به سلول‌های کشت شده بر روی پلی‌استیرن این داده را تأیید می‌کند. بیان بالای تیروزیناز و تراکم سلولی با بیان ملانین و تیره شدن کلونی‌ها مطابق است.

در پایان چنین نتیجه‌گیری می‌شود که پلیمر پلی‌هما شرایط لازم برای زنده ماندن سلول‌ها و بیان بالای ملانین فراهم می‌آورد. بنابراین به نظر می‌رسد شرایط مناسب برای حفظ ماهیت و کشت سلول‌های پوششی رنگدانه‌دار شبکیه‌ی چشم فراهم می‌آورد که از این سلول‌ها بتوان در درمان سلول‌های شبکیه استفاده کرد.

تشکر و قدردانی

این پژوهش با حمایت مالی پژوهشکده‌ی ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری تهران و همکاری سازمان ملی چشم ایران به انجام رسید. به این وسیله از زحمات مسؤولین این مرکز تشکر و قدردانی می‌گردد.

References

1. Klimanskaya I, Hipp J, Rezai KA, West M, Atala A, Lanza R. Derivation and comparative assessment of retinal pigment epithelium from human embryonic stem cells using transcriptomics. *Cloning Stem Cells* 2004; 6(3): 217-45.
2. Strauss O. The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiol Rev* 2005; 85(3): 845-81.
3. Willermain F, Caspers-Velu L, Nowak B, Stordeur P, Mosselmans R, Salmon I, et al. Retinal pigment epithelial cells phagocytosis of T lymphocytes: possible implication in the immune privilege of the eye. *Br J Ophthalmol* 2002; 86(12): 1417-21.
4. Pons M, Marin-Castano ME. Nicotine increases the VEGF/PEDF ratio in retinal pigment epithelium: a possible mechanism for CNV in passive smokers with AMD. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011; 52(6): 3842-53.
5. Baraboi VA. Melanin: structure, biosynthesis, biological functions. *Ukr Biokhim Zh* 1999; 71(4): 5-14. [In Russian].
6. Limb GA, Daniels JT. Ocular regeneration by stem cells: present status and future prospects. *Br Med Bull* 2008; 85: 47-61.
7. Barton DE, Kwon BS, Francke U. Human tyrosinase gene, mapped to chromosome 11 (q14---q21), defines second region of homology with mouse chromosome 7. *Genomics* 1988; 3(1): 17-24.
8. Elejalde BR, Holguin J, Valencia A, Gilbert EF, Molina J, Marin G, et al. Mutations affecting pigmentation in man: I. Neuroectodermal melanolyosomal disease. *Am J Med Genet*

- 1979; 3(1): 65-80.
9. Kwon BS, Haq AK, Pomerantz SH, Halaban R. Isolation and sequence of a cDNA clone for human tyrosinase that maps at the mouse c-albino locus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84(21): 7473-7.
 10. Klein PA, Xiang JH, Kimura AK. Melanoma cells growing in aggregates on a non-adhesive poly(HEMA) substrate exhibit polykaryocytosis but do not develop an increased metastatic capability. *Clin Exp Metastasis* 1984; 2(4): 287-95.
 11. Studenovska H, Slouf M, Rypacek F. Poly(HEMA) hydrogels with controlled pore architecture for tissue regeneration applications. *J Mater Sci Mater Med* 2008; 19(2): 615-21.
 12. Lombello CB, Malmonge SM, Wada ML. Poly-HEMA and Poly-HEMA-poly(MMA-co-AA) as substrates for culturing Vero cells. *J Mater Sci Mater Med* 2000; 11(9): 541-6.
 13. Flynn L, Dalton PD, Shoichet MS. Fiber templating of poly(2-hydroxyethyl methacrylate) for neural tissue engineering. *Biomaterials* 2003; 24(23): 4265-72.
 14. Seidel JM, Malmonge SnM. Synthesis of Poly-HEMA hydrogels for using as biomaterials. Bulk and solution radical-initiated polymerization techniques. *Materials Research* 2000; 3: 79-83.
 15. Goda T, Ishihara K. Soft contact lens biomaterials from bioinspired phospholipid polymers. *Expert Rev Med Devices* 2006; 3(2): 167-74.
 16. Chirila TV. Melanized poly(HEMA) hydrogels: basic research and potential use. *J Biomater Appl* 1993; 8(2): 106-45.
 17. Sajadi SM, Samiei Sh, Kheirandish M, Ataie Z, Meshkani R, Kavari M, et al. The association of FXIII Val34Leu polymorphism with thrombotic events in patients referring to Iranian Blood Transfusion Organization. *Sci J Iran Blood Transfus Organ* 2008; 4(4): 247-52.
 18. Soheili Z, Samiei S. Real time PCR: principles and application. *Hepat Mon* 2005; 5(3): 83-7.
 19. Packard RB, Garner A, Arnott EJ. Poly-HEMA as a material for intraocular lens implantation: a preliminary report. *Br J Ophthalmol* 1981; 65(8): 585-7.
 20. Glowacki J, Trepman E, Folkman J. Cell shape and phenotypic expression in chondrocytes. *Proc Soc Exp Biol Med* 1983; 172(1): 93-8.
 21. Jeyanthi R, Rao KP. Controlled release of anticancer drugs from collagen-poly(HEMA) hydrogel matrices. *J Controlled Rel* 1990; 13(1): 91-8.
 22. Kon M, de Visser AC. A poly(HEMA) sponge for restoration of articular cartilage defects. *Plast Reconstr Surg* 1981; 67(3): 288-94.

The Effect of Polyhydroxyethylmethacrylate (Poly-HEMA), as a Cell Culture Substrate, on Viable and Preserving Nature of Retinal Pigment Epithelium (RPE) Cells

Fatemeh Nazem-Roaya MSc¹, Zahra-Soheila Soheili PhD², Razeih Heidari MSc¹,
Abdolkhalegh Deezagi PhD², Hamid Ahmadi H PhD³, Shahram Samiei PhD⁴,
Abozar Bagheri MSc¹

Original Article

Abstract

Background: Retinal pigment epithelium (RPE) cells play an important role in the maintenance of normal function of the retina. Tyrosinase is a marker of RPE cells that functions in synthesis of melanin. Polymer of polyhydroxyethylmethacrylate (Poly-HEMA) is the basic component of contact lenses. We investigated the effect of Poly-HEMA, as a cell culture substrate, on viable and preserving nature of RPE cells.

Methods: RPE cells between passages 2 and 5 were cultured on Poly-HEMA (12 mg/ml) in 24 wells culture palates. Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM/F12) + 10% Fetal bovine serum (FBS) were used to nourish cultured cells on polystyrene and Poly-HEMA coated vessels. Morphology, the rate of cell proliferation and cell death of RPE cells cultured on Poly-HEMA polymer were evaluated in periodic times. Real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) was performed to evaluate tyrosinase in cultured RPE cells.

Findings: The cells cultured on Poly-HEMA formed many colonies. These colonies could be re-cultured on polystyrene. The number of RPE cells on Poly-HEMA and polystyrene were the same while the proliferation rate of the cultured cells on Poly-HEMA was reduced; no remarkable cell death was detected on polymer and on polystyrene plates. The giant colonies which were formed on Poly-HEMA were re-cultured. The expression of tyrosinase gene was detected 434.65 in cultured RPE cells on the polymer.

Conclusion: Poly-HEMA is a hydrophobic polymer. When RPE cells were cultured on Poly-HEMA they could not adhere to substrate and formed many colonies. Based on our study, Poly-HEMA did not induce cell death in RPE cells but the proliferation of cells was reduced. Tyrosinase expression revealed that Poly-HEMA could support RPE cultures to establish their population as the main constituents of the giant colonies.

Keywords: RPE cell, Polymer of Poly-HEMA, Tyrosinase

Citation: Nazem-Roaya F, Soheili ZS, Heidari R, Deezagi A, Ahmadi H, Samiei Sh, et al. **The Effect of Polyhydroxyethylmethacrylate (Poly-HEMA), as a Cell Culture Substrate, on Viability and Preserving Nature of Retinal Pigment Epithelium (RPE) Cells.** J Isfahan Med Sch 2014; 32(300): 1444-60

1- National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran

2- Assistant Professor, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran

3- Assistant Professor, Ophthalmic Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

4- Assistant Professor, Iranian Blood Transfusion Organization Research Center, Tehran, Iran

Corresponding Author: Fatemeh Nazem-Roaya MSc, Email: nazemroaya@yahoo.com