Effect of Amniotic Fluid on the Invitro Culture of Human Corneal Endothelial Cells

Feizi S, MD*; Soheili ZS, PhD; Bagheri A, MSc; Balagholi S, MSc; Karimi Aval S, MD

Ophthalmic Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
** Corresponding Author: sepehrfeizi@yahoo.com*

Purpose: To evaluate the effect of human amniotic fluid (HAF) on the growth of human corneal endothelial cells (HCECs) and to establish an in vitro method for the expansion of HCECs.
Methods: HCECs were cultured in DMEM-F12 supplemented with 20% fetal bovine serum (FBS). Confluent monolayer cultures were trypsinized and passaged using 20% FBS- or 10%, 20%, or 30% HAF-containing media. Cell proliferation and cell death ELISA assays were performed to assess the effect of HAF on cell growth and viability. The identity of cells cultured with 20% HAF were studied using immunocytochemistry (ICC) and Real-Time RT-PCR techniques for markers presenting specific characteristics of HCECs including Ki-67, Vimentin, Na/K-ATPase and ZO-1.
Results: Primary cultures of HCECs were successfully established under HAF-containing media which led to rapid cell proliferation according to cell proliferation and death ELISA assays. Real-Time PCR and ICC revealed that expression of Na/K-ATPase and ZO-1 in 20% HAF cell cultures was more compared to controls (20% FBS).
Conclusion: HAF containing medium exhibited an invaluable stimulatory effect on HCEC growth. It can be regarded as an enriched supplement in HCECs regeneration studies.

Keywords: Human Corneal Endothelial Cells, Human Amniotic Fluid, Invitro Culture

- Bina J Ophthalmol 2014; 19 (3): 222-233. **Received:** 12 June 2013 **Accepted:** 23 October 2013

کشت سلول‌های اندوتلیال قرنیه انسانی در محیط آزمایشگاه با استفاده از مایع آمنیوتیک انسانی

دکتر سپهر فیضی[1*]، دکتر زهراسهیلا سهیلی[2]، ابوذر باقری[3]، سحر بالاقلی[4]، دکتر سایه کریمی اول[5]

هدف: ارزیابی اثر مایع آمنیوتیک انسانی (Human Amniotic Fluid; HAF) بر روی رشد سلول‌های اندوتلیال قرنیه انسانی (Human Corneal Endothelial Cells; HCECs) و هم‌چنین تعریف محیط کشت برای رشد این سلول‌ها.
روش پژوهش: سلول‌های آندوتلیوم در محیط DMEM-F۱۲ که با سرم جنین گاوی ۲۰ درصد غنی شده بود کشت داده شدند. پس از اشباع محیط کشت، سلول‌ها مورد درمان با تریپسین قرار گرفته و به محیط کشت حاوی سرم جنین گاوی ۲۰ درصد و مایع آمنیوتیک انسانی ۱۰، ۲۰ و ۳۰ درصد منتقل شدند. HAF از زنان باردار در سه ماهه اول بارداری گرفته شد. جهت ارزیابی اثر HAF بر روی رشد و توانایی زیستی سلول، از روش ELISA برای بررسی تکثیر و مرگ سلولی استفاده شد. ماهیت سلول‌های کشت داده شده در محیط حاوی مایع آمنیوتیک ۲۰ درصد با استفاده از روش‌های ایمونوسیتوشیمی و Real time PCR جهت نشانگرهای ویژه HCECs شامل Ki-۶۷، Vimentin، Na/K-ATPase، و ZO-۱ بررسی شد.
یافته‌ها: کشت‌های اولیه در محیط حاوی مایع آمنیوتیک منجر به رشد و تکثیر سلول‌های آندوتلیوم در ۹۵/۸ درصد موارد گردید. Real time PCR و ایمونوسیتوشیمی نشان داد که نشانگرهای Na/K-ATPase و ZO-۱ که ویژه HCECs می‌باشند در سلول‌های کشت شده در محیط حاوی مایع آمنیوتیک ۲۰ درصد، بیش‌تر از محیط شاهد (حاوی سرم جنین گاوی) بیان می‌شود. آزمایش ایمونوسیتوشیمی روی سلول‌های اندوتلیال کشت داده شده با HAF ۲۰ درصد، افزایش بیش‌تری را در بیان نشانگرهای مذکور در مقایسه با محیط‌های حاوی غلظت‌های ۱۰ درصد و ۳۰ درصد HAF نشان داد. تعداد سلول‌های اندوتلیال

www.SID.ir
Archive of SID

کشت داده شده در HAF ۲۰ درصد که نشانگرها را بروز می‌دادند برای شاخص‌های Na/K-ATPase، ZO-۱، Vimentin به ترتیب ۹۸ درصد، ۹۵ درصد، و ۱۰۰ درصد بود. بیش از ۸۰ درصد سلول‌ها، Ki-۶۷ را بروز می‌دادند که نشان می‌دهد سلول‌ها ظرفیت تکثیر خود را حفظ کرده‌اند. میزان افزایش شاخص‌های Na/K-ATPase، ZO-۱، Vimentin به ترتیب ۵ برابر (P=۰/۰۰۳)، ۳/۵ برابر (P=۰/۰۰۱) و ۳ برابر (P=۰/۰۳) در محیط حاوی HAF ۲۰ درصد در مقایسه با محیط شاهد بود. Real time PCR افزایش ۴۰۰ برابری (P=۰/۰۰۸) در بیان ژن Na/K-ATPase و افزایش ۵۰۰ برابری (P=۰/۰۱) در بیان ژن ZO-۱ در محیط حاوی HAF ۲۰ درصد در مقایسه با محیط شاهد نشان داد.

نتیجه‌گیری: محیط حاوی HAF ۲۰ درصد به طور مشخصی باعث افزایش توانایی تکثیر سلول‌های آندوتلیال قرنیه انسان می‌شود ولی مشخصات مورفولوژی و آنتی‌ژنیک آن‌ها را حفظ می‌نماید. بنابراین HAF می‌تواند به عنوان یک مکمل غنی در مطالعات تکثیر HCECs در نظر گرفته شود.

• مجله چشم‌پزشکی بینا ۱۳۹۳؛ دوره ۱۹، شماره ۳: ۲۳۳-۲۲۲.

• **پاسخ‌گو:** دکتر سپهر فیضی (e-mail: sepehrfeizi@yahoo.com)
۱- استادیار- چشم‌پزشک- دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
۲- دکترای ژنتیک- موسسه ملی مهندسی ژنتیک و فن‌آوری زیستی
۳- دانشجوی دکترای حرفه‌ای ژنتیک پزشکی- مرکز تحقیقات چشم- دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
۴- دانشجوی دکترای حرفه‌ای هماتولوژی- مرکز تحقیقات چشم- دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
۵- چشم‌پزشک- مرکز تحقیقات چشم- دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
تهران- پاسداران- بوستان نهم- خیابان پایدارفرد (خیابان امیر ابراهیمی)- پلاک ۲۳- مرکز تحقیقات چشم

دریافت مقاله: ۲۲ خرداد ۱۳۹۲
تایید مقاله: ۱ آبان ۱۳۹۲

مقدمه

سلول‌های اندوتلیال قرنیه انسان (Human Corneal Endothelial Cells; HCEC$_S$) مسوول پمپ مایع از استرومای قرنیه به مایع زلالیه می‌باشند. بنابراین محتوای مایع استرومای قرنیه و در نتیجه ضخامت و شفافیت آن را تنظیم می‌کنند[۱]. تعداد HCECs با افزایش سن و بیماری‌های گوناگون از قبیل بولوس کراتوپاتی و دیستروفی اندوتلیال فوکس کاهش می‌یابد. این کاهش توسط مهاجرت و بزرگ شدن سلول‌های مجاور جبران می‌شود ولی تکثیر بارز سلولی صورت نمی‌گیرد[۲].

پیوند قرنیه برای اختلال عملکرد اندوتلیوم قرنیه طی دهه اخیر از پیوند نافذ (Penetrating Keratoplasty; PK) به سمت روش‌های اختصاصی‌تر شامل کراتوپلاستی لایه‌ای خلفی تغییر کرده است[۳]. امروزه روش Descemet Stripping Endothelial Keratoplasty (DSEK) به عنوان روش درمانی مناسب در اختلال عملکرد اندوتلیوم به طور وسیعی مورد استفاده قرار می‌گیرد.

این روش‌ها وابسته به دسترسی به بافت قرنیه مناسب می‌باشد. به علاوه هدف اصلی کراتوپلاستی انتخابی که تنها جایگزینی بافت غیرطبیعی توسط بافت طبیعی است، به طور کامل توسط DSEK تامین نمی‌شود زیرا ضخامت قرنیه دهنده در این روش پیوند، ۱۵۰ میکرون بوده و حاوی سلول‌های اندوتلیال و غشا دسمه و استرومای خلفی دهنده است.

سلول‌های اندوتلیال قرنیه انسان در شرایط Invivo تکثیر ندارند، زیرا سیکل سلولی در فاز G۱ متوقف شده است. با این حال این سلول‌ها در شرایط مناسب کشت در Invitro خاصیت تکثیر نشان داده‌اند. در چندین مطالعه اثبات شده که اگر عوامل رشد به محیط کشت اضافه شده و عوامل مهار کننده حذف شوند، سلول‌های اندوتلیال قرنیه انسان می‌توانند تکثیر یابند[۴و۸].

در گذشته روش‌ها و محیط‌های مختلفی به کار گرفته شده و عوامل رشد از قبیل: EGF (عامل رشد اپی‌تلیالی)، FGF (عامل رشد فیبروبلاستی)، NGF (عامل رشد عصبی)، و BPE (عصاره هیپوفیز گاو) مورد استفاده قرار گرفته‌اند[۲].

مایع آمنیوتیک انسانی (Human Amniotic Fluid; HAF) غنی از عوامل رشد مختلف و مواد مغذی می‌باشد و گزارش‌های مختلف حاکی از آن است که HAF برای تکثیر سلول جنینی و تمایز آن‌ها ضروری است[۹و۱۰]. هم‌چنین HAF در تکامل سلول‌های بنیادی شبکیه از Retinal Pigment Epithelium (RPE) مؤثر است[۱۰]. هدف از این مطالعه، بررسی اثر HAF افزوده شده به محیط کشت برای جداسازی و کشت سلول‌های اندوتلیال قرنیه انسانی است.

روش پژوهش

آماده‌سازی بافت

نود و شش قرنیه از ۷۵ فرد اهداکننده با سن ۶±۳۵ (۵۱-۵)

Archive of SID
www.SID.ir

سال مورد استفاده قرار گرفت. از این گروه، در ۹۵/۸ درصد به طور موفقیت‌آمیزی کشت سلولی انجام شد. همه قرنیه‌های اهدایی از بانک چشم جمهوری اسلامی ایران تهیه و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در مایع Optisol-GS نگه‌داری شدند و در مدت یک هفته مورد استفاده قرار گرفتند. در همه موارد تعداد تراکم سلول‌های اندوتلیال بیش از $2500\ cell/mm^2$ بود ولی قرنیه‌ها برای استفاده بالینی به دلایل مختلف مانند کدورت استرومای قرنیه مناسب نبودند. این مطالعه توسط کمیته اخلاق مرکز تحقیقات چشم دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی مورد تایید قرار گرفت.

قرنیه جهت جداسازی سلول‌های آندوتلیوم به یک ظرف پلاستیکی به صورتی که اپی‌تلیوم به سمت پایین قرار داشت منتقل شد. سپس زیر میکروسکوپ اتاق عمل و در شرایط استریل، یک سوزن شماره ۲۷ متصل به سرنگ ۵ cc و Bevel up به داخل استروما و زیر دسمه تا مرکز قرنیه وارد گردید. محلول Balanced Salt Solution به آرامی تزریق شد تا دسمه همراه با سلول‌های اندوتلیال از استروما جدا شوند. سعی می‌شد که جدا شدن دسمه تا خط شوالب و به صورت ۳۶۰ درجه گسترش یابد. نمونه در محلول Phosphate Buffered Saline (PBS) قرار داده شد و به آزمایشگاه منتقل گردید. فاصله زمانی از برداشتن نمونه تا کشت ۱۰ دقیقه بود.

آماده‌سازی مایع آمنیوتیک

نمونه‌های مایع آمنیوتیک از خانم‌های باردار که در سه ماهه اول مورد آمنیوسنتز و آزمایش کاریوتیپ جهت بررسی نقایص ژنتیکی قرار گرفته بودند، تهیه شد. مایع باقی‌مانده در مواردی که ناهنجاری‌های کروموزومی وجود نداشت جمع‌آوری شده و در مطالعه مورد استفاده قرار گرفت. جمع‌آوری نمونه‌ها به تایید کمیته اخلاق مؤسسه ملی مهندسی ژنتیک و بیوتکنولوژی ایران و مرکز تحقیقات چشم دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی رسید.

نمونه‌های مایع آمنیوتیک در دور g× ۳۰۰ به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شدند و مایع سطح بالاتر به وسیله فیلتر غشایی ۰/۲ میکرومتری (Orange Scientific, Belgium) استریل شد و در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان مطالعه نگه‌داری شد.

کشت سلولی

غشا دسمه جدا شده و سلول‌های اندوتلیال با ۳/۵ mg/ml کلاژناز A به مدت ۵۰ دقیقه در انکوباتور قرار داده شد و پس از آن در محیط DMEM/F۱۲ به نسبت ۱ به ۱ غنی شده با سه غلظت متفاوت (۳۰، ۲۰ و ۱۰ درصد) از مایع آمنیوتیک، ۱۲۰ µg/ml پنی‌سیلین و ۲۲۰ µg/ml استرپتومایسین در ظرف ۶ چاهکی که با کلاژن تیپ ۴ با غلظت ۲۰ µg/ml پوشیده شده بود کشت داده شد. ظرف‌ها در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه با هوای مرطوب و ۵ درصد دی‌اکسید کربن قرار گرفتند.

محیط‌های کشت ابتدا در روز هفتم و سپس هر ۶ روز تعویض شدند. به منظور حفظ عوامل رشد ترشح شده، محیط‌ها به طور ناکامل تعویض شدند.

سلول‌های کشت داده شده بعد از رسیدن به اشباع ۸۰ درصد محیط کشت، تحت تاثیر تریپسین EDTA قرار گرفتند. سلول‌های درمان شده به آرامی با دور g× ۳۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شدند و مایع سطح بالاتر دور ریخته شد و رسوبات باقی‌مانده در محیط کامل و غنی شده با HAF ۱۰، ۲۰ یا ۳۰ درصد قرار داده شده و دوباره در ظرف‌های جدید کشت داده شدند. نمونه‌های شاهد در همین شرایط تهیه و در انکوباسیون قرار گرفتند اما به جای HAF با سرم جنین گاوی ۲۰ درصد غنی گردیدند. ابتدا تاثیر غلظت‌های ۵، ۱۰ و ۲۰ درصد سرم جنین گاوی بر روی کشت سلولی بررسی شد که غلظت ۲۰ درصد بهترین نتیجه را در تکثیر سلول‌های آندوتلیومی ایجاد نمود. بنابراین در این مطالعه غلظت ۲۰ درصد سرم جنین گاوی مورد استفاده قرار گرفت.

خالص‌سازی سلول‌های اندوتلیال

در صورت مشاهده سلول‌های دوکی شکلی که دلالت بر آلودگی با کراتوسیت‌های استروما می‌کنند، کلونی‌های اندوتلیالی با استفاده از اسکراپ سلولی جدا شده و به یک ظرف ۶ چاهکی جدید منتقل شدند. این روند در صورت نیاز تکرار می‌شد تا هیچ کراتوسیتی در ظرف‌های کشت مشاهده نشود.

شناسایی سلول‌ها

سلول‌های اندوتلیال کشت داده شده بر اساس مشخصات ظاهری و نشانگرهای مولکولی تشخیص داده شدند. ظاهر ۶ وجهی (Slab Stone) که یکی از ویژگی‌های سلول‌های اندوتلیال قرنیه انسان می‌باشد، می‌توانند این سلول‌ها را از فیبروبلاست‌های استرومای قرنیه که ظاهر طویل و دوکی شکل دارند افتراق دهد. وقتی محیط کشت به میزان مناسب از سلول پر شد، سلول‌ها با تریپسین درمان شدند تا اتصالات بین آن‌ها از بین رفته و سلول‌ها از هم جدا شوند. سپس سلول‌های جدا شده در یک ظرف ۲۴ چاهکی کشت داده شدند و نشان‌گرهای مولکولی شامل: Ki-۶۷،

www.SID.ir
Archive of SID

Na/k-ATPase، Vimentin و ZO-۱ توسط روش ایمونوسیتوشیمی (ICC) مشخص شدند. به علاوه تمام RNA با استفاده از کیت cDNA سنتاز استخراج و به صورت معکوس رونویسی شده و به وسیله Real time PCR تکثیر شد.

بررسی تکثیر و مرگ سلولی با روش ELISA

سلول‌های اندوتلیال قرنیه انسان در ظرف‌های ۹۶ چاهکی به تعداد ۵۰۰۰ سلول در هر چاهک در۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت کامل و در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با هوای مرطوب و دی‌اکسیدکربن ۵ درصد قرار گرفت. در روز هفتم محیط کشت تعویض شد و سلول‌ها در ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت تازه بدون سرم و حاوی غلظت‌های ذکر شده مایع آمنیوتیک انسان قرار داده شدند. برای تعیین این که آیا مایع آمنیوتیک انسانی تکثیر سلولی را تغییر می‌دهد Bromodeoxyuridine (BrdU) بعد از ۶ روز از تعویض محیط کشت اضافه شد و ارزیابی تکثیر طبق دستور سازنده انجام شد. برای بررسی مرگ سلولی با ELISA از کیت مرگ سلولی طبق دستور سازنده استفاده گردید.

ایمونوسیتوشیمی

سلول‌های حاصل از پاساژ سوم در ظرف‌های ۲۴ چاهکی به تعداد ۵۰۰۰ سلول در هر چاهک ابتدا توسط متانول ۱۰- درجه سانتی‌گراد برای مدت ۱۰ دقیقه تثبیت شدند. سلول‌ها به وسیله Triton X -۱۰۰ با غلظت ۰/۲۵ درصد نفوذپذیر شدند و به وسیله آلبومین سرم گاوی ۱ درصد (BSA) در PBS برای مدت ۱ ساعت در دمای اتاق بلوک شدند. آنتی‌بادی اولیه پلی‌کلونال ضدانسانی خرگوش (۲۰۰: ۱-۱۰۰: ۱) برای شناسایی Ki-۶۷، Vimentin، Na/K-ATPase و ZO-۱ استفاده شد.

آنتی‌بادی ثانویه کونژوگه با ایزوتیوسیانات فلوئورسئین (FITC) علیه آنتی‌بادی‌های مذکور به نسبت (۲۰۰-۱) رقیق شده و برای شناسایی واکنش ایمنی نسبت به آنتی‌بادی‌های اولیه استفاده شد.

بعد از شستشوی نهایی، اسلایدها با Mounting Medium حاوی 6-diamidino-2-pheyindole Dihydrochloride (DAPI) و ۴ با غلظت ۱/۵ mg/ml به مدت ۱۰ دقیقه به منظور رنگ‌آمیزی متضاد زنجیره‌های DNA انکوبه شدند.

اسلایدها با میکروسکوپ فلورسانس مجهز به فیلتر ۴۶۰ nm برای رنگ‌آمیزی DAPI و فیلتر ۵۲۰ nm برای آنتی‌بادی‌های کونژوگه FITC مشاهده شدند. جهت ارزیابی اختصاصی بودن آزمایش‌های فوق، برای هر نشانگر یک شاهد منفی در نظر گرفته شد که شامل تمام مراحل و مواد ذکر شده به جز آنتی‌بادی اولیه بود.

Real Time PCR

همه RNA از سلول‌های کشت داده شده به وسیله QIAzolLysis Reagent استخراج شد. غلظت و خلوص RNA جدا شده به وسیله NanoDrop معین شد و تمامیت و یکپارچگی RNA به وسیله الکتروفورز در ژل آگاروز و سپس رنگ‌آمیزی Ethidium Bromide تایید شد.

واکنش ترجمه معکوس به وسیله پرایمرهایOligodT و یک کیت ترانس‌کریپتاز معکوس Superscript صورت گرفت. سپس RT-RCT به وسیله کیت Quantifast SYBRGreen PCR انجام شد. برای انجام PCR پرایمرهای خاص شامل Ki-۶۷، Vimentin، Na/k-ATPase، ZO-۱ و GAPDH به عنوان کنترل ژن‌های Housekeeping استفاده شد. مشخصات پرایمرهای استفاده شده به شرح زیر می‌باشد:

Ki -۶۷ (Qiagen, Germany, QT00014203)
Vimentin (Qiagen, Germany, QT00095795)
Na/K-ATPase (Qiagen, Germany, QT00059808)
ZO-1 (Qiagen, Germany, QT00077308)
GAPDH (QIAGEN, Germany, QT01192646)

متغیرهای PCR شامل دناچوره شدن اولیه (۱ سیکل در ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه) ، دناچوره شدن، سردسازی و تبسیط (به ترتیب ۴۰ سیکل در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ ثانیه و ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه) منحنی ذوب شدن، ۷۲ درجه سانتی‌گراد با دمای تدریجی افزایش یابنده ۰/۵ درجه سانتی‌گراد تا ۹۵ درجه سانتی‌گراد بود.

تحلیل آماری

برای تحلیل آماری از برنامه SPSS ویرایش ۱۷ استفاده شد. نتایج اولیه مطالعه شامل شکل سلول‌های آندوتلیوم، میزان تراکم و تکثیر این سلول‌ها و هم‌چنین نشانگرهای سلولی بود. مورفولوژی سلولی به روش کیفی ارزیابی و بین گروه‌های مختلف مقایسه شد. بررسی تفاوت در توانایی تکثیر، بیان نشانگرهای مختلف و تراکم سلولی بین گروه مورد و شاهد با استفاده از آزمون T مستقل صورت گرفت. P کم‌تر از ۰/۰۵ از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

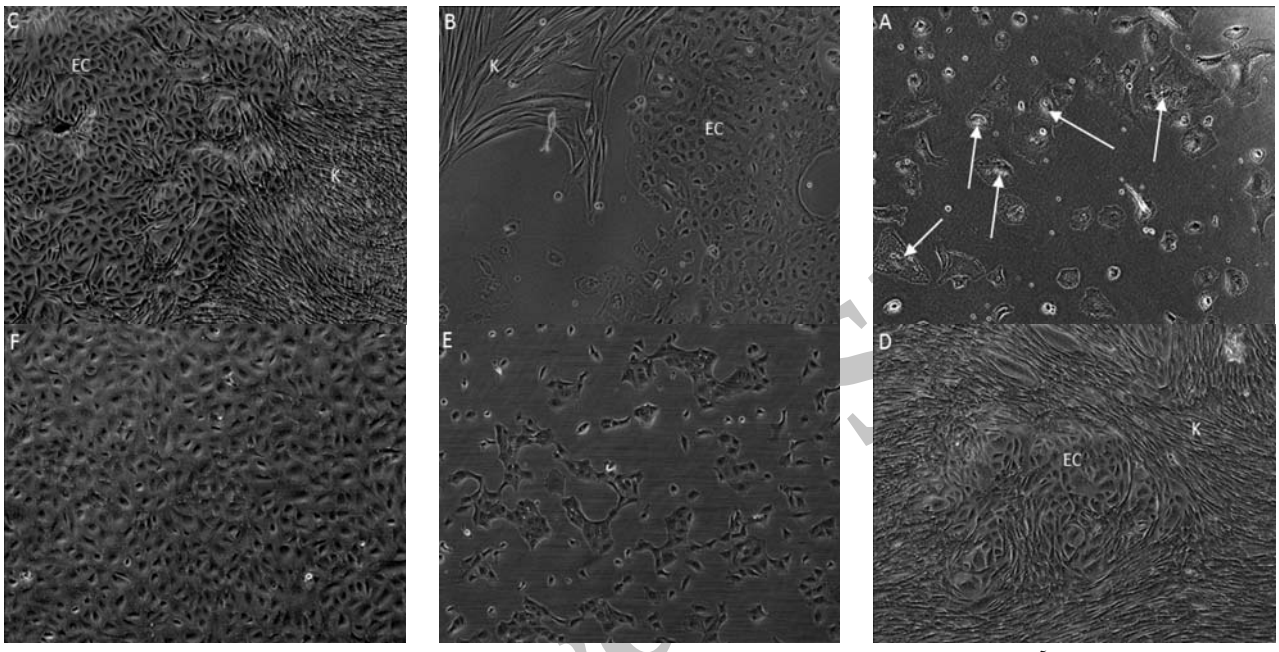
یافته‌ها

خالص‌سازی و مورفولوژی سلول اندوتلیوم

سلول‌های اندوتلیوم قرنیه انسان در محیط کشت حاوی مایع آمنیوتیک انسانی شکل خود را حفظ کردند اما پس از ۴ مرتبه

www.SID.ir

پاساژ، وزیکول‌هایی شروع به رشد کردند و سلول‌ها پهن شده و بعد از چند هفته از بین رفتند (تصویر ۱-A). در کشت اول میزان آلودگی با کراتوسیت‌ها ۱۰ درصد بود (تصویر ۱-B تا ۱-D). با این حال پس از چند بار کشت و با استفاده از جدا کننده سلولی (یک وسیله مکانیکی که به کمک آن می‌توان کلونی‌های سلولی را جدا و به محیطی دیگر منتقل نمود) دیگر کراتوسیت مشاهده نگردید (تصویر ۱- E و ۱- F).



تصویر ۱- کشت سلول‌های آندوتلیوم قرنیه انسان در پاساژهای مختلف قبل و پس از خالص‌سازی. A) ایجاد وزیکول داخل سلول پس از پاساژ چهارم (پیکان) . B) آلودگی محیط کشت سلول‌های آندوتلیوم (EC) با کراتوسیت (K). C) آلودگی محیط کشت با کراتوسیت در پاساژ دوم و سوم (D و E) جداسازی سلول‌های آندوتلیوم از کراتوسیت‌ها به وسیله جداکننده سلولی در محیط کشت اولیه. F) رسیدن به اشباع ۱۰۰ درصد محیط کشت توسط سلول‌های آندوتلیوم پس از خالص‌سازی. (بزرگ‌نمایی ۲۰۰ برابر)

سلول‌هایی که در محیط کشت حاوی مایع آمنیوتیک انسانی ۲۰ درصد رشد کردند، در مقایسه با سلول‌هایی که در مایع آمنیوتیک ۱۰ درصد یا ۳۰ درصد یا FBS رشد کردند شکل یکنواخت‌تر، شباهت بیش‌تر به سلول‌های اندوتلیال ۶ وجهی در محیط زنده و تراکم بیش‌تری داشته و زودتر به حجم انبوه رسیدند (تصویر ۲).

بررسی تکثیر و مرگ سلول‌های اندوتلیوم قرنیه انسان توسط ELISA

آزمایش ELISA نشان داد مایع آمنیوتیک انسان هیچ اثر زیان‌آور روی سلول‌های اندوتلیوم قرنیه ندارد و در مقایسه با محیط کشت شاهد حاوی FBS باعث تکثیر سلولی می‌شود. حداکثر تاثیر با مایع آمنیوتیک ۲۰ درصد مشاهده شد (تصویر ۳) که در مقایسه با محیط شاهد منجر به افزایش ۱/۵ تا ۲ برابری در تکثیر سلول‌های آندوتلیومی گردید (P<۰/۰۳).

ICC

ICC نشان داد که Na/K-ATPase، Vimentin، Ki-۶۷ و ZO-۱ در سلول‌های جدا شده بیان شدند (تصویر ۴). این یافته نشان داد که سلول‌های کشت یافته مانند سلول‌های آندوتلیوم انسانی قابلیت تشکیل پیوند بین سلولی و انتقال غشایی را داشتند. این موضوع وجود سلول‌های اندوتلیال قرنیه را تایید می‌کند.

آزمایش ایمونوسیتوشیمی سلول‌های اندوتلیال کشت داده شده با HAF ۲۰ درصد در مقایسه با محیط شاهد، افزایش بیش‌تر در بیان نشانگرهای Na/K-ATPase، ZO-۱، Vimentin به ترتیب ۵ برابر (P=۰/۰۰۳)، ۳/۵ برابر (P=۰/۰۰۱) و ۳ برابر (P=۰/۰۳) را نشان داد (تصویر ۵). با این وجود تفاوت معناداری در تعداد سلول‌های مثبت برای Ki-۶۷ کشت داده شده در دو محیط دیده نشد (P>۰/۰۵). تعداد سلول‌های اندوتلیال کشت داده شده در HAF ۲۰ درصد که نشانگرها را بروز می‌دادند به قرار زیر است:

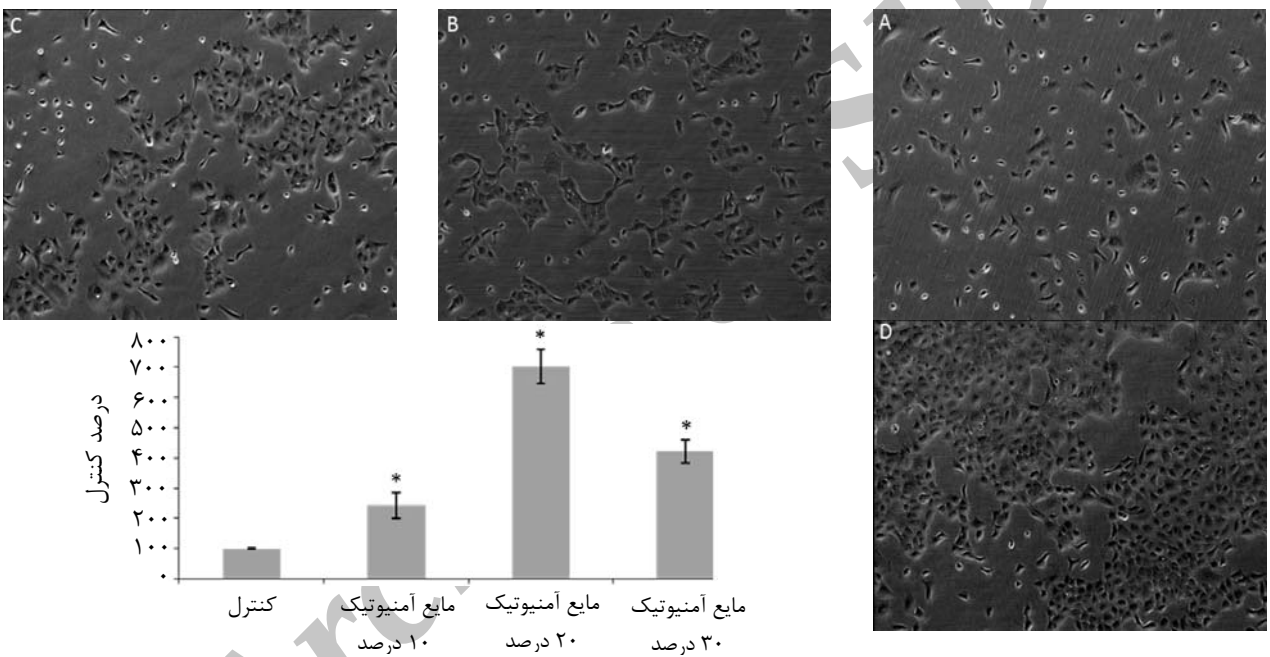
- بیش از ۹۸ درصد سلول‌ها برای Vimentin مثبت بودند.

www.SID.ir

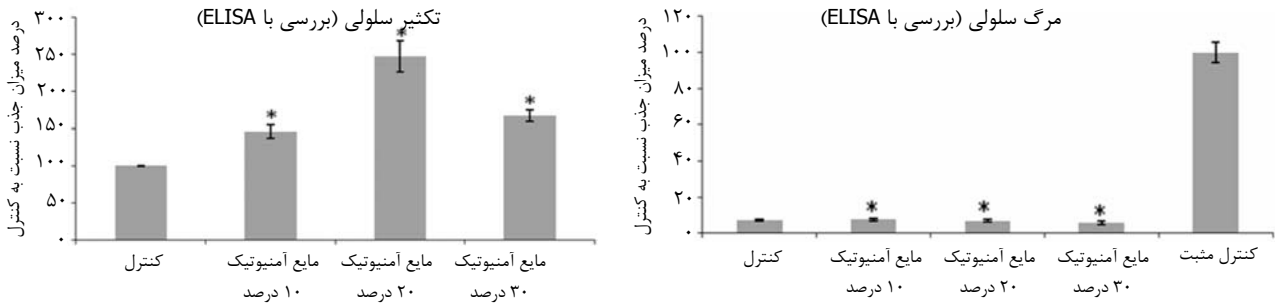
- بیش از ۹۵ درصد، ZO-۱ بروز دادند.
- ۱۰۰ درصد سلول‌ها برای Na/K-ATPase مثبت بودند که بیان‌کننده این است که سلول‌های کشت داده شده در HAF ۲۰ درصد ویژگی‌های اصلی سلول‌های اندوتلیال قرنیه را حفظ کردند.
- بیش از ۸۰ درصد سلول‌ها، Ki-۶۷ را بروز می‌دادند که نشان می‌دهد سلول‌ها ظرفیت تکثیر خود را حفظ کرده‌اند.

تحلیل واکنش RT-PCR

- RT-PCR نشانگرهای سلولی اندوتلیال قرنیه را در سطح رونویسی تایید کرد و افزایش بروز ژن Na/K-ATPase و ZO-1در محیط کشت حاوی مایع آمنیوتیک ۲۰ درصد را نشان داد (تصویر ۶). در مقایسه با محیط شاهد، افزایش ۴۰۰ برابری در بیان ژن Na/K-ATPase (P=۰/۰۰۸) و افزایش ۵۰۰ برابری در بیان ژن ZO-۱ (P=۰/۰۱) در محیط حاوی HAF ۲۰ درصد مشاهده شد. با این حال تفاوت معناداری در بیان ژن Ki-۶۷ و Vimentin بین محیط کشت حاوی HAF ۲۰ درصد و محیط کنترل مشاهده نشد (P>۰/۰۵).

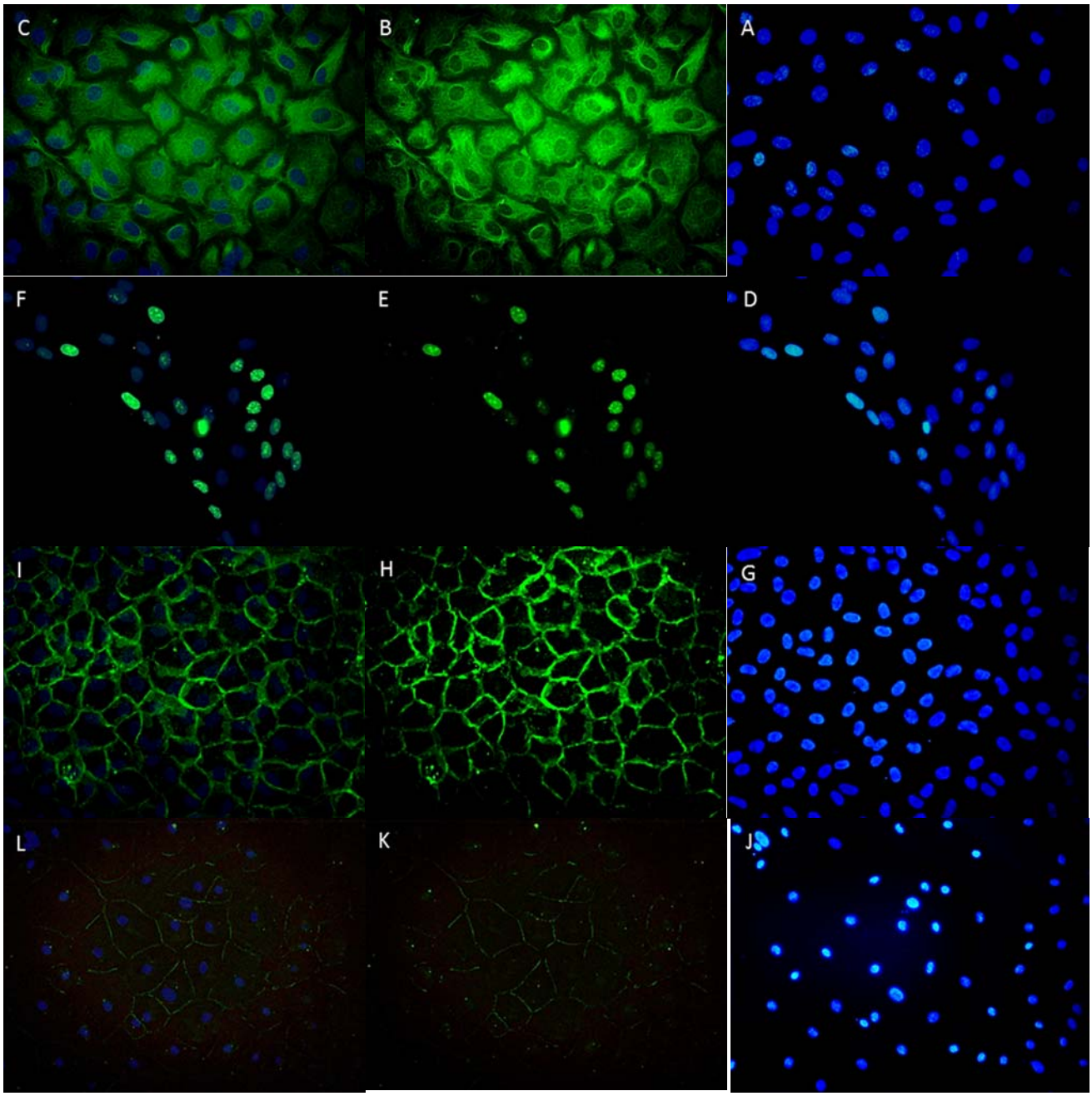


تصویر ۲- کشت سلول‌های آندوتلیوم قرنیه انسان در محیط کنترل و محیط با غلظت‌های مختلف مایع آمنیوتیک. A) کشت سلول‌های آندوتلیوم قرنیه انسان بدون مایع آمنیوتیک. B) کشت سلول‌های آندوتلیوم قرنیه انسان با مایع آمنیوتیک ۱۰ درصد. C) کشت سلول‌های آندوتلیوم قرنیه انسان با مایع آمنیوتیک ۳۰ درصد. D) کشت سلول‌های آندوتلیوم قرنیه انسان با مایع آمنیوتیک ۲۰ درصد. E) تعداد سلول‌های آندوتلیوم قرنیه انسان پس از چهار هفته درمان با مایع آمنیوتیک ۱۰، ۲۰ و ۳۰ درصد و هم‌چنین FBS ۲۰ درصد به عنوان شاهد. (بزرگ‌نمایی ۲۰۰ برابر)



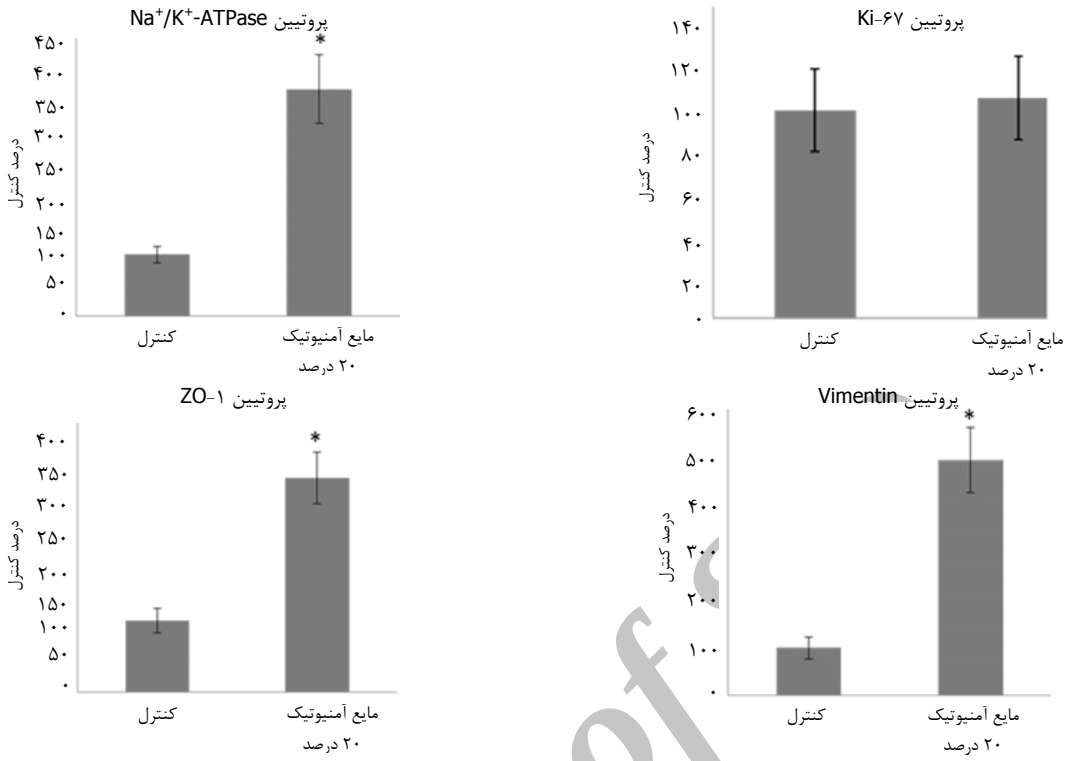
تصویر ۳- اثرات مضر و تکثیری مایع آمنیوتیک ۲۰ درصد بر روی سلول‌های آندوتلیوم قرنیه انسان. مایع آمنیوتیک فاقد اثرات مضر بر روی سلول‌های آندوتلیوم قرنیه انسان بوده و در مقایسه با محیط شاهد باعث افزایش تکثیر سلولی می‌گردد.

www.SID.ir

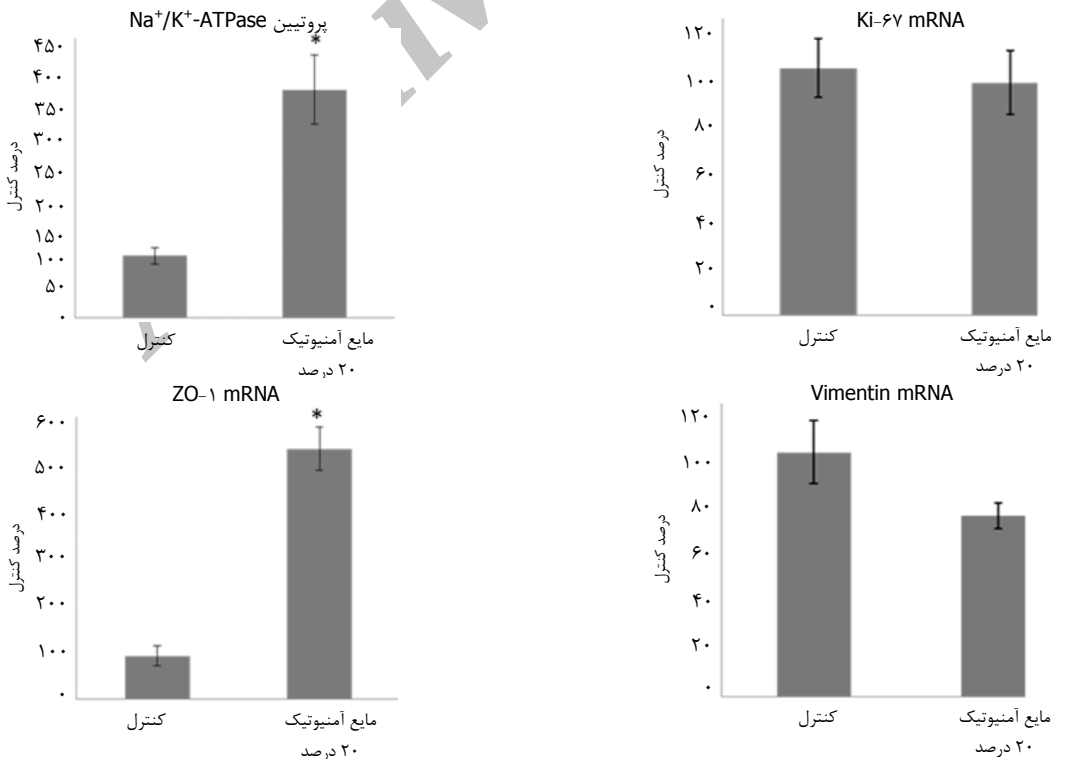


تصویر ۴- ایمونوسیستوشیمی برای بیانگرهای مختلف سلول‌های آندوتلیوم انسان شامل Ki-۶۷، Vimentin، Na+/K+ATPase، و ZO-1. A) هسته سلول‌ها با استفاده از DAPI به رنگ آبی گرفته‌اند. B) سلول‌ها در رنگ‌آمیزی با آنتی‌بادی کونژوگه با FITC علیه Vimentin رنگ سبز گرفته‌اند. C) ادغام تصاویر (A) و (B) به کمک نرم‌افزار کامپیوتری. D) DAPI هسته سلول را آبی و آنتی‌بادی علیه Ki-۶۷ سلول را به رنگ سبز (E) درآورده است. F) ادغام تصاویر (C) و (D) به کمک نرم افزار کامپیوتری. G) هسته سلول‌ها با استفاده از DAPI رنگ آبی گرفته‌اند. H) سلول‌ها در رنگ‌آمیزی با آنتی‌بادی کونژوگه با FITC علیه Na+/K+ATPase رنگ سبز گرفته‌اند. I) ادغام تصاویر (G) و (H) به کمک نرم‌افزار کامپیوتری. J) هسته سلول‌ها با استفاده از DAPI رنگ آبی گرفته‌اند. K) سلول‌ها در رنگ‌آمیزی با آنتی‌بادی کونژوگه با FITC علیه ZO-1 رنگ سبز گرفته‌اند. L) ادغام تصاویر (J) و (K) به کمک نرم‌افزار کامپیوتری (بزرگ‌نمایی ۴۰۰ برابر).

www.SID.ir



تصویر ۵- اثر مایع آمنیوتیک ۲۰ درصد بر روی تعداد سلول‌های مثبت برای نشانگرهای Ki-67، Vimentin، Na+/K+ATPase، و ZO-1 در بررسی ایمونوسیستوشیمی. تعداد سلول‌های مثبت برای نشانگرهای Vimentin، Na+/K+ATPase، و ZO-1 در حضور مایع آمنیوتیک افزایش می‌یابد در صورتی که Ki-67 تغییری نشان نمی‌دهد.



تصویر ۶- بررسی بیان ژن Ki-67، Vimentin، Na+/K+ATPase، و ZO-1 به کمک آزمایش RT-PCR در سلول‌های درمان شده با مایع آمنیوتیک ۲۰ درصد. مایع آمنیوتیک باعث افزایش بیان ژن Na+/K+ATPase، و ZO-1 شده ولی بی‌اثر بر بیان ژن Vimentin و Ki-۶۷ می‌باشد.

www.SID.ir

بحث

مطالعه اخیر اثر و غلظت مناسب مایع آمنیوتیک برای تکثیر سلول‌های اندوتلیال را مشخص نمود. سلول‌های اندوتلیال دارای ظرفیت تقسیم در محیط آزمایشگاهی می‌باشند ولی در محیط زنده (Invivo) فعالیت آن‌ها در فاز G1 متوقف می‌شود[۶-۸]. عدم حضور عوامل مثبت رشد و حضور عامل رشد Transforming (TGF- β۲) در مایع زلالیه که می‌تواند ورود به فاز S را متوقف کند بر وضعیت عدم تکثیر سلول‌های اندوتلیال قرنیه دلالت می‌کند[۱۳-۱۱].

بسیاری از محیط‌های کشت به وسیله عوامل متعددی از جمله سلول‌های اندوتلیال قرنیه گاو،[۱۴] سلول‌های بنیادی جنین موش[۱۵] و عوامل رشد مختلفی (EGF, NGF, b FGF)[۲و۱۶] جهت تقویت تکثیر سلولهای اندوتلیال قرنیه غنی شده‌اند.

محیط کشت حاوی FBS به عنوان یک محیط کشت قابل قبول برای تکثیر سلول‌های اپی‌تلیالی، استرومال و آندوتلیالی قرنیه استفاده شده است.[۱۷،۱۸] این محیط حاوی پروتئین، آمینواسید، چربی، تری‌گلیسرید، ویتامین، مواد معدنی غیرارگانیک، نمک‌ها و عوامل رشد می‌باشد که می‌تواند منجر به تکثیر سلول‌های قرنیه شود. نتایج مطالعه حاضر نشان داد این محیط می‌تواند از تکثیر سلول‌های اندوتلیوم قرنیه انسانی حمایت کند. با این حال ما مشاهده کردیم که اثر FBS بر روی رشد این سلول‌ها وابسته به زمان است و پس از یک هفته سلول‌های اندوتلیالی شروع به تغییر شکل کرده و سرعت رشدشان کاهش می‌یابد. این مشاهده تاییدکننده مطالعات قبلی می‌باشد که نشان دادند در صورت عدم افزودن عوامل رشد به محیط FBS این محیط نمی‌تواند از تکثیر سلول‌های اپی‌تلیال[۱۹] و اندوتلیال[۲۰] قرنیه حمایت کند. از دیدگاه نظری، یک روش کشت ایده‌آل و موثر باید شامل سه مرحله کلیدی به شرح زیر باشد:

جدا کردن سلول‌ها از قرنیه دهنده و سپس غشا دسمه، اتصال سلول‌ها به محیط کشت با سطوح پوشیده شده با مواد مختلف و سرانجام تکثیر سلول‌های جدا شده بر روی یک محیط مناسب. هم‌اکنون جهت جدا کردن سلول‌های اندوتلیال قرنیه از روش دو مرحله شامل جدا کردن غشا دسمه از استرومای روی آن و سپس آزاد کردن سلول‌های اندوتلیوم از DM به کمک آنزیم‌های مختلف شامل کلاژناز[۲۱]، دیسپاز[۲۲] و یا تریپسین/ EDTA[۱۶] استفاده می‌شود. در ابتدا ما از روش درمان آنزیمی به کمک تریپسین/ EDTA استفاده کردیم اما مشاهده نمودیم که سلول‌های حاصل شده به طور مناسبی تکثیر نمی‌یابد. از آنجایی که زمان انکوبه شدن سلول‌ها با تریپسین طولانی است، جداسازی به کمک این آنزیم منجر به دژنره شدن سلول‌ها می‌گردد[۲۳].

با توجه به این واقعیت که ماتریکس خارج سلولی احاطه کننده اندوتلیوم عمدتاً از کلاژن نوع IV می‌باشد[۲۴و۲۵]، در مطالعه ما روش درمان آنزیمی به استفاده از کلاژناز تغییر یافت و مشاهده شد که این روش به طور موثر سلول‌های اندوتلیوم را از غشا دسمه جدا می‌کند. این یافته منطبق با مشاهده انجام شده توسط سایر محققین می‌باشد[۱۶،۲۶و۲۷]. با این وجود، پس از آن که تجمع سلول‌های اندوتلیوم به کمک کلاژناز نوع IV حاصل شد از درمان کوتاه‌مدت با تریپسین/ EDTA در محیط‌های کشت بعدی جهت حذف مهار میتوزی و ایجاد یک لایه تک‌سلولی استفاده گردید[۱۶].

بسیاری از محققان جهت بهبود شرایط رشد سلول‌های اندوتلیال قرنیه با حفظ مورفولوژی ذاتی و عملکردی خود تلاش نموده‌اند. Ishino و همکاران[۲۲] پس از جداکردن اندوتلیوم از محیط قرنیه دهنده، سلول‌های آندوتلیوم را به کمک دیسپاز جدا نموده و بر روی محیط کشت پوشیده شده یا کلاژن نوع IV کشت دادند. ایشان با استفاده از محیط DMEM حاوی سرم جنین گاوی ۱۰ درصد و عامل رشد فیبروبلاست پایه ۲ µg/ml توانستند یک لایه تک سلولی اشباع از آندوتلیوم انسانی در پاساژ پنجم را استخراج نمایند.

Li و همکاران[۱۶] سلول‌های آندوتلیوم انسان را از محیط قرنیه دهنده جدا کردند و نشان دادند که تجمعات سلولی جدا شده در محیط بدون سرم و حاوی کلسیم زیاد برای سه هفته قابل کشت می‌باشند. سپس آن‌ها از محیطی که به طور معمول برای رشد سلول‌های اپی‌تلیالی به کار می‌رود استفاده کردند تا سلول‌های آندوتلیال انسانی را بر روی ظرف‌های پلاستیکی گسترش دهند. ایشان هم‌چنین مشاهده کردند که افزودن عصاره غده هیپوفیز گاوی و یا عامل رشد فیبروبلاستی پایه به محیط مذکور منجر به تغییر بارز شکل سلولی و کاهش رنگ گرفتن هسته با Ki۶۷ می‌شود.

Zhu و Joyce[۲۸] اثر عوامل افزایش دهنده رشد متعددی را بر روی تکثیر سلول‌های آندوتلیوم قرنیه انسانی بدست آمده از دهندگان جوان و مسن بررسی کردند. صرف نظر از سن دهنده، عامل رشد عصب، تکثیر سلولی بالاتر از میزان پایه را القا نکرد. عامل رشد اپی‌تلیالی به طور متوسط تکثیر سلولی در سلول‌های حاصل شده از دهندگان جوان را القا کرد. هم‌چنین عامل رشد حاصل از پلاکت (PDGF) و عصاره غده هیپوفیز به طور متوسط و معمولاً بالاتر از میزان القا شده توسط عامل رشد اپی‌تلیالی تکثیر

www.SID.ir
Archive of SID

سلولی را تحریک کرد. ترکیبی از عصاره هیپوفیز و عامل رشد مشتق از پلاکت یک اثر تجمعی داشته و به طور بارز بیش‌تر از تک تک عوامل، تکثیر سلولی را القا کردند. در مطالعه مذکور صرف‌نظر از سن اهداکننده، FBS به تنهایی و یا در ترکیب با عامل رشد اپی‌تلیالی، عامل رشد عصبی و عصاره غده هیپوفیز بیشترین رشد را القا کرد.

Engelmann و Friedl[29] ۲۰ محیط مغذی، سرم‌های مختلف و ۶ میتوژن را از نظر توانایی در تأثیرگذاری بر روی رشد کلنی و شکل سلول‌های اندوتلیوم قرنیه بررسی کردند. ایشان مشاهده کردند مخلوط دو محیط M۱۹۹ و Hamis F۱۲ به نسبت ۱ به ۱ مؤثرترین محیط کشت پایه در رشد کلونی‌های اندوتلیوم انسانی می‌باشد. در میان سرم‌های مختلف، سرم انسانی و سرم جنین گاوی فعالیت تکثیری مناسبی در ترکیب با محیط پایه مذکور داشت. در حالی که سرم نوزاد گاوی از نظر تکامل مورفولوژی اندوتلیوم قرنیه ارجحیت بیش‌تری داشت.

Peh و همکاران[20] چهار محیط کشت که در مطالعات فوق استفاده شده بودند را از نظر توانائی جداسازی و تکثیر سلول‌های قرنیه به دست آمده از یک تعداد قرنیه دهنده جفت مقایسه کردند. ایشان دریافتند که در هر چهار محیط وقتی ظروف با FNC پوشیده شوند، سلول‌ها به طور مناسبی اتصال می‌یابند. محیط کشت توصیف شده توسط Ishino و همکاران[22] و Li و همکاران[16] نتوانست منجر به گسترش سلولی به ترتیب پس از پاساژ اول و دوم شود. سلول‌های آندوتلیوم کشت یافته در محیط توصیف شده توسط Zhu و Joyce[28] و هم‌چنین Engelmann و Friedl[29] به طور بارزی تکثیر و عرضه شاخص‌های اندوتلیوم قرنیه انسانی بیش‌تری را نشان دادند. اگرچه مشخصات منحصر بفرد مورفولوژی سلول‌های قرنیه انسانی کشت داده شده در این دو محیط پس از سه پاساژ دیگر حفظ نشد.

Nakahara و همکاران[30] تاثیر محیط کشت حاصل شده از سلول‌های بنیادی مزانشیمال مشتق از مغز استخوان انسانی بر روی کشت سلول‌های اندوتلیوم قرنیه انسانی را بررسی کردند. در مقایسه با محیط شاهد، این محیط تکثیر سلولی بیش‌تری را القا کرد و مشخصات فنوتیپی مورد نیاز برای عملکرد سلول‌های اندوتلیال را بهتر حفظ نمود.

طبق خواص تغذیه‌ای مایع آمنیوتیک انسان[31] و تجربیات پیشین ما بر روی سلول‌ها RPE (Retinal Pigmented Epithelium)[10], HAF برای نخستین بار در کشت سلول‌های اندوتلیال قرنیه (HCEC) در این مطالعه به کار برده شد.

نتایج نشان داد که مایع آمنیوتیک انسان یک تقویت کننده قوی رشد HCEC است. با این محیط غنی شده، بیش از ۹۵ درصد از کشت‌های قرنیه موفقیت‌امیز بوده‌اند. به علاوه بیش از ۸۰ درصد سلول‌های اندوتلیال قرنیه دارای Ki-۶۷ بودند که نشان‌دهنده این بود که سلول‌ها خاصیت تکثیر خود را حفظ کرده بودند.

Ki-۶۷ طی مرحله میانی تا انتهایی میتوز روی سلول‌ها ظاهر می‌شود، لذا یک نشانگر عالی جهت فعالیت سیکل سلولی است[۳۲و۳۳]. بنابراین HAF، عوامل کافی جهت رشد و تکثیر HCEC را دارا می‌باشد.

ویژگی خاص اندوتلیوم قرنیه، توانایی انتقال یون‌ها از استرومای قرنیه است که باعث جریان هم‌زمان آب به خارج از قرنیه می‌شود. تمامی سلول‌های اندوتلیال کشت یافته دارای پمپ Na/K-ATPase بودند و توافق عمومی بر این است که پمپاژ مایع وابسته به فعالیت Na/K-ATPase می‌باشد بنابراین سلول‌های اندوتلیال کشت داده شده نقش طبیعی خود را حفظ می‌نمایند[۳۴و۳۵]. علاوه بر این رنگ‌آمیزی سلول‌های اندوتلیال کشت داده شده برای ZO-۱ مثبت بود که نشان می‌دهد HAF هویت آن‌ها را تغییر نداده است[۲و۳۶].

HAF تقریباً PH طبیعی دارد (۷/۲) و فشار اسموتیک آن در محدوده فیزیولوژیک است. بنابراین یک محیط مناسب برای تکثیر سلول‌ها فراهم می‌کند. جهت مشخص کردن محتوای HAF مطالعات مختلفی صورت گرفته‌اند. Cho و همکاران[31]، مقادیر فراوان پروتیین را در مایع آمنیوتیک در ۱۸-۱۶ هفته حاملگی شناسایی کردند که شامل آلبومین، فیبرونکتین، سروترانسفرین، کمپلمان C_3، سرولوپلاسمین و TGFβ می‌باشد.

کمپلمان C_3 عاملی در HAF است که مسئول بازسازی بافت آسیب‌دیده می‌باشد[۳۷و۳۸]. پلاسمینوژن در تکثیر سلولی و بهبود زخم موثر است. سایر پروتیین‌های موجود در HAF شامل سرولوپلاسمین، α-۱ میکروگلوبین، سروترانسفرین، آپولیپوپروتئین A و آلبومین برای هموستاز و انتقال سلولی ضروری می‌باشند.

نتایج این مطالعه دال بر این است که غلظت‌های بالاتر HAF (۳۰ درصد) تکثیر بیش‌تر سلول‌ها را مهار می‌کند. شاید اثر عوامل مهاری نسبت به عوامل رشد در غلظت‌های بالاتر بیش‌تر باشد. به عنوان مثال TGFβ موجود در HAF ورود به فاز S را در سلول‌های اندوتلیال قرنیه مهار می‌کند[۱۳].

برای القای تکثیر، علاوه بر وجود عوامل مکمل باید عوامل مهاری حذف شوند. مهار تماسی، سازوکاری است که می‌تواند فعالانه همانندسازی سلول‌های اندوتلیال بالغ را در شرایط Invivo

www.SID.ir

متوقف کند[۳۹]. در کشت بافت قرنیه، فقط سلول‌های اندوتلیال مجاور با لبه زخم تکثیر می‌شوند که نشان‌دهنده اهمیت از بین رفتن تماس سلول به سلول جهت تکثیر می‌باشد.

انواع مختلفی از کمپلکس‌های اتصال شامل Cadherins، ZO-۱ و Connexin-۴۳ همگی جهت حفظ اتصالشان نیاز به کلسیم دارند[۴۰-۴۲]. وقتی میزان کلسیم پایین باشد این کمپلکس‌ها از هم پاشیده شده و تماس سلول-سلول شکسته می‌شود. EDTA یک شلاتور شناخته شده کلسیم و منیزیوم است که در بسیاری از آزمایشگاه‌ها برای آزاد کردن سلول‌های کشت داده شده از مهار تماسی به کار می‌رود و باعث می‌شود سلول‌ها به محرک‌های میتوژنیک حساس شوند و مایع آمنیوتیک حاوی عوامل مختلفی است که این نقش را به عهده دارند.

به منظور جلوگیری از آلودگی کراتوسیت‌های استروما، کوشش گردید تا نوار باریکی از سلول‌های اندوتلیال همراه با غشای دسمه در این مطالعه جدا شوند. با این وجود مقداری استرومای خلفی (۲۰-۶ میکرون) به غشای دسمه زیرین چسبیده باقی می‌ماند[۴۳]. پس کشت در شرایط Invitro باعث جمعیتی از سلول‌های مختلف شامل کراتوسیت‌های استروما و سلول‌های اندوتلیال می‌شود.

از آن‌جایی که کراتوسیت‌های استروما رشد سریع‌تری دارند، پس از ۱۰ روز تعدادشان از سلول‌های اندوتلیال بیش‌تر می‌شود[۴۴]. به محض مشاهده تعداد کمی کراتوسیت، اسکراپ سلولی جهت حذف آلودگی با کراتوسیت‌ها صورت گرفت و سلول‌های اندوتلیوم به محیط جدید انتقال یافتند. نتایج این مطالعه نشان داد که روش برداشتن دسمه از قرنیه دهنده و اسکراپ سلولی جهت برداشت کراتوسیت‌ها در مراحل بسیار زودرس کشت سلولی، یک روش مفید جهت حذف آلودگی با کراتوسیت است.

نتیجه‌گیری

یافته‌های حاصل از این مطالعه نشان داد که HAF ۲۰ درصد به طور بارزی باعث افزایش توانایی تکثیر و حفظ موفولوژی HCEC می‌شود. بنابراین HAF می‌تواند به عنوان یک مکمل غنی برای محیط کشت بدون سرم جهت تکثیر Invitro این سلول‌ها استفاده شود. البته ما نمی‌دانیم که کدام عامل HAF روی رشد و تکثیر سلول‌های اندوتلیال قرنیه اثر مثبت دارد ولی شناسایی این عوامل برای ساختن محیط غنی برای کشت HCEC مفید می‌باشد.

منابع

1. Dikstein S, Maurice DM. The active control of corneal hydration. *Isr J Med Sci* 1972;8:1523-1528.
2. Joyce NC. Proliferative capacity of the corneal endothelium. *Prog Retin Eye Res* 2003;22:359-389.
3. Patel SV. Keratoplasty for endothelial dysfunction. *Ophthalmology* 2007;114:627-628.
4. Joyce NC, Zhu CC. Human corneal endothelial cell proliferation: potential for use in regenerative medicine. *Cornea* 2004;23:S8-S19.
5. Lai JY, Chen KH, Hsu WM, et al. Bioengineered human corneal endothelium for transplantation. *Arch Ophthalmol* 2006;124:1441-1448.
6. Chen KH, Hsu WM, Chiang CC, et al. Transforming growth factor-beta2 inhibition of corneal endothelial proliferation mediated by prostaglandin. *Curr Eye Res* 2003;26:363-370.
7. Kim TY, Kim WI, Smith RE, et al. Role of p27(Kip1) in cAMP- and TGF-beta2-mediated antiproliferation in rabbit corneal endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42:3142-3149.
8. Paull AC, Whikehart DR. Expression of the p53 family of proteins in central and peripheral human corneal endothelial cells. *Mol Vis* 2005;11:328-334.
9. Hirai C, Ichiba H, Saito M, et al. Trophic effect of multiple growth factors in amniotic fluid or human milk on cultured human fetal small intestinal cells. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2002;34:524-528.
10. Sanie-Jahromi F, Ahmadieh H, Soheili ZS, et al. Enhanced generation of retinal progenitor cells from human retinal pigment epithelial cells induced by amniotic fluid. *BMC Res Notes* 2012;10;5:182.
11. Tripathi RC, Borisuth NS, Tripathi BJ, e al. Analysis of human aqueous humor for epidermal growth factor. *Exp Eye Res* 1991;53:407-409.
12. Harris DL, Joyce NC. Transforming growth factor-beta suppresses proliferation of rabbit corneal endothelial cells in vitro. *J Interferon Cytokine Res* 1999;19:327-334.
13. Chen KH, Harris DL, Joyce NC. TGF-beta2 in aqueous humor suppresses S-phase entry in cultured corneal endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999;40:2513-2519.
14. Gao Y, Zhou Q, Qu M, et al. In vitro culture of human fetal corneal endothelial cells. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2011;249:663-669.
15. Lu X, Chen D, Liu Z, et al. Enhanced survival in vitro of human corneal endothelial cells using mouse embryonic stem cell conditioned medium. *Mol Vis* 2010;16:611-622.
16. Chen KH, Azar D, Joyce NC. Transplantation of adult human corneal endothelium ex vivo: a morphologic study. *Cornea* 2001;20:731-737.
17. Bonfiglio V, Camillieri G, Avitabile T, et al. Effects of the COOH-terminal tripeptide alpha-MSH (11-13) on corneal epithelial wound healing: role of nitric oxide. *Exp Eye Res* 2006;83:1366-1372.
18. Kawakita T, Espana EM, He H, et al. Calcium-induced abnormal epidermal-like differentiation in cultures of mouse corneal-limbal epithelial cells. *Investig*

Archive of SID
www.SID.ir

Ophthalmol Vis Sci 2004;45: 3507-3512.
19. Castro-Combs J, Noguera G, Cano M, et al. Corneal wound healing is modulated by topical application of amniotic fluid in an ex vivo organ culture model. *Exp Eye Res* 2008;87:56-63.
20. Peh GSL, Toh KP, Wu FY, et al. Cultivation of human corneal endothelial cells isolated from paired donor corneas. *PLoS ONE* 2011;e6.
21. Li W, Sabater AL, Chen YT, et al. A novel method of isolation, preservation, and expansion of human corneal endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48:614-620.
22. Ishino Y, Sano Y, Nakamura T, et al. Amniotic membrane as a carrier for cultivated human corneal endothelial cell transplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45: 800-806.
23. Engelmann K, Bednarz J, Valtink M. Prospects for endothelial transplantation. *Exp Eye Res* 2004;78:573-578.
24. Newsome DA, Gross J, Hassel JR. Human corneal stroma contains three distinct collagens. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1982;22:376-381.
25. Ishizahi M, Westerhausen-Larson A, Kino J, et al. Distribution of collagen IV in human ocular tissues. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1993;34:2680-2689.
26. Engelmann K, Bohnke M, Friedl P. Isolation and long-term cultivation of human corneal endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1988;29:1656-1662.
27. Yokoo S, Yamagami S, Yanagi Y, et al. Human corneal endothelial cell precursors isolated by sphere-forming assay. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46:1626-1631.
28. Zhu C, Joyce NC. Proliferative response of corneal endothelial cells from young and older donors. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45:1743-1751.
29. Engelmann K, Friedl P. Optimization of culture conditions for human corneal endothelial cells. *In vitro Cell Dev Biol* 1989;25:1065-1072.
30. Nakahara M, Okumura N, Kay EP, et al. Corneal endothelial expansion promoted by human bone marrow mesenchymal stem cell-derived conditioned medium. *PLoS ONE* 2013;8: e69009.
31. Cho CK, Shan SJ, Winsor EJ, et al. Proteomics analysis of human amniotic fluid. *Mol Cell Proteomics* 2007;6:1406-1415.
32. Gerdes J, Li L, Schlueter C, et al. Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67. *Am J Pathol* 1991;138:867-873.
33. Verheijen R, Kuijpers HJ, van Driel R, et al. Ki-67 detects a nuclear matrix-associated proliferation-related antigen. Ll. localization in mitotic cells and association with chromosomes. *J Cell Sci* 1989;92:531-540.
34. Geroski DH, Matsuda M, Yee RW, et al. Pump function of the human corneal endothelium. Effects of age and cornea guttata. *Ophthalmology* 1985;92: 759-763.
35. Riley MV. Anion-sensitive ATPase in rabbit corneal endothelium and its relation to corneal hydration. *Exp Eye Res* 1977;25:483-494.
36. Stiemke MM, McCartney MD, Cantu-Crouch D, et al. Maturation of the corneal endothelial tight junction. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1991;32:2757-2765.
37. Kimura Y, Madhavan M, Call MK, et al. Expression of complement 3 and complement 5 in newt limb and lens regeneration. *J Immunol* 2003;170:2331-2339.
38. Reca R, Mastellos D, Majka M, et al. Functional receptor for C3a anaphylatoxin is expressed by normal hematopoietic stem/progenitor cells, and C3a enhances their homing-related responses to SDF-1. *Blood* 2003;101:3784-3793.
39. Joyce NC, Harris DL, Zieske JD. Mitotic inhibition of corneal endothelium in neonatal rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998;39:2572-2583.
40. Hirano S, Nose A, Hatta K, et al. Calcium-dependent cell-cell adhesion molecules (cadherins): subclass specificities and possible involvement of actin bundles. *J Cell Biol* 1987;105:2501-2510.
41. Siliciano JD, Goodenough DA. Localization of the tight junction protein, ZO-1, is modulated by extracellular calcium and cell-cell contact in Madin-Darby canine kidney epithelial cells. *J Cell Biol* 1988;107:2389-2399.
42. Jongen WM, Fitzgerald DJ, Asamoto M, et al. Regulation of connexin 43-mediated gap junctional intercellular communication by Ca2+ in mouse epidermal cells is controlled by Ecadherin. *J Cell Biol* 1991;114:545-555.
43. Jafarinasab MR, Rahmati-Kamel M, Kanavi MR, et al. Dissection plane in deep anterior lamellar keratoplasty using the big-bubble technique. *Cornea* 2010;29:388-391.
44. Hyldahl L. Primary cell cultures from human embryonic corneas. *J Cell Sci* 1984;66:343-351.

Archive of SID

www.SID.ir