مقاله تحقیقی

مقایسه فراساختار و تجلی ژنی در سلولهای بنیادی لیمبال کشت داده شده، ملتحمه، لیمبال و قرنیه نرمال

مرضیه ابراهیمی M.Sc.*، ✉حسین بهاروند Ph.D.*، عباس پیریایی M.Sc.، محمد معصومی M.Sc.***

* گروه سلولهای بنیادی پژوهشکده رویان

** مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

وصول: فروردین‌ماه ۸۵، پذیرش خردادماه ۸۵

چکیده

هدف: مطالعه ویژگیهای فرا ساختار و تجلی ژنها در سلولهای بنیادی لیمبال کشت شده بر پرده آمنیون و مقایسه آن با بافتهای طبیعی ملتحمه، لیمبال و قرنیه سالم.

مواد و روشها: روشهای RT-PCR (ReversTranscriptase Polymerase Chain Reaction) ، ایمنوسیتوشیمی و ایمنوبلات به منظور بررسی تجلی ژنهای موثر در حفظ خصوصیات بنیادی (Stem ness)، تمایز یا تکوین اپیتلیوم قرنیه در نمونه‌های تازه تهیه شده لیمبال، قرنیه، ملتحمه انسانی و سلولهای لیمبال کشت شده بر پرده آمنیوتیک، در زمانهای متفاوت مورد استفاده قرار گرفتند. روش میکروسکوپ الکترونی نیز برای بررسی فراساختار سلولهای کشت شده و بافتهای مربوط استفاده شد.

یافته‌ها: پس از ۲-۳ هفته، سلولهای کشت شده صفحه‌ای به اندازه تقریبی ۲×۲ سانتی‌متر مربع را بر پرده آمنیوتیک برهنه (فاقد سلول) تشکیل دادند. سلولهای کشت شده در تمام مراحل کشت از نظر بیان ژن K3- Oct4+ , Pax6+ و P63+ بودند. بیان ژن K12 و کانکسین ۴۳ پس از ۱۴ روز کشت ظاهر شد و با افزایش زمان کشت افزایش یافت، در حالی که بیان ژن P63 با افزایش زمان کاهش یافت. مقایسه سلولهای کشت شده با نوع طبیعی آن نشان داد که بافت لیمبال دارای ژنهای K3- /K12- /P63+/Oct4+/PAX6+ و بافت قرنیه دارای ژن K3+/K12+/ Oct4+/PAX6+ /P63- و بافت ملتحمه نیز دارای ژنهای K3- /K12+/Oct4+/PAX6+ / P63+بودند. بررسی فراساختار سلولهای لیمبال کشت شده نشان دهنده شباهتهای فراوانی بین این سلولها و اپیتلیوم قرنیه طبیعی بود.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد که سلولهای لیمبال کشت شده جمعیت هتروژنی متشکل از سلولهای بنیادی، سلولهای پیش ساز و سلولهای تمایز یافته هستند. همچنین هرچند که سلولهای کشت شده واجد ساختار و اندامکهای نابالغ درون سلولی بودند اما از نظر ساختار و ویژگیهای درون سلولی مشابه نمونه طبیعی بودند.

کلیدواژه‌ها: پرده آمنیوتیک انسانی، سلولهای بنیادی لیمبال، قرنیه، فراساختار

✉ **آدرس مکاتبه:** تهران پژوهشکده رویان، گروه سلولهای بنیادی،
صندوق پستی: ۱۹۳۹۵-۴۶۴۴ E-mail:baharvand50@yahoo.com

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

اپی‌تلیوم قرنیه که سطح جلویی چشم را پوشش می‌دهد، مشتق از اکتودرم بوده و همواره در سطحی پویا و متعادل قرار دارد، به‌طوری که سلولهای سطحی آن به حوضچه اشکی ریزش کرده و سلولهای جدید جایگزین آن می‌شوند، عمل پلک زدن سبب تسهیل این روند می‌شود [۱]. سلولهای بنیادی مستقر در ناحیه لیمبال (مرز بین ملتحمه و قرنیه) منبعی از سلولهای ذخیره‌ای برای باز سازی اپیتلیوم قرنیه هستند این سلولها به‌علت دارا بودن خاصیت خود نوزایی (self-renewal) [۲]، مسئول حفظ تمامیت [۳] و نیز ترمیم اپی تلیوم قرنیه در جراحات و حالات طبیعی هستند [۳ و ٤].

اولین بار در سال ۱۹۷۱ داوانگر (Davanger) و اوینسون (Evensen)در بیماران با زخمهای اپی‌تلیال قرنیه و جوش خوردگی‌های اطراف قرنیه، مهاجرت خط اپی‌تلیالی پیگمانه را از ناحیه لیمبال به مرکز قرنیه گزارش کردند و بدین ترتیب ساختار پاپیلاری لیمبال (Palisades of voget) را به عنوان اندام تولیدکننده اپی‌تلیال قرنیه گزارش نمودند [۵]. سایر مطالعات نیز نشان داد که ناحیه قاعده ای لیمبال حاوی سلولهایی با خصوصیاتی مشابه سلولهای بنیادی است در این ناحیه تعداد کمی از سلولهای تمایز یافته وجود دارد [۸-۱]. به‌علاوه نئوپلاسمها که عمدتاً ناشی از تکثیر سلولهای نسبتا تمایز نیافته هستند، در این ناحیه بیشتر مشاهده می‌شوند [۵-۲ و ۹].

زمانی‌که سلولهای بنیادی لیمبال (Limbal Stem Cells LSC) فاقد عملکرد باشند یا در عملکرد صحیحشان دچار نقص شوند، سطح قرنیه توسط سلولهای مشتق از بافت ملتحمه و از جمله سلولهای جامی شکل، پوشیده می‌شود (ConjunctivaliZation) و نفوذ عروق خونی به ناحیه قرنیه شدت می‌یابد. این امر با التهاب و زخم قرنیه همراه شده [۱۰ و ۱۱] و نشانه‌ای از شکل‌گیری بیماری نقصان سلولهای بنیادی لیمبال(LSCD) است [۱۱]. عوامل موثر در بروز این بیماریی عبارتند از عوامل مادرزادی یا اکتسابی، از جمله جراحات شیمیایی و صدمات گرمایی، سندرم Steven-Johnson, ocular Cicatricalpemphigoid, Extensive Recurrent Petrygium [۱۰-۱۲].

برای بازسازی قرنیه در این بیماران چندین راهکار درمانی ارایه شده است که می‌توان به پیوند پرده آمنیوتیک، پیوند اتوگرافت یا آلوگرافت ناحیه لیمبال و در نهایت پیوند سلولهای لیمبال کشت شده در آزمایشگاه اشاره نمود. روش اخیر واجد مزایای بسیاری ازجمله استفاده از بافت لیمبال خود بیمار و حذف احتمال رد پیوند است [۱ و ۱۵-۱۳]. در حقیقت استفاده از پرده آمنیوتیک به‌عنوان یک سوبسترای مناسب در پیوند همزمان با سلولهای بنیادی لیمبال به منظور درمان بیماران با نقص جزئی مؤثر بوده است [۱۹-۱٦]. همچنین موفقیتهای چشمگیری در بازسازی اپیتلیوم قرنیه بدنبال پیوند سلولهای کشت شده لیمبال بر روی پرده آمنیون به‌دست آمده است [۱٤، ۱۵، ۲۰ و ۲۱].

از آنجا که شناخت بیولوژی سلولهای بنیادی حائز اهمیت فراوان بوده، و بویژه در روند تمایز می‌تواند اطلاعات مفیدی را در خصوص نحوه، مکانیسم و زمان انجام تمایز سلولهای بنیادی بیان دارد، با طراحی مطالعه حاضر نحوه تکثیر و تمایز سلولهای بنیادی لیمبال به اپیتلیوم قرنیه در محیط آزمایشگاه از نظر فراساختار و بیان ژنها مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روشها

محلولها و مواد شیمیایی

محیط کشت Dulbecco's modified Eagle's medium/Ham's F12 (DMEM/F12, 16141-079) ، محلول بافر نمکی هنکز (HBSS: Hancs Buffer Salt Solution, 14185-045)، دیسپاز II (17105-041) , آمفوتریسین B (A9528) و سرم جنین گاو (FBS, 21331-20) از شرکت Gibco (Grand Island, NY, USA) خریداری شد. جنتامایسین(G1387)، هیدروکورتیزون-H0888) (56، دی متیل سولفوکسید (DMSO D2650) , فاکتور رشد اپیدرمال انسانی (hEGF, E9644)،

Archive of SID
www.SID.ir

انسولین/ترانسفرین/سلینیوم (ITS, 55261)، هوخست(B2261) و یدید پرومیدیوم(P4170)از شرکت Sigma(St Louis, MO, USA) و کلراتوکسین زیرواحد A (G115) از شرکت بیومول (Biomol ,Japan) تهیه شد. DNaseI (EN0521)، کیت سنتز cDNA (K1622)، آنزیم Taq DNA polymerase (EP0403) از شرکت فرمنتاز (Fermentas , Germany) و کیت RNA II (740955) از شرکت Macherey Nagle (Germany) تهیه شد.

کشت قطعه ای لیمبال بر غشای آمنیوتیک برهنه

کره‌های کامل چشم از اجساد ۲۰–۵۰ سال از بانک چشم ایران (تهران) (HIV^--HBV^--HCV^-) تهیه (n=۵) و ناحیه لیمبوس آنها جدا شد و در محیط DMEM/F12 حاوی آنتی بیوتیکهای جنتامایسین(۵۰ µg/ml) و آمفوتریسین B (۱/۲۵ µg/ml) شستشو داده شد. بافتهای اضافه شامل عنبیه،آندوتلیوم قرنیه، صلبیه و ملتحمه جدا و باقیمانده بافتی پس از شستشو با محیط DMEM/F12 حاوی آنتی بیوتیک به ظرف حاوی آنزیم دیسپاز II (۲U/ml /۱) درHBSS (عاری از Ca+2 و Mg+2) منتقل و به مدت ۱۰–۱۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه‌سانتی‌گراد، CO2 ۵ درصد انکوبه شد. بافتها پس از شستشو در محیط DMEM/F12 حاوی ES FBS ۱۰ درصد به همراه آنتی بیوتیکهای جنتامایسین (۵۰µg/ml) و آمفوتریسین B(۱/۲۵ µg/ml) و توسط اسکالپل در قطعات mm ۱×۱×۰/۱ برش داده شدند [۲۲ و ۲۳].

غشای آمینوتیک انسانی در زمان سزارین از مادران سالم (HBV^--HIV^-) به صورت استریل تهیه، و پس از جداسازی کوریون و لایه‌های زیرین توسط بافرفسفات نمکی (PBS: Phosphat Buffer Saline) حاوی پنی‌سیلین(۱۰۰۰ U/ml) استرپتومایسین (۵۰µg/ml) و افلاکسوزین (۰/۳درصد)، شستشو شد و سپس بر نیتروسلولز گسترانیده و در ابعاد ۳×۳cm برش داده شد و در محیط DMSO (۱/۵M) در فریز ۸۰– نگهداری شد. در زمان استفاده، غشاء با PBS حاوی آنتی بیوتیک شستشو داده شد و به مدت ۱۵ دقیقه در محلول EDTA (۰/۱درصد)در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس سلولهای اپی تلیالی در محیط حاوی کلرید آمونیوم (۱۰درصد) جدا شدند. پس از اطمینان از برهنه بودن غشاء، پرده آمنیوتیک در پلیتهای کشت ٦ خانه‌ای به گونه ای گسترانیده شد که سطح اپی تلیال آن رو به بالا قرار گیرد. سپس یک قطعه از لیمبال در مرکز غشای آمنیوتیک قرار گرفت و کشت در حضور DMEM/F12 حاوی(۱۰درصد) ES-FCS، DMSO (۰/۵درصد)، EGF (۲۷ ng/ml) , انسولین(µg/ml ۵) ترانسفرین(µg/ml ۵)، سلنیم(µg/ml ۵)، هیدروکورتیزون(۰/۵µg/ml)، کلراتوکسین A (۳۰ ng/ml)، جنتامایسین(۵۰ µg/ml)، آمفوتریسین B (۱/۲۵ µg/ml) و ال ـ گلوتامین ٤ mM در دمای ۳۷درجه سانتی‌گراد و تحت شرایط (۵درصد) CO2 و ۹۵درصد اکسیژن صورت گرفت. پس از گذشت ۱۵–۱۳ روز از کشت، قطعه بافتی از کشت برداشته شد و کشت به مدت ۷ روز در غیاب قطعه ادامه یافت. محیط هر ۲–۳ روز تعویض شد. میزان مهاجرت سلولی توسط میکروسکوپ فازکنتراست مورد بررسی شد [۱ و ۱۹–V]

بررسی با میکروسکوپ نوری

از میکروسکوپ نوری معکوس (Invert) در طول مدت کشت به منظور بررسی شرایط سلولهای کشت شده و مورفولوژی آنها استفاده شد.

ایمنوسیتوشیمی به منظور بررسی حضور ژنهای کراتین۳، کانکسین۴۳، P63 و Oct4

از روش ایمنوسیتوشیمی غیرمستقیم به منظور تایید سلولهای کشت شده برای مطالعه ژنهای کراتین۳ (K۳)، کانکسین٤۳، P63 و Oct4 استفاده شد. ابتدا سلولها در پارافرمالدهید ٤درصد به مدت ۳۰ دقیقه ثابت شدند و پس از شستشو با بافرفسفات نمکی حاوی توئین ۰/۵درصد (PBST: Phosphat Buffer Saline Twein) توسط محلولPBS حاوی ۰/۲درصد تریتون X۱۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه نفوذ پذیر شدند. سپس به منظور حذف

Archive of SID

www.SID.ir

اتصالات غیراختصاصی، سلولها در PBS حاوی ۱۰درصد سرم بز به مدت ۱ ساعت و در دمای اتاق تیمار شدند . پس از شستشو با PBST سلولها با آنتی بادیهای مونوکلونال موشی به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق انکوبه شدند. مشخصات و رقت آنتی بادیهای مورد استفاده در جدول ۱ نشان داده شده است.

در انتها به منظور آشکارساختن مکان اتصال آنتی بادیهای اولیه، از آنتی بادی Anti –IgG1 کونژوگه با FITC در رقت ۱/۲۰۰ استفاده و نتیجه توسط میکروسکوپ فلورسنت (Nikon, Japan) مورد بررسی قرار گرفت. نمونه‌های کنترل منفی به جای آنتی بادی اولیه در IgG موشی تیمار شدند. پرومیدیوم یداید (PI)[1] و یا هوخست ۳۳۳۴۲ (۱۰µg/ml) به منظور رنگ آمیزی هسته سلولها استفاده شد.

ایمنوبلات

بافتهای ملتحمه، قرنیه و لیمبال از بانک چشم ایران تهیه شد. توسط ۵ چرخه فریز و ذوب عصاره سلولی به‌دست آمد و پس از سنجش غلظت پروتئینی به روش برادفورد میزان ۲۰µg/ml از هرکدام به ژل ۷/۵٪ پلی اکریل آمید تزریق شد و پس از انجام الکتروفورز، باندهای پروتئینی به کاغذ نیتروسلولز منتقل و غشاء توسط BSA ۳ درصد بلاک شد. از آنتی بادیهای ضد K3,P63,Oct4 (جدول ۱) و آنتی بادی ثانویه ضد IgG کونژوگه با پرواکسیداز در رقت ۱/۲۰۰ به منظوربررسی محتوای پروتئینی هر باند استفاده شد و سپس مکان باندها توسط DAB آشکار شدند.

تجزیه و تحلیل بیان ژنی توسط واکنش نسخه برداری معکوس (RT-PCR)

بررسی بیان ژنهای ویژه اپی تلیال قرنیه (K۱۲ وK۳) و سلولهای بنیادی لیمبال(P۶۳) و نیز Pax6 و Oct4 در نمونه‌های لیمبال طبیعی (Invivo Limbal, L) و کشت شده (Limbal Culture Epitelium, LCE)، اپی تلیال قرنیه طبیعی (In vivo Cornea, K) و اپی تلیال ملتحمه طبیعی (In vivo Conjunctiva, C) توسط واکنش نسخه برداری معکوس (RT-PCR) صورت گرفت. بدین منظور موجودی RNA سلولها توسط RNX-PLUS TM استخراج و با استفاده از پرایمرهای Random Hexamer و کیت Revert nid TM H minus First Strand CDNA Synthesis رشته مکمل cDNA ساخته شد. مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۲ نشان داده شده است. محصولات پس از انجام واکنش PCR بر روی آگارز ۱/۵٪ (Fermentas) از یکدیگر جدا و پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید توسط دستگاه ترانس لومینوتور UV (Uvido , UK) آشکار شدند.

جدول ۱ مشخصات آنتی بادیهای مورد استفاده در ایمنوسیتوشیمی

نام	Host/Isotype	شرکت	شماره کاتالوگ	ضریب رقت
Anti P63	Ms IgG2a	Chemicon	MAB4135	۱/۱۰۰
Anti K3/K12 (AE5)	Ms IgG1	Chemicon	CBL-218	۱/۱۰۰
Anti Connexin 43(Clone CXN-6)	Ms IgG	Sigma	C8093	۱/۵۰
Anti Oct4	MsIgG	R&D.	MAB1759	۱/۵۰

1. Promidium Iodide

Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۲ مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در RT-PCR نیمه کمی

Genes	Primer sequences (5´-3´)	Size(bp)	Annealing Temperature (°C)	Gene bank accession number
Cytokeratin K3	F: GAG CGG AGC AGG TGG CTTT R: GGT CAG TCT CCA CTT TGA G	٤٢٨	٥٨	NM_057088
Cytokeratin K12	F: TGC GAG CTC TAG AAG AGG CTA R: CCT CGT GGT TCT TCT TCA TGT A	٣٧٨	٦٤	NM_000223
P63	F: CGG ACC TGA GTG ACC CCA T R: TCC GTG ACG TCG TGA GCT T	٤١٥	٦٢	NM_003722
OCT4	F: CTT GCT GCA GAA GTG GGT GGA GGA A R: CTG CAG TGT GGG TTT CGG GCA	١٨٧	٦٧	NM_002701
Pax6	F: TCC ATC AGT TCC AAC GGA GAA G R: GTG GAA TTG GTT GGT AGA CAC TG	٣٣٧	٦٢	NM_001604
-actinβ	F: TGC GTG ACA TTA AGG AGA AG R: TGA AGG TAG TTT CGT GGA TG	٢١٣	٦٠	NM_001101

مطالعه نمونه‌ها با میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM)

ثبوت اولیه توسط محلول گلوتارآلدئید ۲/۵درصد به مدت ۲ ساعت، و ثبوت ثانویه توسط محلول تتراکسیداسمیوم ۱درصد به مدت ۱/۵ ساعت انجام گرفت. سپس جهت آبگیری از سری الکلها با غلظت افزایش یابنده استفاده شد، و عمل خشک کردن نمونه‌ها در هوا (Air drying) و به مدت یک شب انجام شد. پس از چسباندن نمونه‌ها روی stub های آلومینیومی، نمونه‌ها توسط دستگاه Sputter coater پوشش طلا داده شده و توسط میکروسکوپ الکترونی نگاره (Zeiss DSM 940A) بررسی و میکروگرافهای الکترونی تهیه شد.

مطالعه نمونه‌ها با میکروسکوپ الکترونی گذاره(TEM)

ابتدا نمونه‌ها، توسط محلول گلوتارآلدئید ۲/۵درصد در بافر فسفات 0.1M (pH=7.4) به مدت ۲ ساعت ثابت شدند، و بعد از شستشو به مدت ۱/۵ ساعت در محلول ۱ درصد تتراکسیداسمیوم قرار گرفتند. برای آبگیری از غلظتهای رو به افزایش استن استفاده شد. قالب گیری در رزین اپوکسی انجام گردید. برشهای فوق نازک(Ultra-thin) توسط دستگاه اولترامیکروتوم و با استفاده از تیغ الماس، با ضخامت ۷۰ نانومتر زده شد و بر روی گریدهای۲۰۰ خانه‌ای منتقل گردید. رنگ‌آمیزی برشها نیز توسط محلول ۵درصد استات یورانیل، و محلول۰/۵درصد سیترات سرب انجام شد. جهت تهیه الکترون میکروگرافها، برشهای منفرد توسط میکروسکوپ الکترونی گذاره (Zeiss EM 900) و تحت اختلاف پتانسیل KV ۸۰ مورد بررسی قرار گرفتند و مناطق نظر عکسبرداری شد.

یافته‌ها

مورفولوژی سلولهای کشت شده

مهاجرت و تکثیر سلولها طی روزهای اولیه به کندی صورت گرفت و سپس افزایش یافت به‌طوری‌که طی ۲-۳ هفته یک صفحه اپی تلیالی در حدود cm ۲-۱ فضایی متشکل از سلولهای همسان را پوشش داد. برقراری و ارتباط با سطح پرده آمنیوتیک تأمین کننده این مهاجرت و تکثیر سلولی است. سلولهای مهاجر ابتدا به صورت دوکی (شکل 1A)نمایان شدند و سپس ظاهری مکعبی (شکل 1B) یافتند. در ابتدا نسبت هسته به سیتوپلاسم ۱:۱ بود (شکل 1B) اما در کشتهای طولانی مدت در اندازه، شکل و نسبت هسته به سیتوپلاسم سلول تغییر مشاهده شد. رنگ آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین در کشتهای طولانی مدت حضور چندین لایه سلولی را نشان داد.

Archive of SID

www.SID.ir

مقایسه بیان شاخصهای سلولی در in Vivo و in Vitro

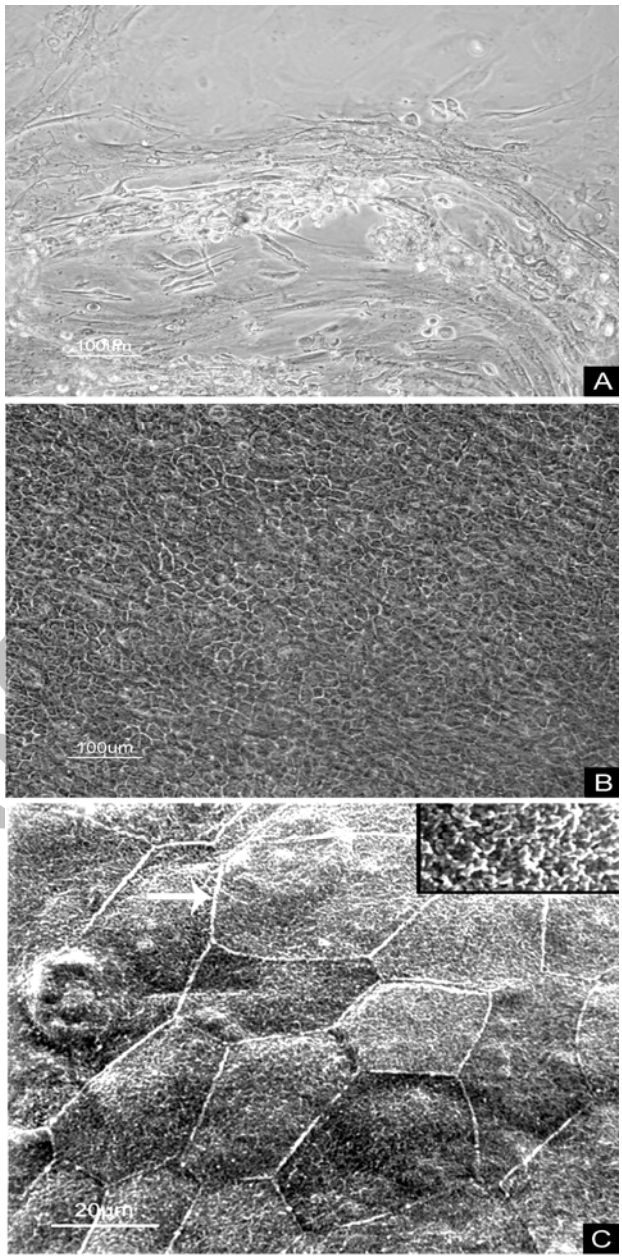
برای بررسی بیان شاخصهای اختصاصی قرنیه(K۱۲ ، K ۳ و کانکسین ٤۳)، شاخصهای پیشنهادی لیمبال (P63) و ژنهای Pax6 و OCT4 از روش ایمنوسیتوشیمی – با استفاده از آنتی بادیهای منوکلونال اختصاصی(جدول۱)- و RT-PCR نیمه کمی – با استفاده از پرایمرهای اختصاصی(جدول ۲)- استفاده گردید. آزمایشها در دو گروه الف- بافتهای طبیعی شامل قرنیه، لیمبال و ملتحمه و ب- سلولهای کشت شده در زمانهای متفاوت شامل روز ۷, ١٤ و ۲۱ صورت گرفت.

با استفاده از β- اکتین، بهعنوان کنترل داخلی، RT-PCR نیمه کمی انجام گرفت و الگوهای بیانی متفاوتی در ژنهای پیشنهادی و مارکرهای تمایزی در نمونههای بافتی (In Vivo) و سلولهای کشت شده (In Vitro) بهدست آمد (جدول۳ شکل ۲A-C). بیان پروتئین هستهایی P63 در بافت اپیتلیال لیمبال، ملتحمه و نیز تمام مراحل کشت سلولی مشاهده شد. در حالی که در سلولهای اپی تلیال قرنیه بیان ضعیفی داشت یا اصلا بیان نشد (جدول۳ شکل ۲A-C). mRNA شاخص تمایزی اختصاصی قرنیه K۳ به فراوانی در اپی تلیال قرنیه مشاهده شد و در ناحیه لیمبال، ملتحمه و یا سلولهای کشت شده بیان نمیشد (جدول۳ شکل ۲A-C). این در حالی بود که شاخص دیگر؛ سلولهای تمایز یافته قرنیه یعنی K12 در بافت ملتحمه و کشتهای طولانی مدت سلولهای لیمبوسی بیان میگردید و بیانی از آن در بافت لیمبوسی مشاهده نگردید و یا از بیان بسیار پایینی برخوردار بود (جدول۳ شکل ۲A-C). مقایسه بافتهای طبیعی و سلولهای کشت شده از نظر بیان K12 و P63 تفاوت معنی داری بین این دو گروه نشان داد به طوریکه بیان افزایش یافته ایی از این دو مارکر در سلولهای کشت شده نسبت به نوع طبیعی دیده شد. از سوی دیگر؛ بیان K12 با افزایش مدت زمان کشت افزایش ($P<0.01$) و P63 کاهش یافت($P<0.05$). هرچند که در سلولهای کشت شده به مدت ۷ روز، mRNA کراتین ۱۲ (K12) قابل تشخیص نبود(جدول۳ و شکل ۲A-C).

جدول ۳. نتایج RT-PCR نیمه کمی در نمونههای بافتی مختلف و زمانهای متفاوت کشت سلولهای لیمبوسی

	Genes	K3	K12	P63	Pax6	Oct4
Fresh Tissue	Conjunctiva	0.00	1.4±0.04	0.92±0.18	0.35±0.07	0.85±0.22
	Limbus	0.00	0.00	1.23±0.20	0.74±0.17	0.93±0.18
	Cornea	0.54±0.02	1.75±0.06	0.00	0.67±0.12	0.87±0.21
Cultured Limbal	7^{th} d	0.00	0.00	1.47±0.09	1.23±0.21	0.98±0.12
	14^{th} d	0.00	0.35±0.09	1.18±0.15	1.03±0.24	0.94±0.17
	21^{st} d	0.00	1.86±0.25	1.03±0.26	1.67±0.34	1.04±0.26

Archive of SID
www.SID.ir



شکل ۱. فتومیکروگراف قطعه لیمبال کشت شده بر روی پرده آمنیوتیک (A,B). دو روز پس از کشت سلولهایی کروی شکل در اطراف این قطعه ظاهر شدند و برخی از آنها که شروع به مهاجرت کرده اند حالتی دوکی شکل دارند (A). با گذشت۲۱ روز سلولها حالتی سنگفرشی و مطبق پیدا کرده و سطحی در حدود ۲*۲ سانتیمتر مربع را پوشانده اند (B). اسکنینگ الکترون میکروگراف روز ۱٤ کشت، سلولهای چند وجهی سنگفرشی و دارای میکروویلی را نشان می‌دهد (C) فلش مرز سلولها را نشان می‌دهد.

Pax6 از جمله فاکتورهای نسخه برداری است که در تکامل چشم و تنظیم مورفوژنز سلولهای اپیتلیالی موثر است این ژن در ناحیه لیمبال و قرنیه از بیان بالاتری نسبت به ملتحمه برخوردار بود($P<0.05$) و بیان آن در سلولهای کشت شده نسبت به بافتهای طبیعی افزایش معنی داری نشان داد (جدول۳ و شکل ۲A-C). OCT4 نیز از جمله ژنهایی است که در سلولهای بنیادی جنینی و برخی از سلولهای سرطانی بیان می‌شود. در این مطالعه بین اپی‌تلیالهای متفاوت یا سلولهای کشت شده در زمانهای متفاوت از نظر بیان OCT4 تفاوتی مشاهده نشد (جدول۳ شکل ۲A-C). ایمنو بلات با استفاده از آنتی بادیهای ضد P63, K3 و Oct4 بر عصاره سلولی قرنیه، لیمبال و ملتحمه (شکل۲D) و نیز ایمنوسیتوشیمی با استفاده از آنتی بادیهای اختصاصی ضد Oct4، P63، k3 و CX43 بر سلولهای کشت شده در زمانهای ۷، ۱٤ و ۲۱ (جدول٤ و شکل۳) درستی نتایج RT-PCR را تایید نمودند. نتایج ایمنوسیتوشیمی نشان داد که در سلولهای کشت شده کانکسین ٤۳(CX43) در روز ۷ پس از کشت قابل تشخیص نیست. در روز ۱٤ کشت درصد بسیار کمی از سلولها به بیان این شاخص می‌پردازند و افزایش زمان کشت سبب افزایش تعداد سلولهای مثبت از نظر کانکسین ٤۳ می‌شود (شکل ۳).

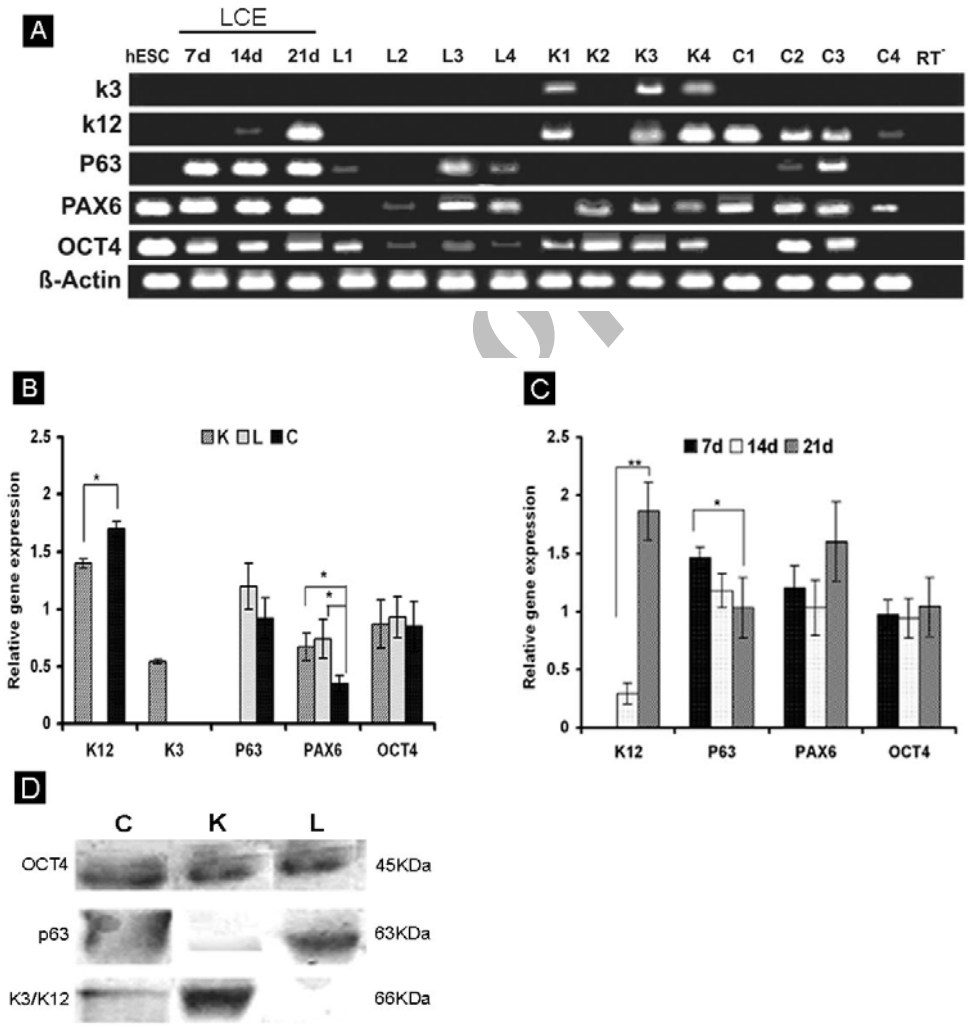
بررسی فراساختار سلولهای کشت شده توسط میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM) و گذاره (TEM)

بررسی سطح بالایی (آزاد) سلولهای کشت شده (۱٤ روزه) با میکروسکوپ الکترونی اسکنینگ حضور لایه پیوسته‌ای از سلولهای سطحی سنگفرشی را نشان داد(شکل 1C)، اندازه سلولها در حدود ۲۰-۳۰ میکرومتر محاسبه گردید. این سلولها دارای مرز کاملا مشخص با یکدیگر بوده و سطحشان توسط میکروویلیهای کوتاه و انگشتی شکل پوشیده شده بود (شکل 1C). سلولهای سطحی از نظر مورفولوژی همتای سلولهای اپی تلیالی قرنیه طبیعی انسانی بودند با این تفاوت که میکروویلیها در این سلولها کوتاهتر و پهن تر از نوع طبیعی بودند.

Archive of SID
www.SID.ir

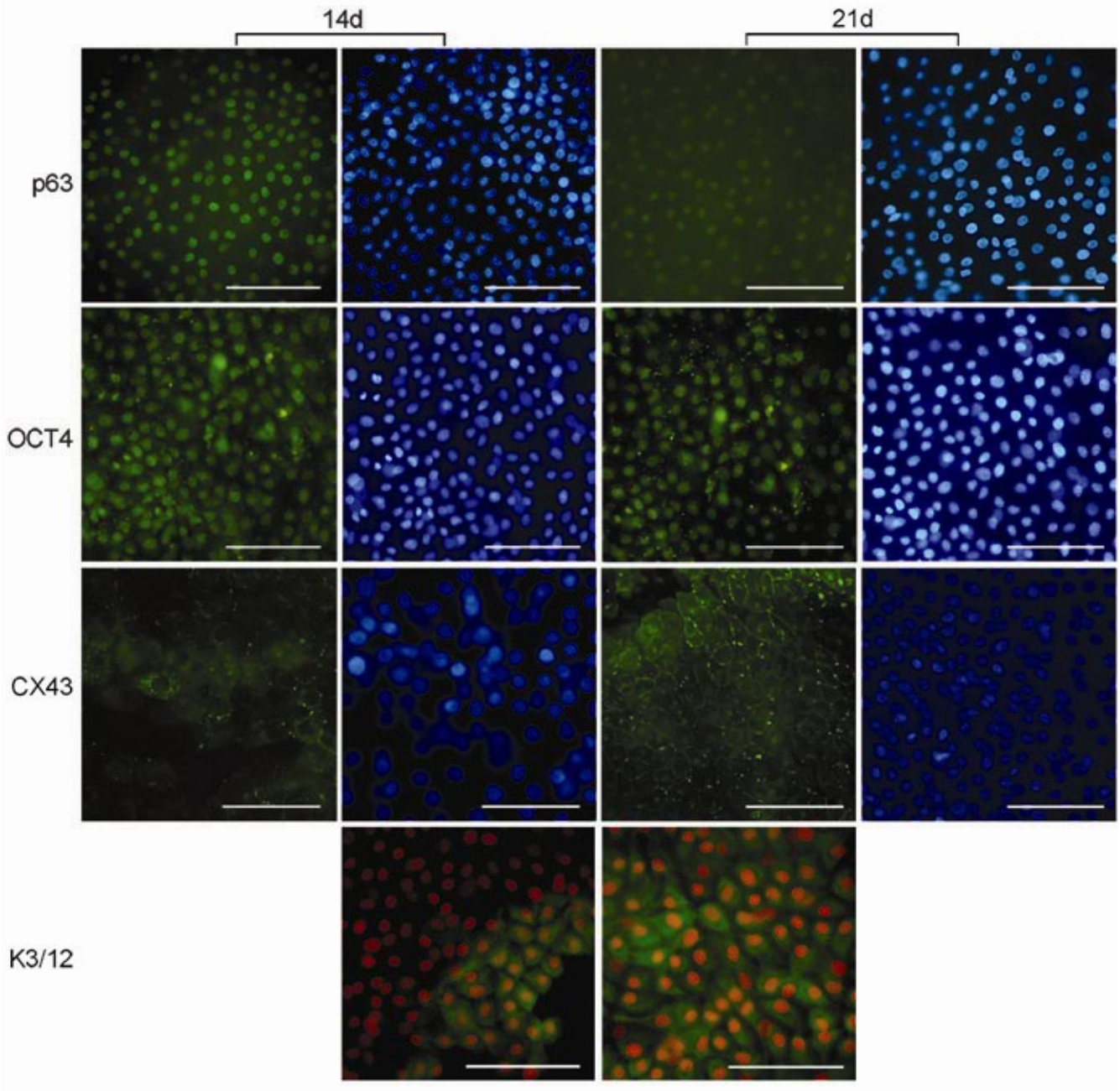
جدول ۴. نتایج ایمنوسیتوشیمی و ایمنوبلات در نمونه‌های بافتی و زمانهای متفاوت کشت سلولهای لیمبوسی

نمونه ها	Immunoblot				Immunocytochemistry			
بافت ها	K3/K12	P63	Oct4	Cultured Cells	K3/K12	Cx43	P63	Oct4
ملتحمه	+	+	+	7^{th} d	N/D	N/D	N/D	N/D
لیمبوس	-	+	+	14^{th} d	17.60±6.63	7.43±4.28	78.41±7.24	60.27±0.90
قرنیه	+	+/-	+	21^{st} d	34.85±8.00	30.20±8.23	64.80±3.83	65.84±0.53



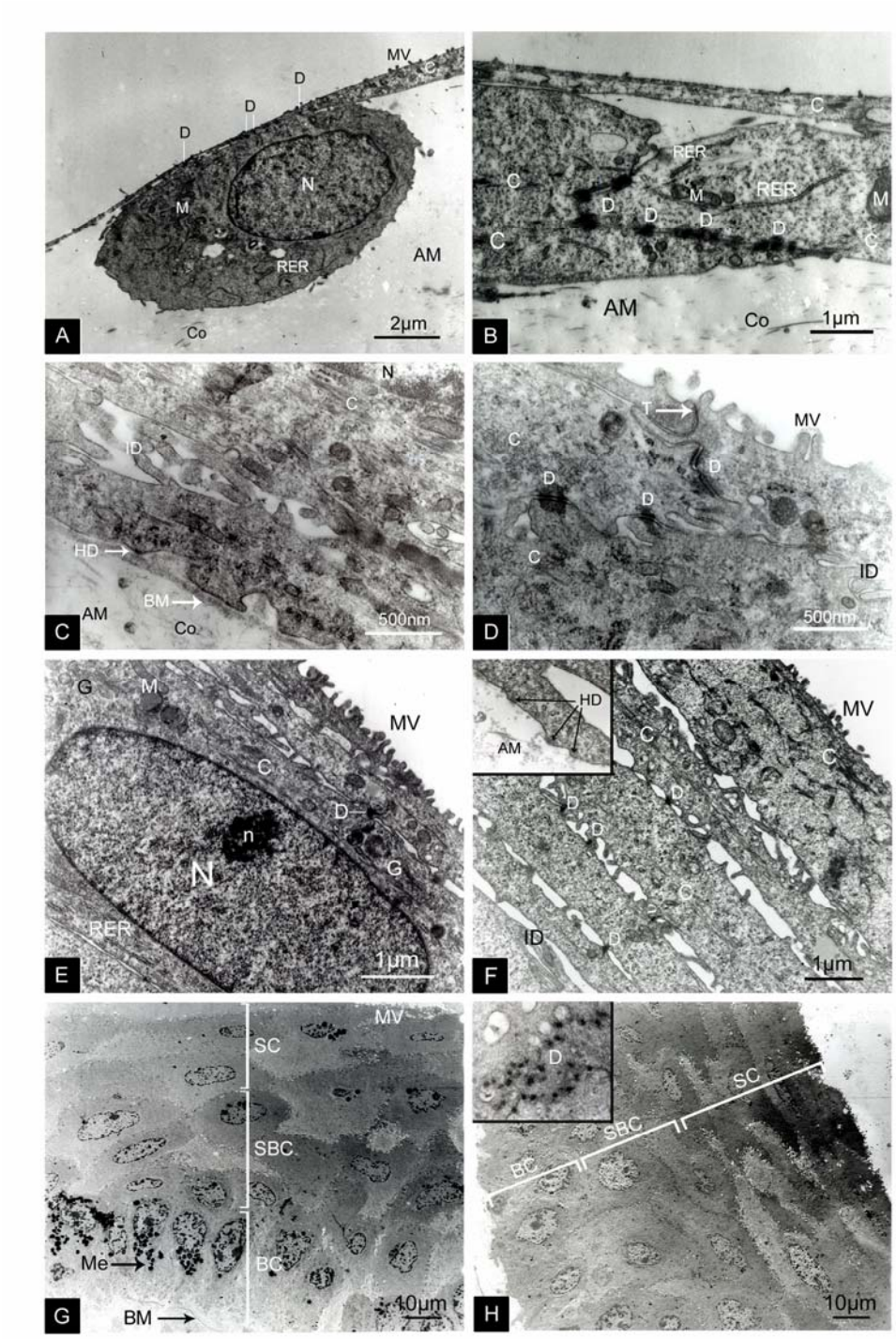
شکل ۲ نتایج بیان ژنهای اختصاصی قرنیه ، لیمبال ، OCT4 و Pax6 در نمونه‌های ملتحمه, لیمبال و قرنیه نرمال.(A) تصویر الکتروفورز cDNA ژنهای مربوطه حضور و یا عدم حضور mRNA را برای ژنهای متعلق به چشم (K3, K12, P63, PAX6)و OCT4 را در ٤ نمونه بافت طبیعی و کشت شده را نشان می‌دهد.(B) نتایج RT-PCR نیمه کمی ژنهای K3, K12, P63, PAX6, OCT4 در بافتهای طبیعی و (C) در سلولهای لیمبوسی کشت شده. (D) نتایج ایمنوبلات در بافتهای طبیعی. (.(*: P<0.05, **: P<0.01).K: بافت قرنیه نرمال, L: لیمبال نرمال, C: ملتحمه نرمال, LCE: سلولهای کشت شده لیمبالی, hESC: سلولهای بنیادی جنینی.

www.SID.ir



شکل ۳. نتایج رنگ آمیزی ایمنو فلورسنت برای شاخصهای P63 ، OCT4، کانکسین ٤٣(CX43) و K3/K12 در سلولهای لیمبوسی کشت شده بر پرده آمنیوتیک در روزهای ١٤ و ٢١ پس از کشت. هسته سلولها با هوخست ٣٣٣٤٢ رنگ آمیزی شده اند. بار: ٢٠٠µm

www.SID.ir



شکل ۴ ترانسمیشن الکترون میکروگراف سلولهای لیمبال کشت شده بر روی پرده آمنیوتیک، که فراساختار سلولهای در حال تمایز را در روزهای ۷ (A,B)، ۱٤ (C,D)، ۲۱ (E,F) روز پس از کشت ، لیمبال طبیعی (G) و قرنیه طبیعی (H) نشان میدهد. AM : پرده آمنیوتیک , BM: غشای پایه, C: سیتوکراتین, Co: رشته‌های کلاژن, D: دسموزوم, G: دستگاه گلژی, HD: همی دسموزوم, ID: زواید سلولی پنجه در پنجه, M: میتوکندری, MV: میکروویلی, N: هسته، RER: شبکه آندوپلاسمیک خشن، N : هستک، Me: ملانین، Bc: سلولهای قاعده ایی، SBC : سلولهای مجاور قاعده‌ای، SC: sg,gihd sxpd

www.SID.ir

مطالعه فراساختار سلولهای کشت شده توسط میکروسکوپ الکترونی ترانسمیشن نیزحضور ۲-۷ لایه سلول متشکل از اپیتلیوم سنگفرشی مطبق را نشان داد. تعداد لایه‌های سلولی در کشتهای ۷ و ۱٤ روزه کم و در کل کشت یکنواخت نبود به این ترتیب که در برخی نواحی گاه تنها یک لایه و در نواحی دیگر به سه لایه سلول می‌رسیدند. سلولهای اپیتلیال لیمبال کاملا به هم متصل شده و اتصالات بین سلولی در بین سلولهای مجاور مشاهده شد (شکل ٤A-D). در کشتهای کوتاه مدت میتوکندری، سیتوکراتین و دسموزومها به مقدار کم وجود داشته و هسته سلولها ظاهری کروی داشتند. همچنین فضاهای بین سلولی وسیعی وجود داشت و استطاله‌های سیتوپلاسمی تشکیل نشده یا بسیار کم بودند. این در حالی است که میکروویلیها در سطح فوقانی در حال تشکیل بودند (شکل٤A,D). افزایش مدت کشت به ۲۱ روز سبب افزایش تعداد لایه‌های سلولی به ۷ لایه شد. در ناحیه سطحی سلولهای کشیده و سنگفرشی بیش از لایه‌های پایین تر بوده و در سطح آزاد آنها میکروویلیهای متراکمتر و منظمتری مشاهده می‌شد. هسته دوکی شکل در سلولهای سطحی به ندرت دیده می‌شد اما سلولهای لایه‌های پایین تر دارای هسته‌های بیضی یوکروماتین با هستک مشخص بودند. فواصل بین سلولی در ناحیه قاعده ایی بیش از ناحیه سطحی بود و به نظر می‌رسید که سلولها در ناحیه فوقانی فشرده تر باشند. زواید انگشتی شکل سلولها که در فضاهای بین سلولی به سمت یکدیگر کشیده شده بودند در برخی نواحی با یکدیگر پنجه در پنجه (Interdigit) شده بودند. سلولها توسط دسموزومها ی فراوانی به یکدیگر متصل شده و تعداد این اتصالات در لایه‌های فوقانی بیش از لایه‌های تحتانی بود. در کشتهای طولانی مدت سلولهای بازال به سنتز غشای پایه پرداخته و توسط اتصالات همی دسموزوم به پرده آمنیون متصل می‌شدنددر سیتوپلاسم سلولهای قاعده ای اغلب ارگانلهای سلولی، از جمله دستگاه گلژی، شبکه اندوپلاسمیک خشن و تعداد زیادی میتوکندریهای میله ای شکل دیده می‌شد. همچنین مقادیر متنابهی از سایتوکراتین وجود داشت که مقدار آن در سلولهای سطحی بیش از سلولهای قاعده ای بود (شکل٤ E,F). بررسی فراساختار سلولهای کشت شده شباهتهای زیادی بین این سلولها و قرنیه و لیمبال طبیعی نشان داد(شکل٤ G,H)، با این وجود تفاوتهایی نیز وجود داشت از جمله: فواصل بین سلولی درسلولهای کشت شده بیش از انواع طبیعی بود. و همچنین فراوانی زواید انگشت مانند بین سلولهای مجاور در سلولهای کشت شده بیشتر بود. تعداد دسموزومها نیز درکشتهای طولانی مدت افزایش می‌یافت اما همچنان بسیار کمتر از نمونه‌های In Vivo بود. در سلولهای کشت شده لیمبال، سلولهای قاعده ای برپرده آمنیون حالتی کشیده وسنگفرشی داشتنددرصورتیکه در لیمبال طبیعی سلولهای قسمت قاعده ایی مکعبی شکل بودند(شکل٤ G,H).

بحث

سلولهای بنیادی لیمبال (LSC) سلولهایی با قدرت تکثیر نامحدود بوده و منشاء تامین اپیتلیوم سالم قرنیه و عامل جلوگیری از حرکت سلولهای اپیتلیال و عروق ملتحمه روی سطح قرنیه می‌باشند. بدیهی است آسیب به این سلولها می‌تواند موجب ناپایداری اپی تلیوم قرنیه شود (24). راهکارهای متنوعی جهت ترمیم قرنیه ارائه گردیده که هر کدام مزایا و معایب خود را دارا هستند. در مواردیکه سلولهای بنیادی لیمبال دچار کاهش قابل توجه شده و یا کاملا از بین رفته باشند و سطح قرنیه توسط بافت ملتحمه جایگزین شده باشد تنها راه ممکن پیوند سلولهای بنیادی می‌باشد.

در این مطالعه به بررسی الگوهای بیان ژنهای P63, K3/12, Oct4 در دو سطح پروتئین و mRNA و Pax6 در سطح mRNA و کانکسین ٤۳(CX43) در سطح پروتئین، در نمونه‌های بافتی تازه تهیه شده(in Vivo) قرنیه، لیمبال و ملتحمه پرداخته شد و نتایج با نتایج حاصل از کشت سلولهای لیمبال (in Vitro) بر پرده آمنیوتیک در روزهای ۷، ۱٤ و ۲۱ مقایسه گردید.

Archive of SID

www.SID.ir

مطالعات مورفولوژی نشان داد که سلولهای اولیه‌ای که از تکثیر سلولهای قطعه لیمبال کشت شده بدست آمده اند درابتدا دارای اشکال کروی و کوچک و در حین مهاجرت دوکی شکل می‌باشند. با افزایش زمان کشت سلولها به تدریج به صورت مکعبی در آمده و قدرت تکثیر خویش را حفظ می‌نمایند(شکل ۱). در مطالعه‌ای که توسط M.Grueterich و همکارانش صورت گرفت مشخص‌گردید که سلولهای اپی‌تلیالی ناحیه قاعده ای لیمبال کشت شده بر روی پرده آمنیوتیک ساختاری متراکم با نسبت هسته به سیتوپلاسم مساوی دارند، رشد این سلولها در هفته اول کم و به تدریج افزایش می‌یابد [۹].

سیتوکراتینهای K3/K12 از جمله شاخصهای اختصاصی سلولهای اپیتلیال قرنیه و نه سلولهای لیمبال و ملتحمه ایی در نظر گرفته می‌شوند(۲۶–۲۸). نتایج ما کمی با نظریه فوق متفاوت بود بطوریکه نتایج RT-PCR در نمونه‌های in Vivo نشان داد, بافت لیمبال K3-/K12- , قرنیه K3+/K12+- و ملتحمه K3-/K12+ می‌باشند. در سلولهای کشت شده (LCE) بیان K3 طی ۲۱ روز کشت مشاهده نگردید. این در حالی بود که بیان K12 از روز ۱٤ کشت نمایان گردید و بطور شاخصی در روز ۲۱ افزایش یافت. در این مطالعه از آنتی بادی AE5 که اختصاصی K3 بوده و با K12 نیز واکنش ضعیفی می‌دهد استفاده گردید. بدین ترتیب حضور سلولهای مثبت در ایمنوسیتوشیمی پس از ۱٤ و یا ۲۱ روز کشت و یا حضور باند ضعیف در ملتحمه ممکن است ناشی از حضور سلولهای K12 مثبت باشد. در حقیقت K12 شاخص تمایز سلولهای لیمبال به اپیتلیال قرنیه می‌باشد(۲۹–۳۰). همراه با افزایش نسبی K3/K12 در سلولهای کشت شده، افزایشی نیز در بیان کانکسین ٤۳(CX43)دیده می‌شد. CX43 از جمله پروتئینهای تشکیل دهنده اتصالات روزنه دار(Gap Junctions)می باشد و در کشتهای ۲۱ روزه در مقادیر کم ظاهر گردید. بنظر می‌رسد که عدم حضور CX43 در حفظ خاصیت بنیادی (Stemness) سلولهای لیمبال موثر باشد(۳۱). یکی از شاخصهای پیشنهادی که در سلولهای بنیادی اپیتلیالی و لیمبالی بیان می‌گردد، فاکتور نسخه برداری هسته ای P63 است که وظیفه مهمی در مورفوژنز و ترمیم اپی تلیوم قرنیه به عهده دارد(۳۲–۳٤). ما حضور این پروتئین را در عصاره‌های بافتی توسط وسترن بلات پیگیری کردیم و حضور آن تنها در ملتحمه و لیمبال مشاهده گردید. این در حالی بود که بیان این پروتئین در تمام مراحل کشت توسط ایمنوسیتوشیمی مشاهده گردید و در کشتهای طولانی مدت سلولهای P63+ کاهش معنی داری می‌یافتند که دلیلی بر تمایز آنها می‌باشد.

یکی دیگر از عوامل موثر در تکوین قرنیه، فعالیت صحیح سلولهای بنیادی لیمبال، مهاجرت سلولهای اپیتلیال قرنیه، تولید و حفظ قرنیه در افراد بالغ, فاکتور نسخه برداری Pax6 است [۳۵–۳٦]. نتایج RT-PCR نشان داد که این پروتئین در قرنیه، لیمبال و ملتحمه بیان می‌شود هرچند که بیان آن در ملتحمه کمتر از دو بافت دیگر است. بیان Pax6 در سلولهای کشت شده بطور معنی داری بالاتر از نمونه‌های Invivo بود. همچنین بیان آن در کشتهای طولانی مدت افزایش می‌یافت. به نظر می‌رسد که افزایش بیان در سلولهای کشت شده یا در کشتهای طولانی مدت نشان‌دهنده از نقش ویژه این ژن در صحت تمایز و یا حفظ خصوصیات سلولهای اپیتلیالی کشت شده باشد . در یک مطالعه نشان داده شد که در موشهای هتروژن Pax6+/- در مقایسه با نوع وحشی آن Pax6+/+ میزان تشکیل کلونیهای LSC کمتر بوده و در تشکیل اپی تلیوم قرنیه دچار نقص می‌شوند [۳٦]. oct4 نیز از جمله ژنهایی است که در سلولهای بنیادی جنینی [۳۷] بیان می‌شود. همچنین بیان این ژن در برخی سلولهای سرطانی از جمله کارسینومای سلولهای اپیتلیالی نیز گزارش شده است [۳۸]. نتایج ما نیز نشان داد که این ژن در تمام بافتهای مورد آزمایش و نیز سلولهای کشت شده بیان می‌گردید و در تمام مراحل هیچ تفاوت بیانی بین نمونه‌ها دیده نشد. به‌نظر می‌رسد که بیان این ژن در یک حد پایه در تمام بافتهای چشمی وجود داشته باشد هرچند که مطالعه بیشتری در این زمینه مورد نیاز است.

Archive of SID
www.SID.ir

در مطالعه حاضر فراساختار سلولهای کشت شده روی پرده آمنیوتیک نشان داد که سلولهای قاعده ای کوچک بوده و اتصالات دسموزوم کمی دارند. این اتصالات به تدریج با افزایش زمان کشت افزایش می‌یابد، و تعداد آنها در لایه‌های بالایی بیش از لایه‌های پایینی است. اتصالات همی دسموزوم که در محل اتصال سلولها به پرده آمنیوتیک در اوایل کشت به ندرت دیده می‌شود با افزایش زمان افزایش می‌یابد، همچنین مقدار سیتوکراتین، میتوکندریها و دسموزومها با افزایش مدت کشت بیشتر می‌شود. در اوایل کشت فواصل بین سلولی زیاد بوده که به تدریج کاهش می‌یابد. سلولها در حین رشد و تکثیر استطاله‌های سیتوپلاسمی فراوان تشکیل می‌دهند که پنجه در پنجه هم قرار گرفته و دو سلول را به هم مرتبط می‌سازند. این استطاله‌ها به تدریج افزایش یافته و با کاهش فواصل سلولی خصوصا در سلولهای سطحی کاهش می‌یابند. میکروویلیها از جمله استطاله‌های سطحی سلول هستند که سبب افزایش سطح تبادل سلول می‌شوند. این زواید سلولی در ابتدای کشت کم بوده و به تدریج افزایش می‌یابند. تصاویر میکروسکوپ الکترونی اسکنینگ تأیید کننده حضور میکرویلیها و مقادیر زیاد دسموزومها در سلولهای کشت شده می‌باشد.

در مطالعه استوبیر (Stoiber) و همکاران که از پیوندهای اتوگرافت و آلوگرافت سلولهای بنیادی لیمبال کشت شده روی پرده آمنیون برای ترمیم قرنیه بیماران استفاده کرده بودند مشاهده شد که بعد از حدود ١٤ تا ٢٨ روز سطح قرنیه توسط سلولهای مشتق از لیمبال پوشیده شده و پرده آمنیون نیز که در بین این سلولها و استرومای قرنیه وجود داشت به مرور شفاف تر شده است به طوری‌که پس از گذشت چند ماه دیگر قابل تشخیص نبود. همچنین مطالعات فراساختاری نشان داد که سلولهای کراتوسیت کاملا از نظر ترشحی فعال بوده و نیز در زیر سلولهای اپیتلیال غشای پایه‌ای هرچند ناپیوسته تشکیل شده اند [٢٤].

بنابر نتایج این مطالعه نشان می‌دهد کشت سلولهای بنیادی لیمبال روی پرده آمنیوتیک باعث می‌شود این سلولها خصوصیاتی شبیه حالت In vivo داشته باشند. به‌نظر می‌رسد این روش کشت می‌تواند اولین قدم در راه مهندسی بافتهای اپیتلیالی و به‌ویژه اپیتلیوم قرنیه باشد که منجر به طراحی روشهای درمانی نوین شود.

تقدیر و تشکر

این پروژه با حمایت مالی پژوهشکده رویان و سازمان گسترش صنایع و نوسازی ایران (بیدکو) به انجام رسیده است که بدینوسیله از جناب آقای دکتر عبدالحسین شاهوردی معاون محترم پژوهشی و آقای دکتر احمد وثوق معاون محترم پشتیبانی و خدمات تخصصی پژوهشکده رویان بابت حمایت از طرح مذکور تشکر و قدردانی می‌شود. از آقای علی فرخی بابت انجام بخشی از آزمایشهای مولکولی و آقای احسان تقی آبادی کارشناس بخش پیوند پژوهشکده رویان سپاسگزاری می‌گردد.

References

1. **Boulton M, Albon J.** Stem cells in the eye. Int J Biochem Cell Biol 2004; 36: 643-57.
2. **Pellegrini G, Golisana O, Paterna P**. Location and Clonal analysis of stem cells and their differentiation progeny in the human ocular surface . J Cell Biol. 1999; 145(4): 76-82.
3. **Dua HS, Azuara-Blanco A**. Limbal stem cells of the corneal epithelium. Surv Ophthalmol 2000; 4495: 415-25.
4. **Sang wan V S**. Limbal stem cells in health and disease, Biosicence Reports 2001; 121(4):

Archive of SID
www.SID.ir

385-405.

5. **Davanger M, Evensen A**. Role of the pericorneal papillary **structure in renewal of corneal epithelium.** Nature. 1971 19; 229(5286): 560-1.
6. **Virender S**. Limbal stem cells in health and diasease. Biosci Report 2001; 21
7. **Daniels JT, Dart JK, Tuft SJ, Khaw PT.** Corneal stem cells in review. Wound Repair Regen 2001; 9: 483-494
8. **Wolosin JM, Budak MT, Akinci MA.** Ocular surface epithelial and stem cell development. Int J Dev Biol 2004; 48: 981-91
9. **Grueterich M, Tseng SC.** Human limbal progenitor cells expanded on intact amniotic membrane ex vivo. Arch Ophthalmol 2002 783-90.
10. **Puangsricharern V Tseng SCG**. Cytologic Evidence of corneal disease with limbal stem cell deficiency. opthalmology 1995; 102: 1476-85.
11. **Ramaesh K, Dhillon B.** Ex vivo expansion of corneal limbal epithelial/stem cells for corneal surface reconstruction. Europej opthelmol 2003; 13: 515-24.
12. **Chen J.J.Y, Tseng SCG**. Abnormal Corneal epithelial wound healing in partial thickness removal of epithelium . In vest opthalmol vis sci 1991; 22: 19-33.
13. **Espana EM, Prabhasawat P, Grueterich M, Solomon A, Tseng SC.** Amniotic membrane transplantation for reconstruction after excision of large ocular surface neoplasias. Br J Ophthalmol 2002; 86: 640-5.
14. **Kozomi N, Inatomi T, Quantock AJ**. Amniotic membrane as a substrate for cultivating limbal corneal epithelial cells for autologous transplantation in rabbit. Cornea 2000; 19: L65-71.
15. **Grueterich M, Tseng SC.** Human limbal progenitor cells expanded on intact amniotic membrane ex vivo. Arch Ophthalmol 2002120(6):783-90.
16. **Kim JC, Tseng SCG**. Transplantation of preserved human amniotic membrane for surface reconstruction in severly damaged rabbit Corneas, Cornea 1995; 14: 473-84.
17. **Tsubota K, Satake Y, Ohyama M**. Surgical reconstruction of ocular surface in advanced ocular Cicatricial pemphigoid and Stevens – Johnson syndrome. AM J Ophthalmol 1996; 122: 38-52.
18. **Shimazaki J. Yang H-y, Tsubota K**, Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction in patients with chemical and thermal burns. Ophthalmol 1997; 104: 2068-76.
19. **Tseng SCG, Prabhasaeat P, Bartan K**. Amniotic membrane transplantation without limbal allografts for corneal surface reconstruction in patients with limbal stem cell deficiency . Arch Ophthalmol 1998; 116: 431-10.
20. **Li DQ, Chen Z, Song XJ, De Paiva CS, Kim HS, Pflugfelder SC.** Partial enrichment of a population of human limbal epithelial cells with putative stem cell properties based on collagen type IV adhesiveness. Exp Eye Res

Archive of SID
www.SID.ir

2005; 80: 581-90

21. **Kubo M, Sonoda Y, Muramatsu R, Usui M.** Immunogenicity of human amniotic membrane in experimental xenotransplantation. Invest Ophthalmol Vis Sci 2001; 42: 539-46.
22. **Meller D, Pires RT, Tseng SC.** Ex vivo preservation and expansion of human limbal epithelial stem cells on amniotic membrane cultures.Br J Ophthalmol 2002; 463-71.
23. **Grueterich M., Espana E.M , Tseng S.C.G.** Modulation of keratin and connexin expression in limbal epthelial expandedon denuded Amniotic membrane with and Without 3T3 Fibroblast feeder layer. Invest opthalmol Res SG.2003; 44: 4230-360.
24. **Dogru M, Tsubota K**. Current concepts in ocular surface reconstruction. Semin Ophthalmol 2005; 20: 75-93.
25. **Du Y, Chen J, Funderburgh JL, Zhu X, Li L.** Functional reconstruction of rabbit corneal epithelium by human limbal cells cultured on amniotic membrane. Mol Vis 2003; 635-43
26. **Barnard Z, Apel J, Harkin D**. Phenotypic analyses of limbal epithelial cell cultures derived from donor corneoscleral rims. Clin Experiment Ophthalmol 2001;29:138-42.
27. **Kinoshita S, Adachi W, Sotozono C, Nishida K, Yokoi N, Quantock AJ, et al.** Characteristics of the human ocular surface epithelium. Prog Retin Eye Res 2001; 20: 639-73.
28. **Harkin DG, Barnard Z, Gillies P, Ainscough SL, Apel AJ.** Analysis of p63 and cytokeratin expression in a cultivated limbal autograft used in the treatment of limbal stem cell deficiency. Br J Ophthalmol 2004; 88:1154-8.
29. **Liu CY, Zhu G, Westerhausen-Larson A, Converse R, Kao CW, Sun TT, et al.** Cornea-specific expression of K12 keratin during mouse development. Curr Eye Res. 1993; 12: 963-74
30. **Shiraishi A, Converse RL, Liu CY, Zhou F, Kao CW, Kao WW.** Identification of the cornea-specific keratin 12 promoter by in vivo particle-mediated gene transfer.Invest Ophthalmol Vis Sci 1998; 39:2554-61.
31. **Matic M, Petrov IN, Chen S, Wang C, Dimitrijevich SD, Wolosin JM**. Stem cells of the corneal epithelium lack connexins and metabolite transfer capacity. Differentiation 1997; 61:251-260.
32. **Chee KY, Kicic A, Wiffen SJ.** Limbal stem cells: the search for a marker. Clin Experiment Ophthalmol. 2006; 34:64-73.
33. **Schlotzer-Schrehardt U, Kruse FE.** Identification and characterization of limbal stem cells. Exp Eye Res 2005; 81:247-64.
34. **Pellegrini G, Dellambra E, Golisano O, et al**. p63 identifies keratinocyte stem cells. Proc Natl Acad Sci USA 2001; 98:3156-61.
35. **Davis J, Duncan MK, Robison WG Jr, Piatigorsky J.** Requirement for Pax6 in corneal morphogenesis: a role in adhesion. J Cell Sci 2003; 116:2157-67.
36. **Collinson JM, Chanas SA, Hill RE, West JD.** Corneal development, limbal stem cell

Archive of SID
www.SID.ir

function, and corneal epithelial cell migration in the Pax6 (+/-) mouse. Invest Ophthalmol Vis Sci 2004; 45:1101-8.

37. **Baharvand H, Ashtiani SK, Taee A, Massumi M, Valojerdi MR, Eftekhari P, et al**. Generation of new human embryonic stem cell lines with diploid and triploid karyotypes. Dev Growth Differ 2006; 48:117-28.
38. **Tai MH, Chang CC, Kiupel M, Webster JD, Olson LK, Trosko JE.** Oct4 expression in adult human stem cells: evidence in support of the stem cell theory of carcinogenesis. Carcinogenesis 2005; 26:495-502.

Archive of SID

www.SID.ir