فصلنامه علمی – پژوهشی زیست شناسی کاربردی دانشگاه الزهرا(س)
دوره ۳۳ ، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۹

تکثیر سلول های U937 میکروکپسوله شده در بیوراکتور همزده خارجی

یونس بیگی خسروشاهی*[۱]، مریم حسینی[۲]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۵/۱۰
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۲/۳

چکیده

استفاده وسیع سلول‌های بنیادی برای کاربردهای درمانی، نیاز به تولید مکرر تعداد زیادی از سلول‌ها با خصوصیات مناسب تحت شرایط کنترل شده در بیوراکتورها دارد. در این تحقیق سلول های U937 به عنوان مدلی از سلول های بنیادی شناور در داخل میکروکپسول های آلژینات-ژلاتین با دانسیته سلولی ۲/۵ ×۱۰^۶ Cells/ml قرار گرفتند. میکروکپسول ها در دو بیوراکتور پرفیوژن با لوپ همزن خارجی و ستونی حبابدار کشت داده شدند. نتایج بدست آمده افزایش ۹/۲± ۰/۹ سلول ها در راکتور پرفیوژن با همزن خارجی را نشان داد در حالی که به دلیل تنش بالا قادر به رشد مناسب در راکتور ستونی حبابدار نبودند. نتایج بدست آمده، تایید کننده مناسب بودن میکرو کپسول های آلژینات-ژلاتینی جهت تکثیر سلولهای بنیادی در سیستمهای دینامیک می‌باشد. برای این منظور بیوراکتور پرفیوژن با لوپ همزن خارجی با کاهش تنش برشی و پخش بهتر اکسیژن، محیط همگن و مناسبتری را برای رشد و تکثیر سلول‌ها ایجاد می‌نماید.

واژه‌های کلیدی: *بیوراکتور پرفیوژن، بیوراکتور ستونی حبابدار، تکثیر هدفمند سلول‌های بنیادی خونساز، لوپ همزن خارجی، میکروکپسول.*

مقدمه

سلول های بنیادی نقش بسیار مهمی در کاربردهای پزشکی ایفا می کنند. بنابراین کشت این سلول ها و افزایش آنها از اهمیت زیادی برخوردار است. در میان روش های مختلف برای کشت، سیستم‌های کشت ساکن مثل تی فلاسک برای گسترش سلول‌های خونساز بیشتر استفاده می‌شود (Collins *et al*., 1998b; Meissner *et al*., 1999). ولی این سیستم ها محدودیت‌هایی از نظر شیب‌های غلظتی از قبیل pH، مصرف اکسیژن و تجمع متابولیت‌ها در محیط کشت دارند. به‌علاوه، شرایط محیطی در

۱- استادیار، گروه مهندسی شیمی، دانشکده فنی مهندسی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران
*(نویسنده مسئول: y.beygi@azaruniv.ac.ir)
۲- استادیار، گروه مهندسی شیمی، دانشکده فنی مهندسی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران

آن نمی‌تواند به صورت آنلاین کنترل شود. در نتیجه استفاده از بیوراکتورها زمانی که تعداد زیاد سلول‌ها و یا دانسیته‌ی بالای سلول مطلوب باشد، مورد نیاز است (Papoutsakis, 1991).

بیوراکتورهای همزن‌دار برای کشت سلول های حیوانی و میکروبی بسیار مناسب هستند و می توانند بسیاری از مشکلات سیستم کشت ساکن مثل گرادیان غلظت، تکرارپذیری کمتر، بررسی‌های مکرر که منجر به آلودگی می‌شود، نمونه‌گیری و کنترل شرایط کشت را بر طرف نمایند (Zandstra *et al.*, 1994 Apperley, 1994;). زانسترا و همکارانش کشت‌های سوسپانسیونی همزن‌دار را بررسی کرده و شروع به کشت سلول‌های خونی گرفته شده از مغز استخوان کردند. مقدار غلظت ماده ی تلقیحی ۱×۱۰^{۶}cell/ml بود که بعد از ۴ هفته حدود ۲۲-۷ برابر افزایش پیدا کردند (Eaves & Zandstra, 1997). اما از سوی دیگر همزن در محیط کشت تنش برشی ایجاد می‌کند (King & Miller, 2007)، به طوریکه می‌تواند برای سلول‌های حساس به تنش آسیب‌زا باشد (Nielson, 1999 Apperley, 1994;).

از سوی دیگر، تثبیت سلولی می تواند جهت حفاظت سلول ها در مقابل شرایط محیطی از قبیل تنش های احتمالی و نیل به دانسیته‌ی سلولی بالاتر نسبت به حالت آزاد و افزایش سطح قابل اتصال، به کار برده شود. این روش برای اولین بار توسط کارل در سال ۱۹۲۳ معرفی شد (Carrel, 1923). بعد از آن روش‌های مختلفی از قبیل به دام انداختن سلول در داخل ذره و کپسوله کردن سلول داخل ژل برای تثبیت سلولی به کار گرفته شد (Alizadeh *et al.*, 2017).

میکروکپسولاسیون روشی برای قرار دادن مواد فعال بیولوژیکی در داخل میکروکره‌های نیمه‌تراوا با قطر بین ۰/۲ تا ۳ میلیمتر است (Carrel, 1923; Chang, 1995). میکروکپسول‌ها باید بتوانند انتقال اکسیژن خالص و مواد مغذی به داخل کپسول را انجام دهند. در نتیجه تعداد مواد شیمیایی مورد استفاده برای کپسوله کردن سلول‌ها دارای محدودیت می باشند. بهترین ماده برای تهیه‌ی ماتریکس، پلی‌ساکاریدهای طبیعی می‌باشد. در میان آن‌ها سدیم آلژینات به دلیل توانایی تشکیل هیدروژل‌های انعطاف‌پذیر درحضور کاتیون‌های دوظرفیتی در دمای محیط بیشترین استفاده را دارد (Lewińska *et al.*, 2008). اساس همه‌ی روش‌های آماده‌سازی میکروکپسول‌ها ریختن محلول آلژیناتی در داخل حمامی حاوی کاتیون‌های دو ظرفیتی است (Lewińska *et al.*, 2008). ترکیب درصد بهینه از ژلاتین ۱/۲ درصد و آلژینات ۰/۹۶ درصد برای تهیه میکرو کپسولها جهت تکثیر سلولهای بنیادی ارائه شده است (Alizadeh *et al.*, 2017).

از سوی دیگر برای افزایش سلول ها نیاز به استفاده از بیوراکتورها می باشد. ولی به دلیل پیچیده‌تر بودن سیستم، هنوز تأثیر پارامترهای مختلف بر روی کشت سلول‌های بنیادی خونساز به‌خوبی مشخص نشده است. در این میان نحوه تأمین اکسیژن یکی از پارامترهای مهم در طراحی بیوراکتورها می‌باشد و میزان هوادهی برای بیوراکتورهای مختلف جهت حفظ سلول ها در حالت زنده متفاوت می‌باشد (Tondreau et al., 2015). آزمایش های زیادی در زمینه‌ی مسمومیت سیستم در غلظت‌های بالای اکسیژن، کمبود اکسیژن در غلظت‌های پایین و تأثیر غلظت اکسیژن در مهار رشد سلول‌ها انجام شده است. غلظت‌های

پایین اکسیژن تمایز و تکثیر بیشتری از جمعیت سلولی را نتیجه می‌دهد (Danquah, 2011). در حالی که در غلظت‌های متوسط نرخ‌های تولید افزایش می‌یابد (Apperley, 1994) . همچنین محیط با محدودیت اکسیژن به طور قابل توجهی غلظت اکسید نیتریک، پراکسید هیدروژن و رادیکال اکسیژن را کاهش می‌دهد که این مواد به عنوان مهارکننده‌ی تکثیر سلولی شناخته شده‌اند (Eibl et al., 2008). بیشترین آسیب در ابتدای بیوراکتور در محل هوادهی و در انتهای بیوراکتور، یعنی هنگام تشکیل کف می‌باشد. بنابراین استفاده از آنتی فوم و همچنین اشباع‌ساز می‌تواند در کاهش آسیب سلولی موثر باشد (Eibl et al., 2008). ترکیدن حباب‌ها در سطح آزاد مهمترین عامل مرگ و میر سلول‌ها مخصوصا در بیوراکتورهای ایرلیفت می‌باشد (Xueliang et al., 2020). حباب‌هایی که منفجر نشده‌اند به سادگی از میان سیال عبور می‌کنند و شرایط تنش بالا که منجر به مرگ سلول‌ها می‌شود، به‌وجود نمی‌آورند (King & Miller, 2007). برای غلبه بر این مشکل، در صورت بروز تلاطم سایز حباب‌ها باید کوچک باشد و در نتیجه برای حداقل کردن تنش برشی منفجر نشوند. بنابراین، میزان هوادهی و نیز جدا کردن محیط کشت حاوی سلول‌ها از سیستم‌های اکسیژن رسانی می‌تواند راه حل بسیار مفیدی باشد.

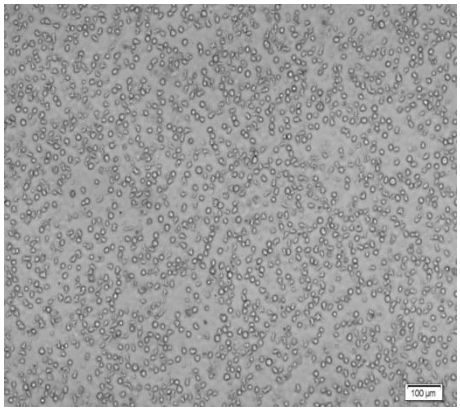
با توجه به این امر طراحی بیوراکتور نسبتا ساده‌ای که بر روی سلول ها تاثیر زیادی نداشته باشد، می‌تواند به عنوان یک هدف مناسب مورد توجه قرار گیرد. یکی از این سیستم ها، بیوراکتور پرفیوژن با لوپ همزن خارجی (PCESCT) با عملکرد و نحوه کنترل بسیار ساده می‌باشد. این بیوراکتور با کاهش تنش برشی و پخش بهتر اکسیژن، محیط همگن و مناسبی را برای رشد و تکثیر سلول‌ها ایجاد می‌نماید.

بنابراین در این تحقیق، در ابتدا سلول‌های U937 در درون میکروکپسول‌ها با ترکیب درصد بهینه گزارش شده در مراجع قرار گرفتند. در ادامه میکروکپسول ها در درون راکتور پرفیوژن با لوپ همزن خارجی و همچنین راکتور ستونی حبابدار (B.C) قرار گرفته و تکثیر شدند. در نهایت میزان رشد سلول ها در دو نوع بیوراکتور در درصدهای مختلف اکسیژن بررسی و مقایسه گردید.

مواد و روش ها

سلول های بنیادی و محیط‌های مربوط

از سلول‌های U937 (خط سلول میلوبلاستی سرطان خون) در سیستم تی‌فلاسک و بیوراکتور توسعه یافته به عنوان سلول‌های مشابه با سلول‌های بنیادی خونساز، استفاده شد. کار با آن‌ها به‌دلیل داشتن مراحل شناخته شده‌ی تمایز و نیاز نداشتن به سایتوکین برای رشد و تمایز، بسیار آسان است و هیچ مسائل اخلاقی مرتبط با استفاده از آن‌ها وجود ندارد. شکل (۱) تصویر میکروسکوپ نوری از سلول‌های U937 مورد استفاده را نشان می‌دهد.



شکل ۱: تصویر میکروسکوپ نوری سلول‌های U937

جهت نگهداری سلول‌های U937 از محیط کشت RPMI 1640 (Invitrogen) با ٪۱۰ FBS (Invitrogen) استفاده شد. این محیط کشت از مواد ذکر شده در جدول (۱) با مقادیر مشخص تهیه شد.

جدول ۱: مقادیر مواد تشکیل دهنده‌ی محیط کشت مربوط به سلولهای U937

نوع ماده	حجم اضافه شده در ۱۰۰ میلی‌لیتر
RPMI 1640	۸۹ میلی‌لیتر
FBS	۱۰ میلی‌لیتر
پنیسیلین G	۱ میلی‌لیتر

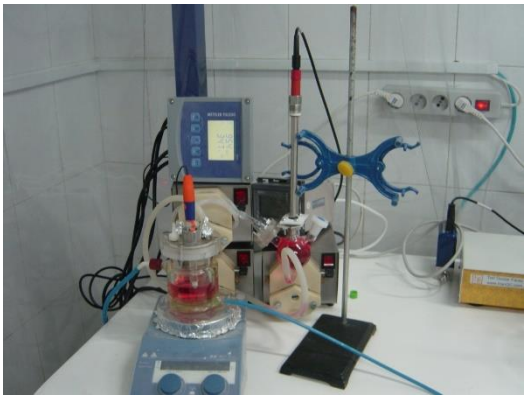
آماده سازی میکرو کپسول

آلژینات سدیم (مرک) (۲٪) در محیط عاری از بافر بدون کلسیم (مرک) (CF-KRH) و با pH برابر با ۷/۴ به مدت یک شب، با استفاده از یک همزن در هود لامینار، حل گردید. ژلاتین (۵٪) در CF-KRH حل شده و سپس با اتوکلاو استریل شد و به محلول آلژینات برای تهیه مخلوط مورد نظر از آلژینات و ژلاتین اضافه شد. سپس میکروکپسول ها با استفاده از یک روش انعقاد الکترواستاتیک با کمک ولتاژ بالا فراهم شده از منبع تغذیه (VitaTeb، ایران) آماده شد. ولتاژ کاربردی، سرعت جریان اکسترودر و فاصله سوزن از حمام۸ kV، ۰/۱۲۵ cc/min و ۶ سانتیمتر به ترتیب در نظر گرفته شد. قطر میکروکپسول ها با استفاده از نرم افزار .BELView 6.2 مشاهده گردید که دارای قطر متوسط ۲۰۰ ± ۶۰۰ میکرومتر بودند.

بیوراکتورهای پرفیوژن با لوپ همزن خارجی و راکتور ستونی حبابدار

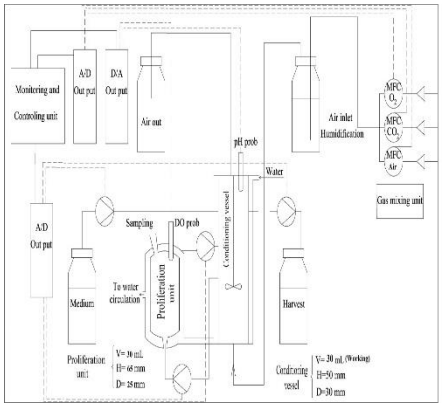
بیوراکتور ستونی حبابدار و راکتور پرفیوژن با لوپ همزن خارجی به عنوان سیستم دینامیک برای تکثیر هدفمند سلول های بنیادی خونساز با استفاده از میکروکپسول ها مورد استفاده قرار گرفت. این سیستم شامل سیستم کنترلی pH و همچنین اکسیژن می‌باشد. دمای سیستم نیز توسط سیرکولاتور آزمایشگاهی (سهند آذر) در دمای ۳۷ درجه سلسیوس کنترل شد.

تصویر راکتور آزمایشگاهی و شمایی از راکتور پرفیوژن با لوپ همزن خارجی آن، در شکل های ۲ و ۳ نشان داده شده است. قسمت تکثیر سلولی (پرفیوژن) از تانک همزده جدا شد تا تنش وارده از طریق همزن به سلول ها وارد نشود. قسمت پرفیوژن، یک سیستم جداره با ظرفیت ۳۰ میلی‌لیتر با قطر داخلی ۲۵ میلی‌متر و ارتفاع ۶۵ میلی‌متر می‌باشد. قسمت همزن خارجی یک تانک دو جداره با حجم کاری ۳۰ میلی‌لیتر با قطر داخلی ۳۰ میلی متر و ارتفاع ۵۰ میلی‌متر و مجهز به یک سنسور pH می‌باشد. حجم کلی کاری سیستم راکتور پرفیوژن با لوپ همزن خارجی برابر با ۶۰ میلی‌متر می‌باشد. بیوراکتور همزده بر روی سیستم همزن شامل مگنت یک سانتی متر قرار گرفته و اختلاط با دور همزن ۳۰ دور بر دقیقه صورت گرفت. محیط کشت بین دو قسمت سیستم راکتور پرفیوژن با لوپ همزن خارجی بوسیله پمپ پریستالتیک در حال چرخش می‌باشد و این دو قسمت بوسیله غشای با سایز ۸ میکرومتر از همدیگر جدا شده‌اند.



شکل ۲: بیوراکتور پرفیوژن با لوپ همزن خارجی راه‌اندازی شده در آزمایشگاه

بیوراکتور ستونی حبابدار با حجم کاری ۲۰ میلی‌لیتر، قطر محفظه‌ی داخلی بیوراکتور ۱/۵ سانتی‌متر، ارتفاع ۱۵ سانتی‌متر و سوراخ‌های پخش‌کننده ۳۰۰ میکرومتر طراحی و ساخته شده است. جهت استریل کردن سیستم تمامی قسمتهای بیوراکتور در داخل اتوکلاو به مدت ۲۰ دقیقه قرار داده شد. قبل از شروع آزمایشات تمامی قسمت های هر دو بیوراکتور بوسیله آب دیونیزه دو بار و بوسیله محیط کشت یکبار شستشو داده می‌شود.



شکل ۳: شمای بیوراکتور پرفیوژن با لوپ همزن خارجی

هوای ورودی شامل مخلوطی از گازهای CO_2, N_2, O_2 با شدت هوادهی ثابت ۰/۱ vvm بوسیله کنترل های هوا (MFC) تنظیم می شد. مخلوط کردن گازهای ورودی به نحوی انجام می شد که در شدت هوادهی ثابت، گاز ورودی حاوی مقدار ثابت ۵٪ CO_2 و غلظت های اکسیژن ۵، ۱۰ و ۲۱٪، بسته به غلظت اکسیژن مورد نظر باشد. مخلوط گاز ورودی پس از عبور از اشباع ساز وارد بیوراکتور می‌گردید. تعویض محیط کشت داخل سیستم بوسیله پمپ پریستالتیک بعد از استراحت دو ساعته سیستم در هر ۲۴ ساعت صورت می گرفت و در هر سری تعویض محیط میزان ۵۰٪ محیط خارج شده و محیط جدید جایگزین می‌شود. در گام اول با توجه به اطلاعات مقالات pH داخل سیستم بوسیله اسید و باز رقیق تنظیم شد. ولی با توجه به حساس بودن سلول ها به pH و احتمال تغییرات ناگهانی آن هنگام تزریق اسید یا باز، تزریق گاز CO_2 به سیستم برای کنترل pH بر روی ۷/۲ استفاده شد.

شمارش سلولی و تعیین درصد زیستایی سلول

برای تعیین تعداد سلول‌ها از لام نئوبار استفاده گردید. برای تعیین میزان زیستایی سلول به ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی درون یک میکروتیوب ۵۰ میکرولیتر تریپان بلو اضافه شده و خوب مخلوط می‌شد. رنگ جذب سلول‌های زنده نمی‌شود و شفاف می‌مانند، در حالی که رنگ جذب سلول‌های مرده می‌شود. بعد از اضافه شدن تریپان بلو در عرض ۳ تا ۵ دقیقه باید شمارش انجام شود، در غیر این صورت مرگ سلولی آغاز می‌شود و شمارش زیستایی کاهش می‌یابد. تعداد کل سلول‌ها و تعداد سلول‌های زنده شمرده شد. درصد سلول های زیستا از تقسیم تعداد سلول های شفاف بر تعداد کل سلول ها بدست می آید. در پایان لام نئوبار با الکل تمیز شده و در الکل ٪۷۰ تا استفاده‌ی بعدی قرار داده می‌شد.

جهت شمارش تعداد سلول ها در داخل هر کدام از میکروکپسول ها، میکروکپسول‌ها با استفاده از محلول ۱۰۰ میلی مولار سدیم تری سیترات حل شده و سلول‌ها آزاد شدند. سپس تعداد سلول‌های زنده به ازای هر میکروکپسول محاسبه شد.

نتایج و بحث

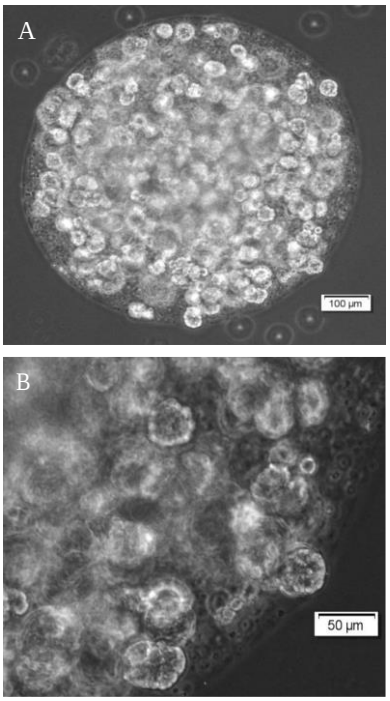
در این قسمت از تحقیق، سلول‌های U937 که رفتار مشابهی با سلول‌های بنیادی خونساز دارند، انتخاب و قبل از تلقیح به داخل راکتورها در داخل میکرو کپسول ها قرار گرفتند. بدیهی است که رشد سلول ها متاثر از تنش برشی، هوادهی و همچنین میزان اکسیژن می باشد. بنابراین برای کنترل تنش برشی، سلول‌ها در داخل میکروکپسول‌های پلیمری قرار داده شدند و بیوراکتورها در شدت هوادهی ثابت و درصدهای مختلفی از اکسیژن هوادهی شدند. در ابتدا رشد این سلول ها در بیوراکتورپرفیوژن با لوپ همزن خارجی مورد بررسی قرار گرفته و سپس با نتایج مربوط به بیوراکتور ستونی حبابدار به صورت خوراک‌دهی ناپیوسته متوالی مورد مقایسه قرار گرفت.

استفاده از میکروکپسول ها جهت تکثیر سلولهای بنیادی

با توجه به مطالعات صورت گرفته میکرو کپسول های آلژینات- ژلاتین به عنوان بهترین ترکیب برای تهیه میکرو کپسول ها انتخاب شدند. در تهیه میکروکپسول‌های آلژینات-ژلاتینی؛ درصد آلژینات، ژلاتین و نوع محلول ژلاسیون از پارامترهای موثر بر رشد سلولی می باشد. وجود آلژینات برای ایجاد محیط سه بعدی ضروری است، و همچنین به یک مقدار بهینه از آلژینات نیاز است تا بتوان ژلاتین موجود در میکروکپسول را در داخل محیط سه بعدی حفظ کرد. در مورد ژلاتین نیز، از آنجایی که این ماده هیچ پیوندی با یون‌های کلسیم و باریم نمی‌دهد، تاثیری در میزان سفتی میکروکپسول‌ها ندارد. برعکس وجود ژلاتین برای کاهش میزان سفتی میکروکپسول‌ها مورد نیاز است و وجود آن باعث بهبود رشد سلولی می‌شود.

رشد سلولی در مقادیر بدست آمده از نتایج مقالات برای مقادیر ژلاتین و آلژینات مورد ارزیابی قرار گرفت. میزان تکثیر سلول‌های U937 به عنوان مدل برای سلول‌های بنیادی خونساز در نظر گرفته شد. از آنجایی که سلول‌های U937، سلول‌های شناور هستند، هرچه محیط سه بعدی میکروکپسولی به یک محیط مایع نزدیک‌تر باشد رشد این سلول‌ها آسانتر خواهد بود. غلظت بهینه آلژینات و ژلاتین به ترتیب ۰/۹۶ و ۱/۲ با توجه به نتایج مراجع انتخاب شد (Alizadeh *et al*., 2017). از سوی دیگر میکروکپسول‌ها باید به اندازه‌ای کوچک باشند که بتوانند انتقال جرم مناسبی از مواد مغذی و اکسیژن را تامین کنند. با توجه به نتایج ارائه شده در مراجع بهترین قطر میکروکپسول ها برای سلولهای بنیادی خونساز سایز ۶۰۰ میکرومتر می‌باشد که با اعمال ولتاژ ۸ کیلوولت و فاصله ۶ سانتی متر سر سوزن با محلول حاوی باریم و غلظت بهینه آلژینات و ژلاتین به ترتیب ۰/۹۶ و ۱/۲ بدست می‌آید (Alizadeh *et al*., 2017).

سلول ها در داخل میکروکپسول ها رشد خوبی را نشان دادند. تعداد سلول‌های کپسوله شده پس از ۷ روز به میزان ۱/۵±۹/۸ برابر در داخل فلاسک افزایش یافت. میکروکپسولها با دانسیته سلولی برابر در فلاسک و هر دو نوع بیوراکتور کشت داده شد. فلاسک نیز در داخل انکوباتور حاوی CO_2 در دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده شد. میزان سلولها در ابتدای فرایند برابر $۲/۵\times۱۰^{۶}$ سلول به ازای هر میلی لیتر محلول در هنگام تزریق توسط دستگاه می‌باشد. رشد سلول‌ها در داخل میکروکپسول‌ها در بزرگنمایی های مختلف در مقیاس های ۵۰ و ۱۰۰ میکرومتر در شکل (۴) نشان داده شده است. با توجه به تصاویر مشخص است که کلونی هایی از سلول ها در داخل میکروکپسول ها بوجود آمده است. بنابراین از نظر کیفی این امر نشانگر محیط مناسب میکروکپسول ها برای تبادل مواد، اکسیژن و دی اکسید کربن و تکثیر سلول ها می باشد.



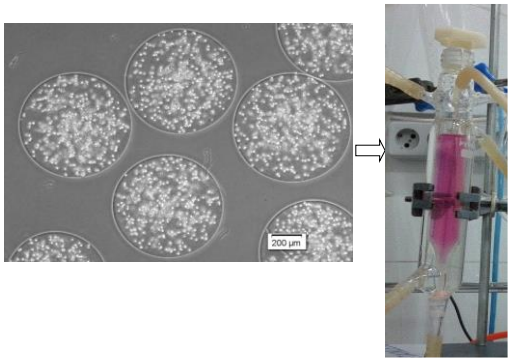
شکل ۴: تصاویر میکروسکوپی رشد سلول‌ها در میکروکپسول‌های کشت داده شده در تی فلاسک در روز هفتم در مقیاس های A)۱۰۰ و B) ۵۰ میکرومتر

بررسی رشد و تکثیر سلول‌های کپسوله شده در بیوراکتورها

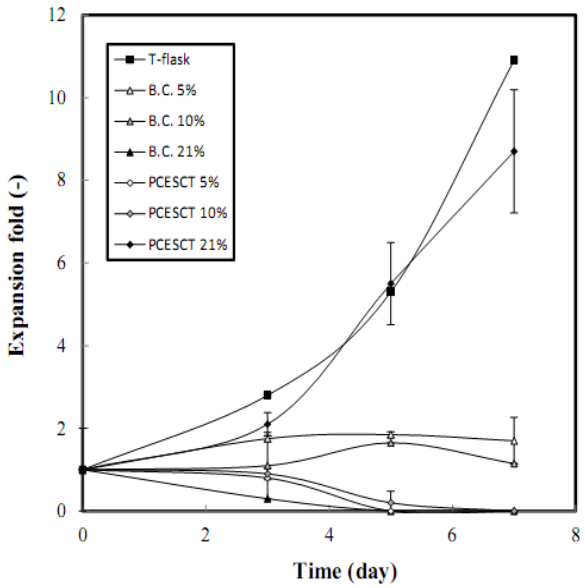
در این تحقیق از سیستم کشت بیوراکتور ستونی حبابدار به‌صورت خوراک‌دهی ناپیوسته متوالی و شامل جریان چرخشی در اثر هوادهی (شکل ۵) و بیوراکتور پرفیوژن با لوپ همزن خارجی استفاده گردید.

در ادامه میکروکپسول‌های حاوی سلول‌های U937 در این بیوراکتورها کشت داده شدند. این آزمایش با دو مرتبه تکرار انجام شد. میزان افزایش سلولی در هر میکروکپسول در بازه‌های زمانی ۳، ۵ و ۷ روز، مورد بررسی قرار گرفت.

بیوراکتورها در هوادهی ثابت ۰٫۱ vvm و درصدهای مختلف اکسیژن (۵٪، ۱۰٪، ۲۱٪) هوادهی شده و تاثیر میزان اکسیژن و تنش وارده مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داده شده در شکل (۶) اهمیت تاثیر تنش و اکسیژن با درصدهای ذکر شده را در تکثیر و عدم تکثیر سلول‌ها نشان می‌دهد.



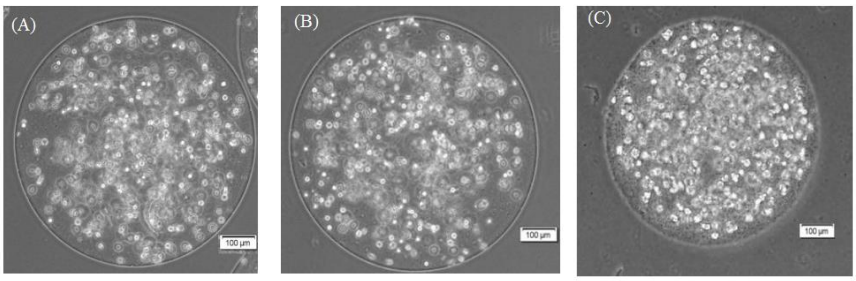
شکل ۵: تصویر بیوراکتور ستونی حبابدار و میکروکپسول ها



شکل ۶: میزان رشد سلول‌ها در سیستمهای مختلف با درصدهای مختلف اکسیژن (B.C. بیوراکتور ستونی حبابدار، PCEST بیوراکتور پرفیوژن با لوپ همزن خارجی در درصدهای مختلف هوادهی اکسیژن و T-flask مربوط به سیستم فلاسک استاتیک)

همانطور که در شکل (۶) نشان داده شده است، در داخل بیوراکتور ستونی حبابدار وقتی هوادهی با ٪۲۱ اکسیژن انجام گرفت پس از یک روز هیچ سلول زنده‌ای یافت نشد در حالیکه وقتی این میزان به ٪۱۰ کاهش پیدا کرد تعداد سلول‌ها تقریبا برابر با مقدار اولیه بود. در نهایت هوادهی با ٪۵ اکسیژن انجام شده و تعداد سلول ها پس از ۵ روز به ۱/۷ برابر مقدار اولیه رسید.

در داخل بیوراکتور پرفیوژن، هوادهی در قسمت بالای قسمت همزن خارجی انجام گرفت. هنگام هوادهی با ٪۲۱ اکسیژن تکثیر سلول ها قابل مقایسه با سیستم استاتیک بود. ولی در ترکیب درصد هوای ٪۱۰ و ٪۵ هیچ گونه افزایشی برای سلول ها مشاهده نشد. از نظر آماری نیز موارد ذکر شده با استفاده از روش تی تست چک شده تفاوت بین میزان هوادهی با ٪۲۱ با هر کدام از ٪۱۰ و ٪۵ تفاوت معنی داری با مقدار P کمتر از ۰/۰۵ داشت. در شکل (۷) نیز رشد سلول‌ها در داخل میکروکپسول‌ها در بیوراکتورهای مختلف با درصدهای مختلف اکسیژن نشان داده شده است. تصاویر تایید کننده نتایج شمارش سلولی می باشند.



شکل ۷: تصاویر میکروسکوپی روند رشد سلول‌ها در بیوراکتورهای A) ستونی حبابدار با ٪۵ اکسیژن B) ستونی حبابدار با ٪۱۰ اکسیژن و C) بیوراکتور پرفیوژن با لوپ همزن خارجی با ٪۲۱ اکسیژن بعد از ۷ روز کشت

یکی از عوامل مهمی که کاربرد بیوراکتورهای همزن‌دار مکانیکی را محدود می‌کند تنش بالای وارده به سلول از طریق پروانه همزن می‌باشد. در بیوراکتورهای ستونی- حبابدار و ایرلیفت که عمل اختلاط در اثر حرکت حباب‌های هوا درون مایع صورت می‌گیرد نیز تنش موجود مانع رشد سلول‌ها می‌شود.

از سوی دیگر فراهم کردن مقدار مطلوب اکسیژن در داخل بیوراکتور حائز اهمیت می‌باشد. علت اصلی کاهش تعداد سلول ها و کم بودن میزان افزایش سلولی در غلظت‌های بالای اکسیژن، مسمومیت سیستم می باشد. در بیوراکتور حبابدار با وارد کردن مستقیم جریان هوا میزان اکسیژن در راکتور افزایش می یابد. از سوی دیگر با معرفی مستقیم جریان هوا به داخل راکتور تنش زیادی نیز به سلول ها وارد می شود. این در حالی است که در بیوراکتور پرفیوژن غلظت اکسیژن در قسمت بالای لوپ خارجی در ۲۱، ۱۰ و ۵٪ تنظیم می گردید. بنابراین غلظت اکسیژن در راکتور پرفیوژن به مراتب کمتر از مقادیر متناظر آن در قسمت همزده می باشد. از سوی دیگر تنش کمتری به دلیل جدا بودن محفظه همزده به سلول ها وارد می شود. میزان افزایش سلولی در ورودی اکسیژن ۲۱٪ برابر ۹/۲± ۰/۹ بود. رشد بالا در این غلظت اکسیژن به دلیل فراهم آمدن غلظت مناسب اکسیژن در داخل بیوراکتور پرفیوژن در هوادهی قسمت همزده با اکسیژن ۲۱٪ بود. عدم رشد در غلظت های پایینتر ٪۱۰ و ٪۵ به دلیل کم بودن غلظت اکسیژن در این غلظت ها می‌باشد. این در حالی است که در بیوراکتور ستونی حبابدار در هوادهی با ٪۲۱ اکسیژن، از یک سو بر اثر غلظت اکسیژن بسیار بالا و از سوی دیگر به دلیل تنش زیاد سلول ها زنده نمی مانند. ولی با کاهش این میزان به ٪۱۰ تعداد سلول‌ها تقریبا برابر با مقدار اولیه و با هوادهی حاوی ٪۵ اکسیژن تعداد سلولها پس از ۵ روز به ۱/۷ برابر مقدار اولیه رسید. در حالی که در راکتور پرفیوژن در غلظت های ۱۰٪ و ۵٪ اکسیژن در قسمت بالای لوپ خارجی اکسیژن کافی در دسترس سلول ها را فراهم نخواهد نمود. نتایج بدست آمده برای بیوراکتور پرفیوژن با ٪۲۱ اکسیژن از نظر آماری با بیوراکتور ستونی حبابدار در هوادهی با ٪۲۱، ٪۱۰ و ٪۵ اکسیژن تفاوت معنی داری با مقدار P کمتر از ۰/۰۵ را داشته و تفاوت دو بیوراکتور نیز از نظر آماری مورد تایید قرار گرفت.

بنابراین با مقایسه رشد سلول ها در دو راکتور می توان نتیجه گرفت که اکسیژن و تنش از عوامل بسیار مهم تاثیر گذار بر میزان رشد سلولی می باشند. میزان رشد کمتر در راکتور ستونی حبابدار در مقایسه با راکتور پرفیوژن با همزن خارجی نشان می دهد که تاثیر تنش، حتی با وجود رشد سلول ها در میکروکپسول ها، پارامتر بسیار مهمی در انتخاب نوع راکتور می باشد.

نتیجه‌گیری

هدف این تحقیق کاهش تنش برشی وارد شده به سلول ها با استفاده از میکرو کپسول ها می‌باشد. سلول های U937 به عنوان نمونه سلول های بنیادی خونساز در دو بیوراکتور پرفیوژن با لوپ همزن خارجی و بیوراکتور ستونی حبابدار به صورت

خوراک‌دهی ناپیوسته متوالی در درصدهای مختلف اکسیژن کشت داده شدند. نتایج بدست آمده نشان داد که میزان اکسیژن و تنش وارده از پارامترهای موثر بر رشد سلولی می باشند. علاوه بر آن، بیوراکتور پرفیوژن با لوپ همزن خارجی با تنش کمتر محیط مناسبتری را برای رشد سلول ها از خود نشان داد. همچنین نتایج نشان دادند که کشت سلول ها در داخل این بیوراکتور در مجاورت اکسیژن ۲۱٪ دارای تفاوت قابل توجهی با سیستم استاتیک می‌باشد.

منابع

Alizadeh Sardroud H, Nemati S, Baradar Khoshfetrat A, Nabavinia M, Beygi Khosrowshahi Y. (2017) Barium-crosslinked alginate-gelatin microcapsule as a potential platform for stem cell production and modular tissue formation. J Microencapsul. 34 (5):488-497.

Apperley J.M., (1994) Umbilical cord blood progenitor cell transplantation. Bone Marrow Transplant. 14: 187-96.

Carrel, A. (1923) A method for the physiological study of tissues in vitro. J. Ex. Med. 38 :407-418.

Chang, T. M. (1995) Artificial cells with emphasis on bioencapsulation in biotechnology. Biotechn. ann. rev.1 : 267-295.

Lewińska, D., Bukowski, J., Kożuchowski, M., Kinasiewicz, A. and Weryński, A. (2008) Electrostatic microencapsulation of living cells. Biocybern. Biomed. Eng. 28 :69-84.

Collins, P.C., Nielsen, L.K., Patel, S.D., Papoutsakis, E.T. and Miller, W.M. (1998b) Characterization of hematopoietic cell expansion, oxygen uptake, and glycolysis in a controlled, stirred-tank bioreactor system. Biotechnol. Prog. 14 (3): 466–472.

Danquah, M.K. (2011) Process challenges relating to hematopoitic stem cell cultivation in bioreactors. Bio. Eng. lab. 38: 761-767.

Eibl, R., Eibl, D., Pörtner, R., Catapano, G. and Czermak, P. (2008) Cell and Tissue Reaction Engineering. Springer.

King, J.A. and Miler, W.M. (2007) Bioreactor development for stem cell expansion and controlled differentiation. Curr. Opin. Chem. Biol. 11: 394-398.

Meissner, P., Schroder, B., Herfurth, C. and Biselli, M. (1999) Development of a fixed bed bioreactor for the expansion of human hematopoietic progenitor cells. Cytotechnology. 30: 227–234.

Nielson. L.K. (1999) Bioreactors for hematopoietic cell culture. Annu. Rev. Biomed. Eng .129-159.

Papoutsakis, E.T. (1991) Fluid-mechanical damage of animal cells in bioreactors. Trends Biotechnol. 9 (12): 427-437.

Tondreau MY., Laterreur V., Gauvin R., Vallières K., Bourget J.M., Lacroix D., Tremblay C., Germain L., Ruel J. and Auger F.A., (2015) Mechanical properties of endothelialized fibroblast-derived vascular scaffolds stimulated in a bioreactor. Acta Biomater. 18:176-85.

Xueliang L.,Guoqiang Z., Xinrui Z., Jingwen Z., Guocheng D., Jian C., (2020) A conceptual air-lift reactor design for large scale animal cell cultivation in the context of in vitro meat production. Chemical Engineering Science., 211(16): 115269.

Zandstra, P.W., Eaves, C.J. and Piret, J.M., (1994) Expansion of hematopoietic progenitor cell populations in stirred suspension bioreactors of normal human bone marrow cells. Biotechnology (NY). 12: 909–914.

Zandstra, P.W., Eaves, C.J. and Piret, J.M., (1997) Cellular determinants affecting the rate of cytokine depletionin cultures of human hematopoietic cells. Biotechnol. Bioeng. 54: 58-6.

Ex vivo expansion of micro capsulated U937 cells in an external stirred bioreactor

Y. Beygi Khosrowshahi[1*], M. Hosseini[2]

Received: 2019.8.1
Accepted: 2020.4.22

Abstract

The wide use of stem cells for therapeutic applications requires frequent production of a large number of cells with proper characteristics under controlled conditions in bioreactors. In this study, U937 cells were introduced as a model of floating stem cells inside alginate-gelatin microcapsules with a cell density of 2.5×10^6 cells/ml. The results showed very good growth of microcapsules inside the flask. Microcapsules were cultured in two different bioreactors with different concentrations of oxygen in two perfusion bioreactors with external stirrer loop (PC-ESCT) and bubble column (B.C). The results showed an increase of 9.2 ± 0.9 in the perfusion reactor with the external stirrer, while due to the high stress they were unable to grow properly in the bubble column reactor. The results confirm the suitability of alginate-gelatin microcapsules for the propagation of stem cells in dynamic systems. The perfusion bioreactor with external loop loops, by reducing the shear stress and better oxygen distribution, creates a homogenous and more suitable environment for growth and proliferation of cells.

Keywords: Bubble Column Bioreactor, External Agitator Loop, Hematopoietic Stem Cell, Microcapsule, Perfusion Bioreactor, Targeted Propagation.

1-Assistant professor,Chemical Engineering Group,Departmet of Engineering, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran
* (Corresponding author: y.beygi@azaruniv.ac.ir)
2-Assistant professor Chemical Engineering Group,Departmet of Engineering, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran