

## تمایز سلول‌های بنیادی پرتوان به سلول‌های اپیتلیوم رنگدانه‌دار شبکه چشم، راهکاری برای درمان بیماری‌های تخریب شبکه

مریم پروینی<sup>۱\*</sup>، کاظم پریور<sup>۲</sup>، محمد جوان<sup>۳</sup>

۱. دانشجوی دکتری تخصصی، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، ایران

۲. استاد، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، ایران

۳. دانشیار، گروه فیزیولوژی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

### چکیده

سلول‌های بنیادی پرتوان، به عنوان سلول‌هایی با قابلیت خودنوزایی و تمایز به انواع رده‌های سلولی خاص، در مطالعات پزشکی ترمیمی بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند. در مورد ترمیم تخریب بیماری‌های چشمی نیز، تمایز سلول‌های اپیتلیوم رنگدانه‌دار شبکه از سلول‌های بنیادی پرتوان در دهه‌های اخیر اهمیت زیادی پیدا کرده‌است؛ زیرا عدم عملکرد صحیح این سلول‌ها عامل اصلی بروز بیماری‌های تخریب چشمی از جمله تخریب ماکولای وابسته به سن است. میلیون‌ها نفر در سراسر دنیا از این بیماری رنج می‌برند. به منظور بازگرداندن سلول‌های تخریب شده و در نهایت بهبود بینایی، مطالعات متعددی در جهت استفاده از سلول‌های بنیادی پرتوان، تمایز آن‌ها به سلول‌های اپیتلیوم رنگدانه‌دار شبکه و در نهایت کاربرد آن‌ها در سلول‌درمانی انجام شده‌است. بر این اساس بسیاری از محققین تلاش کرده‌اند تا سلول‌های اپیتلیوم رنگدانه‌دار شبکه‌ای با کارایی بالا تولید کنند، به طوری که بعد از عمل پیوند، عملکرد مناسبی را در کنار سلول‌های میزبان نشان دهند. در این مطالعه مروری، اهمیت و نقش سلول‌های اپیتلیوم رنگدانه‌دار شبکه و همچنین مطالعات صورت گرفته در زمینه تولید این سلول‌ها در شرایط آزمایشگاهی بررسی گردیده‌است.

**واژه‌های کلیدی:** سلول اپیتلیوم رنگدانه‌دار شبکه، بیماری‌های تخریب شبکه، سلول‌های بنیادی پرتوان

\*نویسنده مسئول: مریم پروینی

نشانی: تهران، انتهای بزرگراه اشرافی اصفهانی، انتهای بلوار سیمون بولیوار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات

تلفن: ۰۹۱۴۱۴۸۶۳۵۶ ایمیل: parvini29@gmail.com

## مقدمه:

و خلوص پایین سلول‌های تولید شده مواجه است و همین عامل، می‌تواند دلیلی برای ناموفق بودن پیوند سلول‌های فوق در انسان باشد. این مطالعه، مروری بر روند تکوین سلول‌های اپیتلیوم رنگدانه دار شبکیه، شاخص‌های شناسایی آن‌ها، برخی از بیماری‌های تخریبی چشم و خلاصه‌ای از مطالعات انجام شده در زمینه تولید این سلول‌ها در شرایط آزمایشگاهی دارد.

## سلول‌های بنیادی، انواع و کاربردهای آن:

سلول بنیادی به سلولی اطلاق می‌گردد که دو خصوصیت جالب توجه و مهم خودنوزایی و توانایی تمایز به چندین رده سلولی را دارا باشد. این سلول‌های پرتوان، علاوه بر خصوصیت خودنوزایی، مارکرهای سطح سلولی اختصاصی شامل SSEA-4، SSEA-3، TRA-1-81 و فاکتورهای رونویسی شامل NANOG، OCT4 و SOX2 را نیز بیان می‌کنند. این سلول‌ها همچنین دارای فعالیت بالای آنزیم‌های تلومراز و آلکالین فسفاتاز هستند و در کشت‌های طولانی مدت، کاریوتیپ خود را در حالت طبیعی حفظ می‌کنند و قادر به ساخت تمام انواع سلول‌های بدنی هستند و این توانایی، آن‌ها را به عنوان منبع مناسبی جهت درمان ضایعات سلولی در طب ترمیم و پیوند مطرح می‌کند (۲، ۴).

سلول‌های بنیادی براساس توان تمایزی و منشأ به دو دسته تقسیم می‌شوند. دسته اول سلول‌های بنیادی پرتوان هستند که بر اساس منشأ به دو دسته جنینی و القایی تقسیم می‌شوند و دسته دوم شامل سلول‌های بنیادی چند توان می‌شوند که سوماتیکی هستند و از ارگان‌های متفاوتی مشتق می‌شوند؛ این دسته از سلول‌ها بر اساس منشأ به دو دسته ی بالغ (Adult Stem Cell) و رویانی (Fetal Stem Cells) تقسیم بندی می‌شوند (۵).

در سال ۱۹۹۸ جیمز تامسون اولین رده سلول‌های بنیادی جنینی را تولید کرد. این سلول‌ها همراه با منشأشان تعریف می‌شوند و از جنین مرحله بلاستوسیستی بدست می‌آیند (۶). همان‌طور که اشاره شد، این سلول‌ها کاربردهای زیادی در درمان و ترمیم دارند اما با این حال مشکلاتی نیز در زمینه استفاده از این سلول‌ها وجود دارد، که از این میان می‌توان به مشکلات مربوط به دفع ایمنی به صورت دفع پیوند سلول‌های مشتق از سلول‌های بنیادی توسط گیرنده پیوند و دفع ایمنی

با توجه به این که از دست رفتن بینایی اثرات اقتصادی- اجتماعی جبران ناپذیری را به همراه دارد، چشم به عنوان یکی از اندام‌های اصلی حسی در انسان محسوب می‌شود (۱). مطالعات مختلف نشان داده اند که افزایش بروز بیماری‌های تخریب کننده بینایی ارتباط مستقیم با افزایش سن دارد. اکثر روش‌های درمانی موجود نمی‌توانند این بیماری‌ها را درمان کنند و فقط می‌توانند سرعت پیشروی آن‌ها را کمتر کنند که در نهایت باز هم نمی‌توانند از بروز نابینایی جلوگیری کنند. بر این اساس، سلول‌های بنیادی می‌توانند به عنوان یک منبع درمانی قوی و امید بخش برای جایگزین کردن سلول‌های از بین رفته در بیماری‌های تخریب کننده بینایی از جمله بیماری تخریب ماکولای وابسته به سن (Age related macular degeneration) یا AMD، که موجب از بین رفتن سلول‌های اپیتلیوم رنگدانه دار شبکیه (Retinal pigment epithelial cell (RPE)) می‌شود محسوب می‌گردند. طی دستاوردهای مهمی که در تحقیقات سلول‌های بنیادی به دست آمده است، سلول‌های بنیادی پرتوان انسانی (Human pluripotent stem cell (hPSC)) شامل سلول‌های بنیادی جنینی (Embryonic stem cell (ESC)) و سلول‌های بنیادی پرتوان القایی (Induced pluripotent stem cell (iPSC)) به عنوان یک منبع سلولی جدید برای تولید سلول‌های اپیتلیوم رنگدانه دار شبکیه انتخاب شده اند چرا که آن‌ها نه تنها می‌توانند خصوصیت خودنوزایی (Self-renewal) خود را حفظ کنند بلکه این توانایی را دارند که به هر نوع سلول بدن در شرایط *in vitro* تمایز پیدا کنند (۲). داشتن این نوع خصوصیات منحصر به فرد، موجب استفاده سلول‌های بنیادی جنینی و پرتوان القایی در کاربردهای زیست-پزشکی نیز شده است. به عنوان مثال پیوند سلول‌های عصبی حاصل از سلول‌های بنیادی جنینی نتایج امیدبخشی را در حیوانات مدل برخی از بیماری‌های سیستم عصبی داشته است (۳). طی دهه‌های اخیر راهکارهای مختلفی برای تولید سلول‌های اپیتلیوم رنگدانه دار شبکیه در شرایط آزمایشگاهی ارائه شده است و کارآمد بودن سلول‌های تولید شده نیز با استفاده از تکنیک‌های ارزیابی مختلف از جمله بیگانه خواری (Phago-cytosis)، الکتروفیزیولوژی (Electrophysiology) و ترشح بعضی از فاکتورهای رشد تأیید شده است. با این وجود روند تولید این سلول‌ها هنوز با مشکلات متعددی از جمله کارایی

### تکوین سلول‌های اپیتلیوم رنگدانه‌دار شبکه:

سلول‌های اپیتلیوم رنگدانه‌دار شبکه چشم (شکل ۱)، سلول‌هایی هستند که به صورت تک لایه سلولی بین غشاء Bruch و شبکه عصبی قرار گرفته اند. منشأ این سلول‌های رنگدانه‌دار برخلاف سایر سلول‌های رنگدانه‌دار که منشأ تاج عصبی دارند، از صفحه عصبی قدامی یا نورواکتودرم است (۱۱). تولید موفق سلول‌های فوق از نورواکتودرم نیازمند وجود یک نقشه سرنوشت سلولی اختصاصی است که با سازماندهی صحیح مراحل تکوینی، در نهایت موجب تولید این سلول‌ها می‌شود.

مطالعات نقشه سرنوشت سلولی در گونه‌های مختلف نشان داده‌اند که سلول‌های حوزه بینایی مشتق از صفحه عصبی قدامی، از سطح قدامی-جانبی، توسط پیش‌سازهای تلم سفالی و از سطح دمی-میانی، توسط سلول‌هایی که سرنوشت هیپوتالاموسی پیدا خواهند کرد، احاطه می‌شوند (۱۲). بعد از شکل‌گیری حوزه بینایی، بیرون‌زدگی اپیتلیوم عصبی مغز قدامی به صورت قرینه موجب تشکیل و زیکول بینایی می‌شود (۱۳). بعد از گسترش بیرون‌زدگی و تماس آن با اکتودرم سطحی یا اکتودرم عدسی، این بخش به سمت داخل کشیده شده و به اصطلاح دچار درون‌رفتگی می‌شود و در نهایت جام بینایی دو لایه را ایجاد می‌کند که لایه داخلی آن تبدیل به سلول‌های شبکه عصبی و لایه خارجی آن تبدیل به اپیتلیوم رنگدانه‌دار شبکه می‌گردد. به دنبال تشکیل جام بینایی، اکتودرم سطحی نیز به سمت داخل کشیده می‌شود که حاصل آن تشکیل عدسی است که در داخل جام بینایی قرار می‌گیرد.

### مسیرهای پیام‌رسانی دخیل در تکوین اپیتلیوم رنگدانه‌دار

#### شبکه:

حداقل پنج مسیر پیام‌رسانی مختلف در الگودهی چشم و تشکیل اپیتلیوم رنگدانه‌دار شبکه نقش دارند:

(۱) مسیر پیام‌رسانی FGF، این مسیر موجب تحریک تشکیل شبکه عصبی می‌شود اما در مقابل از شکل‌گیری اپیتلیوم رنگدانه‌دار ممانعت می‌کند (۱۴).

(۲) مسیر پیام‌رسانی Nodal که مهم‌ترین عضو این گروه،

مشتقات تمایز یافته این سلول‌ها در افراد بیمار با پیش زمینه ژنتیکی متفاوت از نظر ژن‌های HLA، اشاره کرد که استفاده از این سلول‌ها و مشتقات آن‌ها را در علم طب ترمیمی محدود می‌کند (۷). بر خلاف این که این سلول‌ها از جنین‌های مازاد لقاح آزمایشگاهی و با کسب اجازه از والدین آن‌ها اخذ می‌شوند، به دلیل توانایی بالقوه آن‌ها برای تبدیل شدن به یک انسان کامل، بسیاری از کشورها استفاده از آن‌ها را در تحقیقات منع کرده‌اند (۴).

در سال ۲۰۰۶ Yamanaka با وارد کردن چهار وکتور رتروویروسی بیان‌کننده ژن فاکتورهای رونویسی C-myc Klf4 SOX2 و OCT4 در یک سلول فیبروبلاستی بالغ موشی، توانست آن را دچار باز برنامه‌ریزی کند و یک سلول پرتوان بنام سلول پرتوان القایی ایجاد کند. این نوع از سلول‌های پرتوان، مشکلات اخلاقی مربوط به سلول‌های بنیادی جنینی را ندارند و به دلیل اینکه می‌توان آن‌ها را از سلول‌های فیبروبلاستی خود بیمار نیز تهیه کرد، به عنوان یک منبع مناسب از سلول‌های پرتوان اتولوگ در طب ترمیمی مورد استفاده قرار می‌گیرند (۸).

با این حال در مورد سلول‌های پرتوان القایی هم مشکلاتی وجود دارد که استفاده از این سلول‌ها را محدود کرده است. از جمله این محدودیت‌ها احتمال تشکیل تومور و ناپایداری عفونت ویروسی به دلیل استفاده از رتروویروس برای وارد کردن ژن‌های پرتوانی است. هم‌چنین روند تولید سلول‌های پرتوان القایی، فرآیندی کند با بازدهی پایین (کمتر از ۰/۰۱) است که منجر به تولید سلول‌هایی هتروژن می‌شود. اگرچه به تازگی روش‌های دیگری نیز مثل انتقال پروتئین، در تولید این سلول‌ها خطر ناپایداری عفونت ویروسی را کمتر کرده است اما با این حال مشکل بازدهی پایین، روند استفاده از این سلول‌ها را در طب ترمیمی دچار مشکل کرده است (۹).

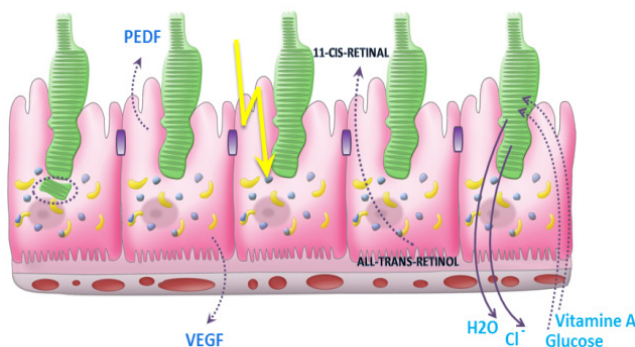
با توجه به محدودیت‌های سلول‌های بنیادی جنینی و سلول‌های پرتوان القایی، یافتن منبعی از سلول‌های اتولوگ که بتواند در سلول درمانی و طب ترمیمی موثر باشد با ارزش خواهد بود. در نتیجه در چند سال اخیر بحث‌های زیادی در زمینه کشف یک سلول پرتوان اتولوگ و استفاده از این سلول‌ها در طب ترمیمی مطرح بوده است تا اینکه در سال ۲۰۰۴ تولید سلول‌های پرتوان شبه جنینی توسط Shinohara گزارش شد و روش جدیدی در مسیر تولید سلول‌های پرتوان معرفی شد (۱۰).

### ساختار و عملکرد سلول های اپیتلیوم رنگدانه دار شبکیه:

از نظر مطالعات فراساختاری با میکروسکوپ الکترونی، سلول های اپیتلیوم رنگدانه دار به صورت ساختارهای ستونی-شانه ای با ابعاد شش ضلعی دیده می شوند. اتصالات دسموزومی در سطح جانبی آن ها تشکیل می شود و در کل سلول ها دارای دو سطح رأسی و پایه هستند: در بخش رأسی، میکروویلی دیده می شود و سیتوپلاسم رأسی دارای تعداد زیادی میتوکندری و رنگدانه است. از سوی دیگر در بخش پایه، هسته و مولکول های حیاتی برای اپیتلیوم رنگدانه دار از جمله BESTROPHIN و RPE65 دیده می شود (۱).

از نظر آناتومی، سلول های اپیتلیوم رنگدانه دار، یک تک لایه سلولی را بین شبکیه و choriocapillaris تشکیل می دهند. غشای رأسی اپیتلیوم رنگدانه دار در مقابل قطعات خارجی سلول های گیرنده نور قرار می گیرد، در حالی که غشای پایه آن ها روی غشای Bruch قرار می گیرد (۲۸). از نظر عملکردی، این سلول ها نقش های مهمی را در شبکیه از جمله شرکت در چرخه بینایی که طی آن موجب تبدیل all trans retinol به ۱۱-cis retinal می شود (۲۹)، تشکیل سد خونی-شبکیه ای، جذب نور انحرافی، فراهم سازی مواد مغذی از جمله گلوکز و اسیدهای چرب برای سلول های گیرنده نور در شبکیه، بیگانه خواری قطعات خارجی سلول های گیرنده نور و ترشح فاکتورهای تروفیک از جمله VEGF، PEDF، FGF، IGF، CNTF و TGF $\beta$  ایفا می کنند (شکل ۱) (۲۸، ۳۰، ۳۱).

Phagocytosis Secretion Light absorption Visual cycle Epithelial Transport



شکل ۱: شمای کلی از ساختمان سلول های اپیتلیوم رنگدانه دار شبکیه و خلاصه ای از عملکردهای آن.

### شاخص های شناسایی سلول های اپیتلیوم رنگدانه دار

#### شبکیه:

با توجه به نوپا بودن مطالعات انجام شده در زمینه تولید سلول های اپیتلیوم رنگدانه دار شبکیه، شاخص های مختلفی جهت شناسایی سلول های رنگدانه دار تولید شده از سلول های بنیادی پرتوان استفاده شده است که به صورت خلاصه به شرح زیر هستند:

عامل رشد اکتیوین است و نقش خیلی مهمی را در تولید رنگدانه در این سلول ها دارد (۱۵).

۳) مسیر پیام رسانی BMP که تکوین شبکیه پستی را پیش می برد (۱۶).

۴) مسیر پیام رسانی Wnt که نوع کانونی آن از طریق عامل بتاکتین در تخصص یابی و حفظ سرنوشت اپیتلیوم رنگدانه دار دخیل است (۱۷ و ۱۸) و نوع غیر کانونی آن نیز در تخصص یابی بخش حوزه بینایی نقش ایفا می کند (۱۹).

۵) مسیر پیام رسانی Shh که تکوین اپیتلیوم رنگدانه دار در مراحل اولیه تکوین چشم پیش می برد (۲۰).

### شاخص های مولکولی دخیل در تکوین اپیتلیوم رنگدانه دار:

بیان تعدادی از ژن های خاص، مراحل مختلف تکوین اپیتلیوم رنگدانه دار را پیش می برند. طی تکوین طبیعی حوزه بینایی در بدن، سطح بیان ژن های شاخص این مرحله از جمله SIX3، RX، PAX6 افزایش پیدا می کند. سپس در مرحله وزیکول بینایی، سطح بیان ژن های OTX2، MITF و CHX10 به تدریج افزایش می یابد. در ابتدا ژن های MITF و CHX10 به طور یکسان در کل سطح وزیکول بینایی بیان می شوند اما در مراحل انتهایی تکوین این بخش، بیان MITF به لایه خارجی شبکیه و بیان CHX10 به بخش داخلی شبکیه محدود می شود که به ترتیب موجب تخصص یابی اپیتلیوم رنگدانه دار و شبکیه عصبی می شوند. به همین دلیل به اصطلاح گفته می شود وزیکول بینایی یک ساختار دو توان است (۲۱-۲۳). با پیشرفت تکوین اپیتلیوم رنگدانه دار و بلوغ آن، بیان مارکرهای اختصاصی اپیتلیوم رنگدانه دار از جمله ژن های دخیل در تولید رنگدانه شامل TYRP1، TYRP2، SILVER و PMEL17، ژن های مربوط به عمل بیگانه خواری از جمله اینترگرین  $\alpha$ V، FAK و MERTK، ژن های درگیر در ترشح پروتئین هایی مثل عامل مشتق از اپیتلیوم رنگدانه دار و عامل رشد اندوتلیالی عروقی، عوامل دخیل در چرخه بینایی از جمله RPE65 و CRALBP، پروتئین های مرتبط با غشاء شامل پروتئین کانالی BEST1 و EMMPRIN، و در نهایت پروتئین های دخیل در تشکیل اتصالات محکم از جمله ZO1 و CLAUDIN افزایش می یابد (۲۴-۲۷).

۷- ترشح فاکتورهای تروفیک: به کمک تست الیزا می توان ترشح فاکتورهایی مثل VEGF و PEDF را اندازه گیری کرد.

۸- ارزیابی بیگانه خواری: حذف موفق قطعات خارجی سلول های گیرنده نور بستگی به حضور سلول های رنگدانه دار با کارایی بالا دارد. اگر ذرات متصل به ترکیبات فلورسنت در مجاورت سلول های رنگدانه دار قرار بگیرند، این ذرات به دلیل وجود فعالیت بیگانه خواری در این نوع سلول ها توسط آن ها بلعیده شده و در نتیجه با میکروسکوپ فلورسنت قابل ردیابی می شوند.

۹- بررسی روند بهبودی بعد از پیوند: قرارگیری صحیح سلول های پیوند شده در بخش آسیب دیده شبکه میزبان، میزان زنده ماندن و درصد ضخیم شدن شبکه بعد از پیوند سلول ها، شاخص خیلی مهمی برای ارزیابی کارایی سلول های تولید شده است.

#### بیماری های حاصل از تخریب و عدم عملکرد سلول های اپیتلیوم رنگدانه دار شبکه:

با توجه به نقش های مهمی که سلول های رنگدانه دار شبکه در چشم ایفا می کنند، بدیهی است که ایجاد هر گونه آسیب در این سلول ها می تواند بر حیات سایر سلول های موجود در شبکه خصوصاً سلول های گیرنده نور تأثیر گذاشته و در نهایت منجر به نابینایی شود. یکی از مهم ترین بیماری های حاصل از تخریب این سلول ها، بیماری تخریب ماکولای وابسته به سن (AMD) است که افراد بالای ۶۰ سال را به ویژه در کشورهای پیشرفته درگیر می کند. بیش از ۳۰ میلیون نفر در جهان مبتلا به این بیماری هستند. این بیماری با رسوب ترکیبات در اسن بین سلول های رنگدانه دار و غشاء Bruch آغاز می شود و با مرگ تدریجی سلول های رنگدانه دار، تخریب سلول های گیرنده نور نیز به دلیل عدم وجود فعالیت بیگانه خواری سلول های رنگدانه دار تشدید می شود.

این حالت از بیماری تحت عنوان Dry AMD شناخته می شود. اما در برخی از موارد پیشروی بیشتر این بیماری باعث بروز نوع دیگری از آن به نام Wet AMD می شود که مشخصه بارز آن افزایش تشکیل عروق خونی جدید در زیر غشاء Bruch و در ناحیه عروق خونی است که به تدریج به داخل اپیتلیوم رنگدانه دار نفوذ کرده و در ایفای عملکرد صحیح این سلول ها اختلال ایجاد می کند (شکل ۲).

۱- ریخت شناسی: اپیتلیوم رنگدانه دار شبکه به صورت تک لایه های سلولی با ساختارهای شش وجهی و قطبیت بالا هستند، به طوری که سطح رأسی دارای میکروویلی بوده و سطح پایه آن ها روی ماتریکس خارج سلولی که غشاء Bruch نامیده می شود قرار گرفته است.

۲- RT-PCR: این تکنیک جهت اثبات وجود بیان ژن های اختصاصی اپیتلیوم رنگدانه دار شبکه از جمله OTX2، MITF، PMEL17، RPE65، CRALBP و در عین حال اثبات کاهش بیان ژن های مرحله چند توانی مثل NANOG و OCT4 طی تمایز به سلول های اپیتلیوم رنگدانه دار استفاده می شود.

۳- سنجش بیان پروتئین: با کمک تکنیک رنگ آمیزی آنتی بادی می توان از بیان یا عدم بیان پروتئین های مربوط به سلول های اپیتلیوم رنگدانه دار شبکه مثل MITF، ZO1، OCCLUDIN، RPE65 و یا BEST اطمینان حاصل کرد. از سوی دیگر، درصد بیان پروتئین های فوق را می توان به کمک تکنیک فلوسایتومتری و یا وسترن بلات کمی کرد.

۴- مقاومت ترانس اپیتلیالی: داشتن مقاومت ترانس اپیتلیالی بالا یک خصوصیت مهم است که به قرارگیری صحیح اتصالات محکم بین سلول ها بستگی دارد. سلول های با کارایی بالا، مقاومتی بالا و در حدود بیشتر از ۵۰۰ اهم نشان می دهند در صورتی که سلول های با کارایی پایین مقاومتی بسیار کمتر از این حد را نشان می دهند (۳۲).

۵- شاخص های الکتروفیزیولوژی: برای اثبات شباهت و نزدیکی سلول های اپیتلیوم رنگدانه دار شبکه مشتق از سلول های بنیادی پرتوان با سلول های معادل خود در بدن از نظر عملکرد، از تکنیکی به نام Whole-cell patch clamp استفاده می شود. به کمک این تکنیک می توان از حضور و عملکرد صحیح کانال های وابسته به ولتاژ مثل ناقل های سدیم و پتاسیم اطمینان حاصل کرد و در نهایت پتانسیل غشاء سلول را اندازه گرفت. مطالعات متعدد، محدوده ولتاژی بین ۴۰- تا ۵۰- را برای این سلول ها گزارش کرده اند (۳۳).

۶- سنجش قطبیت سلول: که طی آن قرارگیری صحیح ترکیباتی مثل Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase در سطح رأسی سلول های رنگدانه دار تشخیص داده می شود.

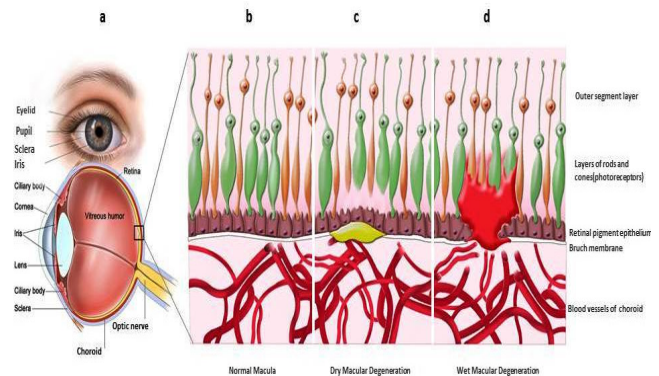
شناخته می شود. این بیماری، شبکیه و بخصوص ماکولا را درگیر می کند و موجب محو شدن شدید بینایی مرکزی می شود (۴۰). در اکثر افراد مبتلا به این بیماری، به دلیل جهش در ژن ABCA4 و در سطح کمتر ژن ELOVL4 رنگدانه های زرد رنگ با ماهیت چربی به نام لیوفوشین در سلول های اپیتلیوم رنگدانه دار شبکیه تشکیل می شوند (۴۱). دومین نوع رایج از بیماری تخریب ماکولای جوانی، بیماری تخریب ماکولای BEST است که تحت عنوان تخریب ماکولای vitelliform نیز شناخته می شود (۴۲). به دلیل جهش در ژن BEST1/VMD2، زخم شبیه کیسه تخم در سلول های اپیتلیوم رنگدانه دار شبکیه ایجاد می شود که موجب جدا شدن شبکیه از ماکولا می گردد (۴۳).

#### تولید سلول های اپیتلیوم رنگدانه دار شبکیه از سلول های بنیادی پر توان در شرایط آزمایشگاهی:

با توجه به این که ایجاد هرگونه تخریب در سلول های اپیتلیوم رنگدانه دار شبکیه باعث ایجاد انواع مختلفی از بیماری های چشمی می شود، دانشمندان تلاش بسیاری برای درمان این بیماری ها به خصوص بیماری تخریب ماکولای وابسته به سن انجام داده اند. در رابطه با این بیماری، استفاده از لیزر و درمان های دارویی عملاً بی فایده بوده و تأثیری بر بهبودی بیماری ندارد. از سوی دیگر به علت پیچیدگی های عمل جراحی و احتمال آسیب رساندن بیشتر به شبکیه بیماران در حین انتقال ناحیه سالم اطراف محل تخریب در شبکیه به ناحیه آسیب دیده بیمار، که انتقال حدود ۳ میلی متر مربع از شبکیه را در برمی گیرد، محققان را به یافتن منبع مناسب دیگری برای جایگزین کردن سلول های تخریب شده شبکیه وادار نمود. تمایز و پیوند سلولی از جمله راهکارهایی بود که محققان در پیش گرفتند. پیوند لایه کامل سلول پوششی رنگدانه دار بزرگسال یا جنینی به علت کمبود تعداد اهدا کنندگان، و رد پیوند، درمان را با مشکل مواجه می کرد. بر این اساس، سلول های بنیادی جنینی منبعی نامحدود جهت درمان به شمار می آیند و می توان سلول های پوششی رنگدانه دار شبکیه را به میزان فراوانی از آن ها تولید کرد.

طی چند دهه اخیر، راهکارهای مختلفی جهت تولید سلول های اپیتلیوم رنگدانه دار در شرایط آزمایشگاهی ارائه شده است. به دنبال دست یابی به دست آوردهای مهم سلول های بنیادی در سال های اخیر و از سوی دیگر تکنولوژی های پیشرفته مربوط به سلول های بنیادی پر توان انسانی شامل سلول های بنیادی

این بیماری علاوه بر اثرات نامطلوبی که بر اپیتلیوم رنگدانه دار می گذارد، باعث ایجاد اختلالات آناتومیکی و عملکردی در غشاء Bruch نیز می گردد و در نهایت منجر به تخریب بینایی مرکزی می شود. عوامل مختلفی از جمله عوامل محیطی و ارثی در بروز این بیماری دخالت دارند. چهار عاملی که ریسک ابتلا به این بیماری را افزایش می دهند شامل افزایش سن، مصرف سیگار، چاقی و وراثت هستند (۳۴، ۳۵).



شکل ۲: (a) شمای کلی از آناتومی چشم، (b) ماکولای سالم، (c) تجمع ترکیبات در اسن (بخش زرد رنگ) بین غشاء Bruch و سلول های اپیتلیوم رنگدانه دار چشم و ایجاد ماکولای مبتلا به Dry AMD و (d) عروق خونی جدید و نفوذ آن ها به درون سلول های اپیتلیوم رنگدانه دار و ایجاد ماکولای مبتلا به Wet AMD.

رتینیتز پیگمنتوزا یکی دیگر از بیماری های ارثی تخریب کننده شبکیه است و شیوع آن حدود ۱ در ۴۰۰۰ نفر است. به طور کلی، این بیماری در اثر ایجاد جهش در ژن CRALBP ایجاد می شود (۳۶). این ژن در سطح بالایی در اپیتلیوم رنگدانه دار شبکیه و سلول های مولر بیان می شود و جهش در آن موجب تخریب گسترده اپیتلیوم رنگدانه دار می شود. به دنبال آزاد شدن رنگدانه و بقایای این سلول ها، مرگ سلولی در سلول های گیرنده نور میله ای نیز شروع می شود. این بیماری بر عکس AMD، بینایی محیطی را دچار اختلال می کند (۳۷).

Leber congenital amaurosis نیز یکی دیگر از بیماری های ارثی اما آتوزومی شبکیه است که موجب تخریب شدید بینایی در نوزادان تازه متولد شده می شود و عامل ۱۰ تا ۱۸ درصد از نابینایی ها محسوب می شود. حداقل چهارده ژن در بروز این بیماری نقش دارند اما جهش در ژن RPE65 نقش مهم و اساسی را در ابتلا به این بیماری ایفا می کند (۳۸، ۳۹).

Stargardts یک بیماری تخریبی ژنتیکی در چشم است که به عنوان اولین نوع رایج از بیماری تخریب ماکولای جوانی نیز

شبکیه رت‌های چهار هفته‌ای مدل RCS پیوند شدند. در این رت‌ها، سلول‌های گیرنده نور به دلیل عدم توانایی سلول‌های رنگدانه‌دار در بیگانه‌خواری قطعات خارجی دچار تخریب می‌شوند. سلول‌های تولید شده از نظر مورفولوژی شش‌ضلعی بوده و مارکرهای خاص سلول‌های رنگدانه‌دار از جمله CRALBP، RPE65، ZO1، و MERTK را بیان می‌کردند. این سلول‌ها همچنین قادر به بیگانه‌خواری قطعات خارجی سلول‌های گیرنده نور بودند (۴۶).

سیستم کشت خود به خودی برای نخستین بار در سال ۲۰۰۴ توسط Klimaskaya و همکارانش طراحی شد و سیستم SFEB نام گرفت که در این سیستم سلول‌های رنگدانه‌دار شبکیه‌ای با فتوتیپ ناپایدار از سلول‌های بنیادی جنینی انسانی بدون نیاز به هر نوع سلول استرومایی یا لایه مغذی تولید می‌شدند. تحت این شرایط، بعد از گذشت ۴ تا ۶ هفته، سلول‌های مشابه اپیتلیوم رنگدانه‌دار شبکیه از سلول‌های بنیادی جنینی انسانی تولید شدند. سلول‌های تولید شده از نظر پروفایل بیان ژنی، بیشتر به سلول‌های رنگدانه‌دار جنین انسان شباهت داشتند تا به سلول‌های رنگدانه‌دار بالغ. این سلول‌ها همچنین قادر به عمل بیگانه‌خواری بودند. میزان سلول‌های رنگدانه‌دار تولید شده در این مطالعه بسیار پایین و کمتر از ۱ درصد بود (۲۴).

Lund و همکارانش در مطالعه خود از سلول‌های بنیادی جنینی انسانی جهت تمایز به سلول‌های رنگدانه‌دار شبکیه استفاده کردند. روش تمایزی آن‌ها به صورت کشت شناور و سپس کشت چسبنده بود که به دنبال آن بعد از ۶ تا ۸ هفته، سلول‌های رنگدانه‌دار شبکیه‌ای ظاهر شدند که مارکرهای CRALBP، BESTROPHIN و RPE65 را بیان می‌کردند (۲۵).

Gong و همکارانش طی مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۸ انجام دادند، اثرات ماتریکس‌های خارج سلولی مختلف را بر تمایز سلول‌های اپیتلیوم رنگدانه‌دار شبکیه از سلول‌های بنیادی جنینی انسانی بررسی کردند. طی این مطالعه، ابتدا سلول‌های بنیادی جنینی انسانی به مدت ۱۳ روز در مجاورت سلول‌های PA6 کشت شدند که موجب تشکیل سلول‌های پیش‌ساز عصبی شد. این پیش‌سازها سپس به دو ظرف کشت مجزایی که به ترتیب با ماتریژل و غشاء Bruch پوشانده شده بودند منتقل شدند. در حضور ماتریژل، سلول‌های پیش‌ساز عصب پس از ۲۱ روز مارکر ZO1 را بیان می‌کردند. اما طی کشت همین سلول‌ها در حضور غشاء Bruch، نواحی رنگدانه‌دار پس از ۴ روز

جنینی و سلول‌های بنیادی پرتوان القایی، این سلول‌ها را به عنوان منبع جدید جهت تولید سلول‌های اپیتلیوم رنگدانه‌دار شبکیه معرفی کرده‌اند، زیرا این سلول‌ها قادرند خصوصیت پرتوانی خود و هم چنین توانایی تمایز یافتن به انواع سلول‌های بدن را حفظ کنند و این نوع کارآیی موجب تبدیل این سلول‌ها به یک منبع انحصاری برای کاربردهای پزشکی شده است. به عنوان مثال پیوند سلول‌های عصبی مشتق از سلول‌های بنیادی پرتوان نتایج امید بخشی را در حیوانات مدل برخی از بیماری‌های چشمی داشته است.

طی مطالعات متعدد، مشخص شده که سلول‌های گلپای مولر می‌توانند به عنوان منبع سلولی درونی در درمان این بیماری باشند (۴۴). اما وجود مشکلاتی از جمله تعداد بسیار پایین این سلول‌ها و هم چنین عدم دسترسی کامل به آن‌ها موجب شد تا مطالعات اصلی به سمت تولید سلول‌های رنگدانه‌دار شبکیه از سلول‌های بنیادی جنینی و سلول‌های بنیادی پرتوان القایی انسانی و موشی در شرایط آزمایشگاهی سوق داده شود. با توجه به اهمیت بسیار زیاد سلول‌های رنگدانه‌دار شبکیه و این که سلول‌های شبکیه منشا اکتودرمی دارند و اجداد آن‌ها سلول‌های عصبی هستند، روش‌های متفاوتی جهت تمایز به سلول‌های شبکیه مورد استفاده محققان قرار گرفت.

اولین گزارش تولید سلول‌های رنگدانه‌دار شبکیه در آزمایشگاه توسط Kawasaki و همکارانش در سال ۲۰۰۲ داده شد که توانستند با استفاده از هم کشتی سلول‌های بنیادی میمونی با سلول‌های PA6 که در کل سیستم کشت SDIA نامیده می‌شد، جمعیت‌های سلولی رنگدانه‌دار را بعد از سه هفته تولید کنند. ۸ درصد از سلول‌ها بعد از سه هفته از نظر بیان مارکرهای اختصاصی جام بینایی شامل Pax6 مثبت بودند. نکته جالب مطالعه فوق این بود که سلول‌های رنگدانه‌داری که برای اولین بار در شرایط آزمایشگاهی تولید شده بودند، مشابه سلول‌های هم‌تای خود در بدن بوده و از سایر سلول‌های رنگدانه‌داری که از تاج عصبی مشتق می‌شوند، قابل تشخیص بودند (۴۵).

در ادامه مطالعه فوق، Haruta و همکارانش با استفاده از سلول‌های بنیادی جنینی میمونی طی روش هم کشتی با سلول‌های PA6 توانستند به سلول‌های اپیتلیوم رنگدانه‌دار شبکیه دست پیدا کنند که از نظر عملکرد و خصوصیات دیگر مشابه سلول‌های هم‌تای خود در بدن بودند. سلول‌های تولید شده به فضای زیر

هفته دیگر جهت تشکیل تک لایه سلولی کشت داده شدند (۲۶). برای نخستین بار HIRAMI و همکارانش در سال ۲۰۰۹ نشان دادند که سلول های بنیادی پرتوان القایی نیز مشابه سلول های بنیادی جنینی قادر به تولید سلول های رنگدانه دار در شرایط کشت مشابه یعنی سیستم کشت SFEB/DLFA هستند. در این مطالعه، سلول های بنیادی جنینی انسانی و سلول های بنیادی پرتوان القایی انسانی به مدت ۴۰ روز در شرایط کشت شناور قرار گرفتند که ۲۰ روز آن به صورت SFEB و ۲۰ روز دیگر به صورت SFEB/DLFA بود. بعد از ۴۰ روز، سلول ها به شرایط کشت چسبیده، در حضور FBS و اکتیوین منتقل شدند. نواحی رنگدانه دار در روز چهارم ظاهر شدند و سلول ها از نظر بیان مارکر RPE65 در روز ۹۰ ام مثبت بودند (۴۹).

Lu و همکارانش در سال ۲۰۰۹ با استفاده از روند تولید سلولی cGMP-complaint، سلول های hESC را ابتدا در شرایط کشت شناور به مدت ۷ روز کشت دادند. این سلول ها سپس به ظرف های کشت پوشیده شده با ژلاتین منتقل شدند و تا ظاهر شدن کلونی های رنگدانه دار تحت شرایط فوق کشت داده شدند. در مرحله ی بعدی، کلونی های تشکیل شده به روش مکانیکی جدا شده و جهت گسترش یافتن و تشکیل تک لایه ی رنگدانه دار، به ظرف های کشت پوشیده شده با ژلاتین منتقل شدند (۵۰).

Buchholz و همکارانش در سال ۲۰۰۹ طی مطالعه ای، سلول های بنیادی جنینی و القایی انسانی را با استفاده از روش تمایز خود به خودی به سلول های رنگدانه دار، تمایز دادند. اساس این روش تمایزی، حذف bFGF از محیط کشت بود. اولین نشانه های ظهور رنگدانه، بین ۲۰ تا ۳۵ روز بعد از حذف bFGF مشاهده شد. نواحی رنگدانه دار فوق بعد از گذشت حدود ۶۰ الی ۹۰ روز، آماده برش مکانیکی بودند. متأسفانه کارایی این سلول ها نیز مشابه مطالعات انجام شده توسط Klimanskaya و Vulger بسیار پایین و در حد یک درصد بود (۲۷).

در مطالعه دیگری که توسط Meyer و همکارانش در سال ۲۰۰۹ و با استفاده از سلول های بنیادی جنینی انسان و سلول های بنیادی پرتوان القایی انجام شد، پیش سازهای عصبی که با استفاده از مولکول های DKK1، Noggin و SU5402 تولید شده بودند، به سمت تولید سلول های شبکه هدایت شدند که طی ۵ هفته سلول های پیش ساز عصب شبکه تولید شد. دستجات سلولی رنگدانه دار چند ضلعی نیز حدود روز سی ام ظاهر شدند (۵۱).

و سلول های مشابه سلول های رنگدانه دار پس از ۱۵ روز مشاهده شدند، که مارکرهای BESTROPHIN و CRALBP را بیان می کردند. نتیجه مطالعه فوق اثبات کننده این حقیقت بود که نوع ماتریکس خارج سلولی در سرعت تولید سلول های رنگدانه دار نقش مهمی دارد (۴۷).

برای بالا بردن کیفیت و کارآمد بودن شرایط کشت، طی مطالعات بعدی محیط SFEB با فاکتورهای متعددی تیمار شد که در مهم ترین آن ها، Osakada و همکارانش در سال ۲۰۰۸ از فاکتورهای FCS، Lefty A، DKK1 و اکتیوین به مدت ۱۸ روز و سپس ادامه کشت در بستر چسبیده به مدت ۹۰ روز دیگر استفاده کردند که در کل سیستم SFEB/DLFA نامیده شد. روش کار به این صورت بود که سلول ها به مدت ۱۸ روز در سیستم SFEB در حضور DKK1 و LeftyA و سپس در شرایط چسبیده به مدت ۷۲ روز دیگر، در مجاورت (FCS و SFEB/Activin) قرار داده شدند که نتیجه آن ظهور نواحی رنگدانه دار از سلول های بنیادی جنینی میمونی، موشی و انسانی در روز چهارم بود. سلول های تولید شده مارکر سلول های رنگدانه دار شبکه بالغ، RPE65 و مارکر اتصالات محکم، ZO1 را در روز ۹۰ ام بیان کردند. ایراد اساسی این مطالعه، پایین بودن کارایی سلول های تولید شده، در حدود کمتر از یک درصد بود (۴۸).

Vulger و همکارانش در سال ۲۰۰۸ با کشت سلول های بنیادی جنینی انسانی روی لایه مغذی حاصل از سلول های فیروبلاستی جنین موش به مدت سه هفته، و سپس برش مکانیکی نواحی سیاه و انتقال آن ها به روی ماتریژل توانستند ظهور نواحی رنگدانه دار را بین ۱ تا ۳ هفته مشاهده کنند. این نواحی رنگدانه دار به مدت ۵ هفته بر روی ماتریژل گسترده شدند. بعد از ۳ تا ۴ هفته، سلول های رنگدانه دار شروع به تشکیل تک لایه رنگدانه دار کردند. جهت پیوند، حدود ۱۰۵ × ۱ سلول به فضای زیر شبکه ای تزریق شد. حیات سلول های پیوند شده تا ۱۰ هفته بود. ایراد اساسی این مطالعه، پایین بودن کارایی سلول های تولید شده، در حدود یک درصد بود (۱).

Carr و همکارانش سلول های بنیادی جنینی انسانی را روی سلول های لایه مغذی حاصل از سلول های فیروبلاستی موشی به مدت بیش از ۳ هفته کشت دادند. نواحی رنگدانه دار بعد از ۱ الی ۲ هفته پس از این که سلول ها سطح ظرف کشت را کاملاً پوشانند، ظاهر شدند. نواحی رنگدانه دار فوق سپس به طور مکانیکی جدا شده و بر روی ماتریژل به مدت ۵



هفته از پیوند، لایه هسته دار خارجی یا ONL ترمیم شد (۵۳).

Nistor و همکارانش از سلول‌های hESC و سلول‌های بنیادی پارتنوژنیک (phESC) جهت تشکیل یافتن ساختارهای سه بعدی از سلول‌های اپیتلیوم رنگدانه دار شبکه و سلول‌های پیش ساز شبکه عصبی استفاده کردند. جهت پیشبرد تکوین ساختارهای اپیتلیومی رنگدانه دار، از فاکتورهای Dkk1 و Lefty A در شرایط کشت شناور استفاده شد. لکه های رنگدانه دار پس از گذشت ۴۲ روز از ظهور آن‌ها، جداسازی شده و به شرایط کشت چسبنده شامل ظروف کشت پوشیده شده با کلاژن/لامینین منتقل شدند (۵۴).

Liao و همکارانش در سال ۲۰۱۰ با استفاده از سلول‌های بنیادی جنینی انسانی و سلول‌های بنیادی پرتوان القایی انسانی و پیروی از روش کار Vulger، توانستند ظهور نواحی رنگدانه دار را بعد از ۳ الی ۴ هفته از کشت بدون bFGF مشاهده کنند (۵۵).

Vaajasaari و همکارانش طی مطالعه‌ای که انجام دادند، سلول‌های بنیادی پرتوان انسانی شامل hESC و hiPSC را از طریق روش تمایز خودبه خودی و تحت شرایط کشت متفاوت به سلول‌های رنگدانه دار تمایز دادند. شرایط کشت اعمال شده بصورت زیر بود:

۱- شرایط بدون سرم (RPEbasic)، که در این حالت شروع تولید رنگدانه از روزهای ۱۱ و ۱۲ گزارش شد.

۲- شرایط فاقد هر نوع عامل خارجی یا Xeno-free (RPEregES) که در حالت فوق، شروع تولید رنگدانه از روزهای ۶ و ۷ گزارش شد (۵۶).

Kokkinaki و همکارانش در سال ۲۰۱۱ با استفاده از سلول‌های بنیادی پرتوان القایی و شرایط کشت بدون لایه فیدر و به کار بردن فاکتورهای Activin A، NIC، و SB431542 توانستند ظهور نواحی رنگدانه دار را بعد از ۴ هفته مشاهده کنند. در این مطالعه، NIC طی هفته اول و سپس Activin و SB431542 طی هفته های چهارم و پنجم به محیط کشت اضافه شدند که بدنال آن اشکال رنگدانه دار پس از هفته چهارم ظاهر شدند. این اشکال رنگدانه دار سپس به شرایط کشت چسبنده در حضور NIC منتقل شدند و به مدت ۳ تا ۵ هفته کشت داده شدند که پس از گذشت این مدت، تک لایه رنگدانه دار شکل گرفتند. پس از گذشت ۴ الی ۶ هفته، حدود ۱۰ تا ۲۰ درصد از سلول‌ها محتوی دستجات رنگدانه دار بودند (۵۷).

Harness و همکارانش از سلول‌های بنیادی جنینی انسانی و سلول‌های بنیادی جنینی پارتنوژنیک طی کشت چسبنده

در سال ۲۰۰۹ بود که Osakada و همکارانش برای نخستین بار از کوچک مولکول‌های CKI-7 و SB431542 به مدت ۲۱ روز، به ترتیب به جای ترکیبات درون سلولی DKK1 و Lefty A استفاده کردند (شرایط کشت آن‌ها SFEB/CS نامیده شد)، سپس سلول‌ها را به ظروف کشت چسبنده منتقل کردند. سلول‌های مثبت از نظر بیان MITF و RX، بین روزهای ۳۵-۳۰ ظاهر شدند. اشکال رنگدانه دار در روز ۴۰ ظاهر شدند. سلول‌های مثبت از نظر بیان فاکتورهای ZO1، RPE65/ CRALBP به ترتیب در روزهای ۱۰ و ۱۲۰ ظاهر شدند. نتایج این مطالعه مشابه مطالعه قبلی انجام شده در سال ۲۰۰۸ بود، اما در مقایسه با ترکیبات معادل درون سلولی خود، کارآمدی تمایز حین استفاده از این کوچک مولکول‌ها پایین تر بود و از سوی دیگر تجمعات سلولی شکل گرفته تحت تأثیر آنها از نظر اندازه کوچک تر بود (۴۴).

به منظور افزایش درصد سلول‌های رنگدانه دار، Idelson و همکارانش در سال ۲۰۰۹ از سلول‌های بنیادی جنینی انسانی و تیمار کردن کشت با مولکول‌های Activin A، TGFβ، NIC، و SB431542 استفاده کردند. برای این کار، سلول‌ها به مدت ۴ هفته در معرض نیکوتینامید و سپس در طی سومین و چهارمین هفته به ترتیب در معرض SB431542، Activin، و TGFβ قرار گرفتند. اشکال پیگمان دار پس از ۴ هفته و سلول‌های پیگمان دار پس از ۸ هفته ظاهر شدند (۳۳ درصد سلول‌ها رنگدانه دار بودند). برای مطالعات پیوند، تعداد  $1 \times 10^5 - 1 \times 10^6$  سلول به فضای زیر شبکه ای رت‌های RCS سه هفته ای پیوند زده شدند. بهبود عملکرد شبکه بعد از ۵ الی ۶ هفته از پیوند مشاهده شد. کارایی سلول‌های رنگدانه دار تولید شده در این مطالعه حدود ۱۰ درصد و کارایی کلی سلول‌های تولید شده حدود ۴ درصد بود (۵۲).

Carr و همکارانش طی مطالعه‌ای که انجام دادند، سلول‌های hiPSC را روی سلول‌های تغذیه ای حاصل از سلول‌های فیروبلست موشی به مدت ۶ روز کشت دادند و پروتکل تمایزی خود را بر پایه حذف bFGF از محیط کشت در مراحل بعدی پیش بردند. کلونی‌های رنگدانه دار در عرض ۴ هفته ظاهر شدند. این نواحی رنگدانه دار به کمک برش مکانیکی از ظرف کشت جدا شدند و در ظرف کشت پوشیده شده با ماتریژل به مدت ۱۴ هفته دیگر جهت تشکیل سلول‌های رنگدانه دار کشت داده شدند. پس از آن، نواحی گسترش یافته از ظرف کشت جدا شده و در محیط کشت خاص fRPE به مدت ۱۳ روز جهت تشکیل تک لایه رنگدانه دار کشت داده شدند. برای پیوند،  $5 \times 10^4$  سلول به فضای زیر شبکه‌ای رت‌های RCS تزریق شدند. بعد از ۱۳

در غیاب عدسی یا اکتودرم سطحی رخ می دهد (۵۹). Meyer و همکاران در سال ۲۰۱۱ روشی را برای تمایز سلول های بنیادی جنینی انسانی و سلول های بنیادی پرتوان القایی به سمت سلول های پیش ساز شبکه و سلول های رنگدانه دار چشم ارائه دادند که از اصول طبیعی تولید شبکه در انسان پیروی می کرد. آن ها با تیمار کشت با DKK1، Noggin یا معادل های کوچک مولکولی آن ها، که به ترتیب شامل XAV939 و Dorsomorphin طی روزهای دوم تا چهارم، سپس انتقال آن ها به شرایط کشت چسبیده در روز هفتم و افزودن Activin A طی روزهای بیستم تا چهل ام توانستند برای نخستین بار به ساختارهای شبیه وزیکول بینی بین روزهای بیستم تا بیست و پنجم از کشت دست پیدا کنند و شروع تولید رنگدانه را بین روزهای چهارم تا ششم مشاهده کنند (۶۰).

Takahashi و Satoshi در سال ۲۰۱۱ با استفاده از سلول های بنیادی پرتوان القایی میمونی و با بکارگیری استراتژی هم کشتی با سلول های PA6، نواحی رنگدانه دار را در روز ۳۰ بعد از شروع تمایز مشاهده کردند.

Zahabi و همکارانش در سال ۲۰۱۱ پروتکلی آسان و پربازده را برای تولید سلول های اپتلیوم رنگدانه دار شبکه در شرایط کشت چسبیده ارائه دادند که طی آن hiPSCs تحت تیمارهای خاص و استفاده از محیط کشت حاوی ترکیبات مشخص می توانستند در مدت زمانی بسیار کوتاه تر از روش های قبلی به سلول های اپتلیوم رنگدانه دار شبکه تمایز پیدا کنند. در گام اول، باید مسیر تمایز به آندودرم و مزودرم در سلول های بنیادی پرتوان القا شده مهار می شد تا فقط به اکتودرم القا شود، سپس ساختارهای عصبی قدامی در کشت سلولی ایجاد می شد تا این سلول ها بتوانند به جام بینی و سپس سلول های پوششی رنگدانه دار شبکه تمایز پیدا کنند. آن ها توانستند در این مطالعه طی تیمار سلول های hiPSC1 با فاکتورهای رشد SHH، RA، Noggin، bFGF، پیگمنتاسیون را بعد از چهار هفته مشاهده کنند و در عرض ۴۰ الی ۵۰ روز به تک لایه سلولی پیگمان دار دست پیدا کنند (۶۱).

Torrez و همکارانش در مطالعه ای از سلول های بنیادی پرتوان انسانی و مارموس استفاده کردند و القای آن ها را به سمت سلول های رنگدانه دار شبکه از طریق تمایز خود به خودی و حذف bFGF و در شرایط کشت شناور به صورت EB و سپس انتقال به شرایط کشت چسبیده پیش بردند. در این مطالعه، بیشترین میزان تجمع سلول های رنگدانه دار در بخش های محیطی اجسام شبه جنینی (EB) مشاهده شد

استفاده کردند. دو نوع شرایط کشت شامل کشت روی سلول های مغزی NSF و کشت روی ماتریژل و سپس روی MEF استفاده شد. نواحی رنگدانه دار ۴ الی ۶ هفته بعد از حذف bFGF مشاهده شدند (۵۸).

در تمامی مطالعات فوق، نواحی رنگدانه دار طی گذر زمان ایجاد شده که با برش مکانیکی این نواحی و پاساژ مجدد آن در ظرف سلولی جدید، سلول ها گسترده شده و لایه جدیدی که دارای سلول های شش وجهی و رنگدانه دار است، شکل می گیرد. این سلول ها شبیه سلول های پوششی رنگدانه دار شبکه طبیعی بوده و ژن ها و پروتئین های ویژه سلول های پوششی رنگدانه دار شبکه را بیان می کردند، اما محققانی که از روش کشت خود به خودی استفاده کردند، همواره در پیوند به حیوان مدل با مشکل عدم خلوص سلولی مواجه بودند. پتانسیل تولید سلول در این روش تمایزی بسیار اندک بوده و عملاً کمتر از ۳ درصد سلول ها به سلول های پوششی رنگدانه دار شبکه تمایز پیدا می کند. برش مکانیکی تنها ۳ درصد سلول بسیار مشکل است و احتمال ناخالصی سلول را زیاد می کند. در بین این سلول های ناخالص، ممکن است سلول هایی وجود داشته باشند که تمایز نیافته باقی مانده و پس از پیوند ایجاد غده کند. در سلول درمانی روش های تمایزی بهینه که در آن سلول ها از خلوص، درصد و یکنواختی بالایی برخوردار باشند، اهمیت زیادی دارد.

این حقیقت که طی تکوین چشم، هر سلول برنامه ژنتیکی خاص خود را دنبال می کند تا در نهایت بخش های مختلف چشم از هم متمایز شوند به طور کامل به اثبات رسیده است. با استناد به این واقعیت، جهت اثبات وجود کنترل فضایی-زمانی الگودهی دینامیک و خود تشکیلی اندام های پیچیده در شرایط سه بعدی به جای دو بعدی، Eiraku و همکارانش از گروه Sasai توانستند برای اولین بار ساختار جام بینی را به صورت ساختارهای خود به خود سازمان یابنده با استفاده از سلول های بنیادی جنینی موشی در شرایط کشت سه بعدی تمایز دهند.

در این مطالعه، سلول های بنیادی جنینی بصورت کشت شناور و تحت شرایط بسیار پایین فاکتورهای رشد کشت داده شدند. این محققین ترکیبات ماتریکس خارج سلولی، شامل ماتریژل یا لامینین و انتاکنین خالص شده را طی روزهای اول تا هفتم به کشت اضافه کردند. آن ها همچنین از SB431542 و Nodal طی کشت استفاده کردند. سلول ها سپس در روز ۷ به ظرف کشت جدید منتقل شدند و در شرایط ۴۰ درصد اکسیژن کشت داده شدند که در نهایت ساختار جام بینی بین روزهای دهم و یازدهم تشکیل شد. به این ترتیب آن ها ثابت کردند که شکل گیری جام بینی

عصبی تمایز دهند که بخشی از این ساختارها بعد از حدود پنج هفته اثراتی از تولید رنگدانه را نشان دادند. قابلیت گسترش به مدت زمان طولانی بدون از دست دادن پتانسیل تمایزی، سهولت در نگهداری و عدم وابستگی به سلول‌های مغذی از نقاط قوت این مطالعه بودند (۶۶).

یکی از نقاط ضعفی که تمام مطالعات انجام شده دارند این است که مشاهده ساختارهای شش وجهی سلول‌های اپیتلیوم رنگدانه دار، نیاز به جداسازی مکانیکی نواحی رنگدانه دار و گسترش آن‌ها در ظرف کشت دیگری دارد تا در نهایت ورقه‌های تک لایه از سلول‌های شش ضلعی تشکیل شوند. جهت برطرف کردن چنین مشکلی، سلول‌های بنیادی پرتوان انسانی در شرایط کشت سه بعدی و در حضور ماتریژل بصورت کیست‌های نوروپیتیلیالی کشت شدند و در روز پنجم به پیش‌سازهای عصبی تبدیل شدند. این پیش‌سازها سپس با استفاده از trans-well filters و در حضور Activin به سمت سرنوشت اپیتلیوم رنگدانه دار سوق داده شدند که در نتیجه آن تولید رنگدانه در روز هجدهم شروع شد و تک لایه سلول‌های اپیتلیوم رنگدانه دار بدون نیاز به انتقال به ظرف کشت دیگر در روز سی‌ام مشاهده شد. سپس حدود ۶۰ الی ۱۳۰ هزار سلول به فضای زیر شبکه‌ای رت‌های مدل، پیوند شدند که بدنال آن ترمیم در برخی از سلول‌های گیرنده نور مشاهده شد (۶۷).

اکثر پروتکل‌هایی که برای تولید سلول‌های اپیتلیوم رنگدانه دار شبکه‌ای ارائه شدند بسیار وقت‌گیر هستند و همین عامل مانع از استفاده آن‌ها در حیطه‌های پزشکی و درمانی می‌شود، ولی Maruotti و همکارانش توانستند محدودیت‌های مطالعات قبلی را از طریق طراحی یک پروتکل ساده و قابل‌سنجش بهبود ببخشند. طی این پروتکل سلول‌های چندتوان انسانی به جای clump passage از طریق clonal propagation تکثیر شدند و سپس به صورت تک لایه سلولی به سلول‌های اپیتلیوم رنگدانه دار تمایز پیدا کردند. پیگمنتاسیون مناسب بین روزهای ۲۵ الی ۳۰ شروع شد و در نهایت سلول‌های رنگدانه دار با خلوص بالا که خصوصیات سلول‌های معادل خود در شرایط طبیعی را نشان می‌دادند در روز ۱۱۵ مشاهده شدند. بعد از پیوند این سلول‌ها به فضای زیر شبکه‌ای موش‌های NOD/SCID، حیات سلول‌های پیوند شده تأیید شد (۶۸).

اما مطالعه‌ای که می‌توان از آن به عنوان یک مطالعه برجسته یاد کرد توسط گروه Clegg در سال ۲۰۱۳ گزارش شد. این

و به طور میانگین، کمتر از ۲۰ درصد از کلونی‌های حاصل از رده‌های بدست آمده از مارموسست به سلول‌های رنگدانه دار شبکه‌ای تمایز پیدا کردند (۶۲).

Krohne و همکارانش در مطالعه خود از سلول‌های بنیادی پرتوان القایی انسانی استفاده کردند که باز برنامه‌ریزی آن‌ها توسط کوچک مولکول‌ها انجام شده بود. جهت تمایز این سلول‌ها به سلول‌های اپیتلیوم رنگدانه دار شبکه‌ای، از پروتکل Idelson با تغییراتی جزئی استفاده شد، بدین صورت که طی ۴ هفته اول القاء، NIC به میزان ۱۰ میلی مولار به محیط کشت اضافه شد، همچنین طی هفته‌های سوم و چهارم، Activin به میزان ۶۲ ng/ml افزوده شد. طی ۱۰ هفته اول، کشت تحت شرایط EB انجام شد. نواحی رنگدانه دار در هفته ششم رویت شدند. این نواحی رنگدانه دار سپس در هفته دهم به شرایط کشت چسبنده و بر روی ماتریژل منتقل شدند (۶۳).

جهت اثبات نقش اساسی نقش ماتریکس خارج سلولی در تولید سلول‌های اپیتلیوم رنگدانه دار شبکه‌ای، لامینین-۱۱۱ همراه با ماتریژل که در مطالعات متعدد کاربرد داشته است مورد استفاده قرار گرفت. نقاط رنگدانه دار در حضور لامینین-۱۱۱ در روزهای ۲۰ الی ۲۲ مشاهده شدند که در مقایسه با ماتریژل تفاوت ناچیزی را نشان می‌داد. از سوی دیگر این مطالعه نشان داد که ماتریکس یا بستری که شباهت بیشتری با غشاء Bruch دارد کاندید مناسب‌تری جهت استفاده در مطالعات تولید سلول‌های رنگدانه دار شبکه‌ای است (۶۴).

در راستای اثبات قابلیت تولید سلول‌های اپیتلیوم رنگدانه دار از سلول‌های بنیادی انسانی علاوه بر نوع موشی در شرایط سیستم سه بعدی، Nakano و همکارانش از گروه Sasai توانستند ساختارهای جام‌بینایی را با استفاده از سلول‌های بنیادی جنینی انسانی به جای سلول‌های موشی در حضور ترکیبات شیمیایی شامل CHIR99021، Y27632، IWR1e، SAG و CHIR99021 تحت شرایط سه بعدی تولید کنند. در این مطالعه، CHIR99021 به عنوان یک فاکتور مؤثر در متعهد کردن سلول‌ها به سمت سرنوشت اپیتلیوم رنگدانه دار شبکه‌ای و یا شکل‌گیری ساختار جام‌بینایی معرفی شد (۶۵).

Cho و همکارانش موفق شدند با استفاده از روشی مشابه روش تولید سلول‌های ترشح‌کننده دوپامین که طی آن ساختارهای عصبی کروی شکل از سلول‌های پرتوان انسانی تولید می‌شدند، این ساختارها را به طور خود بخودی به ساختارهای شبه لوله

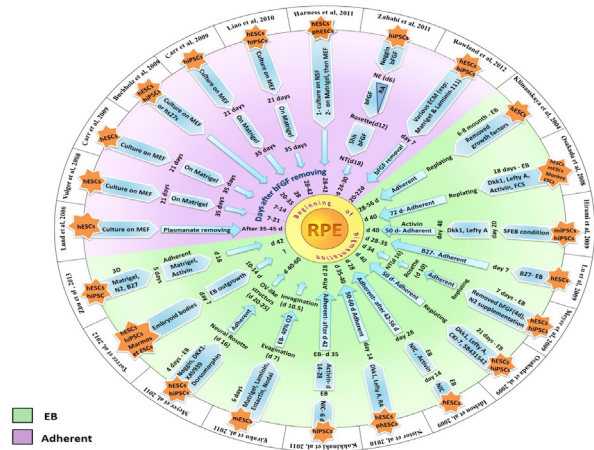
هیچ گونه علایمی از تشکیل تومور، رد پیوند و التهاب بعد از عمل جراحی مشاهده نشد و بهبودی نسبی حاصل شد (۷۰). (برای مطالعه بیشتر رجوع شود به سایت [www.clinicaltrial.com](http://www.clinicaltrial.com)).

### نتیجه گیری:

با توجه به پیشرفت تکنیک های درمانی و امید بخش بودن آن ها در زمینه کاربرد سلول های بنیادی در کشف داروها، مدل سازی بیماری ها و سلول درمانی و علی رغم موانع و مشکلات بسیار در این زمینه، محققان بیش از پیش نسبت به تحقیقات برای درمان برخی از بیماری های تخریبی عصبی مثل تخریب ما کولای وابسته به سن علاقه مند شده اند. مهم ترین عاملی که کاربردهای درمانی این تکنولوژی را محدود می کند، ناکارآمدی تمایز سلول های مورد نظر و نیز دشوار بودن تولید جمعیت کافی و یک دست از سلول های کاملاً تمایز یافته است. ارزیابی سلامت و کیفیت سلول های تولید شده و هم چنین شباهت خصوصیات این سلول ها با نوع همتای خود در بدن از عوامل مهم دیگری است که صلاحیت ورود این سلول ها را به فاز بالینی تعیین می کند زیرا قرارگیری صحیح این سلول ها را بین سلول های میزبان بعد از پیوند تحت تأثیر قرار می دهد. از سوی دیگر چگونگی روند تولید این سلول ها در شرایط آزمایشگاهی از اهمیت ویژه ای برخوردار است. استفاده از شرایط کشت عاری از هر گونه ترکیبات با منشاء حیوانی، از جمله راهکارهایی است که می تواند شانس رد پیوند این سلول ها را در میزبان کاهش دهد. علاوه بر این، جایگزین کردن فاکتورهای رشد با ترکیبات معادل مثل کوچک مولکول ها می تواند بسیار مفید باشد. کوچک مولکول ها ترکیبات شیمیایی هستند که در مقایسه با فاکتورهای رشد، به دلیل حجم مولکولی پایین تر به راحتی از غشاء سلول رد می شوند، پایداری خیلی بیشتری در شرایط کشت دارند، از طرفی می توانند مسیرهای پیام دهی درون سلولی را به طور مستقیم و اختصاصی تر فعال کنند در نتیجه این امیدواری وجود دارد که با استفاده از آن ها طی تمایز بتوان سرنوشت سلولی را نیز به طور مستقیم و تخصصی تر کنترل کرد. استفاده از این ترکیبات برای سلول سالم تر بوده و واکنش های ایمنولوژیک را کمتر تحریک می کنند. بنابراین می تواند جایگزین های مناسب تری برای فاکتورهای رشد یا هر گونه پروتئین نوترکیب باشند.

اطلاعاتی که از بررسی مکانیسم های بیماری طی استفاده از سلول های اپیتلیوم رنگدانه دار شبکه حاصل از سلول های بنیادی پر توان در شرایط آزمایشگاهی به دست می آید می تواند اساس طب ترمیمی باشد. در این مورد شناسایی عوامل دخیل در

گروه موفق شدند تا پروتکلی با بالاترین کارآیی تولید سلول های رنگدانه دار تا حدود ۸۰ درصد را در کوتاه ترین زمان ممکن یعنی ۱۴ روز گزارش دهند. طی این پروتکل، تعدادی از فاکتورهای رشد شامل IGF1، Noggin، DKK1، bFGF، Activin A همراه با SU5402، NIC، و VIP در بازه های زمانی مناسب جهت القای تولید سلول های اپیتلیوم رنگدانه دار از سلول های بنیادی پر توان انسانی افزوده شدند که موجب تمایز ساختارهای شبه روزتی معادل حوزه بینایی، و نقاط رنگدانه دار به ترتیب در روزهای چهارم و دهم ظاهر شدند. میانگین سلول های PMEL+ بعد از روز ۱۴، حدود ۷۸/۵ درصد بود (۶۹). شکل ۳ خلاصه ای از تمامی مطالعات صورت گرفته را به صورت شماتیک نشان می دهد.



شکل ۳: شماتیک از مطالعات انجام شده در زمینه تولید سلول های اپیتلیوم رنگدانه دار شبکه از سلول های بنیادی پر توان. دسته بندی مطالعات بر اساس شرایط کشت سلول ها شامل EB و Adherent صورت گرفته است و به ترتیب سال مرتب شده اند.

در نهایت، چالش اصلی تمام مطالعات صورت گرفته در زمینه تمایز سلول های اپیتلیوم رنگدانه دار شبکه از سلول های بنیادی جنینی انسانی، رسیدن به سلول هایی است که قابلیت پیوند شدن در انسان برای اهداف درمانی را داشته باشند، زیرا پیوند موفق این سلول ها در انسان بسیار اهمیت دارد. خوشبختانه در سال ۲۰۱۱، قابلیت درمانی این نوع سلول ها در انسان توسط Schwartz و همکارانش گزارش شد. در این مطالعه که مربوط به فاز I کارآزمایی بالینی بود، تعداد ۵×۱۰۴ سلول اپیتلیوم رنگدانه دار شبکه حاصل از تمایز سلول های بنیادی جنینی انسانی به فضای زیر شبکه ای بیماران AMD و Stargardts پیوند زده شدند. بعد از ۴ ماه از پیوند،

به طور خلاصه، تحقیقات در زمینه تولید سلول‌های اپیتلیوم رنگدانه دار شبکه از سلول‌های بنیادی پرتوان هنوز در مرحله اولیه قرار دارد، با این حال همین مطالعات اولیه نوید شروع سلول درمانی را بعد از برطرف کردن موانع و مشکلات داده اند. سلول‌های اپیتلیوم رنگدانه دار شبکه حاصل از سلول‌های بنیادی در محیط آزمایشگاهی نه تنها برای مدل سازی بیماری ها و کشف مکانیسم های بیماری می تواند سودمند باشد بلکه در مطالعات زیست-پزشکی از جمله انجام تست های دارویی اختصاصی با استفاده از سلول های خود بیمار نیز نتایج امید بخشی دارند چرا که مانع از کشتن حیوانات مدل بیماری جهت تست داروها و ارزیابی سمیت آن ها می شود.

#### References:

1. Vugler A, Carr AJ, Lawrence J, Chen LL, Burrell K, Wright A, et al. Elucidating the phenomenon of HESC-derived RPE: anatomy of cell genesis, expansion and retinal transplantation. *Exp Neurol*. 2008;214(2):347-61.
2. Smith A. Pluripotent stem cells: private obsession and public expectation. *EMBO Mol Med*. 2010;2(4):113-6.
3. Yuan T, Liao W, Feng NH, Lou YL, Niu X, Zhang AJ, et al. Human induced pluripotent stem cell-derived neural stem cells survive, migrate, differentiate, and improve neurological function in a rat model of middle cerebral artery occlusion. *Stem Cell Res Ther*. 2013;4(3):73-83.
4. Baharvand H, Ashtiani SK, Valojerdi MR, Shahverdi A, Tae A, Sabour D. Establishment and in vitro differentiation of a new embryonic stem cell line from human blastocyst. *Differentiation*. 2004;72(5):224-9.
5. Teo AK, Vallier L. Emerging use of stem cells in regenerative medicine. *Biochem J*. 2010;428(1):11-23.
6. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 1998;282(5391):1145-7.
7. Cowan CA, Klimanskaya I, McMahon J, Atienza J, Witmyer J, Zucker JP, et al. Derivation of embryonic stem-cell lines from human blastocysts. *N Engl J Med*. 2004;350(13):1353-6.
8. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006;126(4):663-76.
9. Zhao T, Zhang ZN, Rong Z, Xu Y. Immunogenicity of induced pluripotent stem cells. *Nature*. 2011;474(7350):212-5.
10. Kanatsu-Shinohara M, Inoue K, Lee J, Yoshimoto M, Ogonuki N, Miki H, et al. Generation of pluripotent stem cells from neonatal mouse testis. *Cell*. 2004;119(7):1001-12.
11. Bharti K, Miller SS, Arnheiter H. The new paradigm: retinal pigment epithelium cells generated from embryonic or induced pluripotent stem cells. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2011;24(1):21-34.
12. Fernández-Garre P, Rodríguez-Gallardo L, Gallego-Díaz V, Alvarez IS, Puelles L. Fate map of the chicken neural plate at stage 4. *Development*. 2002;129(12):2807-22.
13. Martínez-Morales JR, Rodrigo I, Bovolenta P. Eye development: a view from the retina pigmented epithelium. *Bioessays*. 2004;26(7):766-77.
14. Pittack C, Grunwald GB, Reh TA. Fibroblast growth factors are necessary for neural retina but not pigmented epithelium differentiation in chick embryos. *Development*. 1997;124(4):805-16.

ایجاد بیماری های شبکه مثل تخریب ماکولای وابسته به سن می تواند راهکارهای درمانی مؤثر، مناسب و قابل استفاده در درمان را ارائه دهد. از سوی دیگر، سلول های اپیتلیوم رنگدانه دار تولید شده از سلول های بنیادی پرتوان در شرایط آزمایشگاهی می تواند در مدل سازی بیماریزایی و همچنین درمان بیماری های حاصل از تخریب این سلول ها مفید باشد زیرا با استفاده از این سلول ها می توان به مکانیسم های بروز بیماری در محیط آزمایشگاه و خارج از بدن پی برد و این خود نه تنها موجب کاهش ریسک بیمار می شود بلکه باعث کاهش هزینه های مراحل اولیه فاز درمان نیز می شود. به عنوان مثال Jin و همکاران سلول های بنیادی پرتوان القایی را از بیماران مبتلا به رتینیت پیگمنتوزای حاصل از جهش های مختلف تولید کرده اند و پتانسیل سلول های گیرنده نور حاصل از بیمار را برای مدل سازی بیماری نشان داده اند. همچنین طی مطالعه ای در پژوهشگاه رویان تهران، سلول های بنیادی پرتوان القایی از بیماران مبتلا به پنج نوع بیماری تخریبی شبکه تولید شدند و سپس به سلول های اپیتلیوم رنگدانه دار تمایز داده شدند. سلول های تولید شده شاخص های اپیتلیوم رنگدانه دار را بیان می کردند اما در مقایسه با تمایز رده سالم سلول های بنیادی القایی، تعداد کمتری از سلول های بنیادی پرتوان القایی حاصل از بیمار به اپیتلیوم رنگدانه دار تمایز پیدا کردند (۶۱).

این موضوع که کاهش در تعداد سلول های تمایز یافته مربوط به تخریب سلول های اپیتلیوم رنگدانه دار تولید شده است یا مربوط به کاهش تمایل تمایزی رده های سلول بنیادی القایی حاصل از بیماران، نیاز به بررسی بیشتری دارد. اما در کل، مطالعه تولید سلول های مورد نظر از رده های سلول بنیادی القایی بیماران نه تنها برای مطالعه سبب شناسی بیماری مربوطه مفید است بلکه برای کشف و غربالگری داروها نیز اهمیت دارد. در این رابطه، رده سلول اپیتلیوم رنگدانه دار شبکه انسانی به نام ARPE-19 ابزار مناسبی برای کشف داروهای مختلف، درمان با استفاده از دارو و نیز غربالگری سمیت داروهای مورد نظر است (۷۱).

اما استفاده از سلول های اپیتلیوم رنگدانه دار شبکه حاصل از سلول های بنیادی می تواند برای مطالعه انتقال دارو طی انجام تست های دارویی اختصاصی برای هر فرد مناسب تر باشد. به عنوان مثال، در مورد بیماری تخریب ماکولای وابسته به سن، دو مطالعه کامل شده در مرحله فاز ۳ درمانی وجود دارد که از داروی Aflibercept به صورت تزریق در داخل زجاجیه استفاده کرده اند و کارآیی قابل مقایسه ای را با Ranibizumab به عنوان یک داروی ضد VEGF مشاهده کرده اند (۷۲).

15. Fuhrmann S, Levine E.M, Reh TA. Extraocular mesenchyme patterns the optic vesicle during early eye development in the embryonic chick. *Development*. 2000;127(21):4599-609.
16. Fuhrmann S. Eye morphogenesis and patterning of the optic vesicle. *Curr Top Dev Biol*. 2010;93:61-84.
17. Fuhrmann S. Wnt signaling in eye organogenesis. *Organogenesis*. 2008;4(2):60-7.
18. Fujimura N, Taketo MM, Mori M, Korinek V, Kozmik Z. Spatial and temporal regulation of Wnt/beta-catenin signaling is essential for development of the retinal pigment epithelium. *Dev Biol*. 2009;334(1):31-45.
19. Lee HS, Bong YS, Moore KB, Soria K, Moody SA, Daar IO. Dishevelled mediates ephrinB1 signalling in the eye field through the planar cell polarity pathway. *Nat Cell Biol*. 2006;8(1):55-63.
20. Vinothkumar S, Rastegar S, Takamiya M, Ertzer R, Strähle U. Sequential and cooperative action of Fgfs and Shh in the zebrafish retina. *Dev Biol*. 2008;314(1):200-14.
21. Bora N, Conway SJ, Liang H, Smith SB. Transient overexpression of the Microphthalmia gene in the eyes of Microphthalmia vitiligo mutant mice. *Dev Dyn*. 1998;213(3):283-92.
22. Nguyen M, Arnheiter H. Signaling and transcriptional regulation in early mammalian eye development: a link between FGF and MITF. *Development*. 2000;127(16):3581-91.
23. Liu IS, Chen JD, Ploder L, Vidgen D, van der Kooy D, Kalnins VI, et al. Developmental expression of a novel murine homeobox gene (Chx10): evidence for roles in determination of the neuroretina and inner nuclear layer. *Neuron*. 1994;13(2):377-93.
24. Klimanskaya I, Hipp J, Rezai KA, West M, Atala A, Lanza R. Derivation and comparative assessment of retinal pigment epithelium from human embryonic stem cells using transcriptomics. *Cloning Stem Cells*. 2004;6(3):217-45.
25. 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(3):189-99.
26. Carr AJ, Vugler A, Lawrence J, Chen LL, Ahmado A, Chen FK, et al. Molecular characterization and functional analysis of phagocytosis by human embryonic stem cell-derived RPE cells using a novel human retinal assay. *Mol Vis*. 2009;15:283-95.
27. Buchholz DE, Hikita ST, Rowland TJ, Friedrich AM, Hinman CR, Johnson LV, et al. Derivation of functional retinal pigmented epithelium from induced pluripotent stem cells. *Stem Cells*. 2009;27(10):2427-34.
28. Strauss O. The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiol Rev*. 2005;85(3):845-81.
29. Cai X, Conley SM, Naash MI. RPE65: role in the visual cycle, human retinal disease, and gene therapy. *Ophthalmic Genet*. 2009;30(2):57-62.
30. Ishida K, Panjwani N, Cao Z, Streilein JW. Participation of pigment epithelium in ocular immune privilege. 3. Epithelia cultured from iris, ciliary body, and retina suppress T-cell activation by partially non-overlapping mechanisms. *Ocul Immunol Inflamm*. 2003;11(2):91-105.
31. Ryan SJ, Wilkinson CP, Hinton DR, Sadda SR, Wiedemann P. *Retina*, fifth ed. 2013. Elsevier Inc.
32. Sonoda S, Spee C, Barron E, Ryan SJ, Kannan R, Hinton DR. A protocol for the culture and differentiation of highly polarized human retinal pigment epithelial cells. *Nat Protoc*. 2009;4(5):662-73.
33. Wimmers S, Karl MO, Strauss O. Ion channels in the RPE. *Prog Retin Eye Res*. 2007;26(3):263-301.
34. Lim LS, Mitchell P, Seddon JM, Holz FG, Wong TY. Age-related macular degeneration. *Lancet*. 2012;379(9827):1728-38.
35. Ambati J, Fowler BJ. Mechanisms of age-related macular degeneration. *Neuron*. 2012;75(1):26-39.
36. Maw MA, Kennedy B, Knight A, Bridges R, Roth KE, Mani EJ, et al. Mutation of the gene encoding cellular retinaldehyde-binding protein in autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Nat Genet*. 1997;17(2):198-200.
37. Cronin T, Raffelsberger W, Lee-Rivera I, Jaillard C, Niepon ML, Kinzel B, et al. The disruption of the rod-derived cone viability gene leads to photoreceptor dysfunction and susceptibility to oxidative stress. *Cell Death Differ*. 2010;17(7):1199-210.
38. Ooto S, Akagi T, Kageyama R, Akita J, Mandai M, Honda Y, et al. Potential for neural regeneration after neurotoxic injury in the adult mammalian retina. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004;101(37):13654-9.
39. Acland GM, Aguirre GD, Ray J, Zhang Q, Aleman TS, Cideciyan AV, et al. Gene therapy restores vision in a canine model of childhood blindness. *Nat Genet*. 2001; 28(1): 92-5.
40. Gullapalli VK, Sugino IK, Van Patten Y, Shah S, Zarbin MA. Impaired RPE survival on aged submacular human Bruch's membrane. *Exp Eye Res*. 2005;80(2):235-48.
41. Querques G, Prato R, Coscas G, Soubrane G, Souied EH. In vivo visualization of photoreceptor layer and lipofuscin accumulation in stargardt's disease and fundus flavimaculatus by high resolution spectral-domain optical coherence tomography. *Clin Ophthalmol*. 2009;3:693-9.
42. Kinnick TR, Mullins RF, Dev S, Leys M, Mackey DA, Kay CN, et al. Autosomal recessive vitelliform macular dystrophy in a large cohort of vitelliform macular dystrophy patients. *Retina*. 2011;31(3):581-95.
43. Krämer F, White K, Pauleikhoff D, Gehrig A, Passmore L, Rivera A, et al. Mutations in the VMD2 gene are associated with juvenile-onset vitelliform macular dystrophy (Best disease) and adult vitelliform macular dystrophy but not age-related macular degeneration. *Eur J Hum Genet*. 2000;8(4):286-92.
44. Osakada F, Jin ZB, Hiram Y, Ikeda H, Danjyo T, Watanabe K, et al. In vitro differentiation of retinal cells from human pluripotent stem cells by small-molecule induction. *J Cell Sci*. 2009;122(17):3169-79.
45. Kawasaki H, Suemori H, Mizuseki K, Watanabe K, Urano F, Ichinose H, et al. Generation of dopaminergic neurons and pigmented epithelia from primate ES cells by stromal cell-derived inducing activity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002;99(3):1580-5.
46. 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(3):1020-5.
47. Gong J, Sagiv O, Cai H, Tsang SH, Del Priore LV. Effects of extracellular matrix and neighboring cells on induction of human embryonic stem cells into retinal or retinal pigment epithelial progenitors. *Exp Eye Res*. 2008;86(6):957-65.
48. Osakada F, Ikeda H, Mandai M, Wataya T, Watanabe K, Yoshimura N, et al. Toward the generation of rod and cone photoreceptors from mouse, monkey and human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol*. 2008;26(2):215-24.
49. Hiram Y, Osakada F, Takahashi K, Okita K, Yamanaka S, Ikeda H, et al. Generation of retinal cells from mouse and human induced pluripotent stem cells. *Neurosci Lett*. 2009;458(3):126-31.
50. Lu B, Malcuit C, Wang S, Girman S, Francis P, Lemieux L, et al. Long-term safety and function of RPE from human embryonic stem cells in preclinical models of macular degeneration. *Stem Cells*.

- 2009;27(9):2126-35.
51. Meyer JS, Shearera RL, Capowskia EE, Wrighta LS, Wallacea KA, EL McMillan, et al. Modeling early retinal development with human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009;106(39):16698-703.
52. Idelson M, Alper R, Obolensky A, Ben-Shushan E, Hemo I, Yachimovich-Cohen N, et al. Directed differentiation of human embryonic stem cells into functional retinal pigment epithelium cells. *Cell Stem Cell*. 2009;5(4):396-408.
53. Carr AJ, Vugler AA, Hikita ST, Lawrence JM, Gias C, Chen L, Buchholz DE, et al. Protective effects of human iPS-derived retinal pigment epithelium cell transplantation in the retinal dystrophic rat. *PLoS One*. 2009;4(12):8152-64.
54. Nistor G, Seiler MJ, Yan F, Ferguson D, Keirstead HS. Three-dimensional early retinal progenitor 3D tissue constructs derived from human embryonic stem cells. *J Neurosci Methods*. 2010;190(1):63-70.
55. Liao JL, Yu J, Huang K, Hu J, Diemer T, Ma Z, et al. Molecular signature of primary retinal pigment epithelium and stem-cell-derived RPE cells. *Hum Mol Genet*. 2010;19(21):4229-38.
56. Vaajasaari H, Ilmarinen T, Juuti-Uusitalo K, Rajala K, Onnela N, Narkilahti S, et al. Toward the defined and xeno-free differentiation of functional human pluripotent stem cell-derived retinal pigment epithelial cells. *Mol Vis*. 2011;17:558-75.
57. 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(5):825-35.
58. Harness JV, Turovets NA, Seiler MJ, Nistor G, Altun G, Agapova LS, et al. Equivalence of conventionally-derived and parthenote-derived human embryonic stem cells. *PLoS One*. 2011;6(1):1449-57.
59. Eiraku M, Takata N, Ishibashi H, Kawada M, Sakakura E, Okuda S, et al. Self-organizing optic-cup morphogenesis in three-dimensional culture. *Nature*. 2011;472(7341):51-6.
60. Meyer JS, Howden SE, Wallace KA, Verhoeven AD, Wright LS, Capowski EE, et al. Optic vesicle-like structures derived from human pluripotent stem cells facilitate a customized approach to retinal disease treatment. *Stem Cells*. 2011;29(8):1206-18.
61. Zahabi A, Shahbazi E, Ahmadieh H, Hassani SN, Totonchi M, Taei A, et al. A new efficient protocol for directed differentiation of retinal pigmented epithelial cells from normal and retinal disease induced pluripotent stem cells. *Stem Cells Dev*. 2012;21(12):2262-72.
62. Torrez LB, Perez Y, Yang J, Nieden N, Klassen H, Liew C. Derivation of neural progenitors and retinal pigment epithelium from common marmoset and human pluripotent stem cells. *Stem Cells Int*. 2012;12:417-26.
63. Krohne TU, Westenskow PD, Kurihara T, Friedlander DF, Lehmann M, Dorsey AL, et al. Generation of Retinal Pigment Epithelial Cells from Small Molecules and OCT4 Reprogrammed Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cells Transl Med*. 2012;1:96-109.
64. Rowland TJ, Blaschke AJ, Buchholz DE, Hikita ST, Johnson LV, Clegg DO. Differentiation of human pluripotent stem cells to retinal pigmented epithelium in defined conditions using purified extracellular matrix proteins. *J Tissue Eng Regen Med*. 2013;7(8):642-53.
65. Nakao S, Arima M, Ishikawa K, Kohno R, Kawahara S, Miyazaki M, et al. Intravitreal anti-VEGF therapy blocks inflammatory cell infiltration and re-entry into the circulation in retinal angiogenesis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2012;53(7):4323-8.
66. Cho MS, Kim SJ, Ku SY, Park JH, Lee H, Yoo DH, et al. Generation of retinal pigment epithelial cells from human embryonic stem cell-derived spherical neural masses. *Stem Cell Res*. 2012;9(2):101-9.
67. Zhu Y, Carido M, Meinhardt A, Kurth T, Karl MO, Ader M, et al. Three-dimensional neuroepithelial culture from human embryonic stem cells and its use for quantitative conversion to retinal pigment epithelium. *PLoS One*. 2013;8(1):545-54.
68. Maruotti J, Wahlin K, Gorrell D, Bhutto I, Luttu G, Zack DJ. A simple and scalable process for the differentiation of retinal pigment epithelium from human pluripotent stem cells. *Stem Cells Transl Med*. 2013;2(5):341-54.
69. Buchholz DE, Pennington BO, Croze RH, Hinman CR, Coffey PJ, Clegg DO. Rapid and efficient directed differentiation of human pluripotent stem cells into retinal pigmented epithelium. *Stem Cells Transl Med*. 2013;2(5):384-93.
70. Schwartz S.D, Hubschman JP, Heilwell G, Franco-Cardenas V, Pan CK, Ostrick RM, et al. Embryonic stem cell trials for macular degeneration: a preliminary report. *Lancet*. 2012;379(9817):713-20.
71. Juuti-Uusitalo K, Vaajasaari H, Ryhänen T, Narkilahti S, Suuronen R, Mannermaa E, et al. Efflux protein expression in human stem cell-derived retinal pigment epithelial cells. *PLoS One*. 2012;7(1):389-95.
72. Elman MJ, Bressler NM, Qin H, Beck RW, Ferris FL 3rd, Friedman SM, et al. Expanded 2-year follow-up of ranibizumab plus prompt or deferred laser or triamcinolone plus prompt laser for diabetic macular edema. *Ophthalmology*. 2011;118(4):609-14.

# Differentiation of Pluripotent Stem Cells to Retinal Pigment Epithelial Cells: An Approach Toward Retinal Degenerative Diseases Treatment

Maryam Parvini<sup>1\*</sup>, Kazem Parivar<sup>1</sup>, Mohammad Javan<sup>2</sup>

1. PhD Student, Department of Biology, Science and research branch, Islamic azad university, Tehran, Iran

2. Professor, Department of Biology, Science and research branch, Islamic azad university, Tehran, Iran

3. Associate Professor, Department of Physiology, Tarbiat modarres university, Tehran, Iran

## Abstract

*Pluripotent stem cells as the cells with a capacity for self-renewal and differentiation into various specific cell types have been highly regarded in regenerative medicine studies. To repair the eye disease damages, the differentiation into retinal pigment epithelial cells of pluripotent stem cells has gained great importance in recent decades because the inappropriate function of these cells is the main cause of degenerative diseases such as the age-related macular degeneration. Millions of people in the world suffer this disease.*

*To restore the damaged cells and, finally, to improve the vision, numerous studies have been conducted on using pluripotent stem cells, their differentiation into retinal pigment epithelial cells, and finally, their application in cell therapy. Based on this, many researchers have attempted to produce highly efficient retinal pigment epithelial cells, such that they show a proper function after transplant, along with the host cells. In this review article, the importance and the role of pigment epithelial cells, as well as, the studies on the in vitro production of these cells were examined.*

**Keywords:** Retinal pigment epithelial cell, retinal degenerative diseases, pluripotent stem cells

\*Corresponding Author: Maryam Parvini

Address: Islamic azad university, Tehran, Iran

Phone: +989141486356 Email: parvini29@gmail.com