بقا و مهاجرت سلول‌های نوروسفر مشتق از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان بعد از پیوند به فضای زیر شبکیه در مدل تخریب ماکولای وابسته به سن در موش‌های صحرایی آلبینو

حمید ابوطالب کدخدائیان[۱]، تقی طریحی[۲]، حمید احمدیه[۳]، حسین ضیایی اردکانی[۴]، نارسیس دفتریان[۵]، طاهر طاهری[۶]

۱. کارشناس ارشد آناتومی، گروه آناتومی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

۲. استاد، گروه آناتومی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران (مؤلف مسوول) تلفن ثابت: ۲۱-۸۲۸۸۳۸۹۵ takialtr@modares.ac.ir.

۳. استاد، گروه چشم پزشکی، مرکز تحقیقات مهندسی بافت چشم، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی، تهران، ایران.

۴. دانشیار، گروه چشم‌پزشکی، مرکز تحقیقات مهندسی بافت چشم، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی، تهران، ایران.

۵. استادیار، گروه چشم‌پزشکی، مرکز تحقیقات مهندسی بافت چشم، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی، تهران، ایران.

۶. جراح مغز واعصاب مرکز تحقیقات علوم اعصاب شفا، بیمارستان خاتم الانبیا، تهران، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: بیماری‌های تخریبی شبکیه یکی از علل شایع نابینایی در جهان است. هدف از این مطالعه بررسی پیوند سلول‌های نوروسفر مشتق از بافت مغز استخوان به فضای زیر شبکیه در مدل حیوانی (تخریب لایه رنگدانه دار شبکیه با استفاده از سدیم یدیت) بود.

روش بررسی: موش‌های صحرایی آلبینو مقدار ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم از سدیم یدیت در فضای پشت چشم دریافت کردند و بعد از ۳۰ روز، بررسی بافتی با استفاده از هول مانت لایه رنگدانه دار و همچنین رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین انجام شد. سلول‌های بنیادی مشتق از بافت مغز استخوان از استخوان فمور موش‌های صحرایی استخراج و تحت تأثیر محیط تمایزی نوروسفر به سلول‌های شناور نوروسفر تبدیل شد. سلول‌های به‌دست‌آمده با نشانگر هسته‌ای BrdU نشان‌دار و به فضای زیر شبکیه تزریق شدند. ۷ روز بعد از تزریق، برش بافتی تهیه شد و بقا، مهاجرت و همچنین نحوه قرارگیری سلول‌های تزریق‌شده با استفاده از ایمونوهیستوشیمی بررسی شد.

یافته‌ها: ۳ روز بعد از تزریق سدیم یدیت، تغییرات پاتولوژی ازجمله افزایش در نور فلوئورسنس، هایپرتروفی و چندهسته‌ای شدن در لایه رنگدانه دار مشاهده شد و در بررسی بافتی، به‌هم‌ریختگی قسمت خارجی فوتورسپتور ها و همچنین تغییرات لایه رنگدانه دار دیده شد. یافته‌های ایمونوهیستوشیمی ۷ روز بعد از پیوند سلولی نشان داد که سلول‌های تزریق‌شده توانسته‌اند در فضای زیر شبکیه زنده بمانند و به لایه رنگدانه دار و همچنین به لایه شبکیه مهاجرت کرده و در کنار سلول‌های بافت میزبان قرارگرفته‌اند.

نتیجه‌گیری: سلول‌های بنیادی مزانشیمی به دلیل سهولت در دسترسی، منبع مناسبی برای پیوند هستند. توانایی تمایز این سلول‌ها به رده عصبی و همچنین توانایی بقا و مهاجرت این سلول‌ها بعد از پیوند، در مدل‌های آسیب شبکیه، می‌تواند راهی برای درمان بیمارهای تخریبی شبکیه باشد.

کلیدواژه‌ها: سلول‌های نوروسفر، سلول‌های بنیادی مغز استخوان، سدیم یدیت، تخریب ماکولا وابسته به سن

وصول مقاله:۹۴/۹/۱۴ اصلاحیه نهایی:۹۵/۲/۵ پذیرش:۹۵/۲/۷

مقدمه

بیماری تخریب ماکولا وابسته به سن (Age Related Macular Degeneration) مهم‌ترین علت اختلال بینایی در میان افراد مسن در جوامع پیشرفته است و در افراد بالای ۵۰ سال اتفاق می‌افتد. در حدود ۱/۷۵ میلیون نفر در ایالات متحده امریکا از این بیماری رنج می‌برند (۱) و این بیماری در بین حدود ۷۳ میلیون نفر در مرحله متوسط است که این بیماران نیز در معرض پیشرفت بیماری و تبدیل‌شدن آن به حالت پیشرفته هستند (۲). وجود ذرات دروسن که از ویژگی های این بیماری است، به دلیل تجمع رسوبات در فضای خارج سلولی است. این رسوبات حاوی چربی، پروتئین، لیپوپروتئین و ذرات سلولی است که بین لایه بروخ و غشای پایه سلول‌های رنگدانه دار چشم (Retinal Pigmented Epithelium) یا درون لایه بروخ قرار می گیرد (۳). دلایل تشکیل این ذرات عبارت است از: ۱- افزایش تبادل قسمت خارجی فوتورسپتورها، ۲- اختلال در فعالیت سلول‌های RPE، ۳- آسیب ناشی از استرس اکسیداتیو، ۴- افزایش سن و تخریب عناصر سازنده غشای بروخ، ۵- کاهش در میزان باز جذب مواد از لایه بروخ به لایه کوریوکاپیلاری و ۶- فعال شدن سیستم ایمنی. به‌طورکلی عوامل خطر این بیماری شامل سیگار، رژیم غذایی، جنسیت و تاریخچه خانوادگی (۴) است.

به دلیل اینکه ماکولا ناحیه‌ای بسیار حساس در شبکیه است و این ناحیه در شبکیه موش وجود ندارد، بنابراین استفاده از مدل های حیوانی برای این بیماری محدود است. امروزه مدل ایده آل برای بیماری AMD وجود ندارد اما استفاده از مدل هایی که بیماری‌های انسانی را شبیه‌سازی می کند، اطلاعات مفیدی در مورد آسیب‌شناسی این بیماری فراهم می کند (۴). اتفاقات پاتولوژی که در بیماری AMD در انسان دیده می‌شود در مدل‌های حیوانی نیز دیده می‌شود همانند تشکیل دروسن، ضخیم شدن غشای بروخ، تخریب شبکیه، تشکیل عروق جدید در لایه کوروییید (Choroidal NeoVascularization)، و از بین رفتن لایه RPE در قسمت‌های مختلف. تلاش‌هایی برای استفاده از داروهای مختلف برای ایجاد آسیب در لایه RPE و شبکیه انجام‌شده است. یکی از مواد شیمیایی مورداستفاده، سدیم یدیت است ($NaIO_3$) که با استفاده از آن لایه RPE دچار تخریب می‌شود. سدیم یدیت به شکل اختصاصی روی لایه RPE اثر گذاشته و موجب تخریب فوتورسپتورها و لایه کوریوکاپیلاری به‌طور ثانویه می‌شود. تخریب با این ماده وابسته به دوز و زمان است و موجب تغییرات ریخت شناسی و رفتاری می‌شود (۵).

امروزه درمان جایگزینی شبکیه با استفاده از سلول‌های بنیادی که قابلیت تکثیر داشته و می‌توانند به سلول‌های دیگر تمایز یابند شدت بیشتری به خود گرفته است (۶). مطالعات متعددی صورت گرفته است تا بهترین نوع سلول برای پیوند در شبکیه مشخص شود. همچنین نحوه قرارگیری سلول‌های RPE و شبکیه به‌گونه‌ای است که فضای مناسبی برای تزریق در زیر شبکیه را فراهم می‌سازد. از سلول‌های متعددی برای تولید سلول های RPE و فوتورسپتور استفاده‌شده است که عبارتند از سلول‌های بنیادی شبکیه (Retinal Stem Cells)، سلول‌های بنیادی رنگدانه ای شبکیه (Retinal Pigmented Epithelium Stem Cells)، سلول‌های بنیادی جنینی (Embryonic Stem Cells)، سلول‌های مجدد برنامه‌ریزی‌شده (Induced Pluripotent Stem Cells)، سلول‌های بنیادی عصبی (Neural Stem Cells) و سلول های مزانشیمی شامل سلول‌های بنیادی مغز استخوان (Bone Marrow Stromal Stem Cells) و سلول‌های بنیادی چربی (Adipose Derived Stem Cells) (۷).

با توجه به اینکه سلول های رنگدانه دار و عصبی شبکیه از سلول های بنیادی در لوله عصبی جنین مشتق می شوند بنابراین استفاده از سلول هایی که شبیه به سلول های بنیادی عصبی هستند (همانند سلول های نوروسفر) ممکن است

شرایط طبیعی را تقلید کنند. همچنین تزریق در فضای زجاجیه با محدودیت هایی از جمله سد لایه محدود کننده داخلی مواجه است و بنابر محل آسیب، تزریق سلول به فضای زیر شبکیه در آسیب هایی که به لایه رنگدانه دار و فوتورسپتورها محدود است بسیار مفید است. بنابراین در این مطالعه سلول های بنیادی مزانشیمی به سلول های نوروسفر ترانس دیفرانسیه شدند و این سلول‌ها که وارد رده عصبی شده اند به فضای زیر شبکیه در موش‌های صحرایی آلبینو دریافت کننده سدیم یدیت جهت آسیب لایه رنگدانه دار تزریق شدند. بقا و مهاجرت این سلول‌ها به لایه RPE و شبکیه بررسی شد.

روش بررسی

گروه‌های موردمطالعه:

در یک مطالعه تجربی، تعداد ۲۰ عدد رت آلبینو نژاد ویستار (مؤسسه رازی، ایران، تهران) با وزن ۲۵۰-۲۰۰ گرم در این آزمایش استفاده شد. رت ها در محیط آزمایشگاهی استاندارد با ۱۲ ساعت چرخه نور-تاریکی در دمای ۲۱ قرار داده شدند. روش کار روی حیوانات با توجه به مقررات بیانیه ARVO انجام انتخاب شد و توسط کمیته اخلاق دانشگاه تربیت مدرس تائید شد. رت ها بطور تصادفی به گروه‌های زیر تقسیم شدند: (۱) گروه دریافت‌کننده نوروسفر در فضای زیر شبکیه (n=۱۰) و (۲) گروه درمان‌نشده به‌عنوان کنترل (n=۱۰).

مدل تخریب لایه RPE:

پودر سدیم یدیت (سیگما، آمریکا) در بافر فسفات سالین (PBS) به غلظت ۲/۵ میکروگرم/میلی‌لیتر حل شد و در دمای ۴ درجه نگهداری شد. مقدار ۱۰۰ میکرو لیتر از محلول آماده‌شده با استفاده از سرنگ انسولینی به فضای پشت چشم تزریق شد. روش کار بدین‌صورت بود که ابتدا سر حیوان تثبیت شد و پوست سر حیوان به سمت عقب کشیده شد. سوزن سرنگ انسولینی از گوشه داخلی چشم وارد فضای سینوس پشت چشم شد. بعد از ورود سوزن به فضا، محلول در این فضا تزریق و بعد از اتمام، سوزن به آهستگی خارج شد (۸).

کشت سلولی:

سلول های بنیادی مزانشیمی از بافت مغز استخوان موش‌های صحرایی بر اساس روش زیر جداسازی شدند (۹). به‌طور خلاصه، با استفاده از سرنگ، مغز استخوان از فمور و تیبیا استخراج شد و به مدت ۱۰ دقیقه با دور موتور ۱۵۰۰ rpm سانتریفوژ شد. به سلول‌ها محیط کشت DMEM با ۱۰ درصد FBS اضافه شد و به فلاکس‌های ۲۵T انتقال داده شدند. بعد از ۲۴ ساعت، سلول‌های که به کف نچسبیده بودند دور ریخته شدند و سلول‌های چسبیده به فلاسک به مدت چند هفته کشت داده شدند. سلول‌ها تا رسیدن به یکدستی ۹۰ درصد، پاساژ داده شدند و بعد از پاساژ ۳ و ۴ در این مطالعه استفاده شدند. برای تأیید این سلول‌ها از روش ایمونوسیتوشیمی استفاده شد. ابتدا سلول‌ها با پارافرمالدیید ۴٪ به مدت ۱۵ دقیقه ثابت شدند و پس از شستشو به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در سرم بز یا خرگوش مسدود شدند. سلول ها با آنتی‌بادی اولیه به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه انکوبه شدند، به دنبال آن در آنتی‌بادی ثانویه (Fluoresent isothiocyanate (FITC)) به مدت ۱ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند و در پایان، هسته به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق با پروپیدیوم یدیت (۱۰۰۰: ۱) نشان‌دار شد. سلول‌ها در زیر میکروسکوپ فلورسنت (Olympus Optical, Tokyo, Japan) مشاهده شدند. لیست آنتی‌بادی های مورداستفاده در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱ لیست آنتی‌بادی‌های مورداستفاده برای بررسی ایمونوسیتوشیمی سلول‌های بنیادی مغز استخوان

آنتی بادی اولیه	میزبان	تیتر	سلول	تامین کننده
فیبرونکتین	موش	۱:۵۰۰	بنیادی مغز استخوان	abcam, Cambridge, UK
CD90	موش	۱:۵۰۰	تمایز نیافته	abcam, Cambridge, UK
CD166	خرگوش	۱:۵۰۰	استرومایی	abcam, Cambridge, UK
CD44	خرگوش	۱:۱۰۰	استرومایی	abcam, Cambridge, UK
CD34	موش	۱:۱۰۰	خونساز	abcam, Cambridge, UK
نستین	موش	۱:۵۰	بنیادی عصبی	abcam, Cambridge, UK
GFAP	خرگوش	۱:۴۰۰	بنیادی عصبی	abcam, Cambridge, UK

تولید نوروسفر از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان بر اساس روش Fu L و همکاران انجام شد (۱۰). به‌طور خلاصه، سلول‌های بنیادی مزانشیمی با تریپسین EDTA ۰/۵٪ از کف فلاسک کنده شدند و در فلاسک نچسب حاوی محیط کشت NSC محتوی ۱۲ DMEM/F AthenaES)، بالتیمور، MD) همراه با ۲۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر از عامل رشد اپیدرمی (R D & EGF سیستم، شرکت، مینیاپولیس، MN) و عامل رشد فیبروبلاست عمومی bFGF (سیستم R & D، شرکت، مینیاپولیس، منگنز) و مکمل ۲۷B کشت داده شدند. نوروسفرها ظرف ۱۰-۷ روز در محیط کشت ظاهر شدند. برای ایمونوسیتوشیمی نوروسفرها ابتدا سلول‌ها در پارافرمالدیید ۴٪ در PBS ثابت شدند، سپس سلول‌ها با آنتی‌بادی اولیه (جدول ۲) به مدت یک‌شب در دمای ۴ درجه و سپس با آنتی‌بادی ثانویه)(FITC) isothiocyanate) به مدت ۱ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. در پایان، هسته با نشانگر هسته‌ای DAPI به غلظت (۱:۱۰۰۰) رنگ‌آمیزی شد. سلول‌ها توسط میکروسکوپ فلورسنت (Olympus Optical، توکیو، ژاپن) مشاهده شدند.

جدول ۲ آنتی‌بادی‌های مورداستفاده در ایمونوسیتوشیمی نوروسفرها

آنتی بادی اولیه	میزبان	تیتر	سلول	تامین کننده
SOX_2	خرگوش	۱:۳۰۰	نوروسفر	abcam, Cambridge, UK
OCT4	موش	۱:۳۰۰	نوروسفر	abcam, Cambridge, UK
Nanog	موش	۱:۳۰۰	نوروسفر	abcam, Cambridge, UK
NF68	موش	۱:۳۰۰	نوروسفر	abcam, Cambridge, UK
NF160	موش	۱:۳۰۰	نوروسفر	abcam, Cambridge, UK
NF200	موش	۱:۳۰۰	نوروسفر	abcam, Cambridge, UK
MAP2	موش	۱:۳۰۰	نوروسفر	abcam, Cambridge, UK
Nestin	موش	۱:۵۰	نوروسفر	abcam, Cambridge, UK

نشان‌دار کردن سلول‌ها و پیوند سلولی:

۳۰ روز بعد از تزریق سدیم یدیت و تأیید مدل، چشم رتها برای پیوند سلولی آماده شد. برای پیوند ابتدا سلول‌های کشت داده‌شده با استفاده از نشانگر هسته‌ای BrdU نشان‌دار

شدند. برای اینکار پودر BrdU در حلال حل شد و به ازای هر ۲/۵ میلی‌لیتر از محیط کشت مقدار ۷/۸۱ میکرولیتر از BrdU به محیط سلول اضافه شد و به مدت ۷۲ ساعت درون انکوباتور قرار گرفت. نشان‌دار شدن سلول‌ها به روش زیر تأیید شد.

ابتدا سلول‌ها با پارافورمالدیید ۴ درصد به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق ثابت شدند. بعد از شستشو با PBS اسید هیدروکلریک ۲ نرمال اضافه شد و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شدند. سپس بورات سدیم ۰/۱ مولار با ph۸،۵= به آن اضافه شد و به مدت ۲ دقیقه انکوبه شدند. بعد از شستشو، با تریتون X-۱۰۰ و BSA به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شدند و مجدداً شستشو با PBS/BSA انجام شد. سلول‌ها با آنتی BrdU انکوبه و با محلول PBS/BSA شستشو داده شدند. مجدداً سلول‌ها با آنتی بادی ثانویه به مدت یک ساعت در دمای اتاق انکوبه شدند. بعد از شستشوی سلول‌ها با PBS، مانت شدند و در زیر میکروسکوپ فلئورسنس با طیف نور آبی مشاهده قرار شدند (۱۱).

بعد از تأیید سلولی، مابقی سوسپانسیون سلولی حاوی حدود ۳× $۱۰^{۴}$ از نوروسفرهای زنده در ۳ میکرو لیتر PBS به فضای زیر شبکیه از طریق یک برش کوچک در صلبیه و با استفاده از پیپت شیشه‌ای (قطر داخلی، ۷۵-۵۰ میکرومتر) متصل شده به یک سرنگ ۱۰ میکرو لیتری (همیلتون، رنو، NV) تزریق شد. برای کاهش فشار داخل چشم و محدود کردن خروج سلول‌های تزریق‌شده، قرنیه با استفاده از سرنگ انسولینی سوراخ شد (۱۲).

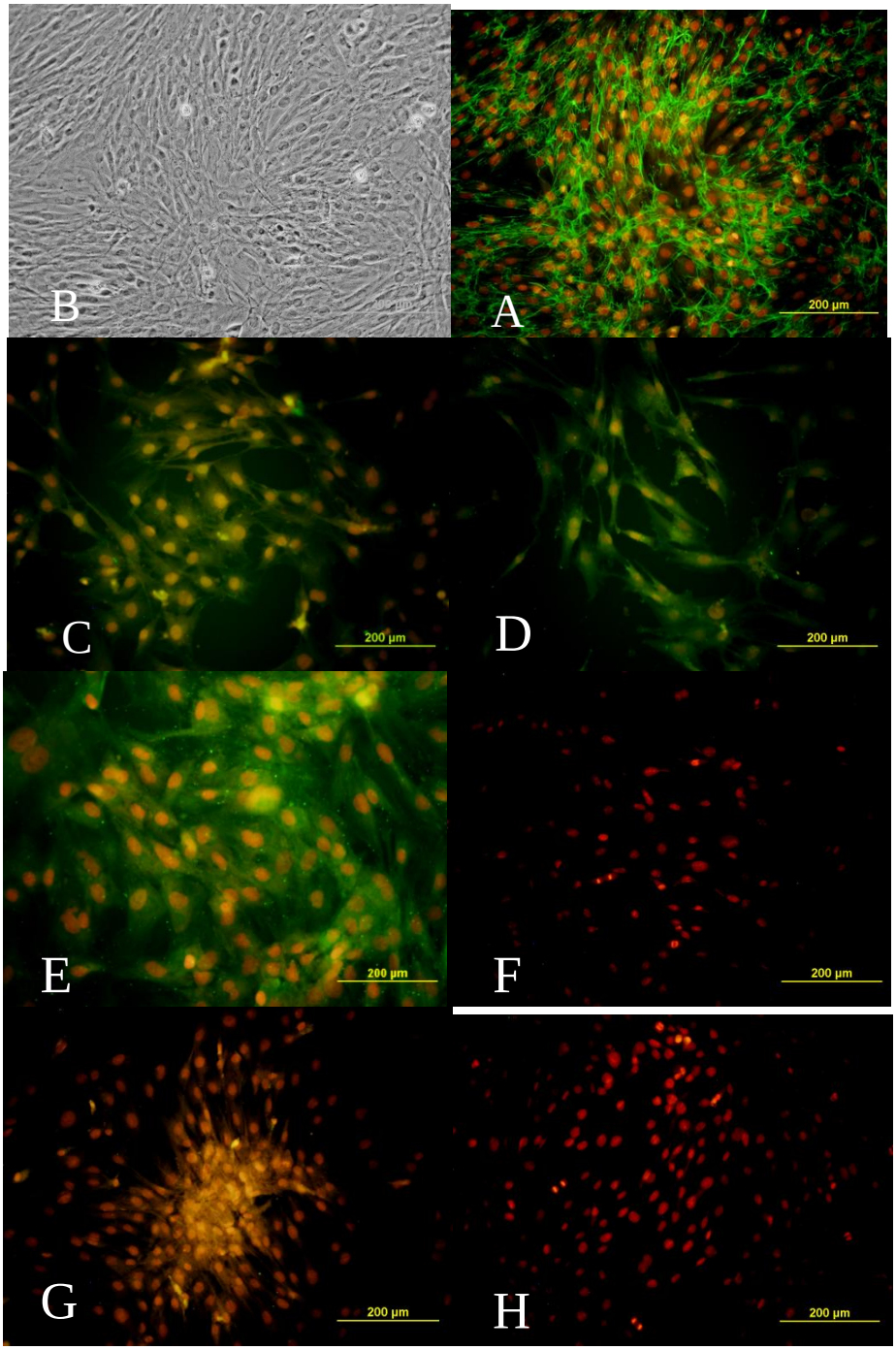
بررسی بافتی:

از تزریق داخلی صفاقی کتامین (۴۰ میلی گرم/کیلوگرم) و زایلزین (۴ میلی گرم/کیلوگرم) برای بیهوش کردن رت ها استفاده شد. سپس با استفاده از پنس و قیچی چشم‌ها خارج و درون پارافرمالدیید ۴ درصد قرار داده شدند. بعد از گذشت دو ساعت با استفاده از میکروسکوپ جراحی قسمت قدامی چشم، باز شد و قسمت خلفی مجدداً درون پارافرمالدیید ۴ درصد به مدت یک‌شب قرار داده شد. در روز بعد نمونه‌ها از درون پارافرمالدیید ۴ درصد خارج و وارد پروسه بافتی شدند. نمونه‌ها با استفاده از پارافین قالب گیری شدند. برش عرضی قالب‌ها به ضخامت ۷-۵ میکرومتر انجام شد و با هماتوکسیلین و ائوزین رنگ شدند. برای بررسی هول مانت RPE، بعد از خارج نمودن چشم‌ها قسمت قدامی آنها جدا شد. سپس بافت همبند چسبیده به اسکلرا برداشته شد و نمونه روی لام قرار گرفت و با استفاده از تیغ بیستوری ۴ برش عمودی زده شد. شبکیه عصبی از مابقی لایه‌ها جدا شد و لایه RPE از لایه کوروییدو اسکلرا جدا و روی لام قرار داده شد. بعد از شستشو، بافت مانت شد و در زیر میکروسکوپ فلوئورسنس مشاهده شد.

یافته‌ها

کشت سلول‌های بنیادی مغز استخوان:

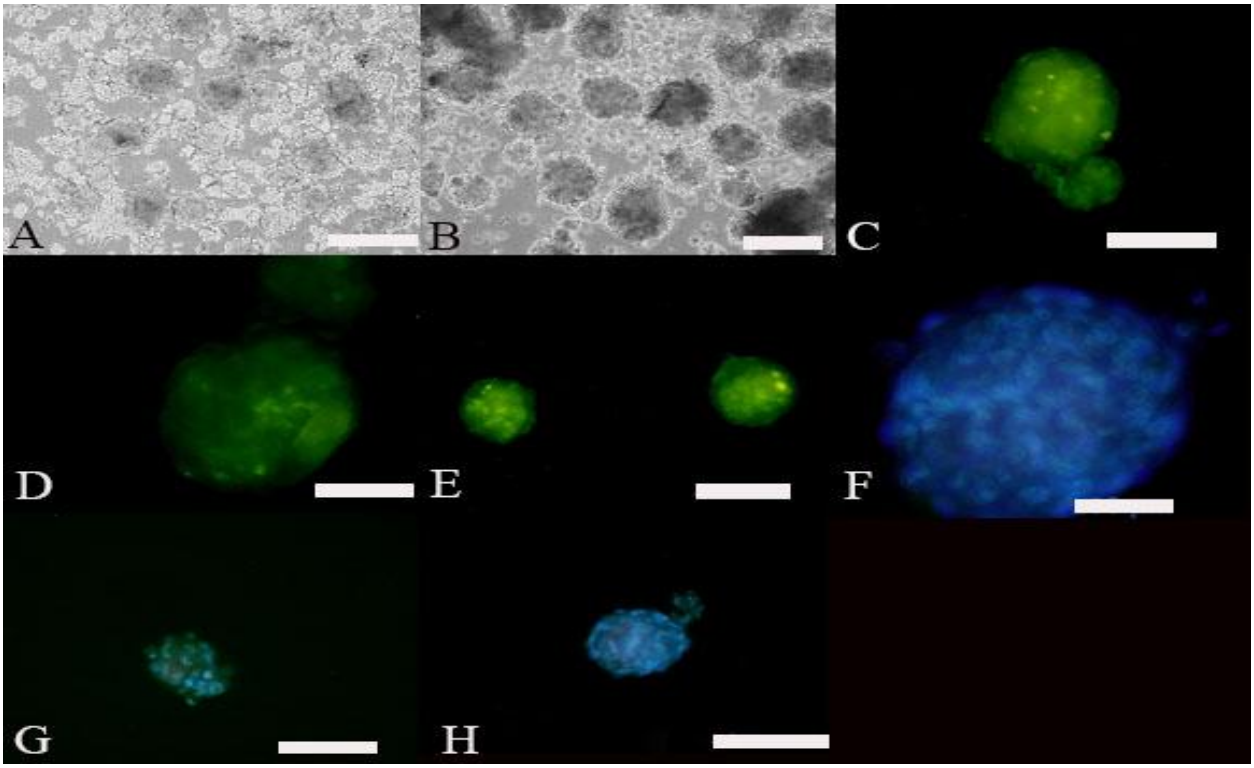
سلول‌های بنیادی مغز استخوان از بافت مغز استخوان نمونه‌های ۸ هفته‌ای به‌دست آمد. این سلول‌ها تا پاساژ ۴ کشت داده شدند تا ازنظر یکدستی و تعداد، به حد نیاز رسیدند. این سلول‌ها ظاهر دوکی و فیبروبلاستی شکل داشتند و از سایر سلول‌ها قابل‌تمایز بودند (شکل ۱ A-E). بررسی ایمونوسیتوشیمی نشان داد که این سلول‌ها نشانگرهای فیبرونکتین و نشانگرهای سطحی CD۹۰, ۱۶۶ CD, ۴۴ CD را بیان می‌کنند اما نشانگر های سطحی ۳۴ CD (نشان دهنده سلول‌های بنیادی خون‌ساز)، Nestin (نشان دهنده سلول‌های عصبی) و همچنین GFAP (نشان دهنده سلول‌های گلیال) را بیان نمی کنند.



شکل ۱. جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی مشتق از بافت مغز استخوان موش‌های صحرایی در پاساژ ۴. A-H : نشان‌دهنده ایمونوسیتوشیمی سلول‌های بنیادی مغز استخوان با فیبرونکتین. B نشان‌دهنده تصور فازکنتراست سلول‌های بنیادی مغز استخوان است. A-H به ترتیب نشان دهنده مارکرهای CD90، CD166، CD44، CD34، Nestin و GFAP می باشد. نور فلوئورسانس مرتبط با آنتی‌بادی ثانویه کونژوگه به FITC است که به رنگ سبز دیده می‌شود. هسته سلول‌ها با استفاده از رنگ هسته‌ای پروپیدیوم یدید به رتگ قرمز رنگ‌آمیزی شد. بزرگنمایی A-H : ۲۰۰ میکرومتر

کشت نوروسفر:

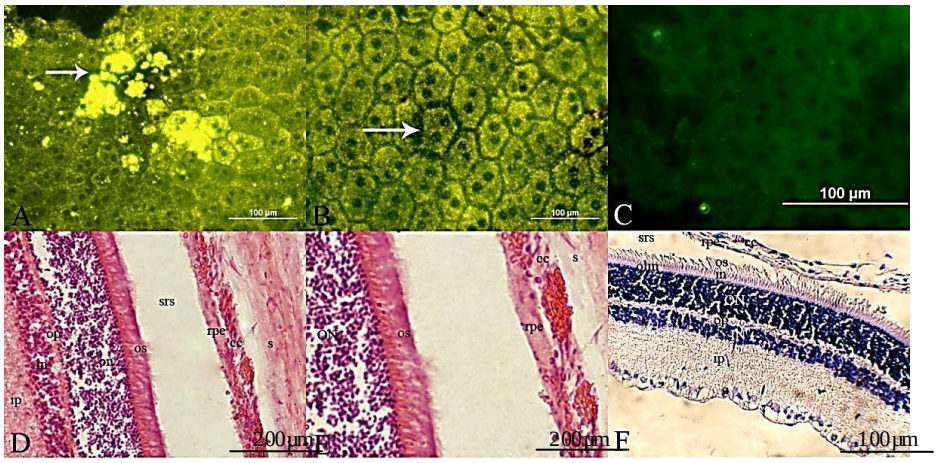
برای تبدیل سلول های بنیادی مغز استخوان به سلول‌های نوروسفر از روش کاری Lijuan Fu و همکاران با کمی تغییرات استفاده شد (۱۰). سلول‌های BMSCs بعد از پاساژ ۴ در محیط کشت، با استفاده از آنزیم تریپسین از فلاسک جدا شدند و در سانتریفوژ با دور موتور ۱۵۰۰ rpm به مدت ۳ دقیقه قرار داده شدند. پلاک سلولی با محیط تمایزی نوروسفر که حاوی DMEM/F ۱۲ به همراه ۲۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر از EGF و bFGF و B ۲۷ است سوسپانسیون و درون چاهک ۶ خانه‌ای نچسب ریخته شد. بعد از گذشت یک ساعت سلول‌ها شروع به تجمع در اطراف هم کردند و تجمعات سلولی ایجاد شد. یک روز بعد از کشت، توده‌های سلولی در محیط کشت دیده شد (شکل ۲ A وB). توده‌های سلولی تا روز ۷ در همین محیط کشت قرار داده شدند و هر دو روز یک‌بار محیط آنها تعویض شد. برای تأیید سلول‌های نوروسفر از روش ایمونوسیتوشیمی استفاده شد. در بررسی ایمونوسیتوشیمی، بیان نشانگر های هسته‌ای نشان‌دهنده بنیادین بودن این سلول‌ها یعنی OCT, Nanog۴ ,SOX۲ (شکل ۲ C-E) مشاهده شد. همچنین بیان نشانگرهای سیتوپلاسمی سلول‌های همانند نوروفیلامنت های ۶۸، ۱۶۰ و ۲۰۰ (شکل۲ A-C) دیده شد.



شکل ۲. تصاویر مورفولوژی و ایمونوسیتوشیمی نوروسفرهای مشتق شده از سلول‌های بنیادی استرومایی مغز استخوان. AوB: نشان‌دهنده مورفولوژی نوروسفرها در روزهای یک و سه بعد از تمایز است؛ C: نشان‌دهنده ایمونوسیتوشیمی نوروسفرها با آنتی‌بادی اولیه علیه Sox۲ و آنتی‌بادی ثانویه FITC است. به‌طور مشابه تصاویر D و E نشان‌دهنده ایمونوسیتوشیمی نوروسفرها با آنتی‌بادی اولیه علیه Oct۴ و Nanog است؛ تصاویر F-H نشان‌دهنده ایمونوسیتوشیمی با آنتی‌بادی اولیه علیه نوروفیلامنت ۲۰۰ و ۱۶۰، ۶۸ و آنتی‌بادی ثانویه FITC و رنگ‌آمیزی هسته‌ای با استفاده از DAPI است؛ بزرگنمایی: ۱۰۰ میکرومتر برای A, B, C, E, G, H و ۲۰۰ میکرومتر برای D, F.

مدل تخریب لایه RPE:

استفاده از سدیم یدیت به‌طور انتخابی موجب اختلال در لایه RPE شده و منجر به از دست رفتن تکه‌ای این لایه و در نهایت تخریب فوتورسپتورها می‌شود. در این مطالعه سدیم یدیت به فضای پشت چشم تزریق شد و ۲۸ روز بعد از تزریق، بررسی شد. در بررسی تک مانت لایه RPE، بعد از ۲۸ روز، تغییر در رنگ فلوئورسانس تعدادی از سلول‌های RPE دیده شد. به‌عبارت‌دیگر؛ در سیتوپلاسم این سلول‌ها در مقایسه با گروه کنترل (شکل ۳ C) رنگدانه های زرد تا سفیدرنگی (شکل ۳A) دیده شد که نشان‌دهنده دانه‌های لیپوفوشین بود. همچنین سلول‌های RPE در اثر استفاده از سدیم یدیت دچار هایپرتروفی شدند و به‌صورت چندهسته‌ای در تصاویر قابل مشاهده بودند (شکل ۳ A). فضای بین سلولی در سلولهای RPE دچار پهن‌شدگی شده بود (شکل ۳ B). در بررسی برش بافتی و رنگ‌آمیزی با استفاده از رنگ هماتوکسیلین و ائوزین، اختلال در سلولهای لایه RPE به شکل افزایش موضعی در تعداد این سلولها دیده شد (شکل ۳ D و E) همچنین قسمت خارجی سلول‌های فوتورسپتور نیز دچار به‌هم‌ریختگی شده بود (شکل ۳، F).

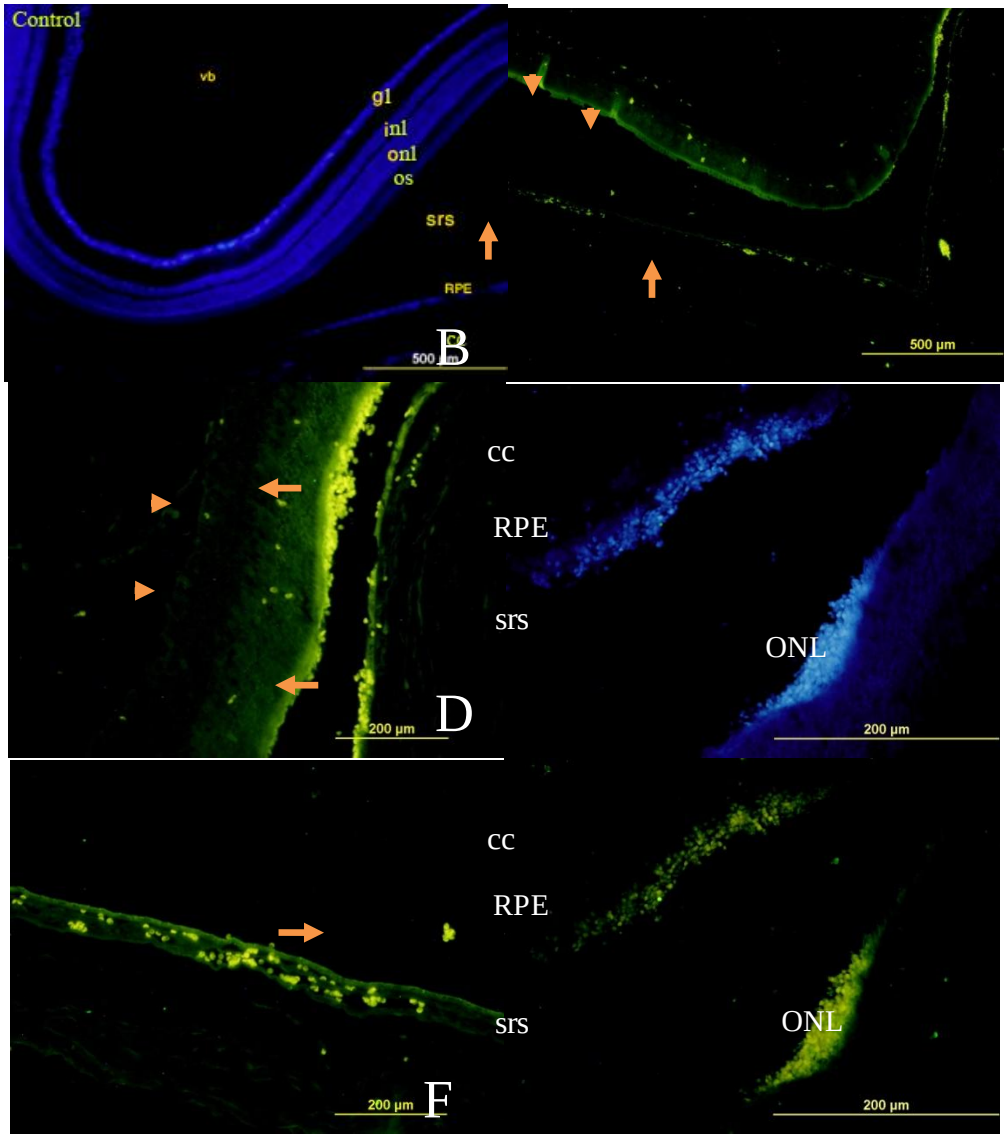


شکل ۳. تصاویر تغییرات پاتولوژی در آمادش های تک مانت لایه RPE و برش عرضی از شبکیه. A-C: تک مانت لایه RPE؛ رسوب بیش‌ازحد ذرات زردرنگ (فلش) در سیتوپلاسم سلول‌های چندضلعی RPE نشان‌دهنده آسیب این سلول‌ها است همچنین هایپرترفی، چندهسته‌ای شدن و افزایش فاصله بین سلولی (فلش در B) در این سلول‌ها دیده می‌شود. افزایش در نور فلوئورسنس سلول‌های RPE در مقایسه با کنترل به خوبی قابل‌مشاهده است. D-E: تغییرات در برش عرضی شبکیه است. به‌هم‌ریختگی در قسمت خارجی فوتورسپتورها و همچنین افزایش در تعداد سلول‌های RPE نشان‌دهنده تغییرات در اثر تزریق سدیم یدیت است. بزرگنمایی A و B : ۲۰۰ میکرومتر ، C: ۱۰۰ میکرومتر ، D و F : ۲۰ میکرومتر و E: ۴۰ میکرومتر CC: لایه کوریوکاپیلاری، RPE: لایه رنگدانه دار شبکیه، Os: قسمت خارجی فوترسپتورها، ONL: لایه هسته‌ای خارجی، Op: لایه شبکه‌ای خارجی، INL: لایه هسته‌ای داخلی، GL: لایه سلولی گانگلیونی، SRS: فضای زیر شبکیه

مهاجرت سلول‌های تزریق‌شده به لایه RPE:

هفت روز بعد از پیوند سلول‌های نورسفر به فضای زیر شبکیه، چشم موش‌های صحرایی خارج شد و بعد از آماده‌سازی قالب پارافینی، برش‌هایی به ضخامت ۷-۵ میکرومتر تهیه شد. برش‌ها برای یافتن سلول‌های نشان‌دار شده با نشانگر هسته‌ای BrdU در لایه RPE و همچنین شبکیه عصبی بررسی شدند. برش‌های مورد بررسی با نشانگر هسته‌ای DAPI رنگ شد تا سلول‌های پیوند شده و همچنین سلول‌های بافت میزبان از هم قابل‌تفکیک و جداسازی باشند. در محل تزریق (شکل ۴ C، D و F) تجمع سلول‌های نوروسفر در اتصال با لایه RPE و شبکیه دیده شد. تعدادی از این سلول‌ها در فضای زیر شبکیه مشاهده شدند (شکل ۴ B و C) اما بیشتر سلول‌های تزریق‌شده در لایه RPE و شبکیه قرار گرفتند. توزیع سلول‌ها در لایه RPE بیشتر بود و سلول‌های تزریق‌شده در این لایه یا زیر آن مشاهده شدند (شکل ۴ B، C و F). در

بعضی از نقاط، سلول‌های تزریق‌شده در لایه کوریوکاپیلاری دیده شدند (شکل ۴ E و F). سلول‌های تزریق‌شده هم به‌صورت نوروسفر و هم بصورت مجزا در برش‌ها دیده شدند (شکل ۴ C). به نظر می‌رسد که ۷ روز بعد از پیوند سلولی، سلول‌های نوروسفر توانسته بودند در فضای زیر شبکیه زنده بمانند و به لایه RPE مهاجرت نمایند.

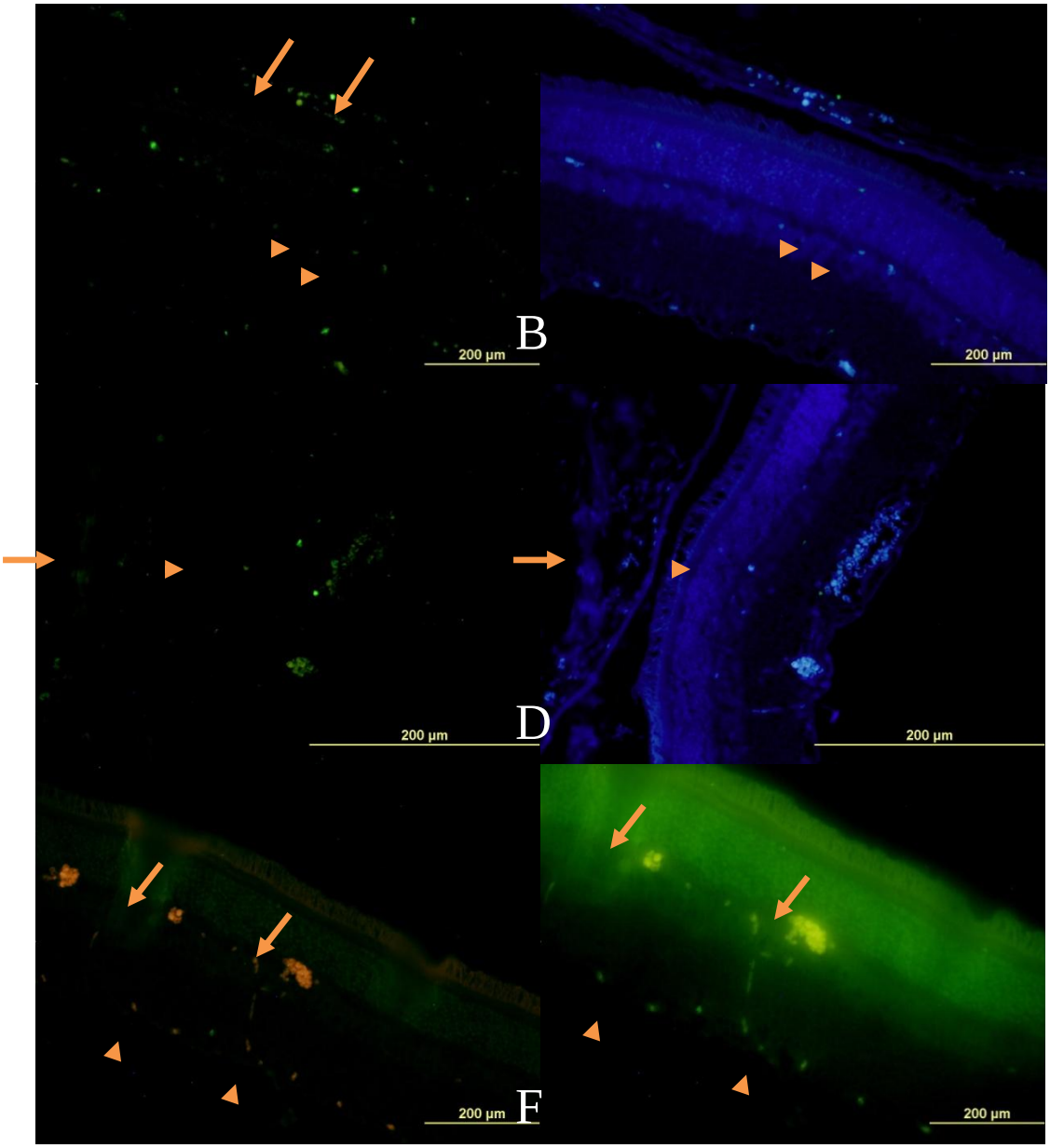


شکل ۴. تصاویر ایمونوهیستوشیمی برش‌های تهیه‌شده از تزریق سلول‌های نوروسفر در فضای زیر شبکیه. A: در گروه کنترل آن لایه‌های شبکیه با نشانگر هسته‌ای DAPI رنگ آمیزی شدند. B: سلول‌های پیوند شده در لایه RPE (فلش‌ها) و لایه شبکیه (نوک فلش‌ها). C-F: تجمع سلول‌های نوروسفر در لایه RPE و لایه شبکیه بعد از پیوند در فضای زیر شبکیه. سلول‌های تزریق‌شده هم در لایه RPE و هم در لایه شبکیه دیده شدند C، D و F : سلول‌های نوروسفر در زیر لایه RPE و E: درون لایه کوریوکاپیلاری نیز دیده شدند. بزرگنمایی A و B: ۵۰۰ میکرومتر ، C-E: ۲۰۰ میکرومتر و F: ۲۰۰ میکرومتر CC: لایه کوریوکاپیلاری، RPE: لایه رنگدانه دار شبکیه، Os: قسمت خارجی فوترسپتورها، ONL: لایه هسته‌ای خارجی، Op: لایه شبکه‌ای خارجی، INL: لایه هسته‌ای داخلی، GL: لایه سلولی گانگلیونی، SRS: فضای زیر شبکیه

مهاجرت به لایه شبکیه:

شکل ۵ مهاجرت سلول‌های نوروسفر نشان‌دار شده با نشانگر هسته‌ای BrdU در لایه شبکیه را نشان می‌دهد. همان‌طور که در شکل ۵ A و B دیده می‌شود، سلول‌های نوروسفر هم در لایه RPE (فلش‌ها) و هم در لایه شبکیه قرار داشتند. در شبکیه عصبی سلول‌های تزریق‌شده در لایه هسته‌ای داخلی (نوک فلش‌ها) و گانگلیونی (ستاره‌ها) دیده شدند. تعداد سلول‌هایی که در لایه هسته‌ای داخلی دیده قرار داشتند بیشتر از لایه هسته‌ای خارجی بود. در این مناطق، سلول‌های تزریق‌شده هم به‌صورت تک‌سلولی و هم به‌صورت جند سلولی مشاهده شدند (شکل ۵ A و C). تعدادی از سلول‌های نوروسفر در مرز بین لایه هسته‌ای داخلی و لایه شبکه‌ای خارجی قرار داشتند (شکل ۵ E). نتایج نشان داد که ۷ روز بعد از پیوند سلولی، سلول‌های نوروسفر توانسته بودند در فضای زیر شبکه زنده بمانند و به لایه شبکیه نیز مهاجرت کنند. در شکل ۵ E و F و در مجاورت دو نوروسفر در لایه شبکه‌ای خارجی (فلش‌ها)، سه سلول نشان‌دار شده با نشانگر هسته‌ای BrdU دیده شد، یکی از این سلول‌ها دارای شکل کشیده‌ای بود و از لایه هسته‌ای داخلی تا لایه گانگلیونی امتداد داشت (فلش موج‌دار). به نظر می‌رسد که این سلول یکی از سلول‌های نورسفر است که به سلول شبکیه‌ای تمایزیافته است هرچند که اثبات این موضوع نیاز به بررسی بیشتر و نشانگرهای اختصاصی دارد. در این مطالعه مهاجرت سلول‌های نوروسفر بعد از تزریق در فضای زیر شبکیه به درون زجاجیه دیده نشد.

نتایج این بخش نشان می‌دهد که ۷ روز بعد از پیوند، سلول‌های نوروسفر بعد از تزریق به فضای زیر شبکیه زنده بودند و به لایه RPE و شبکیه عصبی مهاجرت کرده بودند. مهاجرت هم در لایه رنگدانه دار و هم در لایه‌های شبکیه ازجمله لایه هسته‌ای داخلی و لایه گانگلیونی اتفاق افتاده بود. درواقع سلول‌های تزریق‌شده در تمامی لایه‌ها دیده شدند.



شکل ۵. تصاویر ایمونوهیستوشیمی سلول‌های نوروسفر نشان‌دار شده با نشانگر هسته‌ای BrdU بعد از پیوند به فضای زیر شبکیه. ۷ روز بعد از تزریق سلولی، بقا و مهاجرت سلول‌های به شبکیه و لایه RPE به شکل تک‌سلولی و چند سلولی دیده شد. بزرگنمایی A-D : ۲۰۰ میکرومتر. CC: لایه کوریوکاپیلاری، RPE: لایه رنگدانه دار شبکیه، Os: قسمت خارجی فوترسپتورها، ONL: لایه هسته‌ای خارجی، Op: لایه شبکه‌ای خارجی، INL: لایه هسته‌ای داخلی، GL: لایه سلولی گانگلیونی، SRS: فضای زیر شبکیه

بحث

استفاده از مدل‌های حیوانی در مطالعات رایج است. مدل‌های حیوانی را می‌توان به روش‌های مختلف ایجاد نمود که عبارتند از مدل‌های دستکاری شده با روش‌های ژنتیکی، مدل‌های حیوانی با استفاده از مواد شیمیایی، مدل‌های حیوانی با استفاده از اشعه‌های لیزری. در این بین استفاده از مدل‌هایی که با مواد شیمیایی ایجاد می‌شود موردتوجه بسیاری از محققین است. ازجمله این مواد می‌توان به سدیم یدیت و NMDA (N-Methyl-D-aspartic acid) اشاره نمود. این مواد می‌تواند به‌صورت اختصاصی بافت

هدف را تخریب نماید و مدل‌هایی شبیه به بیماری‌های انسانی را فراهم نماید. در این تحقیق از مدل‌های حیوانی ایجادشده با سدیم یدیت استفاده شد.

مطالعات متعددی نشان داده‌است که سدیم یدیت به‌طور اختصاصی روی سلول‌های رنگدانه دار شبکیه اثر گذاشته و موجب تخریب آنها می‌شود. به‌طور ثانویه تخریب سلول‌های رنگدانه دار موجب آسیب سلول‌های فوتورسپتور و گانگلیونی می‌شود. تزریق سیستمیک این ماده موجب اختلال سلول‌های رنگدانه دار و پچی لوس آن می‌شود. تأثیر توکسیک سدیم یدیت روی این سلول‌ها در مدل‌های حیوانی متعددی ازجمله خرگوش، گوسفند، موش صحرایی و موش مطالعه شده است. توضیحات مختلفی از نحوه تأثیر این ماده روی سلول‌های رنگدانه دار وجود دارد. یکی از تئوری‌های موجود در مورد تأثیر بر ملانوزوم‌های سیتوپلاسمی سلول‌های رنگدانه دار است. تئوری دیگر در مورد تخریب سلول‌های شبکیه در اثر تغییر در سطح سولفیدریل هیدروژن (SH) است. تأثیر دیگری که در مطالعه دیگری بررسی شده است، مهار فعالیت آنزیم سولفیدریل است؛ این ماده می‌تواند موجب تخریب سد خونی شبکیه‌ای شود و اتصال بین سلول‌های رنگدانه دار را سست نماید. به‌طور کلی امروزه تأثیر اختصاصی سدیم یدیت روی سلول‌های رنگدانه دار برای محققین ثابت شده است و برای ایجاد مدل‌های تخریب RPE استفاده می‌شود. (۱۴و۱۳).

تغییراتی که در لایه RPE ایجاد می‌شود عبارتست از؛ هایپرتروفی شبکه اندوپلاسمیک صاف، تجمع فاگوزومها، لیزوزومها یا لیزوزومهای ثاتویه، تجمع لیزوزومهای غیرطبیعی مثل اجسام میلویید، رسوب لیپوفوشین، رسوب کریستال‌ها ازجمله اگزالات، رسوب دیگر ضایعات غیر غشایی و واکوئل دار شدن سلول‌های RPE. تغییراتی که در قطبیت این سلول‌ها ایجاد می‌شود عبارتست از؛ از بین رفتن میکروویلی های رأسی، از بین رفتن تورفتگی‌های پایه‌ای و از بین رفتن ساختار لایه‌ای و الکترون تراکمی دیسک‌های قسمت خارجی فوتورسپتورها. همچنین این سلول‌ها ملانوزومهای خود را ازدست‌داده و میتوکندری آنها متورم و واکوئل دار می‌شود. در مدل تحقیق حاضر لایه RPE دچار هایپرتروفی، از دست دادن رنگدانه های سیتوپلاسمی و همچنین از دست دادن میکروویلی رأسی شد و دیسک‌های قسمت خارجی فوتورسپتورها نیز دچار به هم ریختگی ناشی از آسیب سلول‌های RPE شد. به نظر می‌رسد که عدم توانایی سلولهای RPE در فاگوسیتوز کردن این دیسک‌ها موجب چنین حالتی شده است؛ چراکه به‌طور طبیعی این دیسک‌ها روزانه توسط سلول‌های RPE برداشته می‌شود تا دیسک‌های جدید جایگزین آنها شود. در این حالت به دلیل فاگوسیت نشدن آن‌ها، ابتدا دچار به هم ریختگی می‌شود و سپس در فضای زیر شبکیه تجمع می‌یابد. این حالت موجب تخریب دیسک‌ها و در نتیجه به‌طور ثانویه موجب آسیب سلول‌ها در لایه هسته‌ای خارجی می‌شود (۱۷-۱۵).

سلول‌های RPE هم در تعدیل نمودن استرس اکسیداتیو ناشی از ورود نور به شبکیه و هم در فرایند سیکل بینایی نقش بسیار مهمی دارند. بنابراین آسیب این سلول‌ها موجب افزایش استرس اکسیداتیو می‌شود. استرس ایجادشده روی سلول‌های RPE اثر گذاشته منجر به تولید دانه‌های دروسن می‌شود. عدم توانایی سلول‌های RPE در کنترل استرس اکسیداتیو ناشی از عوامل مختلف، موجب تجمع ذراتی در داخل سیتوپلاسم می‌شود. این ذرات به شکل ذرات زرد تا سفیدرنگی دیده می‌شود که تحت عنوان ذرات لیپوفوشین خوانده می‌شود. در تحقیق حاضر سلول‌های RPE به دلیل آسیب ناشی از تزریق سدیم یدیت، قادر به کنترل استرس اکسیداتیو ناشی از نور ورودی به چشم نبودند و موجب ایجاد ذرات لیپوفوشین در سیتوپلاسم آنها شده بود که در بررسی‌های تک مانت لایه RPE به خوبی این ذرات دیده شدند. این ذرات موجب افزایش نور خروجی از سلول‌ها شدند و درنتیجه اوتوفلوئورسنس این سلول‌ها با شدت

بیشتری در مقایسه با سلول سالم دیده شد. تغییرات شدت نور در تک لایه RPE باگذشت زمان افزایش یافت که این یافته با یافته‌های دیگر محققین همخوانی دارد (۲۲-۱۸).

در تحقیق حاضر نشان داده شد که سلول‌های نوروسفر مشتق شده از BMSCs پیوند شده در مدل تخریب ماکولا وابسته به سن، به لایه آسیب‌دیده RPE مهاجرت کردند و در بین سلول های این لایه قرار گرفتند. برای تزریق سلولهای بنیادی به چشم روش‌های مختلفی وجود دارد که در مقالات مختلف به آنها اشاره شده است و دارای فواید و مضراتی هستند؛ اما به‌طور کلی دو روش برای تزریق سلول در چشم وجود دارد ۱-تزریق زیر شبکیه (subretinal space) و ۲-تزریق به درون زجاجیه. تزریق زیر شبکیه نیز به دو صورت قابل انجام است; ۱-دسترسی به فضای زیر شبکیه از طریق اسکلرا و ۲-دسترسی به فضای زیر شبکیه از طریق زجاجیه. درروش دو احتمال خونریزی، عفونت و همچنین آسیب به عدسی زیاد است. هرچند که در روش یک نیز این احتمالات وجود دارد اما بسیار کمتر است (۲۳). درواقع تزریق زیر فضای شبکیه به دلیل نزدیک بودن به محل آسیب موجب پیوند بهتر و مهاجرت بیشتر سلول‌های پیوند شده می‌شود. از طرفی فضای زیر شبکیه محیطی است که از لحاظ ایمنی به سلول های تزریق شده واکنش ایمنی نشان نمی‌دهد. در مقابل تزریق درون زجاجیه کمتر تهاجمی است و عمومی‌تر است. با این‌حال مطالعات نشان می‌دهد که موانع طبیعی ازجمله لایه محدودکننده داخلی و همچنین ماتریکس خارج سلولی آن در مهاجرت سلول‌های تزریق‌شده درون فضای زجاجیه وجود دارد. روش سومی نیز برای تزریق سلولی استفاده می‌شود که در آن از ورید دمی برای تزریق سیستمیک استفاده می‌شود (۲۷-۲۴).

مطالعات نشان می‌دهد که پیوند سلول‌های بنیادی جنینی انسانی به فضای زیر شبکیه در موش‌ها منجر به تمایز این سلول ها به سلول‌های فوتورسپتور دارای عملکرد می‌شود و موجب بهبود روند پاسخ‌های نوری سلول‌های فوتورسپتور می‌شود ؛ همچنین منجر به تمایز سلول‌های RPE می‌شود (۳۰-۲۸). استفاده از سلول‌های بنیادی جنینی انسانی برای تولید RPE و پیوند نشان می‌دهد که این سلول‌ها ۱ تا ۴ هفته بعد از پیوند در فضای زیر شبکیه زنده می‌مانند و نشانگرهای سلول‌های RPE را نشان می‌دهند (۳۰). سلول‌های بنیادی عصبی به‌عنوان سلول‌های بنیادی بزرگسالان می توانند بعد از پیوند با لایه RPE موجود یکی شده و در بین آنها قرارگیرند و لایه جدیدی را به وجود آورند. پیوند سلول های پروژنیتور عصبی به شکل نوروسفر در موش‌ها به داخل زجاجیه موجب مهاجرت، یکی شدن و تمایز نوروسفرهای تزریق‌شده بعد از گذشت ۷ روز می‌شود (۳۰).

نتیجه‌گیری

درمجموع، پیوند سلول‌های نوروسفر مشتق از بافت مغز استخوان در فضای زیر شبکیه‌ای در مدل‌های حیوانی ایجادشده با سدیم یدیت که منجر به آسیب لایه RPE و همچنین لایه شبکیه می‌شود، می‌تواند موجب بقا و مهاجرت سلول های پیوند شده شود. بنابراین به نظر می‌رسد که این سلول ها توانایی تمایز به سلول‌های مختلف در شبکیه را دارند و می توانند برای درمان بیماری‌های مرتبط با شبکیه امیدبخش باشند.

تقدیر و تشکر

نویسندگان مقاله بدین وسیله از مرکز علوم اعصاب شفا در بیمارستان خاتم‌الانبیا و همچنین مرکز تحقیقات مهندسی بافت چشم وابسته به دانشگاه شهید بهشتی بابت حمایت مالی و علمی سپاسگزاری می‌نمایند.

References

1. Holz FG, Bellman C, Staudt S, Schütt F, Völcker HE. Fundus autofluorescence and development of geographic atrophy in age-related macular degeneration. Investigative ophthalmology & visual science 2001; 42: 1051-6.
2. Hollyfield JG. Age-Related Macular Degeneration: The Molecular Link between Oxidative Damage, Tissue-Specific Inflammation and Outer Retinal DiseaseThe Proctor Lecture. Invest ophthalmol Vis Sci 2010; 51: 1276-81.
3. Hageman GS, Mullins RF. Molecular composition of drusen as related to substructural phenotype. Mol Vis 1999; 5: b71.
4. Ambati J, Anand A, Fernandez S, Sakurai E, Lynn BC, Kuziel WA, et al. An animal model of age-related macular degeneration in senescent Ccl-2-or Ccr-2-deficient mice. Nat Med 2003; 9: 1390-7.
5. Enzmann V, Row BW, Yamauchi Y, Kheirandish L, Gozal D, Kaplan HJ, et al. Behavioral and anatomical abnormalities in a sodium iodate-induced model of retinal pigment epithelium degeneration. Exp Eye Res 2006; 82: 441-8.
6. Li Y, Reca RG, Atmaca-Sonmez P, Ratajczak MZ, Ildstad ST, Kaplan HJ, et al. Retinal pigment epithelium damage enhances expression of chemoattractants and migration of bone marrow–derived stem cells. Invest Ophthalmol Vis Sci 2006; 47: 1646-52.
7. Caplan AI, Bruder SP. Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century. Trends mol med 2001; 7: 259-64.
8. Machalińska A, Lubiński W, Kłos P, Kawa M, Baumert B, Penkala K, et al. Sodium iodate selectively injuries the posterior pole of the retina in a dose-dependent manner: morphological and electrophysiological study. Neurochem Res 2010; 35: 1819-27.
9. Castanheira P, Torquetti L, Nehemy MB, Goes AM. Retinal incorporation and differentiation of mesenchymal stem cells intravitreally injected in the injured retina of rats. Arq Bras Oftalmol 2008; 71: 644-50.
10. Fu L, Zhu L, Huang Y, Lee TD, Forman SJ, Shih CC. Derivation of neural stem cells from mesenchymal stem cells: evidence for a bipotential stem cell population. Stem cells Dev 2008; 17: 1109-22.
11. Pang L, Reddy PV, McAuliffe CI, Colvin G, Quesenberry PJ. Studies on BrdU labeling of hematopoietic cells: stem cells and cell lines. J cell physiol 2003; 197: 251-60.
12. Park UC, Cho MS, Park JH, Kim SJ, Ku SY, Choi YM, et al. Subretinal transplantation of putative retinal pigment epithelial cells derived from human embryonic stem cells in rat retinal degeneration model. Clin Exp Reprod Med 2011; 38: 216-21.
13. Jiang W, Chiou GC. Effects of hydralazine on NaIO3-induced rat retinal pigment epithelium degeneration. Int J Ophthalmol 2008; 8: 1504-0.
14. Franco LM, Zulliger R, Wolf-Schnurrbusch UE, Katagiri Y, Kaplan HJ, Wolf S, et al. Decreased visual function after patchy loss of retinal pigment epithelium induced by low-dose sodium iodate. Investigative ophthalmology & visual science 2009; 50: 4004-10.
15. Ashburn FS, Pilkerton AR, Rao NA, Marak GE. The effects of iodate and iodoacetate on the retinal adhesion. Investigative ophthalmology & visual science 1980; 19: 1427-32.
16. Wang J, Iacovelli J, Spencer C, Saint-Geniez M. Direct Effect of Sodium Iodate on Neurosensory RetinaEffect of Sodium Iodate on Neurosensory Retina. Invest Ophthalmol Vis Sci 2014; 55: 1941-53.
17. Okubo A, Sameshima M, Unoki K, Uehara F, Bird AC. Ultrastructural changes associated with accumulation of inclusion bodies in rat retinal pigment epithelium. Invest Ophthalmol Vis Sci 2000; 41: 4305-12.

18. Karan G, Lillo C, Yang Z, Cameron DJ, Locke KG, Zhao Y, et al. Lipofuscin accumulation, abnormal electrophysiology, and photoreceptor degeneration in mutant ELOVL4 transgenic mice: a model for macular degeneration. Proc Natl Acad Sci U S A 2005; 102: 4164-9.
19. Bonilha VL. Age and disease-related structural changes in the retinal pigment epithelium. Clin Ophthalmol 2008; 2: 413-24.
20. Yi K, Mujat M, Park BH, Sun W, Miller JW, Seddon JM, et al. Spectral domain optical coherence tomography for quantitative evaluation of drusen and associated structural changes in non-neovascular age-related macular degeneration. Br J Ophthalmol 2009; 93: 176-81.
21. Katz ML, Robison WG. Age-related changes in the retinal pigment epithelium of pigmented rats. Exp Eye Res 1984; 38: 137-51.
22. Liu H, Qian J, Wang F, Sun X, Xu X, Xu W, et al. Expression of two endoplasmic reticulum stress markers, GRP78 and GADD153, in rat retinal detachment model and its implication. Eye 2010; 24: 137-44.
23. Dureau P, Legat L, Neuner-Jehle M, Bonnel S, Pecqueur S, Abitbol M, et al. Quantitative analysis of subretinal injections in the rat. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 2000; 238: 608-14.
24. Kollar K, Cook MM, Atkinson K, Brooke G. Molecular mechanisms involved in mesenchymal stem cell migration to the site of acute myocardial infarction. Int J Cell Biol 2009; 2009.
25. Johnson TV, Bull ND, Martin KR. Identification of barriers to retinal engraftment of transplanted stem cells. Invest Ophthalmol Vis Sci 2010; 51: 960-70.
26. Chung JK, Park TK, Ohn YH, Park SK, Hong DS. Modulation of retinal wound healing by systemically administered bone marrow-derived mesenchymal stem cells. Korean J Ophthalmol 2011; 25: 268-74.
27. Li Y, Atmaca-Sonmez P, Schanie CL, Ildstad ST, Kaplan HJ, Enzmann V. Endogenous bone marrow–derived cells express retinal pigment epithelium cell markers and migrate to focal areas of RPE damage. Invest Ophthalmol Vis Sci 2007; 48: 4321-7.
28. Huang Y, Enzmann V, Ildstad ST. Stem cell-based therapeutic applications in retinal degenerative diseases. Stem Cell Rev 2011; 7: 434-45.
29. Park UC, Cho MS, Park JH, Kim SJ, Ku SY, Choi YM, et al. Subretinal transplantation of putative retinal pigment epithelial cells derived from human embryonic stem cells in rat retinal degeneration model. Clin Exp Reprod Med 2011; 38: 216-21.
30. Castro G, Navajas E, Farah ME, Maia M, Rodrigues EB. Migration, Integration, Survival, and Differentiation of Stem Cell-Derived Neural Progenitors in the Retina in a Pharmacological Model of Retinal Degeneration. ISRN Ophthalmol 2013; 2013:752161. doi: 10.1155/2013/752161. eCollection 2013.