جرجانی حکیم سید اسماعیل
مقاله مروری

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

مریم پروینی[1*]، کاظم پریور[2]، محمد جوان[3]

۱. دانشجوی دکتری تخصصی، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، ایران
۲. استاد، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، ایران
۳. دانشیار، گروه فیزیولوژی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

چکیده

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

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

*نویسنده مسئول: مریم پروینی
نشانی: تهران، انتهای بزرگراه اشرفی اصفهانی، انتهای بلوار سیمون بولیوار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات
تلفن: ۰۹۱۴۱۴۸۶۳۵۶ ایمیل: parvini29@gmail.com

مقدمه:

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

سلول‌های بنیادی، انواع و کاربردهای آن:

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

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

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

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

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

با این حال در مورد سلول‌های پرتوان القایی هم مشکلاتی وجود دارد که استفاده از این سلول‌ها را محدود کرده است. از جمله این محدودیت‌ها احتمال تشکیل تومور و ناپایداری عفونت ویروسی به دلیل استفاده از رتروویروس برای وارد کردن ژن‌های پرتوانی است. هم‌چنین روند تولید سلول‌های پرتوان القایی، فرآیندی کُند با بازدهی پایین (کمتر از ۰/۰۱) است که منجر به تولید سلول‌هایی هتروژن می‌شود. اگرچه به تازگی روش‌های دیگری نیز مثل انتقال پروتئین، در تولید این سلول‌ها خطر ناپایداری عفونت ویروسی را کمتر کرده است اما با این حال مشکل بازدهی پایین، روند استفاده از این سلول‌ها را در طب ترمیمی دچار مشکل کرده است (۹). با توجه به محدودیت‌های سلول‌های بنیادی جنینی و سلول‌های پرتوان القایی، یافتن منبعی از سلول‌های اتولوگ که بتواند در سلول درمانی و طب ترمیمی موثر باشد با ارزش خواهد بود. در نتیجه در چند سال اخیر بحث‌های زیادی در زمینه کشف یک سلول پرتوان اتولوگ و استفاده از این سلول‌ها در طب ترمیمی مطرح بوده است تا اینکه در سال ۲۰۰۴ تولید سلول‌های پرتوان شبه جنینی توسط Shinohara گزارش شد و روش جدیدی در مسیر تولید سلول‌های پرتوان معرفی شد (۱۰).

تکوین سلول‌های اپیتلیوم رنگدانه‌دار شبکیه:

سلول‌های اپیتلیوم رنگدانه‌دار شبکیه چشم (شکل۱)، سلول‌هایی هستند که به صورت تک لایه سلولی بین غشاء Bruch و شبکیه عصبی قرار گرفته اند. منشأ این سلول های رنگدانه‌دار برخلاف سایر سلول‌های رنگدانه‌دار که منشأ تاج عصبی دارند، از صفحه عصبی قدامی یا نورواکتودرم است (۱۱). تولید موفق سلول‌های فوق از نورواکتودرم نیازمند وجود یک نقشه سرنوشت سلولی اختصاصی است که با سازماندهی صحیح مراحل تکوینی، در نهایت موجب تولید این سلول ها می شود.

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

مسیرهای پیام‌رسانی دخیل در تکوین اپیتلیوم رنگدانه‌دار شبکیه:

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

۱) مسیر پیام‌رسانی FGF، این مسیر موجب تحریک تشکیل شبکیه عصبی می شود اما در مقابل از شکل گیری اپیتلیوم رنگدانه‌دار ممانعت می کند (۱۴).

۲) مسیر پیام‌رسانی Nodal که مهم ترین عضو این گروه،

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

۳) مسیر پیام‌رسانی BMP که تکوین شبکیه پشتی را پیش می برد(۱۶).

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

۵) مسیر پیام‌رسانی Shh که تکوین اپیتلیوم رنگدانه‌دار را در مراحل اولیه تکوین چشم پیش می‌برد (۲۰).

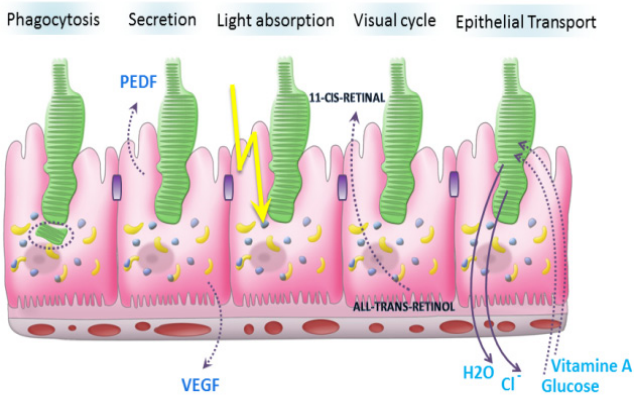
شاخص‌های مولکولی دخیل در تکوین اپیتلیوم رنگدانه دار:

بیان تعدادی از ژن‌های خاص، مراحل مختلف تکوین اپیتلیوم رنگدانه‌دار را پیش می‌برند. طی تکوین طبیعی حوزه بینایی در بدن، سطح بیان ژن‌های شاخص این مرحله از جمله SIX3، RX و PAX6 افزایش پیدا می کند. سپس در مرحله وزیکول بینایی، سطح بیان ژن های MITF ، OTX2 و CHX10 به تدریج افزایش می یابد. در ابتدا ژن‌های MITF و CHX10 به طور یکسان در کل سطح وزیکول بینایی بیان می‌شوند اما در مراحل انتهایی تکوین این بخش، بیان MITF به لایه خارجی شبکیه و بیان CHX10 به بخش داخلی شبکیه محدود می‌شود که به ترتیب موجب تخصص یابی اپیتلیوم رنگدانه‌دار و شبکیه عصبی می‌شوند. به همین دلیل به اصطلاح گفته می‌شود وزیکول بینایی یک ساختار دو توان است (۲۱-۲۳). با پیشرفت تکوین اپیتلیوم رنگدانه‌دار و بلوغ آن، بیان مارکرهای اختصاصی اپیتلیوم رنگدانه‌دار از جمله ژن‌های دخیل در تولید رنگدانه شامل TYRP2، TYRP1 SILVER و PMEL17، ژن‌های مربوط به عمل بیگانه خواری از جمله اینتگرین MERTK، αV و FAK، ژن‌های درگیر در ترشح پروتئین هایی مثل عامل مشتق از اپیتلیوم رنگدانه‌دار و عامل رشد اندوتلیالی عروقی، عوامل دخیل در چرخه بینایی از جمله RPE65 و CRALBP، پروتئین‌های مرتبط با غشاء شامل پروتئین کانالی BEST1 و EMMPRIN، و در نهایت پروتئین‌های دخیل در تشکیل اتصالات محکم از جمله ZO1 و CLAUDIN افزایش می یابد (۱, ۲۴-۲۷).

ساختار و عملکرد سلول‌های اپیتلیوم رنگدانه‌دار شبکیه:

از نظر مطالعات فراساختاری با میکروسکوپ الکترونی، سلول‌های اپیتلیوم رنگدانه‌دار به صورت ساختارهای ستونی-شانه‌ای با ابعاد شش ضلعی دیده می‌شوند. اتصالات دسموزومی در سطوح جانبی آن‌ها تشکیل می‌شود و در کل سلول‌ها دارای دو سطح رأسی و پایه هستند: در بخش رأسی، میکروویلی دیده می‌شود و سیتوپلاسم رأسی دارای تعداد زیادی میتوکندری و رنگدانه است. از سوی دیگر در بخش پایه، هسته و مولکول‌های حیاتی برای اپیتلیوم رنگدانه‌دار از جمله BESTROPHIN و RPE65 دیده می‌شود (۱).

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



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

شاخص‌های شناسایی سلولهای اپیتلیوم رنگدانه‌دار شبکیه:

با توجه به نوپا بودن مطالعات انجام شده در زمینه تولید سلول‌های اپیتلیوم رنگدانه‌دار شبکیه، شاخص‌های مختلفی جهت شناسایی سلول‌های رنگدانه‌دار تولید شده از سلول‌های بنیادی پرتوان استفاده شده است که به صورت خلاصه به شرح زیر هستند:

۱- ریخت‌شناسی: اپیتلیوم رنگدانه‌دار شبکیه به صورت تک لایه‌های سلولی با ساختارهای شش‌وجهی و قطبیت بالا هستند، به طوری که سطح رأسی دارای میکروویلی بوده و سطح پایه آن‌ها روی ماتریکس خارج سلولی که غشاء Bruch نامیده می‌شود قرار گرفته است.

۲- RT-PCR: این تکنیک جهت اثبات وجود بیان ژن‌های اختصاصی اپیتلیوم رنگدانه‌دار شبکیه از جمله MITF، OTX2، CRALBP، RPE65، PMEL17 و BESTROPHIN و در عین حال اثبات کاهش بیان ژن‌های مرحله چند توانی مثل NANOG و OCT4 طی تمایز به سلول‌های اپیتلیوم رنگدانه‌دار استفاده می‌شود.

۳- سنجش بیان پروتئین: با کمک تکنیک رنگ‌آمیزی آنتی‌بادی می‌توان از بیان یا عدم‌بیان پروتئین‌های مربوط به سلول‌های اپیتلیوم رنگدانه‌دار شبکیه مثل MITF، ZO1، RPE65، OCCLUDIN و یا BEST اطمینان حاصل کرد. از سوی دیگر، درصد بیان پروتئین‌های فوق را می‌توان به کمک تکنیک فلوسایتومتری و یا وسترن بلات کمی کرد.

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

۵- شاخص‌های الکتروفیزیولوژی: برای اثبات شباهت و نزدیکی سلول‌های اپیتلیوم رنگدانه‌دار شبکیه مشتق از سلول‌های بنیادی پرتوان با سلول‌های معادل خود در بدن از نظر عملکرد، از تکنیکی به نام Whole-cell patch clamp استفاده می‌شود. به کمک این تکنیک می‌توان از حضور و عملکرد صحیح کانال‌های وابسته به ولتاژ مثل ناقل‌های سدیم و پتاسیم اطمینان حاصل کرد و در نهایت پتانسیل غشاء سلول را اندازه گرفت. مطالعات متعدد، محدوده ولتاژی بین ۴۰- تا ۵۰- را برای این سلول‌ها گزارش کرده‌اند (۳۳).

۶- سنجش قطبیت سلول: که طی آن قرارگیری صحیح ترکیباتی مثل Na+/K+ ATPase در سطح رأسی سلول‌های رنگدانه‌دار تشخیص داده می‌شود.

۷- ترشح فاکتورهای تروفیک: به کمک تست الایزا می‌توان ترشح فاکتورهایی مثل VEGF و PEDF را اندازه‌گیری کرد.

۸- ارزیابی بیگانه‌خواری: حذف موفق قطعات خارجی سلول‌های گیرنده نور بستگی به حضور سلول‌های رنگدانه‌دار با کارآیی بالا دارد. اگر ذرات متصل به ترکیبات فلورسنت در مجاورت سلول‌های رنگدانه‌دار قرار بگیرند، این ذرات به دلیل وجود فعالیت بیگانه‌خواری در این نوع سلول‌ها توسط آن‌ها بلعیده شده و در نتیجه با میکروسکوپ فلورسنت قابل ردیابی می‌شوند.

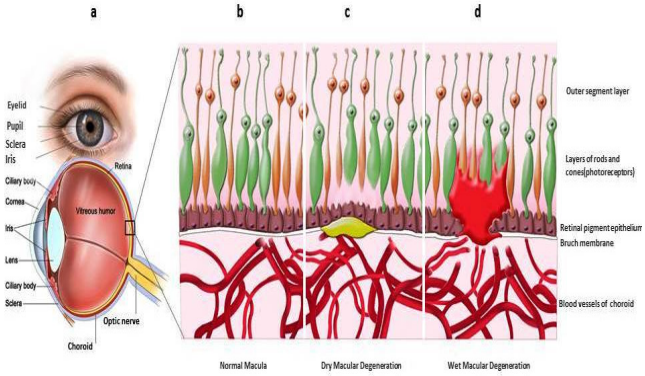
۹- بررسی روند بهبودی بعد از پیوند: قرارگیری صحیح سلول‌های پیوند شده در بخش آسیب دیده شبکیه میزبان، میزان زنده‌مانی و درصد ضخیم‌شدن شبکیه بعد از پیوند سلول‌ها، شاخص خیلی مهمی برای ارزیابی کارآیی سلول‌های تولید شده است.

بیماری‌های حاصل از تخریب و عدم عملکرد سلول‌های اپیتلیوم رنگدانه‌دار شبکیه:

با توجه به نقش‌های مهمی که سلول‌های رنگدانه‌دار شبکیه در چشم ایفا می‌کنند، بدیهی است که ایجاد هرگونه آسیب در این سلول‌ها می‌تواند بر حیات سایر سلول‌های موجود در شبکیه خصوصاً سلول‌های گیرنده نور تأثیر گذاشته و در نهایت منجر به نابینایی شود. یکی از مهم‌ترین بیماری‌های حاصل از تخریب این سلول‌ها، بیماری تخریب ماکولای وابسته به سن(AMD) است که افراد بالای ۶۰ سال را به ویژه در کشورهای پیشرفته درگیر می‌کند. بیش از ۳۰ میلیون نفر در جهان مبتلا به این بیماری هستند. این بیماری با رسوب ترکیبات دراسن بین سلول‌های رنگدانه‌دار و غشاء Bruch آغاز می‌شود و با مرگ تدریجی سلول‌های رنگدانه‌دار، تخریب سلول‌های گیرنده نور نیز به دلیل عدم وجود فعالیت بیگانه‌خواری سلول‌های رنگدانه‌دار تشدید می‌شود.

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

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



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

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

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

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

تولید سلول‌های اپیتلیوم رنگدانه‌دار شبکیه از سلول‌های بنیادی پرتوان در شرایط آزمایشگاهی:

با توجه به این که ایجاد هرگونه تخریب در سلول‌های اپیتلیوم رنگدانه دار شبکیه باعث ایجاد انواع مختلفی از بیماری‌های چشمی می‌شود، دانشمندان تلاش بسیاری برای درمان این بیماری‌ها به خصوص بیماری تخریب ماکولای وابسته به سن انجام داده‌اند. در رابطه با این بیماری، استفاده از لیزر و درمان‌های دارویی عملاً بی‌فایده بوده و تأثیری بر بهبودی بیماری ندارد. از سوی دیگر به علت پیچیدگی‌های عمل جراحی و احتمال آسیب رساندن بیشتر به شبکیه بیماران در حین انتقالِ ناحیه سالم اطراف محلِ تخریب در شبکیه به ناحیه آسیب دیده بیمار، که انتقال حدود ۳ میلی‌متر مربع از شبکیه را در برمی گیرد، محققان را به یافتن منبع مناسب دیگری برای جایگزین کردن سلول‌های تخریب شده شبکیه وادار نمود. تمایز و پیوند سلولی از جمله راهکارهایی بود که محققان در پیش گرفتند. پیوند لایه کامل سلول پوششی رنگدانه‌دار بزرگسال یا جنینی به علت کمبود تعداد اهدا کنندگان، و رد پیوند، درمان را با مشکل مواجه می کرد. بر این اساس، سلول‌های بنیادی جنینی منبعی نا محدود جهت درمان به شمار می آیند و می توان سلول‌های پوششی رنگدانه‌دار شبکیه را به میزان فراوانی از آن‌ها تولید کرد.

طی چند دهه اخیر، راهکارهای مختلفی جهت تولید سلول‌های اپیتلیوم رنگدانه‌دار در شرایط آزمایشگاهی ارایه شده است. به دنبال دست‌یابی به دست آوردهای مهم سلول‌های بنیادی در سال های اخیر و از سوی دیگر تکنولوژی های پیشرفته مربوط به سلولهای بنیادی پرتوان انسانی شامل سلول‌های بنیادی

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

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

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

در ادامه مطالعه فوق، Haruta و همکارانش با استفاده از سلول‌های بنیادی جنینی میمونی طی روش هم‌کشتی با سلول‌های PA6 توانستند به سلول‌های اپیتلیوم رنگدانه‌دار شبکیه دست پیدا کنند که از نظر عملکرد و خصوصیات دیگر مشابه سلول‌های همتای خود در بدن بودند. سلول‌های تولید شده به فضای زیر شبکیه رت‌های چهار هفته‌ای مدل RCS پیوند شدند. در این رت‌ها، سلول‌های گیرنده نور به دلیل عدم توانایی سلول‌های رنگدانه‌دار در بیگانه‌خواری قطعات خارجی دچار تخریب می‌شوند. سلول‌های تولید شده از نظر مورفولوژی شش‌ضلعی بوده و مارکرهای خاص سلول‌های رنگدانه‌دار از جمله CRALBP، RPE65، ZO1 و MERTK را بیان می‌کردند. این سلول‌ها همچنین قادر به بیگانه‌خواری قطعات خارجی سلول‌های گیرنده نور بودند (۴۶).

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

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

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

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

برای بالا بردن کیفیت و کارآمد بودن شرایط کشت، طی مطالعات بعدی محیط SFEB با فاکتورهای متعددی تیمار شد که در مهم‌ترین آن‌ها، Osakada و همکارانش در سال ۲۰۰۸ از فاکتورهای FCS، Lefty A، DKK1 و اکتیوین به مدت ۱۸ روز و سپس ادامه کشت در بستر چسبنده به مدت ۹۰ روز دیگر استفاده کردند که در کل سیستم SFEB/DLFA نامیده شد. روش کار به این صورت بود که سلول‌ها به مدت ۱۸ روز در سیستم SFEB در حضور DKK1 و LeftyA و سپس در شرایط چسبنده به مدت ۷۲ روز دیگر، در مجاورت (FCS و SFEB/) Activin DLFA قرار داده شدند که نتیجه آن ظهور نواحی رنگدانه‌دار از سلول‌های بنیادی جنینی میمونی، موشی و انسانی در روز چهل ام بود. سلول‌های تولید شده مارکر سلول‌های رنگدانه‌دار شبکیه بالغ، RPE۶۵ و مارکر اتصالات محکم، ZO1 را در روز ۹۰ ام بیان کردند. ایراد اساسی این مطالعه، پایین بودن کارایی سلول‌های تولید شده، در حدود کمتر از یک درصد بود (۴۸).

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

Carr و همکارانش سلول‌های بنیادی جنینی انسانی را روی سلول‌های لایه مغذی حاصل از سلول‌های فیبروبلاستی موشی به مدت بیش از ۳ هفته کشت دادند. نواحی رنگدانه‌دار بعد از ۱ الی ۲ هفته پس از این که سلول‌ها سطح ظرف کشت را کاملاً پوشاندند، ظاهر شدند. نواحی رنگدانه‌دار فوق سپس به طور مکانیکی جدا شده و بر روی ماتریژل به مدت ۵ هفته دیگر جهت تشکیل تک لایه سلولی کشت داده شدند (۲۶). برای نخستین بار Hirami و همکارانش در سال ۲۰۰۹ نشان دادند که سلول‌های بنیادی پرتوان القایی نیز مشابه سلول‌های بنیادی جنینی قادر به تولید سلول‌های رنگدانه‌دار در شرایط کشت مشابه یعنی سیستم کشت SFEB/DLFA هستند. در این مطالعه، سلول‌های بنیادی جنینی انسانی و سلول‌های بنیادی پرتوان القایی انسانی به مدت ۴۰ روز در شرایط کشت شناور قرار گرفتند که ۲۰ روز آن به صورت SFEB و ۲۰ روز دیگر به صورت SFEB/DL بود. بعد از ۴۰ روز، سلول‌ها به شرایط کشت چسبنده، درحضور FBS و اکتیوین منتقل شدند. نواحی رنگدانه‌دار در روز چهلم ظاهر شدند و سلول‌ها از نظر بیان مارکر RPE65 در روز ۹۰ ام مثبت بودند (۴۹).

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

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

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

در سال ۲۰۰۹ بود که Osakada و همکارانش برای نخستین بار از کوچک مولکول‌های CKI-7 و SB431542 به مدت ۲۱ روز، به ترتیب به جای ترکیبات درون سلولی DKK1 و Lefty A استفاده کردند (شرایط کشت آن‌ها SFEB/CS نامیده شد)، سپس سلول‌ها را به ظروف کشت چسبنده منتقل کردند. سلول های مثبت از نظر بیان MITF و RX، بین روزهای ۳۵-۳۰ ظاهر شدند. اشکال رنگدانه داردر روز ۴۰ ظاهر شدند. سلول‌های مثبت از نظر بیان فاکتورهای ZO1 و CRALBP/ RPE65 به ترتیب در روزهای ۱۰۰ و ۱۲۰ ظاهر شدند. نتایج این مطالعه مشابه مطالعه قبلی انجام شده در سال ۲۰۰۸ بود، اما در مقایسه با ترکیبات معادل درون سلولی خود، کارآمدی تمایز حین استفاده از این کوچک مولکول‌ها پایین تر بود و از سوی دیگر تجمعات سلولی شکل گرفته تحت تأثیر آنها از نظر اندازه کوچک‌تر بود (۴۴).

به منظور افزایش درصد سلول‌های رنگدانه‌دار، Idelson و همکارانش در سال ۲۰۰۹ از سلول‌های بنیادی جنینی انسانی و تیمار کردن کشت با مولکول‌های Activin A، TGFβ، NIC و SB431542 استفاده کردند. برای این کار، سلول‌ها به مدت ۴ هفته در معرض نیکوتینامید و سپس در طی سومین و چهارمین هفته به ترتیب در معرض SB431542، Activin و TGFβ قرار گرفتند. اشکال پیگمان‌دار پس از ۴ هفته و سلول‌های پیگمان‌دار پس از ۸ هفته ظاهر شدند (۳۳ درصد سلول‌ها رنگدانه دار بودند). برای مطالعات پیوند، تعداد ۱۰۵ × ۱- ۰/۶ سلول به فضای زیر شبکیه ای رت‌های RCS سه هفته ای پیوند زده شدند. بهبود عملکرد شبکیه بعد از ۵ الی ۶ هفته از پیوند مشاهده شد. کارایی سلول‌های رنگدانه‌دارتولید شده در این مطالعه حدود ۱۰ درصد و کارایی کلی سلول‌های تولید شده حدود ۴ درصد بود (۵۲).

Carr و همکارانش طی مطالعه‌ای که انجام دادند، سلول‌های hiPSC را روی سلول‌های تغذیه ای حاصل از سلول‌های فیبروبلاست موشی به مدت ۶ روز کشت دادند و پروتکل تمایزی خود را بر پایه حذف bFGF از محیط کشت در مراحل بعدی پیش بردند. کلونی‌های رنگدانه دار در عرض ۴ هفته ظاهر شدند. این نواحی رنگدانه دار به کمک برش مکانیکی از ظرف کشت جدا شدند و در ظرف کشت پوشیده شده با ماتریژل به مدت ۱۴ هفته دیگر جهت تشکیل سلول‌های رنگدانه دار کشت داده شدند. پس از آن، نواحی گسترش یافته از ظرف کشت جدا شده و در محیط کشت خاص fRPE به مدت ۱۳ روز جهت تشکیل تک لایه رنگدانه دار کشت داده شدند. برای پیوند، ۱۰۴× ۵ سلول به فضای زیر شبکیه‌ای رت‌های RCS تزریق شدند. بعد از ۱۳ هفته از پیوند، لایه هسته دار خارجی یا ONL ترمیم شد (۵۳).

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

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

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

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

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

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

Harness و همکارانش از سلول های بنیادی جنینی انسانی و سلول های بنیادی جنینی پارتنوژنیک طی کشت چسبنده

استفاده کردند. دو نوع شرایط کشت شامل کشت روی سلول‌های مغذی NSF و کشت روی ماتریژل و سپس روی MEF استفاده شد. نواحی رنگدانه‌دار ۴ الی ۶ هفته بعد از حذف bFGF مشاهده شدند (۵۸).

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

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

در این مطالعه، سلول‌های بنیادی جنینی بصورت کشت شناور و تحت شرایط بسیار پایین فاکتورهای رشد کشت داده شدند. این محققین ترکیبات ماتریکس خارج سلولی، شامل ماتریژل یا لامینین و انتاکتین خالص شده را طی روزهای اول تا هفتم به کشت اضافه کردند. آن‌ها همچنین از SB431542 و Nodal طی کشت استفاده کردند. سلول‌ها سپس در روز ۷ به ظرف کشت جدید منتقل شدند و در شرایط ۴۰ درصد اکسیژن کشت داده شدند که در نهایت ساختار جام بینایی بین روزهای دهم و یازدهم تشکیل شد. به این ترتیب آن‌ها ثابت کردند که شکل گیری جام‌بینایی در غیاب عدسی یا اکتودرم سطحی رخ می دهد (۵۹).

Meyer و همکاران در سال ۲۰۱۱ روشی را برای تمایز سلول‌های بنیادی جنینی انسانی و سلول‌های بنیادی پرتوان القایی به سمت سلول‌های پیش ساز شبکیه و سلول‌های رنگدانه‌دار چشم ارایه دادند که از اصول طبیعی تولید شبکیه در انسان پیروی می کرد. آن‌ها با تیمار کشت با DKK1، Noggin یا معادل‌های کوچک مولکولی آن‌ها، که به ترتیب شامل XAV939 و Dorsomorphin طی روزهای دوم تا چهارم، سپس انتقال آن‌ها به شرایط کشت چسبنده در روز هفتم و افزودن Activin A طی روزهای بیستم تا چهل ام توانستند برای نخستین بار به ساختارهای شبیه وزیکول بینایی بین روزهای بیستم تا بیست و پنجم از کشت دست پیدا کنند و شروع تولید رنگدانه را بین روزهای چهلم تا شصتم مشاهده کنند (۶۰).

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

Zahabi و همکارانش در سال ۲۰۱۱ پروتکلی آسان و پربازده را برای تولید سلول‌های اپیتلیوم رنگدانه دار شبکیه در شرایط کشت چسبنده ارائه دادند که طی آن hiPSCs تحت تیمارهای خاص و استفاده از محیط کشت حاوی ترکیبات مشخص می توانستند در مدت زمانی بسیار کوتاه‌تر از روش‌های قبلی به سلول‌های اپیتلیوم رنگدانه دار شبکیه تمایز پیدا کنند. در گام اول، باید مسیر تمایز به آندودرم و مزودرم در سلول‌های بنیادی پرتوان القا شده مهار می‌شد تا فقط به اکتودرم القا شود، سپس ساختارهای عصبی قدامی در کشت سلولی ایجاد می‌شد تا این سلول‌ها بتوانند به جام بینایی و سپس سلول‌های پوششی رنگدانه‌دار شبکیه تمایز پیدا کنند. آن‌ها توانستند در این مطالعه طی تیمار سلول‌های hiPSC1 با فاکتورهای رشد SHH، RA، Noggin و bFGF، پیگمنتاسیون را بعد از چهار هفته مشاهده کنند و در عرض ۴۰ الی ۵۰ روز به تک لایه سلولی پیگمان‌دار دست پیدا کنند (۶۱).

Torrez و همکارانش در مطالعه‌ای از سلول‌های بنیادی پرتوان انسانی و ماروموست استفاده کردند و القای آن‌ها را به سمت سلول‌های رنگدانه‌دار شبکیه از طریق تمایز خود به خودی و حذف bFGF و در شرایط کشت شناور به صورت EB و سپس انتقال به شرایط کشت چسبنده پیش بردند. در این مطالعه، بیشترین میزان تجمع سلول‌های رنگدانه دار در بخش‌های محیطی اجسام شبه جنینی(EB) مشاهده شد

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

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

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

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

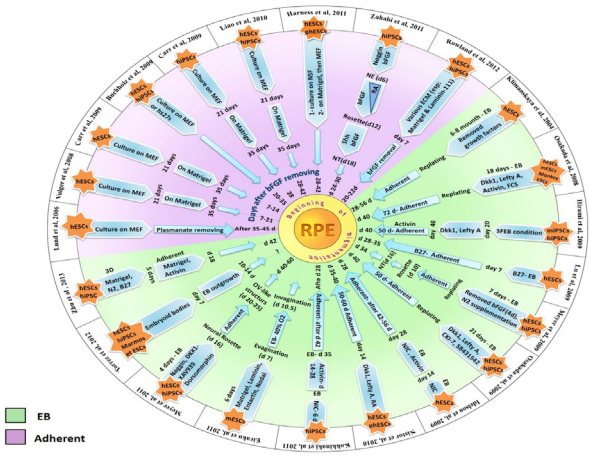
Cho و همکارانش موفق شدند با استفاده از روشی مشابه روش تولید سلول‌های ترشح‌کننده دوپامین که طی آن ساختارهای عصبی کروی شکل از سلول‌های پرتوان انسانی تولید می‌شدند، این ساختارها را به طور خود بخودی به ساختارهای شبه لوله عصبی تمایز دهند که بخشی از این ساختارها بعد از حدود پنج هفته اثراتی از تولید رنگدانه را نشان دادند. قابلیت گسترش به مدت زمان طولانی بدون از دست دادن پتانسیل تمایزی، سهولت در نگهداری و عدم وابستگی به سلول‌های مغذی از نقاط قوت این مطالعه بودند (۶۶).

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

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

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

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



شکل ۳: شکلی شماتیک از مطالعات انجام شده در زمینه تولید سلول‌های اپیتلیوم رنگدانه دار شبکیه از سلول‌های بنیادی پرتوان. دسته بندی مطالعات بر اساس شرایط کشت سلول‌ها شامل EB و Adherent صورت گرفته است و به ترتیب سال مرتب شده اند.

در نهایت، چالش اصلی تمام مطالعات صورت گرفته در زمینه تمایز سلول‌های اپیتلیوم رنگدانه‌دار شبکیه از سلول‌های بنیادی جنینی انسانی، رسیدن به سلول‌هایی است که قابلیت پیوند شدن در انسان برای اهداف درمانی را داشته باشند، زیرا پیوند موفق این سلول‌ها در انسان بسیار اهمیت دارد. خوشبختانه در سال ۲۰۱۱، قابلیت درمانی این نوع سلول‌ها در انسان توسط Schwartz و همکارانش گزارش شد. در این مطالعه که مربوط به فاز I کارآزمایی بالینی بود، تعداد ۵×۱۰۴ سلول اپیتلیوم رنگدانه‌دار شبکیه حاصل از تمایز سلول‌های بنیادی جنینی انسانی به فضای زیر شبکیه‌ای بیماران Dry AMD و Stargardts پیوند زده شدند. بعد از ۴ ماه از پیوند، هیچ گونه علایمی از تشکیل تومور، رد پیوند و التهاب بعد از عمل جراحی مشاهده نشد و بهبودی نسبی حاصل شد (۷۰). (برای مطالعه بیشتر رجوع شود به سایت www.clinicaltrial.com).

نتیجه گیری:

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

اطلاعاتی که از بررسی مکانیسم‌های بیماری طی استفاده از سلول‌های اپیتلیوم رنگدانه دار شبکیه حاصل از سلول های بنیادی پرتوان در شرایط آزمایشگاهی به دست می‌آید می‌تواند اساس طب ترمیمی باشد. در این مورد شناسایی عوامل دخیل در

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

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

اما استفاده از سلول‌های اپیتلیوم رنگدانه‌دار شبکیه حاصل از سلول‌های بنیادی می‌تواند برای مطالعه انتقال دارو طی انجام تست‌های دارویی اختصاصی برای هر فرد مناسب‌تر باشد. به عنوان مثال، در مورد بیماری تخریب ماکولای وابسته به سن، دو مطالعه کامل شده در مرحله فاز ۳ درمانی وجود دارد که از داروی Aflibercept به صورت تزریق در داخل زجاجیه استفاده کرده‌اند و کارآیی قابل مقایسه ای را با Ranibizumab به عنوان یک داروی ضد VEGF مشاهده کرده‌اند (۷۲).

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

References:

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

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

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

Review Article

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

Maryam Parvini[1*], Kazem Parivar[1], Mohammad Javan[2]

1. PhD Student, Department of Biology, Science and research branch, Islamic azad university, Tehran, Iran
2. Professor, Department of Biology, Science and research branch, Islamic azad university, Tehran, Iran
3. Associate Professor, Department of Physiology, Tarbiat modarres university, Tehran, Iran

Abstract

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

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

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

*Corresponding Author: Maryam Parvini
Address: Islamic azad university, Tehran, Iran
Phone:+989141486356 Email: parvini29@gmail.com