Design, fabrication and evaluation of the cell micro-injector for improvement of the quality of subretinal space injection with minimum damage

Hamid Aboutaleb Kadkhodaeian [1],**Amir Salati** [2] , **Hamidreza Sameni** [3] , **Alireza Lashay** [4]

1. Assistant Professor, Department of Anatomy, School of Medicine, Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran., (Corresponding Author), Tel: +9823-33654162, Email: Habootaleb92@gmail.com. ORCID ID: 0000-0002-9736-9722

2. Assistant Professor, Department of Tissue Engineering and Applied Cell Sciences, Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran. ORCID ID: 0000-0002-6840-1527

3. Associate Professor, Nervous System Stem Cells Research Center, Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran. ORCID ID: 0000-0002-2669-6697

4. Professor, Farabi Eye Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

ABSTRACT

Background and Aim: An accurate cell injection in therapeutic methods is one of the most important and challenging stages in animal and human cell therapy. The aim of this study was to design and fabricate a device for injecting stem cells into the subretinal space and the vitreous body in degenerative eye diseases.

Materials and Methods: In this study, the primary map of the device, metal molds and the appropriate tools for the machine were prepared. The pieces of the device were manufactured by a CNC machine and assembled together. In order to verify the device function we used immunohistochemistry (IHC) method and fluorescein was injected into the subretinal space of the rats. Tissue samples were examined by fluorescent microscope six and 24 hours after injection

Results: The results of IHC showed that six and 24 hours after the injection, fluorescein dye was observed in the sub-retinal space, between retinal pigment epithelium (RPE) and neurosensory retina. Histologic samples showed minimal damage due to the insertion of needle and there was no disorganization in the retina.

Conclusion: This study revealed that fluorescein can be injected by the micro-injector into the subretinal space accurately. It seems that this device has the capability to inject stem cells into the retina properly and can be used in animal models.

Keywords: Micro-injector, Stem cells, Subretinal space, Rat.

Received: Nov 14, 2019 **Accepted:** Mar 1, 2021

How to cite the article: Hamid Aboutaleb Kadkhodaeian,Amir Salati , Hamidreza Sameni , Alireza Lashay. Design, fabrication and evaluation of the cell micro-injector for improvement of the quality of subretinal space injection with minimum damage. SJKU 2021;26(4):105-116.

Copyright © 2018 the Author (s**).** Published by Kurdistan University of Medical Sciences. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non Commercial License 4.0 (CCBYNC), where it is permissible to download, share, remix, transform, and buildup the work provided it is properly cited. The work cannot be used commercially without permission from the journal

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی کردستان / دوره بیست و شش / مهر و آبان ۱۴۰۰/۱۱۶-۱۰۵

طراحی، ساخت و ارزیابی دستگاه میکرواینجکتور سلولی جهت بهبود کیفیت تزریق در فضای زیر شبکیه با حداقل آسیب

حمید ابوطالب کدخداییان [۱و۲]، امیر سلاطی [۲]، حمیدرضا ثامنی [۳]، علیرضا لاشیئی [۴]

۱. استادیار، گروه علوم تشریح، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، سمنان، ایران. پست الکترونیک: habootaleb92@gmail.com ، **تلفن:** ۰۲۳-۳۳۶۵۴۱۶۲ ، کد ارکید: ۰۰۰۰-۰۰۰۲-۹۷۳۶-۹۷۲۲

۲. استادیار، گروه مهندسی بافت و علوم سلولی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، سمنان، ایران. کد ارکید: ۰۰۰۰-۰۰۰۲-۶۸۴۰-۱۵۲۷

۳. دانشیار، مرکز تحقیقات سلول های بنیادی سیستم عصبی، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، سمنان، ایران. کد ارکید: ۰۰۰۰-۰۰۰۲-۲۶۶۹-۶۶۹۷

۴. استاد، مرکز تحقیقات چشم فارابی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: تزریق صحیح سلول در روش های سلول درمانی یکی از مراحل مهم و چالش برانگیز در مطالعات حیوانی و انسانی است. هدف از این مطالعه طراحی و ساخت دستگاهی برای تزریق سلول های بنیادی به فضای زیر شبکیه و درون زجاجیه سلول درمانی در بیماری های تخریبی شبکیه است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه نقشه اولیه دستگاه تهیه شد و سپس قالب های فلزی تهیه و ابزار مناسب برای ساخت دستگاه فراهم شد. قطعات دستگاه جداگانه توسط دستگاه برش سی ان سی تهیه شد و بر روی هم سوار شدند. برای تایید کارکرد دستگاه از روش ایمونوهیستوشیمی استفاده شد و تزریق ماده فلوئورسین در فضای زیر شبکیه با دستگاه ساخته شده در موش های بزرگ آزمایشگاهی انجام شد. نمونه های بافتی بعد از گذشت ۶ ساعت و ۲۴ ساعت بعد از تزریق توسط میکروسکوپ فلوئورسنت جهت تزریق صحیح مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته‌ها: نتایج حاصل از تزریق ماده فلوئورسین در فضای زیر شبکیه نشان داد که ماده تزریق شده ۶ ساعت و ۲۴ ساعت بعد از تزریق به درستی در فضای زیر شبکیه قرار گرفته است و بین لایه سلولی رنگ دانه دار شبکیه و شبکیه عصبی قرار دارد. نمونه های بافتی دارای حداقل آسیب ناشی از ورود سوزن بوده و لایه های بافتی شبکیه دچار بهم ریختگی نشده اند.

نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان داد که دستگاه میکرواینجکتور سلولی توانسته است به طور صحیح و دقیق ماده فلوئورسین را در فضای زیر شبکیه تزریق نماید. به نظر می رسد که این دستگاه توانایی تزریق صحیح سلول های بنیادی به فضای زیر شبکیه را دارد و می تواند در مدل های حیوانی مورد استفاده قرار گیرد.

کلمات کلیدی: میکرواینجکتور، سلول های بنیادی، فضای زیر شبکیه، موش بزرگ آزمایشگاهی.

وصول مقاله: ۹۸/۸/۲۳ اصلاحیه نهایی: ۹۹/۱۲/۱۰ پذیرش: ۹۹/۱۲/۱۱

مقدمه

تزریق سلولهای بنیادی به درون چشم به طرق مختلف انجام می شود اما بطور کلی دو روش برای تزریق سلول به درون چشم وجود دارد ۱- تزریق درفضای زیر شبکیه (sub retinal space) و ۲- تزریق به درون زجاجیه (intra vitreous). تزریق در فضای زیر شبکیه نیز به سه شکل انجام می شود; ۱- دسترسی به فضای زیر شبکیه از طریق قرنیه (ترانس کورنئال)که از طریق مردمک و با عبور از عدسی، زجاجیه و شبکیه وارد فضا می شود(۱)، ۲- دسترسی به فضای زیر شبکیه از طریق اسکلرا با عبور از پارس پلانا یا لیمبوس (۲) و ۳- دسترسی به فضای زیر شبکیه از طریق کوروئید و غشای بروکس بدون آسیب به شبکیه(۳). در تزریق داخل زجاجیه ای غلظت بالایی از دارو و مواد تزریق شونده نیاز است با این حال جداشدگی شبکیه، اندوافتالمیت و خونریزی از عوارض این روش است (۴-۷). میانگین سهم سطح شبکیه تحت تاثیر با یکبار تزریق در فضای زیر شبکیه بین ۸,۷۹ تا ۳۶,۹ درصد می باشد که وابسته به سن (اندازه کره چشم) و حجم تزریق شده می باشد (۵).تزریق در فضای زیر شبکیه روشی تهاجمی و پیچیده است.

یکی از موارد بسیار مهم در پیوند سلولی در بیماری های تخریبی شبکیه انتخاب محل دقیق پیوند سلولی است. تزریق در فضای زیر شبکیه در بیماری های تخریبی شبکیه از جمله تخریب ماکولا وابسته به سن (Age Related Macular Degeneration, AMD) و رتینیت پیگمنتوزا (Retinitis Pigmentosa, RP) به دلیل نزدیک بودن به محل آسیب موجب مهاجرت بیشتر سلول های پیوند شده می شود(۸). از طرفی فضای زیر شبکیه محیطی است که از لحاظ ایمنی به سلول های تزریق شده واکنش ایمنی نشان نمی دهد (۷) با این حال مطالعات نشان می دهند که موانع طبیعی از جمله لایه محدود کننده داخلی شبکیه و همچنین ماتریکس خارج سلولی آن در مهاجرت سلول های تزریق شده درون فضای زجاجیه وجود دارد (۹). روش سومی نیز برای تزریق سلولی وجود دارد که از ورید دمی برای تزریق سیستمیک استفاده می شود (۶, ۱۰-۱۲).

سلول درمانی هم اکنون در مرحله بالینی برای درمان بسیاری از بیماری های شبکیه از جمله تخریب ماکولا وابسته به سن (نئوواسکولار و آتروفیک)، استارگات، رتینیت پیگمنتوزا قرار دارد. سلول های مورد استفاده بر حسب پژوهش عبارتند از سلول های رنگ دانه دار شبکیه (Retinal Pigment Epithelium, RPE) مشتق شده از سلول های بنیادی جنینی و یا سلول های القا شده پرتوان، سلول های بنیادی عصبی مشتق شده از جنین انسانی (Human Central Nervous System Stem Cell, HuCNS-SC)، سلول های بنیادی مشتق شده از بند ناف انسانی و سلول های بنیادی اوتولوگوس مغز استخوان. مکانیسم پیشنهاد شده برای سلول درمانی با استفاده از این سلول ها به دو عامل بستگی دارد: جانشینی سلول های آسیب دیده توسط سلول های پیوند شده و یا رها سازی پایدار فاکتورهای رشد که موجب افزایش فعالیت سلول های شبکیه شود. سلول درمانی در فضای زیر شبکیه به صورت سوسپانسیون سلولی و یا به شکل لایه ای سازمان یافته از سلول ها صورت می گیرد. با استفاده از جراحی این سلول ها را می توان به فضای زیر شبکیه از طریق ویترکتومی پارس پلانا، رتینوتومی و انتقال سلولی تزریق نمود. بسیاری از مشکلات به دلیل وسایل جراحی و تکنیک جراحی ایجاد می شوند این درحالی است که با افزایش ایمنی سلولی و ایمنی جراحی میزان قابل توجهی از مشکلات بدون برش جراحی برای دسترسی بهتر به فضای زیر شبکیه برطرف خواهد شد (13, 14).

رساندن سلول های بنیادی به بافت هدف به طور دقیق، موثر و به میزان کافی امری است بسیار مشکل. هدف در این گونه موارد عبارت است از رساندن صحیح سلول ها به محل های آسیب، جلوگیری از آسیب بافت میزبان و حفظ میزان بقا و تکثیر سلول های بنیادی بعد از پیوند و جلوگیری از ایجاد بدخیمی و تراتوما. مسیرهای دسترسی و پیوند سلول های

بنیادی بر حسب مقاصد پژوهشی متفاوت است. به طور مثال تزریق داخل وریدی یکی از ساده ترین روش های رساندن سلول های بنیادی است اما در این روش اثربخشی سلول هاکم بوده و میزان کمی از سلول ها به محل ضایعه می رسند (۱۵).

تاکنون استانداری برای تعیین حجم، غلظت و سرعت تزریق سلول های بنیادی در کارآزمایی های بالینی تعریف نشده است. به طور مثال تزریق حدودا ۶۰۰۰۰ سلول RPE برای پوشش کامل ماکولا جهت حفظ دید مرکزی برآورد شده است. همچنین حجم تزریق شده در کارآزمایی های بالینی بین ۱۵۰-۱۰۰ میکرولیتر بوده است و بنابراین با توجه به کوچکی اندازه چشم مدل های حیوانی در مقایسه با چشم انسان، غلظت استفاده شده (سلول/میکرولیتر) کمتر از چیزی است که در مطالعات حیوانی استفاده می شود (۸). تزریقات داخل زجاجیه و زیر شبکیه هم در کلینیک و هم در آزمایشگاه های تحقیقاتی برای تزریق مواد مختلف از جمله داروها و محلول ها و یا سلول ها مورد استفاده است(۷). چنین تزریقاتی می تواند به صورت دستی و از طریق قرار دادن یک سوزن به درون صلبیه چشم و ایجاد سوراخ از طریق آن به درون زجاجیه یا زیر شبکیه انجام شود. روش های مختلف تزریق نیازمند قرارگیری صحیح سوزن در فضای مورد نظر است. سوزن تزریق را می توان از طریق میکرومانیپولاترو ها به درون زجاجیه فرستاد و یا برای ثبت فعالیت الکتریکی سلول های شبکیه نزدیک شبکیه قرار داد. چنین وسایلی نیازمند قرارگیری درست سوزن در شبکیه است. دستگاه هایی که چنین توانمندی را دارند گران بوده و برای استفاده در حیوانات کوچک آزمایشگاهی مناسب نیستند(16).

تزریقات داخل چشمی که به صورت خودکار انجام می شود در مقایسه با تزریقاتی که با استفاده دست انجام می شود دارای ایمنی بیشتر و دقت تزریق بیشتری هستند. شرکت استولتینگ دستگاه تزریق کننده ای را طراحی کرده است که شبیه به استریوتاکس بوده و می توان برای نمونه های مختلف استفاده نمود اما این دستگاه هزینه بالایی داشته و به صرفه نیست. هم اکنون از تزریق کننده های زیر شبکیه لامبرت و لاندرز با اندازه سوزن 20g و انتهای انحنا دار به سمت بالا استفاه می شود که البته تزریق با استفاده از دست صورت می گیرد. با این حال دستگاه اولتراپمپ Ultra Pomp3, UMP3 نیز ساخته شده است که قابلیت تنظیم تزریقات را دارد اما هزینه بالایی دارد و به صرفه نیست. (۱۷-۲۴). بنابراین ساخت دستگاه های تزریق کننده سلولی با دقت بالا و با هزینه کم برای مقاصد درمانی ضروری به نظر می رسد. در این طرح وسیله ای طراحی شده است که ساده، کارا و ارزان بوده و در حیوانات آزمایشگاهی قابلیت استفاده دارد. این وسیله دارای سوزن تزریق 30g است که در دستگاه های میکرومانیپولاتور استفاده می شود و توسط دست قابلیت حرکت دارد. مزیت این طرح در داشتن قطعه ای است که متحرک بوده و امکان حرکت و تنظیم برای تزریقات در فضای زیر شبکیه و داخل زجاجیه توسط دست را فراهم می سازد و بعد از ورود به فضای مورد نظر نیاز به دست اوپراتور نیست و بنابراین درصد خطای تزریق کاهش می یابد. مزایای این دستگاه عبارتند از: توانایی تزریق مایع و سلول در فضای زیر شبکیه و داخل زجاجیه، قابلیت تزریق بصورت افقی و اوریب، قابلیت حرکت سوزن تزریق در مقیاس میکرومتر (گام حرکت کوچک)، قابلیت حرکت سوزن در مقیاس سانتی متر (گام حرکت بزرگ)، قابلیت تنظیم ارتفاع سرنگ، تزریق مایع و سلول بدون ایجاد حرکت و لرزش در سوزن تزریق، قابلیت نصب دوربین و ادوات سیستم تزریق خودکار. همچنین به دلیل استفاده از آلیاژ آلومینیوم در ساخت قطعات دستگاه، لذا به راحتی می توان آن را با استفاده از اتوکلاو و یا فور استریل نمود و در محیط های کشت و یا اتاق جراحی استفاده کرد.

مواد و روش‌ها

گروههای مورد مطالعه:

تمامی روش های مورد استفاده در این تحقیق بر اساس دستورالعمل (The Association for the Research in Vision and Ophthalmology,ARVO) برای استفاده از حیوانات در تحقیقات چشم انجام شد و ملاحظات اخلاقی بر اساس کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی سمنان با کد اخلاق IR.SEMUMS.REC.1397.048 و همچنین دستور العمل اخلاقی هلسینکی سال ۱۹۷۵ مد نظر قرار گرفت. در این مطالعه از شش سر موش بزرگ آزمایشگاهی نژاد هودد (hooded) خریداری شده از انستیتو پاستور با وزن بین ۲۵۰-۲۰۰ گرم استفاده شد. نمونه ها بعد از تزریق ماده فلوئورسین به مدت ۶ ساعت و ۲۴ ساعت بعد از تزریق مورد مطالعه قرار گرفتند.

طراحی و ساخت دستگاه:

اجزای دستگاه (شکل شماره ۱) عبارتند از ۱- دیسک نگهدارنده (در قسمت پایین دستگاه یک دیسک به قطر ۱۵ سانتی متر و ضخامت یک سانتی متر طراحی گردید که به عنوان پایه نگهدارنده دستگاه محسوب می شود. در نقطه مرکزی این دیسک یک سوراخ برای اتصال پایه عمودی درنظر گرفته شده است)، ۲- میله عمودی (این میله به مرکز دیسک نگهدارنده متصل می شود و سایر اجزا روی آن نصب می گردد. این میله دارای طول ۱۰ و قطر ۱۵ میلی متر است. میله به صورت ثابت نصب می شود ولی به کمک رابط ارتفاع عمودی سرنگ روی آن قابل تنظیم است)، ۳- مکعب رابط (مکعب رابط با ابعاد 2.5 در 2.5 در 4.5 سانتی متر طراحی شده است. دو سوراخ در امتدادهای افقی و عمودی مکعب برای میله های افقی و عمودی ایجاد شده است. از طریق این مکعب ارتفاع عمودی و افقی سوزن قابل تنظیم است)، ۴- میله افقی (شبیه به میله عمودی بوده با این تفاوت که در انتهای آن یک زائده به همراه سوراخ ایجاد شده است که از طریق آن به مفصل دو سویه متصل می گردد)، ۵- مفصل دوسویه (این مفصل از یک استوانه که دو سر آن دارای شیار است تشکیل شده است. شیار پایین به میله افقی و شیار بالا به پایپ الاکلنگی از طریق سوراخ هایی که در کنار شیار ها قرار دارد پیچ می شود. با شل کردن پیچ ها می توان زاویه تزریق را تغییر داد)، ۶- پایپ الاکلنگی (یک استوانه تو خالی لوله مانند است که در زیر آن یک زائده قرار ارد. این زائده به مفصل دو سویه متصل می شود. درون پایپ دسته سرنگ قرار می گیرد. دسته سرنگ از این طریق می تواند به عقب و جلو (گام بزرگ) و به صورت دورانی حرکت کند و در جای خود محکم شود)، ۷- دسته سرنگ (یک میله افقی به قطر 9.5 سانتی متر است که درون پایپ قرار می گیرد. در قسمت انتهایی دسته سرنگ زائده ای قرار دارد که مکانیزم کنسول تزریق روی آن پیچ می شود. پایه سرنگ در انتهای دیگر دسته سرنگ قرار دارد)، ۸- پایه سرنگ (محلی برای نصب پمپ پلاستیکی یا شیشه ای سرنگ است. پمپ سرنگ بعد از قرارگیری در این محل در جای خود محکم می شود. مایع و یا سوسپانسیون سلولی بعد از خروج از طریق یک لوله پلاستیکی به سوزن تزریق متصل می شود. همچنین پایه سرنگ در قسمت پایین خود یک پیچ برای ثابت نگه داشتن روی دسته سرنگ دارد. به این ترتیب عمل تزریق مایع و سلول بدون حرکت دادن (تکان و لرزش) سوزن انجام می پذیرد)، ۹- کنسول تزریق (مهمترین بخش طراحی دستگاه یعنی مکانیسم حرکتی سوزن تزریق (گام کوچک) را شامل می شود. کنسول تزریق روی دسته سرنگ قرار می گیرد و دارای یک آلت متحرک بنام راهبر سوزن است. راهبر سوزن در انتهای کنسول قرار می گیرد و سوزن تزریق روی راهبر پیچ شده و ثابت می ماند. روی بدنه راهبر یک سوراخ رزوه دار قرار دارد. پس از قرار گرفتن راهبر روی کنسول تزریق، یک پیچ بلند از درون سوراخ های تعبیه شده در کنسول تزریق و سوراخ رزوه دار راهبر عبور می کند. قطر سوراخ های کنسول به نحوی انتخاب شده است که پیچ عبوری بتواند براحتی حرکت دورانی داشته باشد. در کناره کنسول شیاری برای قرارگرفتن سرپیچ دایره ای قرار دارد. سر پیچ دایره ای

علاوه بر ایجاد حرکت دورانی مانع از حرکت افقی پیچ می شود. با چرخش پیچ درون راهبر می توان آن را به عقب و جلو هدایت کرده و عمق تزریق را بصورت دقیق (گام کوچک) تنظیم نمود).

تزریق به فضای زیر شبکیه توسط دستگاه طراحی شده:

موش های بزرگ آزمایشگاهی توسط کتامین 62.5 mg/kg و زایلزین 12.5 mg/kg از طریق داخل صفاقی بیهوش شدند. همچنین مردمک چشم ها توسط قطره فنیل افرین 2.5% و پروپاراکایین 0.5%گشاد شد. موهای بلند و زائد اطراف چشم حیوان برداشته شد تا دید مناسب و خوبی برای چشم و فوندوس فراهم شود. اندازه و پیشرفت گشاد شدن مردمک توسط میکروسکوپ جراحی بررسی شد. بعد ازا اینکه موش بزرگ آزمایشگاهی بیهوش شد دوز دوم داروی میدریاز چشمی استفاده شد. موش های بزرگ آزمایشگاهی به مدت ۲۰ تا ۳۰ دقیقه وارد بیهوشی عمیق شدند و این زمان مناسبی برای تزریق در فضای زیر شبکیه است. بعد از اینکه موش های بزرگ آزمایشگاهی بیهوش شد به صورت لترال در زیر میکروسکوپ جراحی قرار داده شدند و با دست دیگر نگه داشته و پوزیشن مناسب داده شد. با استفاده از قطره چشمی متیل سلولز 2.5% فوندوس چشم مشاهده شد. با استفاده از پنس و قیچی ظریف در کره چشم برش کوچکی ایجاد شد و به آرامی لایه های زیرین باز شد تا لایه اسکلرا دیده شد. بعد از نمایان شدن این لایه و ۲ میلی متر در خلف لیمبوس در موقعیت ساعت ۲ موقعیت سوزن تثبیت شد و با سوزن همیلتون (30G) با استفاده از قطعه متحرک دستگاه میکرواینجکتور به آرامی وارد فضای زیر شبکیه شد و ۳ میکرولیتر از محلول فلوئورسین تزریق شد (شکل شماره ۲). در همین حین سوراخ کوچکی در لبه خارجی قرنیه ایجاد شد تا فشار داخل چشم افزایش پیدا نکند. بعد از اتمام تزریق مجدد توسط قطعه متحرک، سوزن به آرامی خارج شد و محل برش لایه ها با استفاده از نخ -10 0 بخیه زده شد. برای تایید صحیح بودن تزریق با استفاده از میکروسکوپ ته چشم مشاهده شد و با دیدن برآمدگی یا bleb تزریق تایید شد. بلافاصله بعد از تزریق و پایان جراحی از پماد چشمی حاوی باسیتراسین، نئومایسین و پلی میکسین استفاده شد تا ریسک عفونت و آسیب قرنیه کاهش یابد.

ایمونوهیستوشیمی:

بعد از تزریق فلوئورسین، بر اساس روش achalinskaM و همکاران (۲۵) نمونه‌ها به تعداد ۵ موش بزرگ آزمایشگاهی برای بررسی بافتی مورداستفاده قرار گرفتند.بدین ترتیب که ابتدا نمونه ها با استفاده از تزریق داخلی صفاقی کتامین (۶۲,۵ mg/kg میلی‌گرم/کیلوگرم) و زایلزین (۱۲,۵ mg/kg میلی‌گرم/کیلوگرم) بی‌هوش شدند. سپس با استفاده از پنس و قیچی چشم‌ها از کاسه چشم خارج و درون پارافورمالدئید ۴ درصد (سیگما، آلمان) به مدت یک شب قرار داده شدند. در روز بعد نمونه‌ها از درون پارافرمالدئید ۴ درصد خارج و بلوک پارافینی تهیه شد. برش‌های ۷-۵ میکرومتری از تمامی قسمت‌های چشم به‌صورت سریالی تهیه شد. برای ردیابی ماده فلوئورسین تزریق شده پارافین برش ها به روش روتین برداشته و آبدهی بافت انجام شد. نمونه ها با بافر سالین (Phosphate Buffer Saline, PBS) شسته شد و با H_2O_2 ۳ درصد به مدت ۱ دقیقه در دمای اتاق پراکسیدهای درونی بلاک شدند. نمونه ها با PBS شستشو داده شد و اسید هیدروکلریک ۲ درصد نرمال به آن اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه قرار گرفت. نمونه ها با بافر بورات شسته شد و ۱۰۰ میکرولیتر از تریپسین گرم به نمونه ها اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه انکوبه شد. بر روی نمونه ها ۱۰۰ میکرولیتر از محلول بلاک کننده به مدت ۱۵ دقیق در دمای ۳۷ درجه ریخته شد. در مرحله بعدی، بعد از شستشوی نمونه ها، از مارکر هسته ای پروپیدیوم یدیت به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق استفاده شد و هسته سلول ها در لایه های شبکیه نشان دار شد. در انتها نمونه ها با PBS شستشو داده و مانت شد و در زیر میکروسکوپ فلئورسنس مشاهده شد.

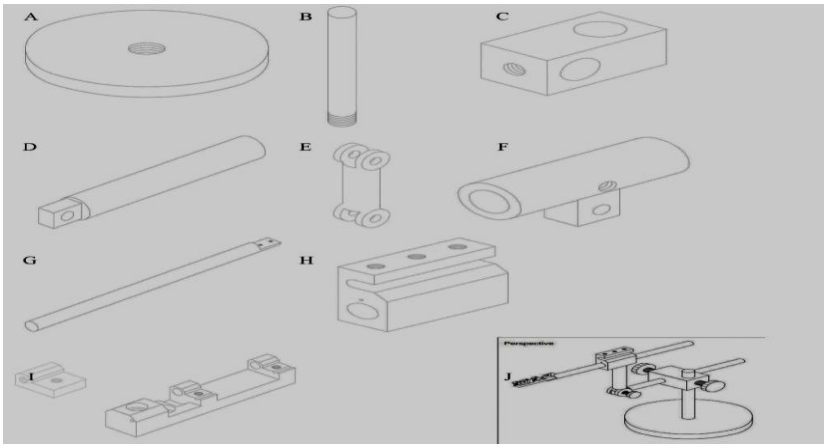
آناالیز آماری:

جامعه مورد مطالعه در این تحقیق شش سر موش بزرگ صحرایی بود که بعد از تزریق فلوئورسین در فضای زیر شبکیه آنها به مدت ۶ و ۲۴ ساعت بعد از تزریق کشته شدند و نمونه های بافتی آنها مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به اینکه هدف در این مطالعه بررسی قرارگیری ماده فلوئورسین در فضای زیر شبکیه بود لذا داده های آماری قابل استخراج نبوده و بر اساس داده های کیفی مورد بررسی قرار گرفت.

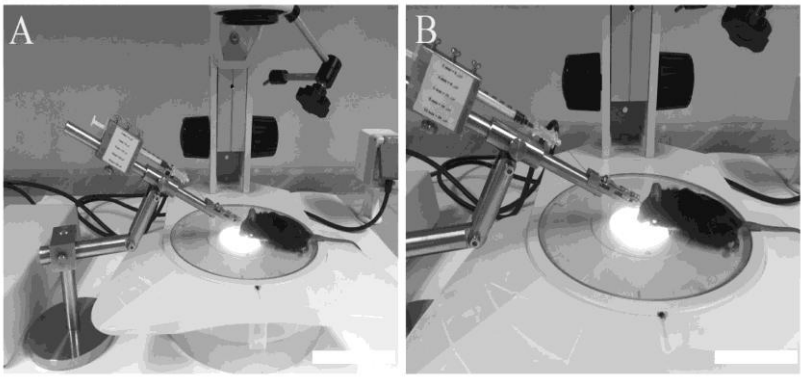
طراحی و ساخت دستگاه:

همانطور که در شکل (۱) به تفصیل نشان داده شده است دستگاه از اجزای مختلفی ساخته شده است که این اجزا با دقت بالایی مونتاژ گردیدند تا بهترین عملکرد ممکن را برای انجام تزریق داشته باشند. این دستگاه متحرک بوده و قابلیت قرارگیری در هر طرف را دارد (شکل شماره ۲) و می توان تزریق را در هر سمتی انجام داد.

یافته‌ها



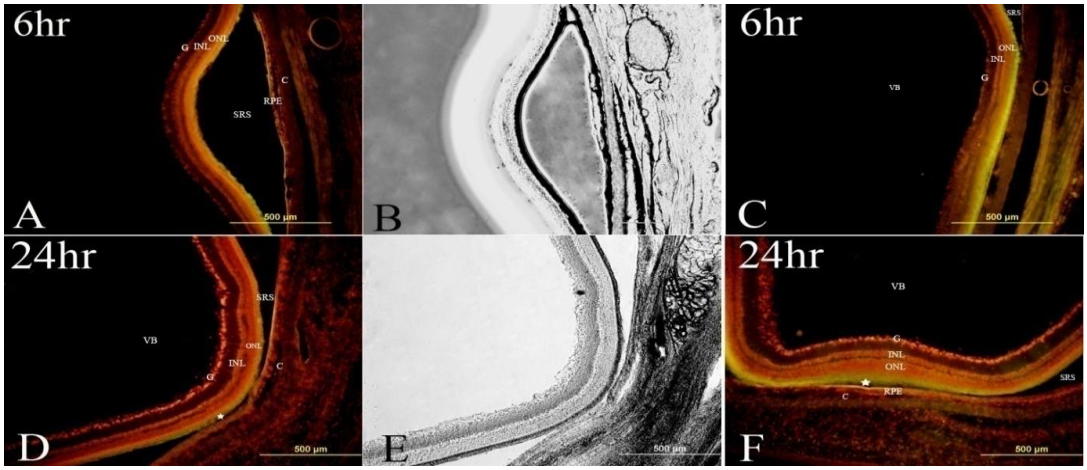
شکل ۱.تصاویر طراحی دستگاه تزریق کننده سلول به صورت قطعات جداگانه. قطعات به ترتیب عبارتند از دیسک نگهدارنده (A)، میله عمودی (B)، مکعب رابط (C)، میله افقی (D)، مفصل دوسویه (E)، پایپ الاکلنگی (F)، دسته سرنگ (G)، پایه سرنگ (H)، کنسول تزریق (I). تصویر نهایی قطعات جدا بصورت یکجا در تصویر J دیده می شود.



شکل ۲. تصویر میکرواینجکتور سازگار شده با استریومیکروسکوپ برای تزریق به درون چشم. این دستگاه متحرک بوده و قابلیت قرارگیری در هر طرف را دارد و می توان تزریق را در هر سمتی انجام داد. بزرگنمایی تصاویر به ترتیب ۵۰۰ میکرومتر برای A و ۲۰۰ میکرومتر برای B.

تزریق به فضای زیر شبکیه:

برای درستی تزریق در فضای زیر شبکیه از تزریق ماده فلوئورسین در فضای زیر شبکیه موش های بزرگ آزمایشگاهی استفاده شد (شکل ۳ A-F). نتایج این آزماش نشان داد که تزریق ماده فلوئورسین در فضای زیر شبکیه با استفاده از دستگاه طراحی شده میکرواینجکتور موثر و کارا بوده است چنانکه ۶ ساعت از بعد از تزریق (شکل ۳ A-C) این ماده در فضای زیر شکبیه بین لایه رنگدانه دار شبکیه و شبکیه عصبی به رنگ سبز دیده شد. و همچنین بعد از ۲۴ ساعت از تزریق (شکل ۳ D-F) نیز فلوئورسین در فضای زیر شبکیه بخوبی دیده شد. این روش این امکان را فراهم می سازد تا بتوان سلول های بنیادی را به همین ترتیب در فضای زیر شبکیه تزریق نمود.



شکل ۳. ایمونوهیستوشیمی نشان دهنده تزریق فلوئورسین به فضای زیر شکبیه در موش های بزرگ آزمایشگاهی۶ و ۲۴ ساعت بعد از تزریق. تصاویر A-C نشان دهنده تزریق فلوئورسین ۶ ساعت بعد از تزریق می باشد و تصاویر D-F نشان دهنده تزریق فلوئورسین ۲۴ ساعت بعد از تزریق می باشد. وجود ماده فلوئورسین به رنگ سبز در تصاویر (ستاره ها) در فضای بین شبکیه عصبی و لایه رنگدانه دار دیده می شود. اختصارات;RPE: لایه رنگدانه دار شبکیه، CC: لایه کوروئید، SRS: فضای زیر شبکیه، ONL: لایه هسته ای خارجی، INL: لایه هسته ای داخلی، G: لایه گانگلیونی، VB: زجاجیه. رنگ قرمز: پروپیدیوم یدیت. بزرگنمایی ۵۰۰ میکرومتر برای A-F.

بحث

در این مطالعه دستگاهی برای تزریق سلول های بنیادی به فضای زیر شبکیه و داخل زجاجیه طراحی شد. تزریق ماده فلوئورسنت با استفاده از این دستگاه در مدل حیوانی نشان داد که این دستگاه به خوبی می تواند وارد فضای زیر شبکیه شده و ماده مورد نظر را در این فضا تزریق نماید. مزایای این دستگاه عبارت است از: ۱- توانایی تزریق مایع و سلول در فضای زیر شبکیه و داخل زجاجیه، ۲- قابلیت تزریق بصورت افقی و اوریب، ۳- قابلیت حرکت سوزن تزریق در مقیاس میکرومتر (گام حرکت کوچک)، ۴- قابلیت حرکت سوزن در مقیاس سانتی متر (گام حرکت بزرگ)، ۵- قابلیت تنظیم ارتفاع سرنگ، ۶- تزریق مایع و سلول بدون ایجاد حرکت و لرزش در سوزن تزریق، ۷- قابلیت نصب دوربین و ادوات سیستم تزریق خودکار.

رساندن سلول های بنیادی به بافت هدف با دقت بالا، راندمان بالا و موثر بسیار مشکل است. هدف از این کار عبارت است از: ۱- رساندن دقیق سلول ها در مناطق آسیب دیده، ۲- دوری از آسیب به بافت میزبان و ۳- حفظ بقا و تکثیر سلول های بنیادی بعد از پیوند (۱۵). برای درمان شبکیه راههای رساندن سلول عبارتند از پیوند داخل زجاجیه، فضای زیر شبکیه (۷)، راه بینایی و ورید بینایی و حتی داخل شبکیه ای. با توجه به اینکه فضای زیر شبکیه راه

بهتری است و دقت بالاتری داشته و میزان تمایز سلولی بیشتری را بدنبال دارد دو شکل تکامل یافته از آن عبارت است از استفاده از سیستم قابل جذب هیدروژل و بستر های بسیار نازک. این دو سیستم موجب افزایش ایمنی، بقا و توزیع یکسان سلول های پیوند شده در فضای زیر شبکیه می شوند (۱۵). اما نکته قابل توجه در اجرای این روش ها داشتن ابزار مناسب و دقیق و همچنین تکنیک جراحی مناسب است.

در بسیاری از موارد تزریقات در داخل چشم به روش دستی انجام می شود و جراح و یا فرد محقق با دست سوزن را وارد فضای زیر شبکیه و یا داخل زجاجیه می کند و تزریق را با دست دیگر و یا با کمک فرد دیگری انجام می دهد(۲۴).در همین راستا Kita و همکاران برای بررسی نیروی چسبندگی شبکیه در خرگوش از یک میکروپیپت شیشه ای استفاده کرد و از ۲ میلی متری خلف لیمبوس وارد چشم شد و به فضای زیر شبکیه رسید. این محققین برای تزریق نرمال سالین از یک میکروپیپت دیگر استفاده کرده و بعد از ورود به فضای زیر شبکیه به یک سیستم اندازه گیری کننده فشار متصل شد و تزریق با سرعت 0.1 ml/hr انجام دادو با استفاده از این روش فشار زیر شبکیه نیز اندازه گیری شد (۲۶). در این روش تزریق نیازمند وجود اپراتور است و ورود و نگه داشتن میکروپیپت در فضای زیر شبکیه با دست است و لذا احتمال جابجایی و خطا افزایش می یابد. همچنین در سال ۲۰۱۷ Fernandezفرناندز و همکارانش موفق به ابداع روشی برای تزریق سلول های رنگ دانه دار مشتق شده از سلول های بنیادی جنینی به فضای زیر شبکیه شدند که در آن سلول ها بر روی لایه ای از پلیمر پاریلن C قرارداده شدند و سپس با استفاده دستگاه ابداعی آنها به درون شبکیه پیوند زده شد. با استفاده از این تکنیک امکان پیوند بافت و یا داربست های پلیمری حاوی سلول های بنیادی فراهم شده است (۲۷). این دستگاه توسط دست جراح و یا اپراتور نگه داری می شود و ورود به فضای زیر شبکیه نیز توسط دست انجام می شود لذا بعد از ورود به چشم احتمال جابجایی آن و آسیب وجود دارد. Oner و همکاران نیز برای تزریق سلول های بنیادی چربی (Adipose Derived Stem Cells, ADSCs)در بیماران، از ویترتومی پارس پلانا استفاده کردند و بعد از ویترکتومی کامل و در منطقه ای دورتر از فووآ سلول های بنیادی را با استفاده از سوزن 41-gauge تزریق کردند. در این روش نیز تزریق به روش دستی و توسط جراح انجام شد (۲۸). همچنین Abe و همکاران از وسیله ای برای تزریق سلول ها در فضای زیر شبکیه در انسان استفاده کردند که دارای یک بدنه و دو مجرا بود. یک مجرا برای تزریق سلول و دیگری برای تزریق سالین. البته برای استفاده از آن باید دستگاه توسط پزشک در فضای زیر شبکیه قرا داده می شد و توسط اپراتور سالین و یا سلول به فضای زیر شبکیه تزریق می شد (۲۹). این روش به دلیل اینکه نگهدارنده ای در آن وجود نداشت و توسط انسان نگه داشته می شد دقت مناسبی نداشته و درصد خطای در آن در مقایسه با دستگاه های دیگر بالاست.

در روش دیگر برای حذف و یا کم کردن خطای دست انسانی می توان قبل از ورود سوزن اصلی تزریق ابتدا کانولا و یا سوزن راهنما را وارد فضا نمود و سپس سوزن اصلی را از طریق آن به فضای مورد نظر رساند(۳۰). بطور مشابه در سال ۲۰۱۸ مارک و همکاران موفق به ساخت وسیله ای برای تزریق سلول های بنیادی مشتق از بافت بند ناف انسانی به فضای زیر شبکیه در خوکچه ها شدند که قابلیت تزریق نرمال سالین را نیز داشته و در واقع از دو لاین برای تزریق استفاده می نماید و ازیک کانولا که حاوی سوزن کوچکی است برای تزریقات فوق کوروئیدی استفاده می کند. از طریق این سوزن دستگاه قابلیت رسیدن به فضای زیر شبکیه را دارد و تزریقات زیر شبکیه نیز قابل اجرا است (۳۱). در این روش توسط جراح ابتدا کانولا در فاصله ۹-۸ میلی متری لیمبوس به روش اسکلرتومی وارد فضای

سوپراکوروئید شده و به اندازه ۵-۳ میلی متر در این فضا پیش برده می شود و برای اینکه کانولا در حین تزریق حرکت نداشته باشد توسط نخ بخیه به اسکلرا بخیه شده است و سپس سوزن اصلی تزریق از طریق کانولا وارد فضای زیر شبکیه شده است و تزریق انجام گرفته است. همچنین Yang Sang Yu و همکاران در سال ۲۰۱۴ موفق به ساخت سوزنی شدند که توانایی تزریق به فضای زیر شبکیه را داشت و حداقل آسیب به شبکیه را ایجاد می کند. این سوزن به صورت منحنی بوده و دارای زاویه ۴۵ درجه روبه بالا است، ۵ میلی متر طول داشته و قطر داخلی آن ۴۰میکرون و قطر خارجی آن ۱۰۰ میکرون است. اساسا این وسیله برای تزریق دارو به فضای زیر شبکیه ساخته شده است (۳۲). در این روش همانند de Smet و همکاران برای جلوگیری از حرکت سوزن، از کانولا استفاده شده است و به بافت اطراف بخیه زده شده است تا از حرکات اضافی و آسیب جلوگیری شود و سپس سوزن طراحی شده از طریق کانولا وارد فضای زیر شبکیه در نمونه شده است. Schwartz و همکاران نیز سلول های RPE مشتق از سلول های بنیادی جنینی را به فضای زیر شبکیه تزریق کردند. این محققین برای رسیدن به این فضا از ویترکتومی پارس پلانا استفاده کردند و بعد از قرار دادن کانولا سلول ها را تزریق نمودند (۳۳).

روش سومی نیز وجود دارد که در آن می توان اثر دست انسانی را به حداقل ممکن رساند و خطا و آسیب ناشی از آن را به کمترین حد ممکن رساند. در این روش می توان از دستگاههایی که به طور خودکار تزریق را انجام می دهند استفاده نمود. این دستگاهها از ساده تا پیشرفته ترین حالت می توانند بطور خودکار وارد فضای زیر شبکیه شوند و بصورت کنترل شده با سرعت و حجم مناسب تزریق را انجام دهند. البته این روش پرهزینه بوده و مقرون به صرفه نیست. دستگاه مورد استفاده در این تحقیق شبیه با این دسته است البته دستگاه اتوماتیک نبوده اما با داشتن قطعه متحرک که توسط پیچی به اندازه میلی متر به جلو و یا عقب برده می شود می توان با دقت بالا وارد فضای زیر شبکیه شد. در سال ۲۰۱۱ هالتمن Haltman و همکاران دستگاهی برای تزریق داخل زجاجیه و همچنین گرفتن ثبت الکتریکی از داخل چشم طراحی نمودند. این دستگاه قابلیت نصب بر روی میکروسکوپ را دارد و حاوی یک سوزن همیلتون و دو سوزن برای هدایت سوزن اصلی و همچنین کانولایی که سوزن همیلتون را به دو سوزن دیگر ارتباط می دهد است. هالتمن با استفاده از این دستگاه با دقت بالا توانست تزریقات داخل زجاجیه ای را انجام دهد (۱۶). با این حال این تزریق در فضای زیر شبکیه با این دستگاه گزارش نشده است. Hewing و همکاران نیز از تزریق داخل زجاجیه ای استفاده کردند و مهارکننده بافتی ماتریکس متالوپروتئیناز و فاکتور رشد اپیدرمال را با استفاده از دستگاه اولترامیکروپمپ ۳ در چشم موش ها تزریق کردند. روش تزریق آنها همانند روش Kita و همکاران بود (۲۲). در این روش تزریقات به صورت کنترل شده و با دقت بالا در چشم تزریق شده است. بطور مشابه Christaina و همکاران برای تزریق در فضای زیر شبکیه از سیستم تزریق میکرولیتری با پمپ UMP-III استفاده کردند. در این مطالعه برای رسیدن به فضای زیر شبکیه از قرنیه استفاده شده است و بعد از گذراندن سوزن از قرنیه، از طریق مردمک به شبکیه رسیده اند که البته در این روش احتمال آسیب عدسی بسیار بالاست (۲۴). Xie و همکاران برای تزریق رتروویروس به فضای زیر شبکیه در جوجه از میکروپیپت متصل به پمپ پنوماتیک با فشار مثبت استفاده کردند (۳۴).

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد با استفاده از دستگاه طراحی شده با دقت بالا می توان وارد فضای زیر شبکیه شد و تزریق را انجام داد و از آسیب لایه های چشم جلوگیری کرد. در این روش اثر دست فرد محقق بسیار کم بوده و لذا درصد خطا نیز کاهش می یابد. این دستگاه در مقایسه با

نمونه های خودکار بسیار به مقرون به صرفه بوده و می توان از آن در پژوهش های حیوانی و تزریقات سلولی و یا حتی بعد از تایید های کابردی در فضای زیر شبکیه و یا داخل زجاجیه انسان نیز استفاده کرد.

تشکر و قدردانی

این مقاله با کد اخلاق IR.SEMUMS.REC.1397.048 مصوب کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی سمنان و با تامین مالی دانشگاه علوم پزشکی سمنان انجام شده است. نویسندگان مقاله تعارض منافی برای انتشار این مقاله ندارند. نویسندگان مقاله از حمایت های مرکز تحقیقات سلول های بنیادی سیستم عصبی دانشگاه علوم پزشکی سمنان و همچنین مرکز تحقیقات چشم فارابی کمال تشکر و امتنان را دارد.

منابع

1.Qi Y, Dai X, Zhang H, He Y, Zhang Y, Han J, et al. Trans-corneal subretinal injection in mice and its effect on the function and morphology of the retina. PloS One. 2015;10(8):e0136523.
2.Mühlfriedel R, Michalakis S, Garrido MG, Biel M, Seeliger MW. Optimized technique for subretinal injections in mice. Retinal Degeneration: Springer; 2012. p. 343-9.
3.Parikh S, Le A, Davenport J, Gorin MB, Nusinowitz S, Matynia A. An alternative and validated injection method for accessing the subretinal space viaa transcleral posterior approach. J Vis Exp. 2016(118):e54808.
4.Rakoczy PE, Meaghan J, Nusinowitz S, Chang B, Heckenlively JR. Mouse models of age-related macular degeneration. Exp Eye Res. 2006;82(5):741-52.
5.Dureau P, Legat L, Neuner-Jehle M, Bonnel S, Pecqueur S, Abitbol M, et al. Quantitative analysis of subretinal injections in the rat. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 2000;238(7):608-14.
6.Siemann DW, Chaplin DJ, WalickePA. A review and update of the current status of the vasculature-disabling agent combretastatin-A4 phosphate (CA4P). Expert Opin Investig Drugs. 2009;18(2):189-97.
7.Peng Y, Tang L, Zhou Y. Subretinal Injection: A Review on the Novel Route of Therapeutic Delivery for Vitreoretinal Diseases. Ophthalmic Res. 2017;58(4):217-26.
8.Jones MK, Lu B, Girman S, Wang S. Cell-based therapeutic strategies for replacement and preservation in retinal degenerative diseases. Prog Retin Eye Res. 2017;58:1-27.
9.Johnson TV, Bull ND, Martin KR. Identification of barriers to retinal engraftment of transplanted stem cells. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2010;51(2):960-70.
10.Chung JK, Park TK, Ohn YH, Park SK, Hong DS. Modulation of retinal wound healing by systemically administered bone marrow-derived mesenchymal stem cells. Korean J Ophthalmol. 2011;25(4):268-74.
11.Li Y, Atmaca-Sonmez P, Schanie CL, Ildstad ST, Kaplan HJ, Enzmann V. Endogenous bone marrow–derived cells express retinal pigment epithelium cell markers and migrate to focal areas of RPE damage. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2007;48(9):4321-7.
12.Demuth T, Berens ME. Molecular mechanisms of glioma cell migration and invasion. J Neurooncol. 2004;70(2):217-28.
13.Aboutaleb HK, Tiraihi T, Ahmadieh H, Ziaei HA, Daftarian N, Taheri T. Survival and Migration of Adipose-Derived Stem Cells Transplanted in the Injured Retina. Exp ClinTransplant. 2018;16(2):204-11.
14.Schwartz SD, Nagiel A, Lanza R, Blumenkranz MS. Cellular Therapies for Retinal Disease 2017; 6(1): 4-11.
15.Wang J, Jokerst JV. Stem cell imaging: tools to improve cell delivery and viability. Stem cells Int. 2016;1(2):20-27.
16.Hultman D, Newman EA. A micro-advancer device for vitreal injection and retinal recording and stimulation. Exp Eye Res. 2011;93(5):767-70.

17.Cheah M, Fawcett JW, Andrews MR. Dorsal Root Ganglion Injection and Dorsal Root Crush Injury as a Model for Sensory Axon Regeneration. J Vis Exp. 2017;4(123):12-19.
18.Evsen L, Doetzlhofer A. Gene Transfer into the Chicken Auditory Organ by In Ovo Micro-electroporation. J Vis Exp. 2016;5(110):25-41.
19.Nesbit SC, Van Hoof AG, Le CC, Dearworth Jr JR. Extracellular recording of light responses from optic nerve fibers and the caudal photoreceptor in the crayfish. J Undergrad Neurosci Edu. 2015;14 (2): 29-35.
20.Zhou Z, Luther N, Singh R, Boockvar JA, Souweidane MM, Greenfield JP. Glioblastoma spheroids produce infiltrative gliomas in the rat brainstem. Childs Nerv Syst. 2017;33(3):437-46.
21.Augestad IL, Nyman AKG, Costa AI, Barnett SC, Sandvig A, Håberg AK, et al. Effects of neural stem cell and olfactory ensheathing cell co-transplants on tissue remodelling after transient focal cerebral ischemia in the adult rat. Neurochem Res. 2017;42(6):1599-609.
22.Hewing NJ, Weskamp G, VermaatJ, Farage E, Glomski K, Swendeman S, et al. Intravitreal injection of TIMP3 or the EGFR inhibitor erlotinib offers protection from oxygen-induced retinopathy in mice. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2013;54(1):864-70.
23.Nickerson JM, Goodman P, Chrenek MA, Bernal CJ, Berglin L, Redmond TM, et al. Subretinal delivery and electroporation in pigmented and nonpigmented adult mouse eyes. Retin Develop: Springer; 2012. p. 53-69.
24.Johnson CJ, Berglin L, Chrenek MA, Redmond T, BoatrightJH, Nickerson JM. Technical brief: subretinal injection and electroporation into adult mouse eyes. Mol Vis. 2008;14(1):2211-18.
25.Machalińska A, Lubiński W, Kłos P, Kawa M, Baumert B, Penkala K, et al. Sodium iodate selectively injuries the posterior pole of the retina in a dose-dependent manner: morphological and electrophysiological study. Neurochem Res. 2010;35(11):1819-27.
26.Kita M, Negi A, Kawano S, Honda Y, Maegawa S. Measurement of retinal adhesive force in the in vivo rabbit eye .Investigative ophthalmol Vis Sci. 1990;31(4):624-8.
27.Fernandes RAB, Stefanini FR, Falabella P, Koss MJ, Wells T, Diniz B, et al. Development of a new tissue injector for subretinal transplantation of human embryonic stem cell derived retinal pigmented epithelium. Int J Retina Vitreous. 2017;3(1):41.
28.Oner A, Gonen ZB, Sinim N, Cetin M, Ozkul Y. Subretinal adipose tissue-derived mesenchymal stem cell implantation in advanced stage retinitis pigmentosa: a phase I clinical safety study. Stem Cell Res Ther. 2016;7(1):178.
29.Abe T, Yoshida M, Tomita H, Kano T, Sato M, Wada Y, et al. Auto iris pigment epithelial cell transplantation in patients with age-related macular degeneration: short-term results. Tohoku J Exp Med. 2000;191(1):7-20.
30.Verdugo ME, Alling J, Lazar ES, Del Cerro M, Ray J, Aguirre G. Posterior segment approach for subretinal transplantation or injection in the canine model. Cell Transplant. 2001;10(3):317-27.
31.de Smet MD, Lynch JL, Dejneka NS, Keane M, Khan IJ. A subretinal cell delivery method via suprachoroidal access in minipigs: safety and surgical outcomes. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2018;59(1):311-20.
32.You YS, Lee CY, Li C, LeeSH, Kim K, Jung H. An arched micro-injector (ARCMI) for innocuous subretinal injection. PloS One. 2014;9(8):e104145.
33.Schwartz SD, Tan G, Hosseini H, Nagiel A. Subretinal transplantation of embryonic stem cell–derived retinal pigment epithelium for the treatment of macular degeneration: an assessment at 4 years. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2016;57(5):1-9.
34.Xie W, Yan R-T, Ma W, Wang S-Z. Enhanced retinal ganglion cell differentiation by ath 5 and NSCL1 coexpression. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2004;45(9):2922-8 .