

## Culture and Proliferation of Human Limbal Stem Cells In Vitro

Baharvand H, PhD; Ebrahimi M, MSc; Javadi MA, MD; Einollahi B, MD; Massumi M, MSc

**Purpose:** To evaluate the properties of cultured limbal stem cells for corneal surface reconstruction.

**Methods:** Specimens of limbal explants were prepared from the Eye Bank of I.R. Iran. The explants were cultured and expanded on acellular amniotic membrane for 21 days. The cultured cells were evaluated for expression of Connexin 43 and keratinine K3 by immunocytochemistry and expression of K12 keratinine and P63 by RT-PCR.

**Results:** After 2 to 3 weeks, the limbal epithelial cells grew to form a sheet approximately  $2 \times 2 \text{ cm}^2$  in size on the amniotic membrane. On histological examination the epithelial sheet was composed of 4 to 5 cell layers at the margin of the sheet and from 1 to 4 cell layers in the area between the margin and the original explant tissue.

Immunocytochemistry analysis showed Keratinine K3 and Connexin 43 were expressed in normal cornea. The markers were expressed weakly in cultured limbal cells. Also, RT-PCR analysis revealed that P63 and K12 were expressed in cultured and normal limbal cells. The normal cornea expressed K3 and K12 but not P63.

**Conclusions:** These data support the notion that expansion of limbal stem cells on amniotic membrane can be used of transplantation to patients with limbal stem cell deficiency.

**Key words:** limbal stem cells, corneal markers, amniotic membrane

- Bina J Ophthalmol 2005; 10 (4): 419-429.

## کشت و تکثیر یاخته‌های بنیادی لیمبوس انسان در محیط آزمایشگاه

حسین بهاروند<sup>۱</sup>، مرضیه ابراهیمی<sup>۲</sup>، محمدعلی جوادی<sup>۳</sup>، بهرام عین‌اللهی<sup>۴</sup> و محمد معصومی<sup>۵</sup>

### چکیده

**هدف:** ارزیابی کشت یاخته‌های بنیادی لیمبوس قرنیه انسانی با حفظ خواص ذاتی و قدرت تکثیری آن‌ها در آزمایشگاه به منظور پیوند در بیماران دچار نقص یاخته‌های بنیادی ناحیه لیمبوس.

**روش پژوهش:** نمونه‌های لیمبوس حاوی یاخته‌های بنیادی، از بانک چشم جمهوری اسلامی ایران تهیه شد. کشت قطعات لیمبوس بر روی پرده آمیونی بدون یاخته (برهنه) به مدت ۲۱ روز صورت پذیرفت. مورفولوژی یاخته‌ها پس از ۱۳ و ۲۱ روز کشت، توسط ایمونوسیتوشیمی، با استفاده از پادتن‌های کانکسین-۴۳، کراتین-۳ و پان‌سیتوکراتین و بیان ژن‌های اختصاصی قرنیه با روش RT-PCR مورد بررسی قرار گرفت.

**یافته‌ها:** پس از ۲ تا ۳ هفته، یاخته‌های اپی‌تلیوم لیمبوس، صفحه‌ای در اندازه تقریبی  $2 \times 2 \text{ cm}^2$  را بر روی پرده آمیونی برهنه تشکیل دادند. مطالعه هیستولوژی صفحه اپی‌تلیومی تشکیل‌شده نشان داد که این یاخته‌ها متشکل از ۱-۴ لایه یاخته‌ای، بین محل قرارگیری قطعه بافتی و حاشیه کشت می‌باشند. بررسی‌های ایمونوسیتوشیمی با استفاده از نمونه‌های لیمبوس و قرنیه طبیعی و لیمبوس کشت‌شده، نمایانگر بیان کراتین-۳ و کانکسین-۴۳ در نمونه‌های قرنیه طبیعی بود ولی بیان ضعیفی از این نشانگرها در یاخته‌های کشت‌شده دیده شد. هم‌چنین تحلیل داده‌های RT-PCR نشان داد که ژن

P<sub>۶۳</sub> و K<sub>۱۲</sub>، هم در یاخته‌های لیمبوسی کشت‌شده و هم در نمونه‌های لیمبوس طبیعی بیان می‌گردد؛ در حالی که در قرنیه، تنها بیان ژن‌های K<sub>۳</sub> و K<sub>۱۲</sub> دیده شد و بیان P<sub>۶۳</sub> مشاهده نشد.  
نتیجه‌گیری: مطالعه نشان داد که یاخته‌های لیمبوسی طی ۲۱ روز کشت، خواص بنیادی خود را از نظر مورفولوژی و بیان ژن‌های خاص آن ناحیه حفظ نمودند و می‌توان از آن‌ها برای درمان بیماران دچار نقص یاخته‌های بنیادی لیمبوسی استفاده نمود.

• مجله چشم‌پزشکی بینا ۱۳۸۴؛ سال ۱۰، شماره ۴: ۴۲۹-۴۱۹.

### اختصارات

**DMEM:** Dulbecco Modified Egle Medium, **DMSO:** dimethyl sulfoxide, **EGF:** epidermal growth factor, **EDTA:** ethylene diamine tetraacetic acid, **ES-FBS:** embryonic stem cell qualified-fetal bovine serum, **FITC:** fluorescein isothiocyanate, **HBSS:** Hanxs buffer salt solution, **LSC:** limbal stem cell, **LSCD:** limbal stem cell deficiency, **PBS:** phosphate buffer saline, **PBST:** phosphate buffer saline/Tween, **PI:** promedium iodide, **RT-PCR:** reverse transcriptase-polymerase chain reaction

• پاسخ‌گو: دکتر حسین بهاروند

۱- استادیار- بیولوژی تکوینی- عضو هیات علمی پژوهشکده رویان

۲- مربی پژوهشی- ایمنولوژی- گروه سلول‌های بنیادی پژوهشکده رویان

۳- استادیار- چشم‌پزشک- دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

۴- دانشیار- چشم‌پزشک- دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

۵- مربی پژوهشی- بیوشیمی- گروه سلول‌های بنیادی پژوهشکده رویان

تهران- پژوهشکده رویان- گروه سلول‌های بنیادی- صندوق پستی ۱۹۳۹۵-۴۶۴۴

• این پژوهش با حمایت سازمان گسترش و نوسازی صنایع ایران در قالب برنامه‌های SBDC و همکاری مرکز تحقیقات چشم دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی انجام پذیرفت.

قرنیه توسط یاخته‌های مشتق از بافت ملتحمه و از جمله یاخته‌های جامی‌شکل پوشیده می‌شود (conjunctivalization) و نفوذ عروق خونی به ناحیه قرنیه شدت می‌یابد که با التهاب و زخم قرنیه همراه می‌گردد<sup>۱،۹</sup> که نشانه‌ای از شکل‌گیری بیماری نقصان یاخته‌های بنیادی لیمبوس (LSCD) می‌باشد<sup>۱</sup>. مواردی از بیماری‌های چشم که منجر به نقص یاخته‌های بنیادی لیمبوس می‌گردند عبارتند از عوامل مادرزادی و یا اکتسابی از جمله جراحات شیمیایی و صدمات گرمایی، سندرم تریژنوم راجعه وسیع، پمفیگوبید سیکاتریسی چشمی و سندرم استیون-جانسون.

راهکار درمانی مناسب به منظور بازسازی قرنیه در این بیماران، پیوند اتولوگ یا آلوژنیک یاخته‌های بنیادی است<sup>۱۱-۱۳</sup> که به صورت پیوند بافت لیمبوس و یا یاخته‌های لیمبوسی کشت‌شده در محیط آزمایشگاه قابل اجراست. مطالعات نشان

### مقدمه

یاخته‌های بنیادی قرنیه، در ناحیه لیمبوس، یعنی حذفاصل بین ملتحمه و قرنیه قرار گرفته‌اند<sup>۱</sup>. این یاخته‌ها به علت دارا بودن خاصیت خودتجدیدشوندگی (self-renewal)<sup>۱</sup>، مسوول حفظ تمامیت اپی‌تلیوم قرنیه<sup>۲</sup> و هم‌چنین ترمیم اپی‌تلیوم قرنیه در جراحات و حالات طبیعی می‌باشند<sup>۳،۴</sup>. مطالعات انجام‌شده نشان داده‌اند که یاخته‌های واقع در اپی‌تلیوم قاعده‌ای لیمبوس (یاخته‌های بنیادی لیمبوس) قادر به بیان نشانگرهای اختصاصی یاخته‌های اپی‌تلیوم قرنیه هم‌چون کراتین-<sup>۵،۶</sup> و کانکسین-<sup>۳</sup> نمی‌باشند در حالی که می‌توانند به بیان ژن P<sub>۶۳</sub> پردازند که مختص یاخته‌هایی با تکثیر بالاست<sup>۸</sup>.

زمانی که یاخته‌های بنیادی لیمبوسی (LSC) فاقد عملکرد باشند و یا در عملکرد صحیح خود دچار نقص شوند، سطح

حسین بهاروند- کشت و تکثیر یاخته‌های بنیادی لیمبوس انسان

### روش کار

#### کشت قطعه‌ای لیمبوس بر غشای آمینونی برهنه

پنج عدد کره چشمی کامل از اجساد ۲۰ تا ۵۰ ساله از بانک چشم جمهوری اسلامی ایران (HCV-منفی، HBV-منفی و HIV-منفی) تهیه شد. سپس ناحیه لیمبوس آن‌ها جدا گردید و ۳ بار در محیط DMEM/F12 حاوی آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین (۵۰ µg/ml) و آمفوتریسین B (۱٫۲۵ µg/ml) شستشو داده شدند. در زیر میکروسکوپ استریو، بافت‌های اضافه شامل عنبیه، آندوتلیوم قرنیه، صلبیه و ملتحمه جدا گشتند و باقی‌مانده بافتی، پس از شستشو با محیط DMEM/F12 حاوی آنتی‌بیوتیک، به ظرف حاوی آنزیم دیسپاز II (۱٫۲ U/ml) در HBSS (عاری از  $Ca^{2+}$  و  $Mg^{2+}$ ) منتقل شد و به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه در دمای  $37^{\circ}C$  و دی‌اکسید کربن ۵ درصد انکوبه گردید. سپس به منظور خنثی‌سازی اثر آنزیم، بافت‌ها توسط محیط DMEM/F12 حاوی ES-FBS (۱۰ درصد) به همراه آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین (۵۰ µg/ml) و آمفوتریسین B (۱٫۲۵ µg/ml) شستشو داده و توسط تیغ جراحی در قطعات  $1 \times 1 \times 0.1$  میلی‌متر برش داده شدند<sup>۱۸، ۱۹</sup>.

پرده آمینونی انسانی، در زمان سزارین از مادران سالم (HIV-منفی و HBV-منفی) به صورت استریل تهیه شد و توسط بافر فسفات نمکی (PBS) حاوی پنی‌سیلین (۱۰۰۰ U/ml)، استرپتومایسین (۵۰ µg/ml) و افلاکسوزین (۰٫۳ درصد)، پس از جداسازی کوریون و لایه‌های زیرین، شستشو گردید. پرده آمینونی بر روی کاغذ نیتروسولوز گسترانیده و در ابعاد  $3 \times 3$  سانتی‌متر برش داده شد و در محیط DMSO (۱٫۵ M) و در دمای انجماد  $80^{\circ}C$  -نگهداری گردید. پرده آمینونی در زمان استفاده، با PBS حاوی آنتی‌بیوتیک شستشو داده شد و به مدت ۱۵ دقیقه در محلول EDTA (۰٫۱ درصد) در دمای  $37^{\circ}C$  انکوبه گردید و سپس محیط آن تخلیه شد و در محیط حاوی کلرید آمونیوم (۱۰ درصد)، یاخته‌های اپی‌تلیومی آمینون توسط یک میله شیشه‌ای جدا شدند. پرده آمینونی، پس از اطمینان از برهنه بودن، در پلیت‌های کشت ۶ خانه‌ای، به گونه‌ای گسترانیده شد که سطح اپی‌تلیومی آن روبه بالا قرار گیرد. سپس یک قطعه از لیمبوس در مرکز پرده آمینونی قرار داده شد و کشت در محیط DMEM/F12 حاوی ES-FBS (۱۰ درصد)، DMSO (۰٫۵ درصد)، EGF (۲۷ ng/ml)، انسولین (۵ µg/ml)،

داده‌اند که استفاده از پرده آمینونی به عنوان یک بستر مناسب، در پیوند هم‌زمان با یاخته‌های بنیادی لیمبوس به منظور درمان بیماران دچار نقص جزئی موثر می‌باشد<sup>۱۷-۱۴</sup>.

از آن‌جا که برداشت قطعه بزرگی از ناحیه لیمبوس به منظور پیوند، سبب آسیب چشم دهنده و بروز نقص یاخته‌های بنیادی لیمبوس در چشم سالم می‌گردد<sup>۱۳-۱۱</sup>، لذا در مطالعه حاضر به کشت قطعه‌ای کوچک ( $1 \text{ mm}^2$ ) بر روی پرده آمینون برهنه اقدام گردید و یاخته‌های حاصل توسط ایمونوسیتوشیمی و RT-PCR مورد بررسی قرار گرفتند تا مشخص گردد که آیا یاخته‌های به دست آمده از کشت، از نوع یاخته‌های لیمبوسی هستند و حالت تمایز نیافته خود را حفظ کرده‌اند و قابل استفاده در پیوند (اتوگرافت یا آلوگرافت) بیماران با نقص ناحیه لیمبوس می‌باشند یا خیر.

### روش پژوهش

#### مواد به کاررفته

مواد زیر از شرکت Gibco (Grand Island N.Y USA) تهیه شدند: محیط کشت DMEM/F12 (۱:۱) (16141-079)، سرم جنین گاو، ویژه یاخته‌های بنیادی (ES-FBS) (21331-020)، آنزیم دیسپاز II (17105-041)، محلول نمکی بافر هنکز (HBSS) (14185-045)، آمفوتریسین B (15290-026)، پنی‌سیلین-استرپتومایسین (15070-063)، عامل رشد اپیدرمی (EGF)، ال-گلوتامین (15039-027) و سرم بز (16210-064).

مواد زیر از شرکت سیگما خریداری شدند: هیدروکورتیزون (H0888-56)، دی‌متیل سولفوکسید (DMSO) (D2650)، اتیلن دی‌آمین تترااستیک اسید (EDTA) (E6758)، کلرید آمونیوم (A-0171)، ترانسفرین (T-1147)، سلنات سدیم (S5261)، اوفلوکساسین (O-8757)، جنتامایسین (G1387) و نیتروسولوز (N8267).

انسولین از شرکت Biochem (57590) و کلراتوکسین ویا، زیر واحد A، از شرکت Biomol ژاپن (G 115) خریداری شدند. از پادتن‌های مونوکلونال زیر استفاده شد: آنتی‌کانکسین-۴۳، کلون CXN6 (8093)، آنتی‌سیتوکراتین K12/3، کلون AE5 (Chemicon CBL 218)، آنتی‌پان‌کراتین (۴، ۵، ۶، ۸، ۹، ۱۰، ۱۳ و ۱۸) (Chemicon-MAB1636) و پادتن‌های ثانویه بزی ضد IgG خرگوشی کونژوگه با FITC (Jakson 111-095003).

شدند. پس از ۳ بار شستشو با PBST، یاخته‌ها با پادتن‌های تک‌دومانی موشی با رقت‌های زیر به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق انکوبه شدند: آنتی‌پان‌کراتین (Anti Pan Keratin) = ۱/۲۰۰، آنتی-K<sub>۳</sub> = ۱/۱۰۰ و آنتی‌کانکسین-۴۳ = ۱/۳۰.

پس از شستشو، به منظور آشکار ساختن مکان اتصال پادتن‌های اولیه، یاخته‌ها توسط PBST از پادتن Anti-IgG<sub>۱</sub> کوئزوگه با FITC در رقت ۱/۲۰۰ استفاده گردید و نتیجه توسط میکروسکوپ فلورسنت مورد بررسی قرار گرفت. برای بررسی و رنگ‌آمیزی هسته یاخته‌ها، از یدید پرومیدیوم (PI) در رقت ۱/۱۰۰ استفاده گردید.

#### تجزیه و تحلیل بیان ژن‌های K<sub>۳</sub>، K<sub>۱۲</sub> و P<sub>۶۳</sub> توسط RT-PCR

بررسی بیان ژن‌های ویژه اپی‌تلیوم قرینه (K<sub>۳</sub> و K<sub>۱۲</sub>) و یاخته‌های بنیادی لیمبوس (P<sub>۶۳</sub>) بر روی نمونه‌های لیمبوسی طبیعی (in vivo limbal) و کشت‌شده (in vitro limbal) و اپی‌تلیوم قرینه طبیعی (in vivo cornea) توسط RT-PCR صورت گرفت. بدین منظور، RNA یاخته‌ها توسط RNX-PLUS TM استخراج و با استفاده از پرایمرهای Random Hexamer و کیت Revert nid TM H minus First Strand CDNA Synthesis، رشته مکمل cDNA ساخته شد. مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در جدول (۱) نشان داده شده‌اند. محصولات پس از انجام واکنش PCR بر روی آگارز ۱٫۵ درصد (Fermentas) و رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید توسط دستگاه ترنس‌لومینیتور فرابنفش (Uvido, UK) آشکار گردید.

ترانسفرین (۵ µg/ml)، سلنیم (۵ µg/ml)، هیدروکورتیزون (۰٫۵ µg/ml)، کلراتوکسین A (۳۰ ng/ml)، آمفوتریسین B (۱٫۲۵ µg/ml)، جنتامایسین (۵۰ µg/ml) و ال-گلوتامین ۴ mM در دمای C ۳۷ و تحت شرایط CO<sub>۲</sub> (۵ درصد) و اکسیژن (۹۵ درصد) صورت گرفت. پس از گذشت ۱۵-۱۳ روز از کشت، قطعه بافتی از کشت برداشته شد و کشت به مدت ۷ روز در غیاب قطعه بافتی صورت گرفت. محیط هر ۲-۳ روز تعویض گردید و میزان مهاجرت یاخته‌ها، توسط میکروسکوپ فازکنتراست مورد بررسی قرار گرفت.<sup>۱۸-۲۰</sup>

#### بررسی با میکروسکوپ نوری

از میکروسکوپ نوری معکوس (invert) و فازکنتراست در طول مدت کشت، به منظور بررسی شرایط یاخته‌های کشت‌شده استفاده گردید. نتایج فنوتیپی یاخته‌ها در محیط کشت با رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین مورد بررسی قرار گرفتند.

#### ایمونوسیتوشیمی برای کراتین-۳ و کانکسین-۴۳ و پان‌سیتوکراتین‌ها

روش ایمونوسیتوشیمی غیرمستقیم برای مطالعه کراتین-۳ (K<sub>۳</sub>)، کانکسین-۴۳ و پان‌سیتوکراتین‌ها مورد استفاده قرار گرفت. ابتدا یاخته‌ها توسط پارافرمالدید ۴ درصد به مدت ۳۰ دقیقه، تثبیت شدند و پس از ۳ بار شستشو با بافر فسفات نمکی حاوی تویین ۰٫۵ درصد (PBST) توسط محلول PBS حاوی ۰٫۲ درصد تریتون X<sub>۱۰۰</sub> به مدت ۱۰ دقیقه نفوذپذیر گردیدند. سپس به منظور حذف اتصالات غیراختصاصی، یاخته‌ها در PBS حاوی ۱۰ درصد سرم بز به مدت ۱ ساعت و در دمای اتاق تیمار

جدول ۱- مشخصات پرایمرهای ژن‌های K<sub>۳</sub>، K<sub>۱۲</sub> و P<sub>۶۳</sub>

ژن	توالی پرایمر	دمای گرمایش (°C)	طول قطعه تکثیرشده (BP)
P <sub>۶۳</sub>	Forward: 5' CAG ACT CAA TTT AGT GAG GTA 3' Reverse: 5' TCC GTG ACG TCG TGA GCT T 3'	۵۳٫۵	۳۰۰
K <sub>۳</sub>	Forward: 5' GAG CGG AGC AGG TGG CTTT 3' Reverse: 5' GGT CAG TCT CCA CTT TGA G3'	۵۸	۴۲۸
K <sub>۱۲</sub>	Forward: 5' TGC GAG CTC TAG AAG AGG CTA 3' Reverse: 5' CCT CGT GGT TCT TCT TCA TGT A 3'	۶۴	۳۷۷
B-actin	Forward: 5' CGC ACC ACT GGC ATT GTC AT 3' Reverse: 5' TTC TCC TTG ATG TCA CGC AC 3'	۶۲	۲۰۰

## یافته‌ها

### خصوصیات و مورفولوژی یاخته‌های کشت‌شده

دو تا سه روز پس از کشت، مهاجرت یاخته‌های بنیادی لیمبوسی آغاز شد (اتصال به سطح پرده آمینونی، تامین‌کننده این مهاجرت و تکثیر می‌باشد). یاخته‌های مهاجر در روزهای اولیه کروی بودند و به تدریج با حرکت به سمت حاشیه، از حالت مدور به حالت کشیده، دوکی‌شکل و نامنظم تبدیل شدند (شکل ۱-الف). در چند روز اول، مهاجرت و تکثیر یاخته‌ها به کندی صورت گرفت و به تدریج افزایش یافت؛ به طوری که در انتهای هفته دوم، فضایی حدود  $2 \times 2 \text{ cm}^2$  را پوشش دادند. پس از یک هفته، در حد فاصل یاخته‌های مهاجر و قطعه کشت‌شده، یاخته‌ها به صورت سنگ‌فرشی متراکم در آمدند که هنگام مشاهده با میکروسکوپ، به رنگ خاکستری با هسته‌هایی بزرگ و در حال تقسیم دیده می‌شدند (شکل ۱-ب و ۱-ج). در کشت‌های طولانی‌مدت، یاخته‌ها چندلایه و به تدریج از سطح کنده می‌شوند و به صورت شناور در می‌آیند. رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین در بافت‌های کشت‌شده به مدت ۲۱ روز، حاکی از وجود یاخته‌های متراکم و با نسبت مساوی هسته و سیتوپلاسم و به صورت چندلایه می‌باشد (شکل ۱-د).

### ایمونوسیتوشیمی برای کراتین-۳، کانکسین-۴۳ و پان‌سیتوکراتین‌ها

برای بررسی بیان نشانگرهای اختصاصی قرنیه ( $K_{12}$  و  $K_{3}$ ، کانکسین-۴۳) از روش ایمونوسیتوشیمی و پادتن‌های تک‌دودمانی اختصاصی ضد نشانگرهای سطحی قرنیه ( $K_{12}$ ،  $K_{3}$ ، کانکسین-۴۳ و پان‌سیتوکراتین) استفاده شد. نتایج به دست آمده نشان دادند که پس از گذشت ۱۳ روز از کشت قطعه‌ای، جمعیت‌های کوچکی به طور پراکنده وجود دارند که به بیان کراتین ۳ می‌پردازند (تقریباً ۱۰ درصد) اما پس از گذشت ۲۱ روز از کشت، تعداد بیشتری از یاخته‌ها که در حاشیه کشت مستقر هستند،  $K_{3}$  را بیان می‌کنند (تقریباً ۳۰ درصد) (شکل ۲). بررسی بیان کانکسین-۴۳ نشان داد که پس از ۱۳ روز کشت، هیچ‌کدام از یاخته‌های کشت‌شده، کانکسین ۴۳ را بیان نمی‌کنند اما افزایش مدت کشت به ۲۱ روز، سبب ظهور دسته‌های پراکنده یاخته‌ای در حاشیه منطقه تکثیر و دورترین مکان نسبت به قرارگیری قطعه بافتی شد که به بیان کانکسین ۴۳ می‌پردازند (شکل ۳). افزایش زمان کشت بیش از ۲۱ روز

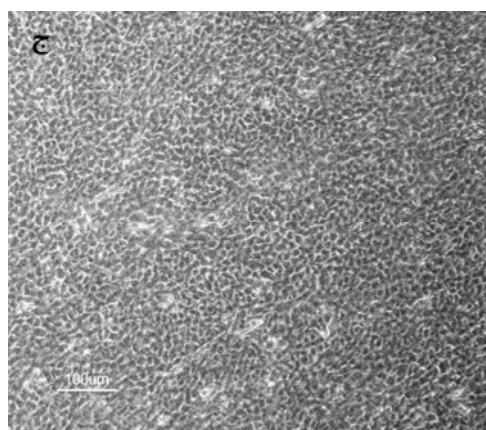
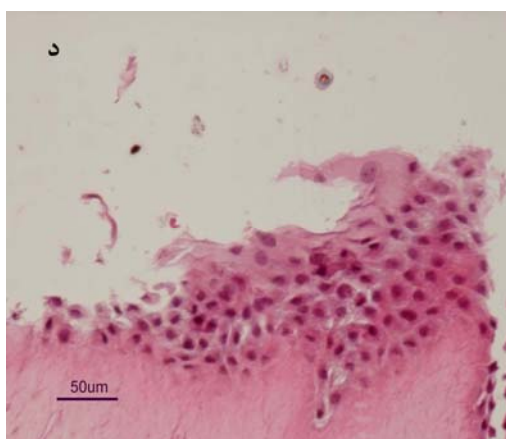
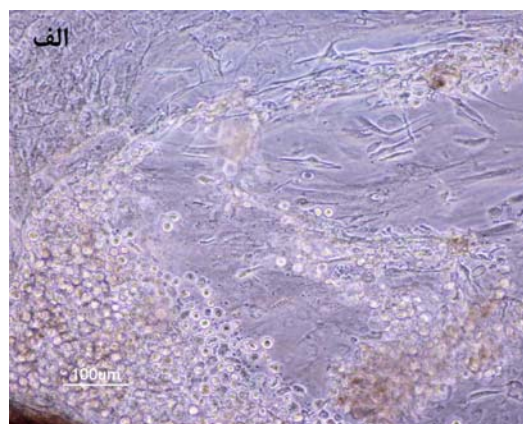
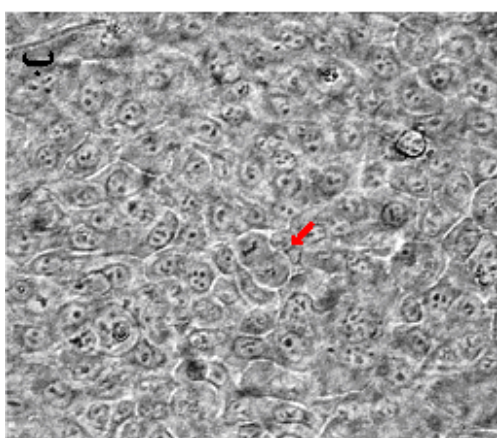
سبب افزایش بیان هر دو نوع پروتیین در یاخته‌های کشت‌شده گردید. استفاده از پادتن‌های ضد کراتین‌های یاخته‌ای، نتایجی مشابه با نتایج بیان کراتین  $K_{3}$  به دست داد (شکل ۴).

### بررسی بیان ژن‌های $K_{12}$ ، $K_{3}$ و $P_{63}$ توسط RT-PCR

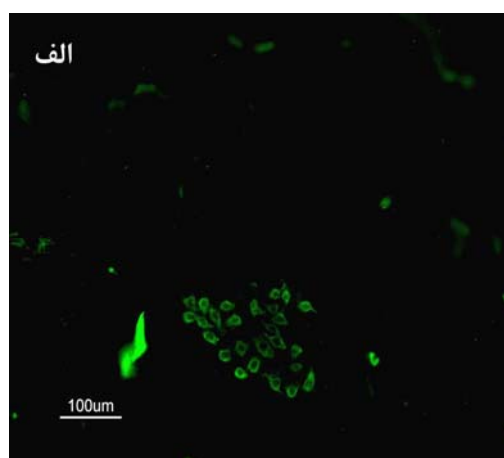
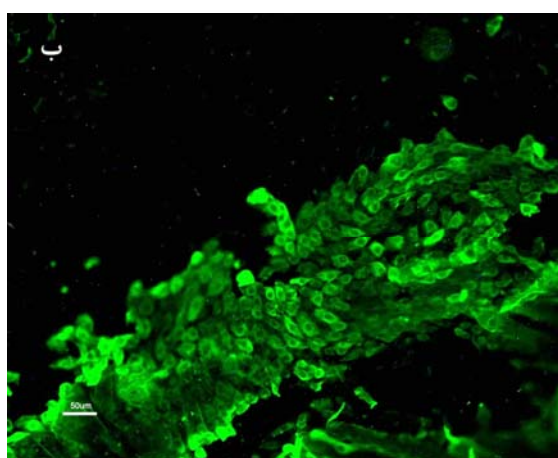
نتایج حاصل از انجام RT-PCR با استفاده از پرایمرهای ویژه ژن‌های  $K_{12}$ ،  $K_{3}$  و  $P_{63}$  (جدول ۱) در شکل (۵) نشان داده شده است. همان‌طور که در جدول (۱) و شکل (۵) مشخص شده است؛ در قرنیه طبیعی، بیان ژن  $K_{3}$  و  $K_{12}$  مشاهده می‌گردد در حالی که یاخته‌های لیمبوس طبیعی و یاخته‌های کشت‌شده (۱۳ روز)، فاقد بیان ژن  $K_{3}$  بودند و در عوض، ژن  $P_{63}$  و  $K_{12}$  را در مقادیر بالایی بیان نمودند.

## بحث

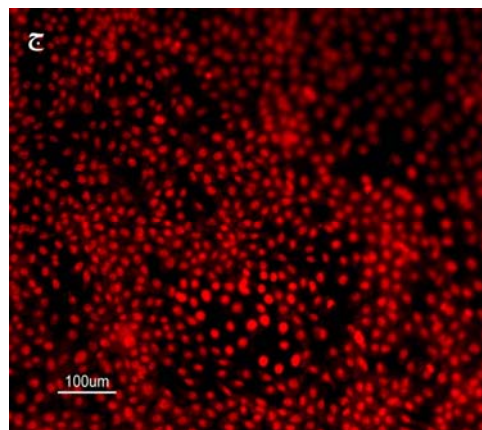
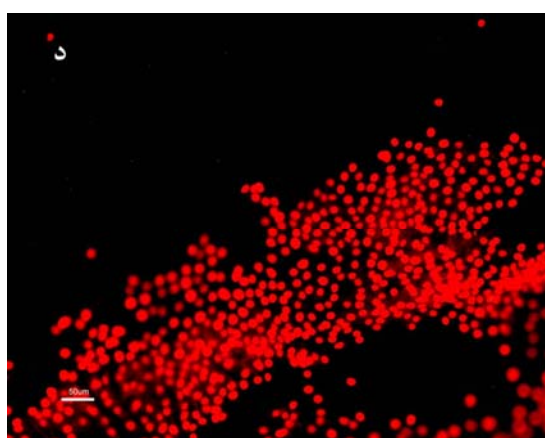
نشانه بالینی نقص یاخته‌های بنیادی لیمبوسی (LSCD)، پوشیده شدن سطح قرنیه توسط یاخته‌های مشتق از بافت ملتحمه و از جمله یاخته‌های جامی‌شکل (goblet cell) و نفوذ عروق خونی به ناحیه قرنیه می‌باشد که با التهاب و زخم قرنیه همراه است<sup>۱۰-۸</sup>. برای بازسازی قرنیه در این بیماران، چندین راهکار درمانی ارائه شده‌اند که شامل پیوند پرده آمینون، پیوند اتوگرافت و یا آلوگرافت ناحیه لیمبوس و پیوند یاخته‌های لیمبوسی تکثیرشده در محیط آزمایشگاه می‌باشند<sup>۴،۵،۲۰</sup>. از آن‌جا که برداشت قطعه لیمبوسی از چشم سالم به منظور درمان LSCD یک‌طرفه و یا چشم اهداکنندگان به منظور درمان LSCD دوطرفه منجر به شکل‌گیری LSCD چشم سالم می‌گردد و از آن‌جا که درصد ابتلا به تریژنوم کاذب در چشم سالم افزایش می‌یابد و به دلیل تاخیر در ترمیم سریع چشم سالم به دنبال برداشت قطعه‌ای از ناحیه لیمبوس<sup>۱۰،۵</sup>، به نظر می‌آید که استفاده از یاخته‌های کشت‌شده در آزمایشگاه، به علت آسانی کشت یاخته‌ها و عدم آسیب چشم دهنده به دلیل برداشت قطعه خیلی کوچک از لیمبوس و فقدان مشکلات موجود در رد پیوند بافتی در نمونه‌های آلوگرافت، از اهمیت ویژه‌ای برخوردار باشد. بدین منظور، چندین راهکار درمانی ارائه شده‌اند که می‌توان به کشت قطعه‌ای و یا کشت سوسپانسیون یاخته‌ای اشاره نمود<sup>۵</sup>.



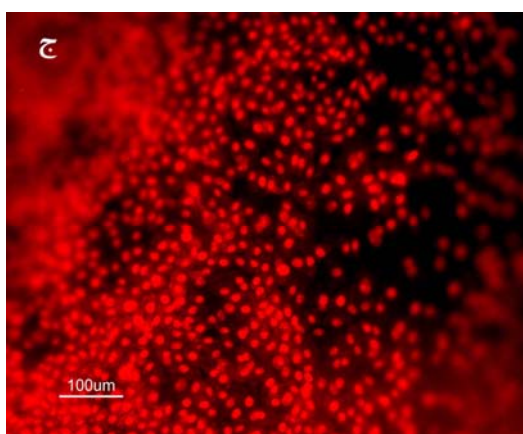
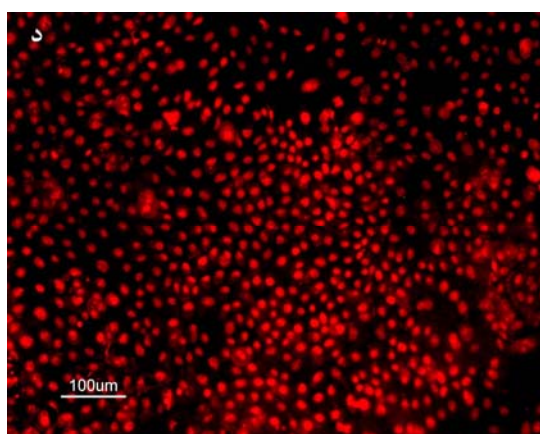
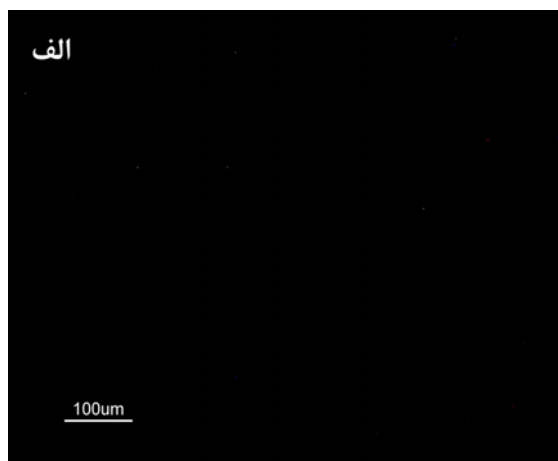
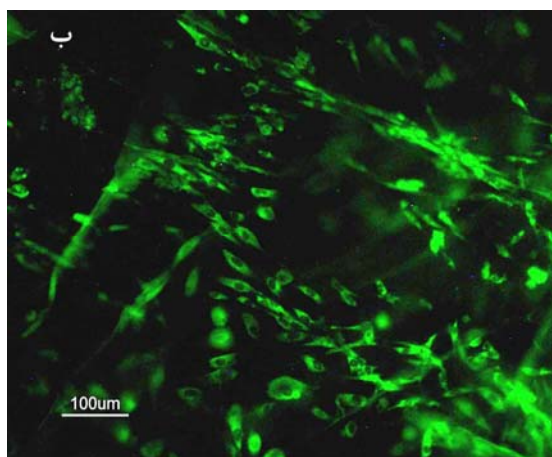
شکل ۱- یاخته‌های بنیادی لیمبوس چشم انسان، کشت شده در محیط آزمایشگاه: الف) مهاجرت یاخته‌های بنیادی لیمبوسی پس از ۲ روز کشت ( میکروسکوپ فازکنتراست)، ب و ج) نمای فازکنتراست یاخته‌های لیمبوسی پس از ۱۳ روز (ب) و ۲۱ روز (ج) کشت، نشان دهنده حضور یاخته‌های کوچک در حال تقسیم و مکعبی یا سنگ‌فرشی است. پیکان (شکل ب)، یکی از یاخته‌ها را در حال تقسیم (مرحله تلوفاز) نشان می‌دهد و د) رنگ آمیزی به روش هماتوکسیلین-ائوزین.



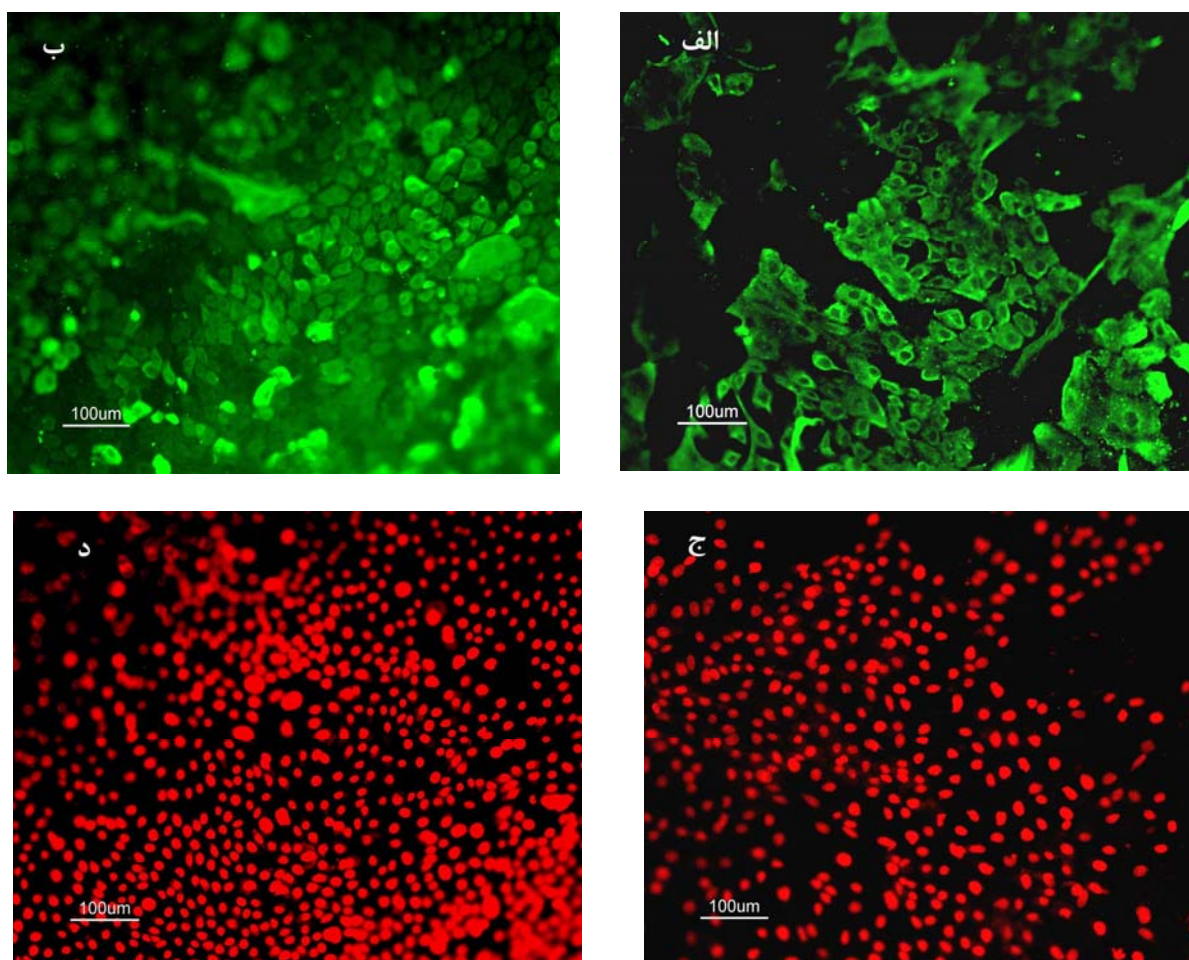
شکل ۲- رنگ آمیزی ایمونوسیتوشیمی با پادتن تک‌دومانی K3: الف) پس از ۱۳ روز کشت، جمعیت کوچکی از یاخته‌ها به بیان کراتین-۳ (K3) پرداختند، ب) پس از ۲۱ روز کشت، اکثر یاخته‌ها در حاشیه کشت، کراتین-۳ (K3) را بیان نمودند.



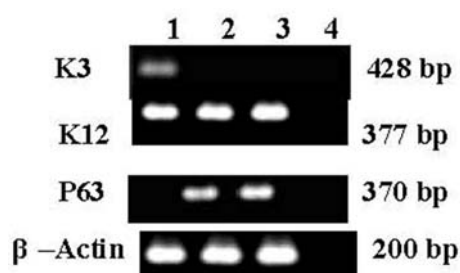
ادامه شکل ۲: ج و د) رنگ‌آمیزی هسته یاخته‌ها توسط یدید پرومیدیم دیده می‌شود. در تصویر ج، هسته‌ها مربوط به شکل الف و در تصویر د، هسته‌ها مربوط به شکل ب می‌باشند.



شکل ۳- رنگ‌آمیزی ایمونوسیتوشیمی با پادتن تک‌دومانی ضد کانکسین-۴۳ (CX43): الف) پس از ۱۳ روز کشت، هیچ‌کدام از یاخته‌ها کانکسین-۴۳ را بیان نکردند؛ ب) پس از ۲۱ روز کشت، جمعیت کمی از یاخته‌ها به طور پراکنده و در حاشیه کشت به بیان کانکسین-۴۳ پرداختند و ج و د) جمعیت یاخته‌های موجود در شکل الف و ب را نشان می‌دهند که هسته یاخته‌ها توسط یدید پرومیدیم رنگ‌آمیزی شده است.



شکل ۴- رنگ آمیزی ایمنوسیتوشیمی با پادتن تک‌دومانی ضد سیتوکراتین‌های یاخته‌ای: الف) پس از ۱۳ روز کشت، تعدادی از یاخته‌ها به بیان سیتوکراتین‌ها پرداختند؛ ب) پس از ۲۱ روز کشت، جمعیت بیشتری از یاخته‌ها که بیش‌تر در حاشیه کشت مستقر هستند، به بیان سیتوکراتین پرداختند و ج و د) رنگ آمیزی هسته یاخته‌ها توسط یدید پرومیدوم را نشان می‌دهد.



شکل ۵- نتایج RT-PCR بر روی نمونه‌های لیمبوسی و قرنیه‌ای طبیعی و نمونه لیمبوسی کشت‌شده، نشان داد که در قرنیه طبیعی (in vivo corneal) ژن کراتین ۳ و ۱۲ بیان می‌گردد (ستون ۱) در حالی که نمونه لیمبوسی طبیعی (in vivo limbal) (ستون ۲) و یاخته‌های لیمبوسی کشت‌شده به مدت ۲۱ روز (ex vivo limbal) (ستون ۳)، ژن‌های K<sub>۱۲</sub> و P<sub>۶۳</sub> بیان می‌گردند. ستون ۴، کنترل منفی می‌باشد.



یاخته‌ای بیان‌کننده این کراتین در حاشیه کشت می‌گردد. بررسی بیان ژن‌ها توسط RT-PCR نیز مشخص ساخت که ژن  $K_{12}$  در تمام مراحل تمایزی، از مرحله لیمبوسی تا قرنیه کامل و حتی یاخته‌های کشت‌شده (۱۳ روز) نیز بیان می‌گردد. این در حالی است که بیان ژن  $K_2$ ، تنها مختص به قرنیه تمایزیافته می‌باشد و بیان ژن  $P_{63}$  نیز خاص یاخته‌های لیمبوسی کشت‌شده و لیمبوسی طبیعی است.

DU و همکاران<sup>۸</sup> با استفاده از RT-PCR ژن‌های  $K_{12}$  و  $P_{63}$  نشان دادند که یاخته‌های اپی‌تلیوم قرنیه از نظر بیان  $K_{12}$  مثبت هستند اما بیان ژن  $P_{63}$  در این یاخته‌ها دیده نشد؛ در حالی که در ناحیه لیمبوس، بیان هر دو ژن ( $K_{12}$ ،  $P_{63}$ ) هم در ناحیه لیمبوس فرد بالغ و هم جنین، مثبت گزارش شد.<sup>۸</sup> پروتیین کانکسین-۴۳ نیز که به فراوانی در اتصالات فاصله‌ای (gap junction) یافت می‌گردد، در یاخته‌های لیمبوسی وجود ندارد؛ در حالی که در یاخته‌های قرنیه تمایزیافته به فراوانی دیده شده است.<sup>۸</sup> پاره‌ای از تحقیقات نشان داده‌اند که کانکسین-۴۳ در اپی‌تلیوم پایه لیمبوس وجود ندارد اما در ناحیه اپی‌تلیوم پایه قرنیه یعنی محل استقرار یاخته‌های با قدرت تکثیر محدود، به فراوانی بیان می‌گردد.<sup>۸،۷</sup> در حقیقت، عدم حضور کانکسین-۴۳، نشانه‌ای از تکثیر سریع یاخته‌های مربوط است<sup>۸</sup> و ظهور آن با میزان تکثیر یاخته، رابطه معکوس دارد.

کشت یاخته‌ای لیمبوس به مدت ۳ هفته بر روی پرده آمینیونی به همراه یاخته‌های تغذیه‌کننده فیبروبلاستی (3T3) نشان داد که در نواحی نزدیک به قطعه کشت‌شده، برخی جمعیت‌ها به بیان کانکسین-۴۳ می‌پردازند و چنانچه یاخته‌های اخیر پیوند شوند، پس از گذشت ۵ روز، در کل اپی‌تلیوم حاصل‌شده، بیان کانکسین-۴۳ مثبت می‌گردد.<sup>۸</sup> یافته‌های ما نشان دادند که طی ۱۳ روز کشت یاخته‌های لیمبوس بر پرده آمینیونی، کانکسین-۴۳ بیان نمی‌شود اما در نواحی حاشیه‌ای کشت‌های طولانی‌مدت (۲۱ روز)، دسته‌هایی از یاخته‌های بیان‌کننده کانکسین-۴۳ ظاهر می‌گردند. از آنجا که بیان کانکسین-۴۳، خاص نواحی قاعده‌ای اپی‌تلیوم قرنیه و فوق‌قاعده‌ای لیمبوس می‌باشد؛ به نظر می‌رسد که در کشت‌های طولانی‌مدت، یاخته‌هایی از نوع یاخته‌های با قدرت تکثیر محدود به وجود می‌آیند که در قرنیه طبیعی نیز در ناحیه قاعده

مطالعات نشان داده‌اند که پرده آمینیون، به ویژه بخش استرومایی آن، فراهم‌آورنده ریزمحیط لازم برای حفظ ویژگی و خواص یاخته‌های بنیادی لیمبوس، به منظور تامین کشت مناسب لیمبوس می‌باشد<sup>۸،۷،۴</sup>. از آنجا که حفظ خواص ویژه یاخته‌های بنیادی لیمبوس هم‌چون تکثیر بالا و عدم تمایز آن در محیط کشت، به منظور انجام یک پیوند موفق در بیماران با نقص یاخته‌های لیمبوسی، از اهمیت به‌سزایی برخوردار است؛ لذا در این مطالعه به بررسی خواص مورفولوژیک و بیان ژن‌های اختصاصی یاخته‌های اپی‌تلیومی قرنیه در یاخته‌های کشت‌شده بر پرده آمینیونی طی دو زمان متفاوت (۱۳ و ۲۱ روز) با استفاده از کشت قطعه‌ای، با در نظر گرفتن آسانی کشت و بدون کاهش بقای یاخته‌ای، پرداخته شد. خواص مورفولوژی یاخته‌های لیمبوسی کشت‌شده نشان داد که یاخته‌های مهاجر ابتدا گروهی شکل هستند و پس از گذشت یک هفته، یاخته‌های سنگ‌فرشی با هسته‌ای مشخص و در حال تقسیم، فضایی به وسعت ۲×۲ cm را مفروش می‌سازند (شکل ۱). در مطالعاتی که توسط Grueterich و همکاران<sup>۸</sup> و Tseng و همکاران<sup>۷</sup> صورت گرفت، مشخص گردید که یاخته‌های اپی‌تلیومی ناحیه قاعده‌ای لیمبوس کشت‌شده روی پرده آمینیونی، از ساختاری متراکم با نسبت مساوی هسته و سیتوپلاسم برخوردارند.

استفاده از پادتن‌های ویژه شاخص‌های یاخته‌ای اپی‌تلیومی قرنیه طبیعی، همچون  $K_2$  و  $K_{12}$  نشان داده است که کراتین-۳ در سرتاسر اپی‌تلیوم قرنیه طبیعی و ناحیه فوق‌قاعده‌ای (suprabasal) لیمبوس طبیعی و یاخته‌های کشت‌شده لیمبوسی، به مدت ۲۱ روز بیان می‌گردد در حالی که ناحیه ملتحمه، کراتین-۳ را بیان نمی‌کند<sup>۷،۵</sup>.

کراتین-۱۲ یکی دیگر از پروتیین‌های اختصاصی یاخته‌های اپی‌تلیومی قرنیه است که در سرتاسر اپی‌تلیوم قرنیه طبیعی<sup>۸،۷،۵</sup> و فوق‌قاعده‌ای لیمبوس به فراوانی وجود دارد اما در ناحیه ملتحمه و یا یاخته‌های کشت‌شده لیمبوسی دیده نمی‌شود.<sup>۵</sup> بدین ترتیب، کراتین‌های ۳ و ۱۲ از جمله کراتین‌های اختصاصی ناحیه قرنیه می‌باشند.

در مطالعه حاضر مشخص گردید که پس از ۱۳ روز کشت، جمعیت‌های پراکنده و کوچکی از یاخته‌های لیمبوسی در محیط کشت ظاهر می‌گردند که حاوی کراتین-۳ هستند. افزایش زمان کشت (۲۱ روز) سبب افزایش جمعیت‌های

آن‌جا که اکسیژن و یا مواجه با هوا، یکی از عوامل موثر در بلوغ یاخته‌های لیمبوسی است؛ پیوند به چشم و در معرض قرار گرفتن یاخته‌های کشت‌شده با هوا، در تکمیل روند تمایز این یاخته‌ها موثر است. علاوه بر این، به علت آن که تعداد یاخته‌های لیمبوسی کشت‌شده نسبت به بافت لیمبوس، کم‌تر است و از سوی دیگر از خلوص یاخته‌ای بالاتری (نسبت به بافت لیمبوسی) برخوردار است؛ لذا به نظر می‌رسد که واکنش‌های ایمونولوژیک ناخواسته کم‌تری را در گیرنده پیوند به دنبال داشته باشد که نیازمند مطالعات و آزمایش‌های بیش‌تری است.

#### نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر از پرده آمنیون برهنه (بدون یاخته‌های اپی‌تلیومی) استفاده گردید و نتایج حاکی از تایید این نظریه است که پرده آمنیون، فراهم‌آورنده محیط لازم برای حفظ و نگهداری خاصیت تکثیری و عدم تمایز یاخته‌های بنیادی است. از آن‌جا که حصول نتیجه مطلوب از این تحقیق نیازمند پیوند این یاخته‌ها و بررسی آن‌ها در بدن موجود زنده می‌باشد؛ انجام مطالعات بیش‌تر برای حصول نتیجه قطعی، ضروری است.

قرنیه جای می‌گیرند و تا مدتی محدود، قدرت تکثیر خود را حفظ می‌کنند.

از ویژگی‌های این تحقیق، استفاده از پرده آمنیون برهنه (فاقد یاخته‌های اپی‌تلیومی سطحی آمنیون) و عدم استفاده از یاخته‌های تغذیه‌کننده فیبروبلاستی (3T3) می‌باشد؛ هرچند که وجود یاخته‌های تغذیه‌کننده فیبروبلاستی (3T3) سبب افزایش رشد یاخته‌های لیمبوسی می‌گردد و یاخته‌های حاصل نسبت به گروه شاهد، تمایزنیافته‌تر نیز باقی می‌مانند<sup>۱۸</sup> اما از آن‌جا که منشا این یاخته‌ها موشی است و ممکن است سبب تغییر آنتی‌ژن در یاخته‌های لیمبوسی کشت‌شده گردد و از جمله عوامل تداخلی در پیوند به گونه انسانی باشد؛ در این مطالعه مورد استفاده قرار نگرفت. هم‌چنین در این مطالعه گزارش شده است که بیان ژن K<sub>۱۲</sub> مختص قرنیه تمایزنیافته نیست و در ناحیه لیمبوسی طبیعی کشت‌شده نیز به طور دایم بیان می‌گردد.

نتایج این تحقیق نشان دادند که یاخته‌های کشت‌شده لیمبوسی پس از ۱۵-۱۳ روز کشت، بهترین شرایط را برای پیوند کسب می‌کنند و به نظر می‌رسد که ادامه مسیر تمایزی یاخته‌ها به قرنیه کامل، در چشم گیرنده پیوند صورت گیرد. از

#### منابع

- 1- Pellegrini G, Golisana O, Paterna P. Location and clonal analysis of stem cells and their differentiation progeny in the human ocular surface. *J Cell Biol* 1999;145:76-482.
- 2- Dua HS, Azurara Blanco A. Limbal stem cells of the corneal epithelium. *Surg Ophthalmol* 2000;44:415-424.
- 3- Sang Wan VS. Limbal stem cells in health and disease. *Biosci Rep* 2001;121:385-405.
- 4- Tseng SCG. Regulation and clinical implications of corneal epithelial stem cells. *Mol Biol Rep* 1996;23:47-58.
- 5- Koizumi N, Cooper LY, Fullwood NY, Nakamura T. An evaluation of cultivated corneal limbal epithelial cells using cell suspension culture. *Inv Ophthalmol Vis Sci* 2002;43:2114-2210.
- 6- Meller D, Pires RTF, Tseng SCG. Exvivo preservation and expansion of human limbal epithelial stem cells on amniotic membrane cultures. *Br J Ophthalmol* 2002;86:463-471.
- 7- Grueterich M, Tseng SCG. Human limbal progenitor cells expanded on intact amniotic membrane exvivo. *Arch Ophthalmol* 2002;120:783-790.
- 8- Du Y, Chen J, Funderburgh YL, Zhu X, Ligsong L. Functional reconstruction of rabbit corneal epithelium by human limbal cells cultured on amniotic membrane. *Mol Vis* 2003;6:35-43.
- 9- Chen JJY, Tseng SCG. Abnormal corneal epithelial wound healing in partial thickness removal of epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1991;22:19-33.
- 10- Puangsricharern V, Tseng SCG. Cytologic evidence of corneal disease with limbal stem cell deficiency. *Ophthalmology* 1995;102:1476-1485.

- 11- Meallet MA, Espana EM, Gruetrich M, Tseng SCG, Amniotic membrane transplantation with conjunctinonal limbal autograft for total limbal stem cell Difficiency. *Ophthalmology* 2003;110:1582-1592.
- 12- Tsubota K, Satake Y, Kaido M. Treatment of severe ocular surface disorders with corneal epithelial stem cell transplantation. *N Engl J Med* 1993;340:697-703.
- 13- Keryon KR, Tseng SCG, Limbal autograft transplantation for ocular surface Disorders. *Ophthalmology* 1989;96:709-723.
- 14- Kim JC, Tseng SCG. Transplantation of preserved human amniotic membrane for surface reconstruction in severely damaged rabbit corneas. *Cornea* 1995;14:473-484.
- 15- Tsubota K, Satake Y, Ohyama M. Surgical reconstruction of ocular surface in advanced ocular cicatricial pemphigoid and Stevens-Johnson syndrome. *Am J Ophthalmol* 1996;122:38-52.
- 16- Shimazaki J, Yang HY, Tsubota K. Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction in patients with chemical and thermal burns. *Ophthalmology* 1997;104:2068-2076.
- 17- Tseng SCG, Prabhasaeat P, Barton K. Amniotic membrane transplantation without limbal allografts for corneal surface reconstruction in patients with limbal stem cell deficiency. *Arch Ophthalmol* 1998;116:431-410.
- 18- Grueterich M, Espana EM, Tseng SCG. Modulation of keratin and connexin expression in limbal epithelial expanded on denuded amniotic membrane with and without 3T3 fibroblast feeder layer. *Invest Ophthalmol Res* 2003;44:4230-360.
- 19- Koisumi N, Inatomi T. Amniotic membrane as a substrate for cultivating limbal epithelial cells for autologous transplantation in rabbits. *Cornea* 2000;19:65-71.
- 20- Prabhasawat P, Barton K, Burkett G, Tseng SCG. Comparision of conjunctinonal autografts amniotic membrane grafted primary closure for pterygium excision. *Ophthalmology* 1997;104:974-985.