



Semnan University of Medical Sciences

# KOOMESH

Journal of Semnan University of Medical Sciences

**Volume 21, Issue 3 (Summer 2019), 395- 578**

**ISSN: 1608-7046**

**Full text of all articles indexed in:**

*Scopus, Index Copernicus, SID, CABI (UK), EMRO, Iranmedex, Magiran, ISC, Embase*

## تغییرات ریخت‌شناسی لایه رنگ‌دانه‌دار شبکیه و سلول‌های فوتورسپتور آسیب‌دیده بعد از پیوند سلول‌های بنیادی به فضای زیر شبکیه

حمید ابوطالب کدخداییان\* (Ph.D)

مرکز تحقیقات سلول‌های بنیادی سیستم عصبی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، سمنان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۳/۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱/۱۹

habootaleb92@gmail.com

\* تلفن: ۰۹۱۲۸۵۹۸۹۴۳

### چکیده

هدف: بیماری‌های تخریبی شبکیه مهم‌ترین علت نابینایی غیرقابل برگشت است. یکی از روش‌های درمانی امیدبخش در این بیماری‌ها استفاده از سلول‌های بنیادی است. در این بین سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان به‌عنوان یکی از سلول‌های ایمن می‌تواند در تولید سلول‌های آسیب‌دیده و درمان این بیماری‌ها نقش مهمی ایفا نماید. هدف این مطالعه، بررسی تغییرات ریخت‌شناسی لایه رنگ‌دانه‌دار شبکیه و سلول‌های فوتورسپتور آسیب‌دیده بعد از پیوند سلول‌های بنیادی به فضای زیر شبکیه بود.

مواد و روش‌ها: مدل تخریب لایه رنگ‌دانه‌دار شبکیه با استفاده از تزریق سدیم یدید در سینوس پشت چشم موش‌های صحرایی رنگ‌دانه‌دار انجام شد. بعد از ۲۸ روز از تزریق سدیم یدید و تأیید تخریب لایه رنگ‌دانه‌دار، برای پیوند سلولی مورد استفاده قرار گرفت. برای پیوند سلولی، در مرحله اول تولید سلول‌های رنگ‌دانه‌دار از تمایز دو مرحله‌ای سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان استفاده شد. برای این کار سلول‌های بنیادی از مغز استخوان ران موش صحرایی استخراج شد بعد از پاساژ سوم با استفاده از محیط تمایزی به سلول‌های رنگ‌دانه‌دار تمایز داده شد. سلول‌های تولیدشده به فضای زیر شبکیه مدل‌های ایجادشده تزریق شدند. ۳۰ روز بعد از پیوند سلولی، بررسی‌های بافتی از جمله بررسی لایه رنگ‌دانه‌دار و شمارش تعداد هسته‌ها در لایه هسته‌ای خارجی شبکیه با استفاده از رنگ‌آمیزی کریزل ویولت انجام شد.

یافته‌ها: بررسی ایمونوسیتوشیمی سلول‌های تمایز یافته نشان داد که درصد بالایی ( $93 \pm$ ) از این سلول‌ها مارکرهای اختصاصی (RPE65, CRALBP) سلول‌های رنگ‌دانه‌دار را نشان دادند. این سلول‌ها به موش‌های صحرایی دارای آسیب لایه رنگ‌دانه‌دار تزریق شدند. بررسی‌های بافتی این نمونه‌ها بعد از ۳۰ روز نشان داد که لایه رنگ‌دانه‌دار و لایه هسته‌ای خارجی فوتورسپتورها بهبود یافته و تعداد سلول‌ها در این لایه‌ها در مقایسه با گروه کنترل افزایش یافته است.

نتیجه‌گیری: تولید سلول‌های رنگ‌دانه‌دار شبکیه مشتق شده از سلول‌های بنیادی مغز استخوان که از نظر بیان ژن‌های اختصاصی شبیه به سلول‌های طبیعی باشند و هم‌چنین بعد از پیوند در بافت بتوانند فعالیت فیزیولوژیک از خود نشان دهند و موجب بهبودی شوند در درمان بیماری‌های تخریبی شبکیه بسیار مفید هستند.

واژه‌های کلیدی: سلول‌های رنگ‌دانه‌دار، فوتورسپتورها، درمان سلولی، تزریق فضای زیر شبکیه، بیماری‌های تخریبی شبکیه، تخریب وابسته به سن ماکولا

### مقدمه

هم‌چنین این بیماری مهم‌ترین علت کم‌بینایی غیر قابل درمان است. با بررسی مطالعات مشخص شده است که AMD در ۲/۰ درصد افراد بالای ۶۴-۵۵ سال، ۱۳ درصد در افراد بالای ۸۵ سال وجود دارد [۲]. در این گروه‌های مطالعاتی آتروفی منطقه‌ای از ۰/۰۴ درصد به ۴/۲ درصد افزایش یافته است، در حالی که AMD تنوواسکولار از ۱۷ درصد به ۵/۸ درصد افزایش یافته

بیماری تخریب ماکولا وابسته به سن (Age Related Macular Degeneration, AMD) شایع‌ترین علت نابینایی در جوامع صنعتی است [۱]. در سال ۲۰۰۵، Taylor and colleagues با بررسی مطالعات قبلی دریافتند که در حدود ۲۴۲۰۰ نفر از مردم استرالیا به دلیل AMD نابینا شده‌اند و این بیماری مهم‌ترین علت نابینایی در افراد بالای ۴۰ سال است.

سلول‌های مزانشیمی مشتق از بند ناف و عنبیه و جسم مزگانی بزرگسالان [۱۱، ۱۳-۱۸].

به دلیل این‌که سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان (Bone Marrow Stromal Stem Cells, BMSCs) دارای خصوصیتی از جمله پلاستیسیته و نوروپروتکشن و تعدیل سیستم ایمنی هستند، به‌عنوان یک منبع سلولی مناسب در درمان بیماری‌های چشمی محسوب می‌شوند. یکی از فواید بسیار خوب این سلول‌ها در درمان بیماری‌های چشمی، دسترسی آسان به این سلول‌ها و همچنین استفاده از سلول‌های BMSCs خود بیمار برای تزریق اوتولوگوس است [۱۹-۲۲]. سلول‌های BMSCs نقش مهمی در ترمیم بافت دارند. این سلول‌ها می‌توانند به بافت آسیب‌دیده مهاجرت کرده و با بافت مورد نظر یکی شده و روند ترمیم را ارتقا بخشد. خصوصیت دیگر سلول‌های BMSCs، تعدیل سیستم ایمنی توسط این سلول‌ها است. این سلول‌ها از تکثیر سلول‌های T و بیان سیتوکین‌ها توسط سلول‌های T جلوگیری می‌کنند. ترمیم شبکه بر اساس استفاده از سلول‌های BMSCs یکی از روش‌های درمانی امیدبخش در بیماری‌های شبکه است. فاکتورهای رشد شرکت‌کننده در تکامل سلول‌های شبکه برای تمایز سلول‌های BMSCs به سلول‌های شبکه لازم و ضروری می‌باشند [۲۲، ۱۳].

سلول‌های بنیادی مغز استخوان توانایی تمایز به سلول‌های RPE و شبکه را دارند [۱۵، ۱۶]. هم‌چنین تزریق مستقیم این سلول‌ها در فاز بالینی بیمارهای چشمی مورد مطالعه قرار گرفته است. به‌طوری‌که در بیماری AMD، گلوکوم، رتینوپاتی دیابتی، رتینیت پیگمنتوزا، ایسکمی رتینوپاتی، دیستروفی ماکولا، آتروفی اپتیک و به شکل تزریق داخل زجاجیه مورد مطالعه قرار گرفته‌اند [۱۹]؛ بنابراین استفاده از این سلول‌ها برای درمان بیماری‌های تخریبی چشم در مراحل مختلف قرار دارد و این سلول‌ها با توجه به خصوصیات برشمرده شده می‌توانند برای درمان مورد استفاده قرار گیرند.

تاکنون از روش‌هایی از جمله تزریق مستقیم این سلول‌ها به فضای زیر شبکه و یا داخل زجاجیه استفاده شده است و تمایز این سلول‌ها در محل پیوند و مهاجرت آن‌ها مورد مطالعه قرار گرفته است. هم‌چنین پیوند سلول‌های بنیادی عصبی به فضای زیر شبکه مطالعه شده است [۲۳].

است. به طور کلی، مطالعات نشان می‌دهند که AMD در سنین قبل از ۵۵ سالگی به‌ندرت دیده می‌شود و بعد از سن ۷۵ سالگی شیوع پیدا می‌کند [۳]. برآورد شده است که این بیماری در حدود ۸ میلیون نفر در آمریکا و حالت پیشرفته آن در حدود ۱/۷۵ میلیون نفر را تحت تأثیر قرار داده است و این رقم با تا سال ۲۰۲۰ به ۵۰ درصد خواهد رسید [۴، ۵].

مطالعات اپیدمیولوژی نشان می‌دهند که رتینیت پیگمنتوزا عمدتاً در جمعیت‌های جوان و کودکان دیده می‌شود و رتینوپاتی دیابتی در میان‌سالی و هم‌چنین تخریب ماکولا وابسته به سن (AMD) در کهن‌سالی دیده می‌شود [۶]. استراتژی‌های درمانی رایج برای چنین بیماری‌هایی استفاده از داروها، مداخلات جراحی و سلول‌درمانی است. دارودرمانی یک روش معمول و فراگیر است اما اثربخشی آن برای بیمارهایی مثل رتینیت پیگمنتوزا کم است. مداخلات جراحی مثل جابه‌جایی اوتولوگوس لایه رنگ‌دانه‌دار شبکه (Retinal Pigment Epithelium, RPE) برای درمان بیماری‌هایی مثل نئوواسکولاریزاسیون استفاده شده است اما نتایج حاصل از آن متفاوت بوده است و استفاده از چنین روش‌های جراحی به لحاظ فنی با مشکلاتی روبرو است. مهم‌تر این‌که چنین روش‌های جراحی برای ترمیم شبکه آسیب‌دیده قابل اجرا نیست [۷-۱۲].

اخیراً درمان بر پایه سلول‌های بنیادی برای تخریب شبکه پیشنهاد شده است [۱۳]. این روش درمانی در مدل‌های حیوانی مختلف در بیمارهای تخریبی شبکه آزمایش شده است. پیوند سلول‌های شبکه دارای عملکرد یا سلول‌های بنیادی، به بازگشت و حفظ جمعیت سلولی آسیب‌دیده شبکه کمک می‌کند. با این حال اختلاف نظر و خطر رد پیوند ایمونولوژیکی موجب محدود شدن استفاده از سلول‌های بنیادی جنینی (Human Embryonic Stem Cells, hESCs) شده است. از سلول‌های مختلفی برای درمان شبکه آسیب‌دیده می‌توان استفاده نمود که عبارت‌اند از: سلول‌های بنیادی جنینی، سلول‌های پروژنیاتور شبکه عصبی، سلول‌های پروژنیاتور شبکه انسانی، پیش‌سازهای فوتورسپتور، سلول‌های بنیادی جنینی انسانی و موشی، سلول‌های مجدد برنامه‌ریزی‌شده انسانی و موشی، سلول‌های بنیادی بزرگسالان، سلول‌های پروژنیاتور عنبیه و جسم مزگانی، سلول‌های مشتق از هیپوکامپ بزرگسالان، سلول‌های پروژنیاتور خون‌ساز، سلول‌های مزانشیمی بزرگسالان،

DMED/F12 (سیگما، آلمان) به همراه FBS (سیگما، آلمان) ده درصد به آن اضافه شد و درون انکوباتور تحت شرایط ۵ درصد CO<sub>2</sub>، رطوبت ۹۵ درصد و دمای ۳۷ درجه قرار داده شد. بعد از ۲۴ ساعت سلول‌های شناور جدا شد و به سلول‌های چسبیده به کف فلاسک محیط جدید اضافه شد و محیط کشت سلول‌ها هر ۴۸ ساعت یک‌بار تعویض شد.

برای تمایز سلول‌های بنیادی مغز استخوان به سلول‌های RPE از روش Giorando و همکاران [۲۶] و Farmbach و همکاران [۲۷] با تغییراتی در آن استفاده شد. بعد از کشت سلول‌های بنیادی مغز استخوان تا پاساژ سوم و رسیدن به یک‌دستی مورد نظر سلولی، بر روی کاوراسلیپ پوشیده شده با ژلاتین قرار گرفتند و در دو مرحله تمایز داده شدند. ابتدا در محیط

DMEM/F12 حاوی N2 (سیگما، آلمان) قرار داده شدند و بعد از گذشت دو روز محیط تمایزی تغییر داده شد و از محیط DMEM به همراه یک درصد FBS، ۲ میلی‌مولار آل-گلوتامین، ۱۰۰ واحد/میلی‌لیتر پنیسیلین، ۱۰۰ میکروگرم/میلی‌لیتر استرپتومایسین، ۱۰<sup>-۱۱</sup> مولار تری‌یدوتیرونین، ۲ میکروگرم/میلی‌لیتر هیپارین و ۸/۳ × ۱۰<sup>-۷</sup> مولار انسولین (سیگما، آلمان) و ۲۰ نانوگرم/میلی‌لیتر EGF استفاده شد. سلول‌ها به مدت ۷-۱۴ روز در این محیط کشت داده شدند. برای تأیید سلول‌های تمایز یافته از مارکرهای اختصاصی سلول‌های رنگدانه‌دار استفاده شد. آنتی‌بادی‌های استفاده‌شده در این قسمت شامل آنتی RPE65، آنتی-CRALBP بودند. سلول‌ها بعد از فیکس شدن با پارافمالدئید ۴ درصد شستشو داده شدند و غشای سلول‌ها با استفاده از تریتون X-100 محلول در PBS و FBS سوراخ شده و بعد از شستشو، آنتی‌بادی اولیه بر روی آن‌ها ریخته شد و بعد از انکوبه نمودن سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه، آنتی‌بادی ثانویه FITC به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق استفاده شد و سلول‌ها بعد از شستشو با استفاده از میکروسکوپ فلوروسنت اینورت Olympus مورد مشاهده و بررسی و شمارش قرار گرفتند.

روش پیوند سلول‌های تمایز یافته به فضای زیر شبکه

در این مطالعه از ۸۰ سر موش صحرایی رنگدانه‌دار نژاد Hooded تهیه شده از انستیتو رازی (ایران، تهران) استفاده شد و به گروه‌های زیر تقسیم شدند: ۱- گروهی که دارای تخریب RPE است و بعد از تأیید مدل،

با این حال تمایز مستقیم سلول‌های بنیادی مغز استخوان به وسیله مولکول‌های کوچک القاکننده به سلول‌های RPE و پیوند آن‌ها در مدل‌های تخریب ماکولا انجام نشده است. به نظر می‌رسد که سلول‌های تمایز یافته می‌توانند بعد از پیوند به فضای زیر شبکه موجب عملکرد بهتری در لایه RPE و فوتورسپتورها شوند. لذا در این مطالعه بر آن شدیم تا با روشی مستقیم و نوین سلول‌های بنیادی مغز استخوان را به سلول‌های RPE تمایز داده و در نمونه موش صحرایی دارای تخریب RPE با استفاده از سدیم یدید تزریقی کنیم و تغییرات ریخت‌شناسی لایه RPE و فوتورسپتورها را بررسی نماییم.

## مواد و روش‌ها

روش ایجاد مدل تخریب لایه رنگدانه‌دار شبکه‌ی مدل تخریب لایه RPE در دو گروه از موش‌های صحرایی رنگدانه‌دار به تعداد ۱۰ عدد (n=۱۰) در هر گروه انجام شد. برای ایجاد مدل تخریب لایه RPE از پودر شیمیایی سدیم یدید استفاده شد [۲۴]. برای تزریق سدیم یدید (سیگما، آلمان) از موش‌های صحرایی با وزن ۲۰۰-۲۵۰ گرمی و بر اساس مقاله machalinska و همکاران [۲۵] استفاده شد که بر اساس وزن، سدیم یدید مورد نیاز، محاسبه شد. ابتدا موش‌های صحرایی با استفاده از تزریق داخل صفاقی کتامین و زایلزین (سینا دارو، ایران) بی‌هوش شدند و بعد از بی‌هوشی کامل، زیر میکروسکوپ قرار گرفتند به طوری که چشم مورد نظر (چشم چپ) به سمت بالا قرار گرفت سپس با استفاده از سرنگ انسولینی وارد فضای سینوسی پشت چشم شده و مقدار ۱۰۰ میکرو لیتر از سدیم یدید در این فضا تزریق شد. بعد از تزریق، سوزن به آرامی خارج شد و اندکی فشار داده شد تا از خروج خون و ماده تزریق شده جلوگیری شود. تأیید تخریب لایه RPE در این نمونه‌ها با استفاده از الکتروترینوگرافی و بررسی بافتی هفت روز بعد از تزریق و ۲۸ روز بعد از تزریق انجام گرفت و بعد از تأیید برای پیوند سلولی مورد استفاده قرار گرفتند.

روش کشت سلول‌های بنیادی مغز استخوان و تمایز آن‌ها به سلول‌های رنگدانه‌دار شبکه‌ی

موش‌های صحرایی رنگدانه‌دار با تزریق داخل صفاقی کتامین کشته شدند. عضلات متصل به فمور و تیبیا جدا شد و با استفاده از سرنگ مغز استخوان استخراج شد و درون فلاسک T-25 ریخته شد و محیط

بدین ترتیب که ابتدا موش‌های صحرایی با استفاده از تزریق داخلی صفاقی کتامین (۴۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) و زایلین (۴ میلی‌گرم/کیلوگرم) بی‌هوش شدند. سپس با استفاده از پنس و قیچی چشم‌ها از کاسه چشم خارج شدند و درون پارافورمالدئید ۴ درصد (سیگما، آلمان) به مدت یک شب قرار داده شدند. در روز بعد نمونه‌ها از درون پارافورمالدئید ۴ درصد خارج شدند بلوک پارافینی تهیه شد. برش‌های ۷-۵ میکرومتری از تمامی قسمت‌های چشم به صورت سریالی تهیه شد و توسط رنگ آمیزی کریزیل ویولت مورد بررسی قرار گرفتند و شمارش هسته سلول‌ها در لایه هسته‌ای خارجی انجام شد. برای این کار در هر نمونه ۵ لام در ناحیه تزریق شده به طور تصادفی انتخاب و بعد از رنگ آمیزی با کریزیل ویولت در زیر میکروسکوپ مشاهده شدند و با بزرگ‌نمایی ۲۰ X عکس گرفته شد. سپس عکس‌ها با نرم‌افزار image J (1.45m; National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) مورد بررسی قرار گرفتند و تعداد هسته‌ها در لایه هسته‌ای خارجی شمارش شدند. میانگین تعداد هسته‌ها در هر نمونه به دست آمده و با دیگر نمونه‌ها در هر گروه مقایسه شد و میانگین کلی تعداد هسته‌ها در لایه هسته‌ای خارجی در هر گروه محاسبه شد. تفاوت تعداد هسته‌ها در هر گروه با استفاده از نمودار هیستوگرام نمایش داده شد.

#### روش آماری

داده‌های آماری حاصل ابتدا توسط آزمون Clomogrove-smirnovه نرمال بودن آن‌ها بررسی شد و با توجه به  $P > 0.05$  به دست آمده، آزمون آماری واریانس یک طرفه (ANOVA) با آزمون post hoc Tukey's استفاده از نرم‌افزار SPSS 16.1 استفاده شد و سطح معنی‌داری  $P < 0.05$  در نظر گرفته شد.

#### نتایج

نتایج حاصل از بررسی برش‌های بافتی تهیه شده از موش‌های صحرایی که دوز ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم از سدیم یدید را دریافت کرده‌اند (شکل ۱) نشان داد که در مقایسه با گروه کنترل ۷ روز بعد از تزریق سدیم یدید، تغییرات در لایه هسته‌ای خارجی و لایه رنگ‌دانه‌دار دیده شد. به طوری که تعداد هسته‌ها در این لایه کاهش یافته و هم‌چنین قسمت خارجی فوتورسپتورها که توسط سلول‌های رنگ‌دانه‌دار فاگوسیت می‌شود دچار به هم‌ریختگی شده است. نتایج برش‌های بافتی بعد از ۲۸

سلول‌های تمایز یافته RPE به فضای زیر شبکه‌ای آن‌ها تزریق شد ( $n=30$ )، ۲- گروهی که دارای تخریب RPE است و نرمال سالین به فضای زیر شبکه‌ای آن‌ها تزریق شد ( $n=25$ )، ۳- گروهی که فاقد تخریب RPE است و نرمال سالین نیز دریافت نکردند (گروه کنترل) ( $n=25$ ).

برای پیوند سلولی از روش تزریق از طریق اسکلارا استفاده شد [۲۴]. موش‌های صحرایی توسط کتامین ۶۲/۵ mg/kg و زایلین ۱۲/۵ mg/kg از طریق داخل صفاقی بی‌هوش شدند. مردمک چشم‌ها توسط ۲/۵ درصد phenylephrine ۰/۵ درصد proparacaine شاد شد. موهای بلند و زائد برداشته شد تا دید مناسب و خوبی برای چشم و فوندوس فراهم شود. بعد از این‌که موش صحرایی بی‌هوش شد دوز دوم داروی میدریاز چشمی استفاده شد. رت به مدت ۲۰ تا ۳۰ دقیقه وارد بی‌هوشی عمیق شد و این زمان مناسبی برای تزریق زیر شبکه‌ای است. بعد از این‌که موش صحرایی بی‌هوش شد به صورت لترال در زیر میکروسکوپ جراحی قرار داده شد. با استفاده از قطره چشمی ۲/۵ درصد methylcellulose فوندوس چشم مشاهده شد. با استفاده از پنس و قیچی ظریف در قسمت قطب خلفی داخلی کره چشم برش کوچکی ایجاد شد و به آرامی لایه‌های زیرین باز شد تا لایه اسکلارا دیده شد. بعد از نمایان شدن این لایه با استفاده از سوزن هیلتون (۳۰ G) وارد فضای زیر شبکه‌ای شده و ۳ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی تزریق شد. در همین حین سوراخ کوچکی در لبه خارجی قرنیه ایجاد شد تا فشار داخل چشم افزایش پیدا نکند. بعد از اتمام تزریق سوزن خارج شد و محل برش لایه‌ها با استفاده از نخ ۱۰-۰ بخیه زده شد. برای تأیید صحیح بودن تزریق با استفاده از میکروسکوپ ته چشم مشاهده شد و با دیدن برآمدگی یا bleb تزریق تأیید شد. بلافاصله بعد از تزریق و پایان جراحی از پماد چشمی حاوی bacitracin, neomycin و polymyxins استفاده شد تا ریسک عفونت و آسیب قرنیه کاهش یابد. بعد از تزریق در فضای زیر شبکه‌ای، با توجه به زمان تعریف شده برای بررسی‌های بعد از تزریق که شامل ۷ روز بعد از تزریق و ۱ ماه بعد از تزریق است رت‌ها تحت بررسی بافتی قرار گرفتند.

#### بررسی بافت‌شناسی

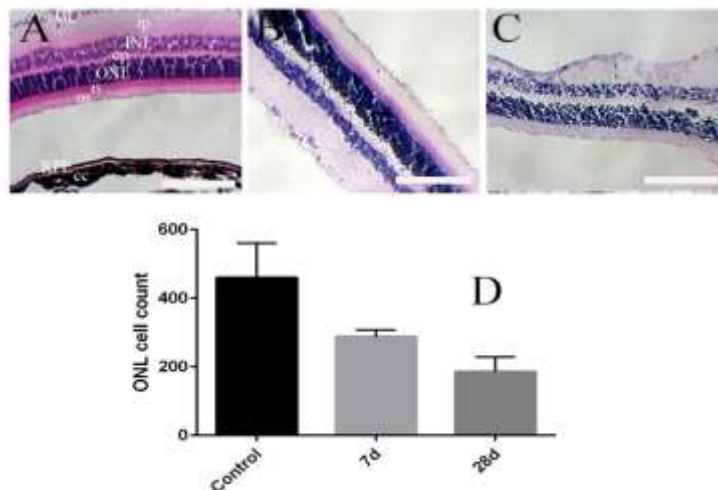
بعد از پیوند سلولی، بر اساس روش achalinskaM و همکاران [۲۵] نمونه‌های آن روز به تعداد ۵ موش صحرایی برای بررسی بافتی مورد استفاده قرار گرفت.

از جمله (E) CD34 و سلول‌های گلیال از جمله (F) GFAP را نشان نمی‌دهند. این یافته‌ها نشان داد که این سلول‌ها بنیادی بوده و مارکرهای سلول‌های رده عصبی و گلیالی و بنیادی خون‌ساز را نشان نمی‌دهند. نتایج آنالیز آماری داده‌های حاصل از بررسی ایمونوسیتوشیمی نیز نشان داد که بالای ۹۵ درصد از سلول‌های بنیادی مغز استخوان کشت داده‌شده مارکرهای اختصاصی را نشان می‌دهند (شکل ۲ G).

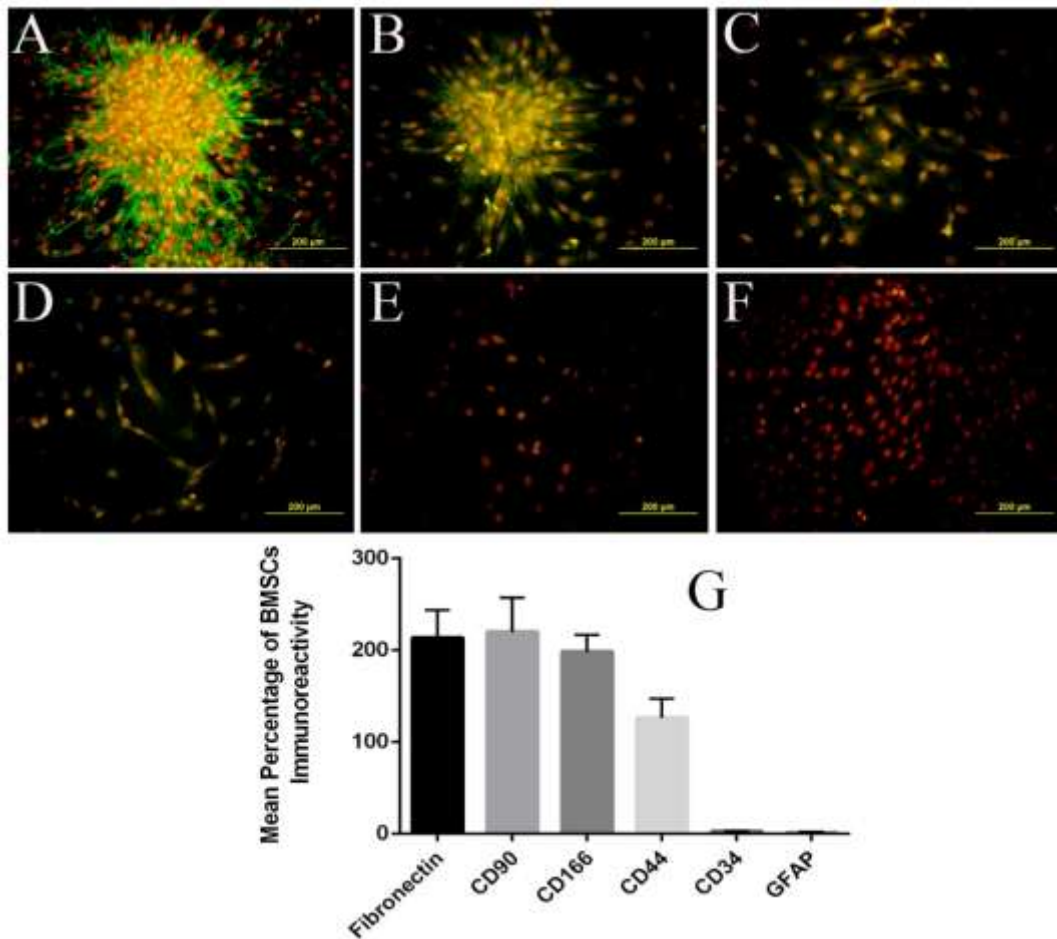
نتایج حاصل از تمایز سلول‌های بنیادی مغز استخوان نشان داد که بعد از تعویض محیط پایه‌ای این سلول‌ها به محیط تمایزی، مرگ سلولی از لحاظ ظاهری دیده نشد و تمامی سلول‌ها در محیط تمایزی جدید زنده بودند. بعد از گذشت ۷ روز از تمایز، در بعضی از آن‌ها نقاط تیره‌رنگی دیده می‌شد که احتمالاً به دلیل ساخت رنگ‌دانه در سیتوپلاسم سلول‌های این سلول‌ها بوده است. بعد از ۱۴ روز از تمایز در محیط کشت (شکل ۳ A)، سیتوپلاسم سلول‌ها تیره‌تر دیده می‌شد. نتایج حاصل از بررسی ایمونوسیتوشیمی سلول‌های رنگ‌دانه‌دار نشان داد مارکر سیتوپلاسمی شرکت‌کننده در فرایند بینایی یعنی CRALBP بعد از ۱۴ روز از تمایز در محیط کشت این پروتئین را بیان کردند (شکل ۳ B). به همین ترتیب بعد از گذشت ۱۴ روز از تمایز در محیط کشت، این سلول‌ها مارکر سیتوپلاسمی اختصاصی سلول‌های رنگ‌دانه‌دار شبکیه‌ای RPE65 را نشان می‌دهند (شکل ۳ C).

روز نشان‌دهنده کاهش معنی‌دار در تعداد هسته‌ها در لایه هسته‌دار خارجی در مقایسه با گروه کنترل بود. آنالیز آماری داده‌های حاصل از شمارش تعداد هسته‌ها نشان داد که با گذشت زمان از تزریق سدیم یدید تعداد هسته‌ها کاهش یافته و به شدیدترین حالت خود در روز ۲۸ رسید. این داده‌ها با یافته‌های بافتی هم‌خوانی داشت.

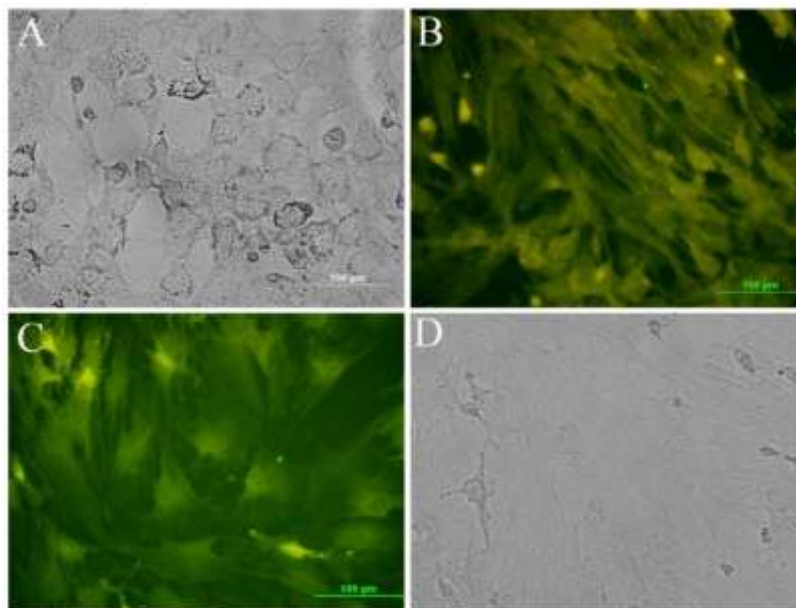
تصاویر حاصل از کشت سلول‌های بنیادی مغز استخوان نشان داد که این سلول‌ها بعد از جدا شدن از مغز استخوان دارای ظاهری گرد هستند. این سلول‌ها بعد از جدا شدن به دلیل قدرت چسبندگی بالایی که دارند در کوتاه‌ترین زمان ممکن و در صورتی که شرایط کشت مناسب باشد به کف فلاسک چسبیده و ظاهر آن‌ها از گرد به دوکی شکل تغییر می‌دهد این در حالی است که سایر سلول‌های موجود در مغز استخوان در زمان کوتاه در این شرایط کشت قادر به رشد نبودند. سلول‌های بنیادی استرومایی مغز استخوان در محیط کشت پایه، در پاساژهای اولیه دارای ظاهری متفاوت بودند و یک‌دستی لازم را ندارند اما بعد از پاساژ سوم و چهارم این سلول‌ها ظاهر یک‌دست و هم‌وزنی به صورت دوکی و فیروبلاستی به دست آوردند (شکل ۲ A-D). نتایج حاصل از بررسی ایمونوسیتوشیمی این سلول‌ها برای تأیید بنیادی بودن نشان داد که این سلول‌ها در محیط کشت مارکرهایی از جمله فیبرونکتین و هم‌چنین مارکرهای سطحی CD90، CD44، CD166 را بیان می‌کنند (شکل ۲ A-D). این سلول‌ها مارکرهای سطحی سلول‌های بنیادی خون‌ساز



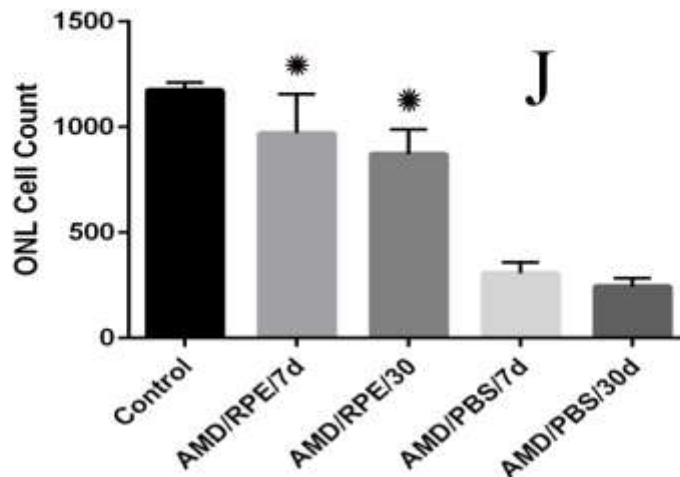
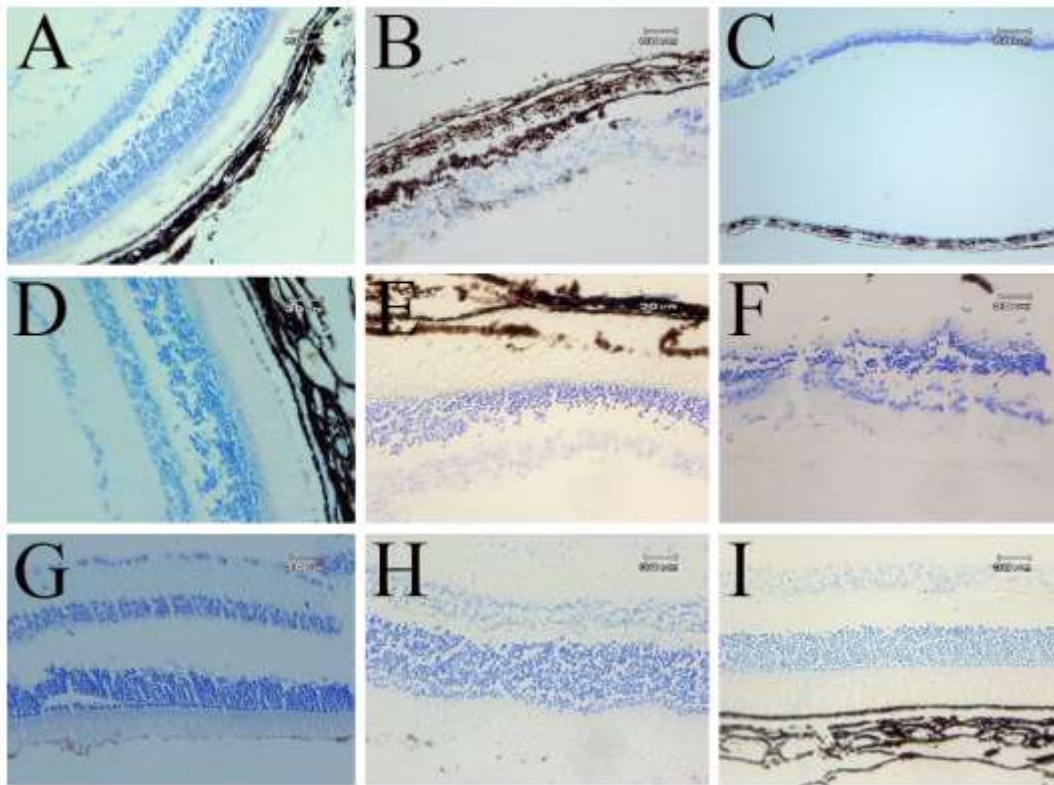
شکل ۱. تغییرات لایه رنگدانه دار و لایه هسته ای خارجی شبکیه بعد از تزریق سدیم یدید. کاهش تعداد هسته‌ها در لایه هسته ای خارجی هفت روز بعد (B) و ۲۸ روز (C) بعد از تزریق سدیم یدید در فضای سینوس پشت چشم در رت های رنگ دانه دار در مقایسه با گروه کنترل (C) دیده می‌شود. نمودار هیستوگرام (D) روند کاهش در تعداد هسته‌ها را بخوبی بیان می‌کند. بزرگنمایی  $\times 20$ . اختصارات: CC: لایه کوریوکلپیلاری، RPE: لایه رنگدانه دار شبکیه، OS: قسمت خارجی فوتورسپتورها، IS: قسمت داخلی فوتورسپتورها، ONL: لایه هسته دار خارجی، OP: لایه شبکه ای خارجی، INL: لایه هسته دار داخلی، IP: لایه شبکه ای داخلی، GL: لایه گانگلیونی.



شکل ۲. تصاویر ایمونوسیتوشیمی سلول‌های بنیادی مشتق از بافت مغز استخوان. A-F واکنش سلول‌های بنیادی مغز استخوان نسبت به فیبرونکتین (A)، مارکر سطحی CD90 (B)، مارکر سطحی CD166 (C)، مارکر سطحی CD44 (D)، مارکر سطحی CD34 (E) و مارکر سلول‌های گلیال GFAP (F) را نشان می‌دهد. G میانگین درصد بیان مارکرهای سلول‌های بنیادی مغز استخوان را نشان می‌دهد. هسته سلول‌ها با استفاده از رنگ هسته‌ای پروپیدیوم بدید به رنگ قرمز رنگ‌آمیزی شد.



شکل ۳. تصاویر تمایز سلول‌های بنیادی مغز استخوان به سلول‌ها رنگدانه دار شبکه‌ای. سلول‌های تمایز داده شده دارای ظاهری شبیه به سلول‌های پوششی هستند و درون سیتوپلاسم آنها رنگ دانه‌های تیره دیده می‌شود (A). بیان مارکرهای اختصاصی این سلول‌ها که شامل CRALBP (B) و RPE65 (C) نشان دهنده تمایز این سلول‌ها است. D تصویر فازکنتراست تصویر C است.



شکل ۴. تغییرات بافت‌شناسی در لایه رنگدانه‌دار و شبکیه عصبی بعد از پیوند سلولی به فضای زیر شبکیه. هفت روز (B, E, H) و ۳۰ روز (C, F, I) بعد از پیوند سلولی تغییرات بافت‌شناسی در مقایسه با گروه کنترل (G-I) نشان می‌دهد که در گروه دریافت‌کننده سلول (B-C) در مقایسه با گروهی که بجای سلول PBS دریافت کرده است (E-F) آرایش لایه رنگدانه‌دار به شکل تک لایه دیده می‌شود و لایه هسته‌دار خارجی همانند گروه کنترل به شکل لایه منظمی دیده می‌شود. J نمودار هیستوگرام بهبود در تعداد هسته‌ها در لایه هسته‌دار خارجی شبکیه عصبی هفت روز و ۳۰ روز بعد از پیوند در مقایسه با گروه دریافت‌کننده PBS با  $P < 0.05$  را نشان می‌دهد. تفاوت معنی‌داری بین روزهای هفت و ۳۰ از نظر تعداد سلول‌ها در گروه دریافت‌کننده سلول در لایه ONL را نشان می‌دهد.

رنگدانه‌دار به شکل مجموعه‌ای از سلول‌ها دیده می‌شود که شکل منظمی نداشته و دارای رنگدانه‌های تیره ملانین در داخل سیتوپلاسم خود می‌باشند و همچنین لایه‌های هسته‌ای داخلی و خارجی کاملاً از بین رفته و لایه گانگلیونی نیز دیده نمی‌شود. بعد از گذشت ۳۰ روز (شکل ۴ C) در مقایسه با گروه کنترل و روز ۷ بعد از پیوند (شکل ۴ F, I)، تمامیت لایه رنگدانه‌دار در محل

نتایج بررسی رنگ‌آمیزی کریزیل و یولت در گروه مدل شده با سدیم یدید و دریافت‌کننده سلول (شکل ۴ A-C) در مقایسه با گروه کنترل (شکل ۴ G-I) نشان می‌دهد که ۷ روز بعد از پیوند سلولی (شکل ۴ B) به هم‌ریختگی در لایه رنگدانه‌دار در محل پیوند دیده می‌شود و منظمی که در شبکیه عصبی همان‌طور که در گروه کنترل (شکل ۴ H) دیده می‌شود دیده نمی‌شود. لایه



هم‌چنین افزایش سلول‌ها در لایه هسته‌ای خارجی می‌تواند به دلایل زیر باشد: ۱- تجمع سلول‌های پیوند شده، ۲- مهاجرت سلول‌های درون‌زاد [۲۸،۱۳] و ۳- واکنش لایه هسته‌ای خارجی به تزریق در زیر فضای شبکیه [۲۹]. Tomita و همکاران نشان دادند که تزریق سالی‌ن به زیر فضای شبکیه منجر به افزایش موضعی در تعداد سلول‌های لایه هسته‌ای خارجی می‌شود که ناشی از فرایند تخریب است در حالی‌که دو هفته بعد از پیوند سلول‌های بنیادی در این فضا، منجر به تکثیر سلولی در لایه هسته‌ای خارجی می‌شود [۲۹]. هم‌چنین بعد از پیوند سلولی، مهاجرت سلولی بیش‌تر در قسمت لایه هسته‌ای خارجی و هسته‌ای داخلی و هم‌چنین لایه RPE دیده شده است [۳۰]. بنابراین افزایش سلول‌ها یک هفته بعد از تزریق می‌تواند به دلیل افزایش تکثیر سلولی و تجمع سلول‌های پیوند شده در محل تزریق باشد.

سلول‌های بنیادی مغز استخوان از سه طریق موجب حفظ فعالیت سلول‌های شبکیه می‌شوند؛ ۱- تمایز سلولی، ۲- تأثیرات پاراکرینی و ۳- ترمیم لایه پوشش رنگ‌دانه‌دار شبکیه [۱۳]. در سال ۲۰۱۸ Oner و همکاران نشان دادند که سلول‌های MSCs انسانی در محیط کشت می‌تواند با استفاده از روش القا به سلول‌های RPE تمایز یابند و بعد از تزریق در فضای زیر شبکیه یا داخل زجاجیه منجر به بهبودی در عملکرد شبکیه آسیب‌دیده شوند [۳۱]. تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی و سلول‌های BMSCs و ADSCs در محیط کشت به سلول‌های RPE و پیوند زیر شبکیه‌ای و داخل زجاجیه‌ای آن‌ها به مدل‌های حیوانی از جمله موش، موش صحرایی، گربه و انسان نشان می‌دهد که این سلول‌های موجب بهبودی در عملکرد بافت شبکیه بعد از آسیب می‌شوند [۳۲،۳۳]. مطالعات نشان می‌دهد که پیوند سلول‌های بنیادی جنینی انسانی به فضای زیر شبکیه در موش‌ها منجر به تمایز این سلول‌ها به سلول‌های فوتورسپتور دارای عملکرد می‌شود و موجب بهبود روند پاسخ‌های نوری سلول‌های فوتورسپتور می‌شود [۳۴،۳۳]. هم‌چنین منجر به تمایز به سلول‌های RPE می‌شود [۳۵،۱۶-۳۷]. استفاده از سلول‌های بنیادی جنینی انسانی برای تولید RPE و پیوند نشان می‌دهد که این سلول‌ها ۴-۱ هفته بعد از پیوند در فضای زیر شبکیه زنده مانده و مارکرهای سلول‌های RPE را نشان می‌دهند [۲۸]. هم‌چنین در مدت طولانی ۸ ماه نیز نشانه‌های ایجاد تومور و التهاب دیده نشده است [۳۷]. هم‌چنین افزایش

پیوند دیده می‌شود و هم‌چنین لایه‌های هسته‌ای خارجی و داخلی و هم‌چنین گانگلیونی در برش‌های بافتی دیده می‌شود. ردیف شدن سلول‌های رنگ‌دانه‌دار در کنار یک‌دیگر دیده می‌شود که نشان‌دهنده ترمیم لایه آسیب‌دیده رنگ‌دانه‌دار است. سلول‌های موجود در این تصویر از لحاظ ظاهری باهم کمی تفاوت دارند به طوری‌که بعضی از سلول‌ها بزرگ‌تر دیده می‌شوند و در داخل سیتوپلاسم خود رنگ‌دانه بیش‌تری نیز دارند. با این حال از لحاظ وجود رنگ‌دانه سیتوپلاسمی و قرارگیری آن‌ها در یک ردیف همانند گروه کنترل می‌باشند. نتایج بررسی گروه مدل شد با سدیم یدید و دریافت‌کننده فسفات بافر سالی‌ن در فضای زیر شبکیه (شکل ۴ D-F) در مقایسه با گروه کنترل (شکل ۴ G-I) با توجه به این‌که مداخله درمانی در این گروه صورت نگرفته است بنابراین روند تخریبی لایه رنگ‌دانه‌دار و لایه شبکیه عصبی با گذشت زمان از روز ۷ (شکل ۴ E) به روز ۳۰ (شکل ۴ F) به وضوح دیده می‌شود.

نتایج به‌دست آمده از بررسی تعداد هسته‌ها در لایه هسته‌ای خارجی (شکل ۴ J) نشان می‌دهد که در روز ۷ بعد از پیوند سلولی، تعداد هسته‌ها در لایه هسته‌ای خارجی بسیار بیش‌تر از گروه مدل شده دریافت‌کننده فسفات بافر سالی‌ن است. در روز ۳۰ بعد از پیوند نیز تعداد هسته‌ها در لایه هسته‌ای خارجی با گروه مدل دریافت‌کننده فسفات بافر سالی‌ن تفاوت معنی‌داری دارد ( $P < 0.05$ ) اما از گروه کنترل کم‌تر است.

## بحث و نتیجه‌گیری

در تحقیق حاضر نشان داده شد که پیوند سلول‌های RPE تمایز یافته از سلول‌های بنیادی مغز استخوان در مدل تخریب ماکولا وابسته به سن می‌تواند به لایه آسیب‌دیده RPE مهاجرت کرده و در بین سلول‌های این لایه قرار گیرند. هم‌چنین بررسی‌های بافتی نشان داد که تعداد هسته‌ها در لایه هسته‌ای خارجی ۳۰ روز بعد از پیوند سلولی بهبود یافته و لایه سلول‌های فوتورسپتور حفظ شده و بهبود یافته است.

یک هفته بعد از پیوند سلول، در بررسی بافتی تعداد سلول‌ها در لایه هسته‌ای خارجی افزایش یافته است. مطالعات نشان می‌دهد که تخریب لایه RPE با استفاده از سدیم یدید موجب ترشح سیتوکین‌ها از لایه آسیب‌دیده شده و منجر به افزایش مهاجرت سلول‌های بنیادی مغز استخوان به محل آسیب‌دیده می‌شود [۲۸،۱۳].

بررسی‌های مولکولی از نظر بیان ژن‌های اختصاص این سلول‌ها با استفاده از PCR و Real time PCR و بررسی‌های سلولی شامل بررسی فعالیت فیزیولوژیک سلول‌ها در محیط کشت و بعد از پیوند از جمله موارد کاستی در این تحقیق است که برای دستیابی به نتیجه بهتر نیاز به بررسی در این زمینه‌ها نیز می‌باشد. محدودیت منابع مالی برای بررسی‌های سلولی و مولکولی در این تحقیق یکی از موادی است که منجر به عدم بررسی‌های ذکر شده گردید.

### تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از مرکز تحقیقات سلول‌های بنیادی سیستم عصبی دانشگاه علوم پزشکی سمنان و همچنین مرکز تحقیقات علوم اعصاب بیمارستان خاتم الانبیا کمال تشکر و قدردانی را دارد.

### منابع

- [1] Evans JR. Risk factors for age-related macular degeneration. *Prog Retin Eye Res* 2001; 20: 227-253.
- [2] Smith W, Assink J, Klein R, Mitchell P, Klaver CC, Klein BE, et al. Risk factors for age-related macular degeneration: pooled findings from three continents. *Ophthalmology* 2001; 108: 697-704.
- [3] Klein R, Peto T, Bird A, Vannewkirk MR. The epidemiology of age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol* 2004; 137: 486-495.
- [4] Klein R, Klein BE, Knudtson MD, Meuer SM, Swift M, Gangnon RE. Fifteen-year cumulative incidence of age-related macular degeneration: the Beaver Dam Eye Study. *Ophthalmology* 2007; 114: 253-262.
- [5] Oner A, Sevim DG. *Stem Cell Research Open Library*. Science 2017; 1.
- [6] Ash J, Grimm C, Hollyfield JG, Anderson RE, LaVail MM, Rickman CB. *Retinal degenerative diseases: Mechanisms and experimental therapy*. Springer 2015; 854.
- [7] Schwartz SD, Nagiel A, Lanza R. *Cellular therapies for retinal disease: a strategic approach*. Springer 2017.
- [8] Nicoară, S.D., et al., *Novel Strategies for the Improvement of Stem Cells' Transplantation in Degenerative Retinal Diseases*. *Stem cells international*, 2016. 2016.
- [9] Canto-Soler V, Flores-Bellver M, Vergara MN. Stem cell sources and their potential for the treatment of retinal degenerations stem cell sources and potential for treatment. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2016; 57: ORSFd1-ORSFd9.
- [10] Seveler G, Miriuka S, Pitossi F. Differentiation of mesenchymal stem cells into retinal progenitor cells. *Ophthalmic Res* 2015; 53: 28-29.
- [11] Mead B, Berry M, Logan A, Scott RA, Leadbeater W, Scheven BA. Stem cell treatment of degenerative eye disease. *Stem Cell Res* 2015; 14: 243-257.
- [12] Ramsden CM, Powner MB, Carr AJ, Smart MJ, da Cruz L, Coffey PJ. Stem cells in retinal regeneration: past, present and future. *Development* 2013; 140: 2576-2585.
- [13] Park SS, Moisseiev E, Bauer G, Anderson JD, Grant MB, Zam A, et al. Advances in bone marrow stem cell therapy for retinal dysfunction. *Prog Retin Eye Res* 2017; 56: 148-165.
- [14] Wong IY, Poon MW, Pang RT, Lian Q, Wong D. Promises of stem cell therapy for retinal degenerative diseases. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2011; 249: 1439-1448.

ضخامت لایه هسته‌ای خارجی و بهبود فعالیت بینایی در رت‌های RCS و تولید اجسام لاملار در سیتوپلاسم سلول‌های تزریق‌شده دیده شده است [۴۰،۳۹،۳۷]. Lecaude و همکاران در سال ۲۰۱۵ نشان دادند که سلول‌های BMSCs توانایی تمایز به سلول‌های RPE را در شرایط هم‌کشتی دارند اما بعد از پیوند موجب افزایش ضخامت در شبکیه نشده است هر چند که در حدت بینایی موش‌ها افزایش جزئی دیده شده است [۴۱]. مطالعات نشان می‌دهد که سلول‌های بنیادی مزانشیمی در محیط کشت توانایی تمایز به سلول‌های RPE و سلول‌های شبکیه را دارد و هم‌چنین بعد از پیوند نیز می‌توانند به سلول‌های شبکیه تمایز یابند [۱۳] با این حال توانایی این سلول‌ها در تمایز کم‌تر از سلول‌های بنیادی جنینی و سلول‌های مجدد برنامه‌ریزی‌شده است [۱۳] هم‌چنین اثبات‌شده است که تزریق در فضای زیر شبکیه نسبت به تزریق داخل زجاجیه دارای اثرات بهتری است [۱۳]. در مدل‌های حیوانی، تزریق سلول‌های BMSCs به مدل رتینوپاتی دیابتی منجر به مهاجرت و قرارگیری در لایه آسیب‌دیده شبکیه شده است و در بهبودی عملکرد شبکیه تأثیر به‌سزایی داشته است [۱۳].

مطالعات نشان می‌دهد که سلول‌های RPE تمایز یافته از سلول‌های مجدد برنامه‌ریزی‌شده بعد از پیوند، فعالیت فاگوسیتوزی را نشان داده و موجب افزایش بینایی و حفظ لایه هسته‌ای خارجی در موش‌های صحرایی RCS شده است و دارای خصوصیت نوروپروتکتیو می‌باشند. مهم‌ترین مشکل در این زمینه رد پیوند در این نمونه‌ها بوده است [۴۳،۴۲،۱۶،۱۵]. هم‌چنین پیوند سلول‌های RPE مشتق شده از سلول‌های مجدد برنامه‌ریزی‌شده انسانی نشان داده شده است که موجب بهبود بینایی و الکترورتینوگرافی سه ماه و ۸ ماه بعد از پیوند شده و مارکر RPE65 را نیز نشان داده و لایه هسته‌ای خارجی نیز بهبودی را نشان می‌دهد [۴۴،۴۳].

در مجموع پیوند سلول‌های رنگدانه‌دار مشتق شده از سلول‌های بنیادی مغزاستخوان توانایی قرارگیری در بافت شبکیه و لایه رنگدانه‌دار آسیب‌دیده را دارند و می‌توانند موجب بهبود عملکرد شبکیه شده و یا از آسیب بیش‌تر آن جلوگیری نمایند؛ بنابراین، از آن‌ها می‌توان در سلول‌درمانی در بیماری‌های تخریبی شبکیه استفاده نمود. استفاده از این سلول‌ها در بیماری‌های تخریبی شبکیه انسانی در آینده می‌تواند برای بیماران امیدبخش باشد.

محدودیت‌های تحقیق:

- [31] Öner A. Stem cell treatment in retinal diseases: recent developments. *Turk J Ophthalmol* 2018; 48: 33-38.
- [32] Tang Z, Zhang Y, Wang Y, Zhang D, Shen B, Luo M, Gu P. Progress of stem/progenitor cell-based therapy for retinal degeneration. *J Transl Med* 2017; 15: 99.
- [33] Duan P, Zeng Y, Liu Y, Wang Y, Xu H, Yin Z. Comparison of protective effects of hESCs-derived and hBMSCs-derived RPE cells on sodium iodate-injured rat retina. *Int J Clin Exp Pathol* 2017; 10: 5274-5284.
- [34] Israel P, Masterson E, Goldman AI, Wiggert B, Chader GJ. Retinal pigment epithelial cell differentiation in vitro. Influence of culture medium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1980; 19: 720-727.
- [35] Enzmann V, Yolcu E, Kaplan HJ, Ildstad ST. Stem cells as tools in regenerative therapy for retinal degeneration. *Arch Ophthalmol* 2009; 127: 563-571.
- [36] Kokkinaki M, Sahibzada N, Golestaneh N. Human induced pluripotent stem-derived retinal pigment epithelium (RPE) cells exhibit ion transport, membrane potential, polarized vascular endothelial growth factor secretion, and gene expression pattern similar to native RPE. *Stem Cells* 2011; 29: 825-835.
- [37] Haruta M, Sasai Y, Kawasaki H, Amemiya K, Ooto S, Kitada M, et al. In vitro and in vivo characterization of pigment epithelial cells differentiated from primate embryonic stem cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004; 45: 1020-1025.
- [38] Lund RD, Adamson P, Sauvé Y, Keegan DJ, Girman SV, Wang S, et al. Subretinal transplantation of genetically modified human cell lines attenuates loss of visual function in dystrophic rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 9942-9947.
- [39] Lund RD, Wang S, Klimanskaya I, Holmes T, Ramos-Kelsey R, Lu B, et al. Human embryonic stem cell-derived cells rescue visual function in dystrophic RCS rats. *Cloning Stem Cells* 2006; 8: 189-199.
- [40] Royer EM, Toh CK. A review of current routing protocols for ad hoc mobile wireless networks. *IEEE Person Commun* 1999; 6: 46-55.
- [41] Lecaudé S, Wolf-Schnurrbusch U, Enzmann V. Bone marrow-derived stem cells differentiate into retinal pigment epithelium-like cells in vitro but are not able to repair retinal degeneration in vivo. *Stem Cell Translat Invest* 2015.
- [42] Li Y, Tsai YT, Hsu CW, Erol D, Yang J, Wu WH, et al. Long-term safety and efficacy of human-induced pluripotent stem cell (iPS) grafts in a preclinical model of retinitis pigmentosa. *Mol Med* 2012; 18: 1312-1319.
- [43] Blaauwgeers HG, Holtkamp GM, Rutten H, Witmer AN, Koolwijk P, Partanen TA, et al. Polarized vascular endothelial growth factor secretion by human retinal pigment epithelium and localization of vascular endothelial growth factor receptors on the inner choriocapillaris: evidence for a trophic paracrine relation. *Am J Pathol* 1999; 155: 421-428.
- [44] Comyn O, Lee E, MacLaren RE. Induced pluripotent stem cell therapies for retinal disease. *Curr Opin Neurol* 2010; 23: 4-9.
- [15] Huang Y, Enzmann V, Ildstad ST. Stem cell-based therapeutic applications in retinal degenerative diseases. *Stem Cell Rev* 2011; 7: 434-445.
- [16] Stern JH, Temple S. Stem cells for retinal replacement therapy. *Neurotherapeutics* 2011; 8: 736-743.
- [17] Parameswaran S, Krishnakumar S. Pluripotent stem cells: A therapeutic source for age-related macular degeneration. *Indian J Ophthalmol* 2017; 65: 177-183.
- [18] Forest, D.L., L.V. Johnson, and D.O. Clegg. Cellular models and therapies for age-related macular degeneration. *Dis Model Mech* 2015; 8: 421-427.
- [19] Catacchio I, Berardi S, Reale A, De Luisi A, Racanelli V, Vacca A, Ria R. Evidence for bone marrow adult stem cell plasticity: properties, molecular mechanisms, negative aspects, and clinical applications of hematopoietic and mesenchymal stem cells transdifferentiation. *Stem Cells Int* 2013; 2013: 589139.
- [20] Duan P, Xu H, Zeng Y, Wang Y, Yin ZQ. Human bone marrow stromal cells can differentiate to a retinal pigment epithelial phenotype when co-cultured with pig retinal pigment epithelium using a transwell system. *Cell Physiol Biochem* 2013; 31: 601-613.
- [21] Xu W, G.-X. Xu, Mesenchymal stem cells for retinal diseases. *Int J ophthalmol* 2011; 4: 413.
- [22] Vemuri MC, Chase LG, Rao MS. Mesenchymal stem cell assays and applications. Springer 2011.
- [23] Lu B, Morgans CW, Girman S, Luo J, Zhao J, Du H, et al., Neural stem cells derived by small molecules preserve vision. *Transl Vis Sci Technol* 2013; 2: 1-1.
- [24] Aboutaleb Kakhodaiean H, Tiraihi T, Ahmadi H, Ziaei Ardakani H, Daftarian N, Taheri T. Survival and migration of adipose-derived stem cells transplanted in the injured retina. *Exp Clin Transplant* 2018; 16: 204-211.
- [25] Machalińska A, Lubiński W, Klos P, Kawa M, Baumert B, Penkala K, et al. Sodium iodate selectively injures the posterior pole of the retina in a dose-dependent manner: morphological and electrophysiological study. *Neurochem Res* 2010; 35: 1819-1827.
- [26] Giordano F, De Marzo A, Vetrini F, Marigo V. Fibroblast growth factor and epidermal growth factor differently affect differentiation of murine retinal stem cells in vitro. *Mol Vis* 2007; 13: 1842-1850.
- [27] Frambach DA, Fain GL, Farber DB, Bok D. Beta adrenergic receptors on cultured human retinal pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1990; 31: 1767-1772.
- [28] Li Y, Reza RG, Atmaca-Sonmez P, Ratajczak MZ, Ildstad ST, Kaplan HJ, Enzmann V. Retinal pigment epithelium damage enhances expression of chemoattractants and migration of bone marrow-derived stem cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006; 47: 1646-1652.
- [29] Tomita M, Adachi Y, Yamada H, Takahashi K, Kiuchi K, Oyaizu H, et al. Bone marrow-derived stem cells can differentiate into retinal cells in injured rat retina. *Stem Cells* 2002; 20: 279-283.
- [30] Zhang Y, Wang W. Effects of bone marrow mesenchymal stem cell transplantation on light-damaged retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010; 51: 3742-3748.

# Morphological changes in injured retinal pigment epithelium and photoreceptor cells after transplantation of stem cells into subretinal space

Hamid Aboutaleb Kadkhodaeian (Ph.D)\*

Nervous System Stem Cell Research Center, Semnan University of Medical Science, Semnan, Iran

\* +98 9128598943 habootaleb92@gmail.com

Received: 29 May 2018; Accepted: 8 Apr 2019

**Introduction:** Degenerative retinal diseases are main cause of irreversible blindness. Stem cells therapy is a promising way in these diseases. Therefore, mesenchymal stem cells because of its safety can produce degenerated cells and can play important role in treatment. The aim of this study was to examine morphological changes in injured retinal pigment epithelium (RPE) and photoreceptor cells after transplantation of stem cells into subretinal space.

**Materials and Methods:** Retinal pigment epithelium injury induced with retro-orbital sinus injection of sodium iodate in pigmented rats and following histological verification, ready for transplantation. The generation of retinal pigment epithelium cells from bone marrow stromal stem cells were done in two steps. First, Bone marrow stromal stem cells isolated from rat femoral bone and after passage three differentiated into retinal pigment epithelium cells. Generated cells transplanted into sub retinal space of animal model and after 30 days the morphological analysis such as retinal pigment epithelium layer and cell count in outer nuclear layer of retina performed.

**Results:** Differentiated cells expressed high yield ( $\pm 93$ ) of specific markers (RPE65, CRALBP) in immunocytochemistry. These cells transplanted into injured pigmented layer and after 30 days showed improvement in retinal pigment epithelium and outer nuclear cell layer. In other words, the cell count in these layer increased in comparing to control group.

**Conclusion:** The generation of retinal pigment epithelium cells from bone marrow stromal stem cells which in term of expression of specific genes are similar to native RPE cells, as well as after transplantation into damaged tissue can show physiological activity are very useful in treatment of degenerative eye diseases.

**Keywords:** Retinal Pigment Epithelium, Age Related Macular Degeneration, Cell Therapy, Degenerative Eye Diseases, Photoreceptor Cells, Sub-retinal space injection.