

بقا و مهاجرت سلول‌های نوروسفر مشتق از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان بعد از پیوند به فضای زیر شبکه 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، ناریس 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 مسؤل) 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 چشم پزشکی، مرکز تحقیقات مهندسی بافت چشم، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی، تهران، ایران.

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

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

چکیده

زمینه و هدف: بیماری‌های تخریبی شبکه یکی از علل شایع نابینایی در جهان است. هدف از این مطالعه بررسی پیوند سلول‌های نوروسفر مشتق از بافت مغز استخوان به فضای زیر شبکه در مدل حیوانی (تخریب لایه رنگدانه دار شبکه 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 رنگ آمیزی هماتوکسیلین و اتوزین 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 به دست آمده با نشانگر هسته‌ای BrdU نشان دار و به فضای زیر شبکه تزریق شدند. ۷ روز بعد از تزریق، برش بافتی تهیه شد و بقا، مهاجرت و همچنین نحوه قرارگیری سلول‌های تزریق شده با استفاده از ایمونوهیستوشیمی بررسی شد.

یافته‌ها: ۳ روز بعد از تزریق سدیم یدیت، تغییرات پاتولوژی از جمله افزایش در نور فلئورسنس، هایپرتروفی و چندهسته‌ای شدن در لایه رنگدانه دار مشاهده شد و در بررسی بافتی، به هم ریختگی قسمت خارجی فوتورسپتور ها و همچنین تغییرات لایه رنگدانه دار دیده شد. یافته‌های ایمونوهیستوشیمی ۷ روز بعد از پیوند سلولی نشان داد که سلول‌های تزریق شده توانسته‌اند در فضای زیر شبکه زنده بمانند و به لایه رنگدانه دار و همچنین به لایه شبکه مهاجرت کرده و در کنار سلول‌های بافت میزبان قرار گرفته‌اند. **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 شبکه، می‌تواند راهی برای درمان بیمارهای تخریبی شبکه باشد.

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

و 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) مهم ترین علت اختلال بینایی در میان افراد مسن در جوامع پیشرفته است و در افراد بالای ۵۰ سال اتفاق می افتد. در حدود ۱/۷۵ میلیون نفر در ایالات متحده آمریکا از این بیماری رنج می برند (۱) و این بیماری در بین حدود ۷۳ میلیون نفر در مرحله متوسط است که این بیماران نیز در معرض پیشرفت بیماری و تبدیل شدن 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، لیوپروتئین و ذرات سلولی است که بین لایه بروخ و غشای پایه سلول های 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 سلول های 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 کوریو کاپیلاری و ۶- فعال شدن سیستم ایمنی. به طور کلی عوامل خطر این بیماری شامل سیگار، رژیم غذایی، جنسیت و تاریخچه خانوادگی (۴) است.

به دلیل اینکه ماکولا ناحیه ای بسیار حساس در شبکه است و این ناحیه در شبکه 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 بیماری های انسانی را شبیه سازی می کند، اطلاعات مفیدی در مورد آسیب شناسی این بیماری فراهم می کند (۴). اتفاقات پاتولوژی که در بیماری AMD در انسان دیده می شود در مدل های حیوانی نیز دیده می شود همانند تشکیل دروسن، ضخیم شدن غشای بروخ، تخریب شبکه، تشکیل عروق جدید در لایه کوریوید

(Choroidal NeoVascularization)، و از بین رفتن لایه RPE در قسمت های مختلف. تلاش هایی برای استفاده از داروهای مختلف برای ایجاد آسیب در لایه RPE و شبکه انجام شده است. یکی از مواد شیمیایی مورد استفاده، سدیم یدید است (NaIO₃) که با استفاده از آن لایه RPE دچار تخریب می شود. سدیم یدید به شکل اختصاصی روی لایه RPE اثر گذاشته و موجب تخریب فوتورسپتورها و لایه کوریو کاپیلاری به طور ثانویه می شود. تخریب با این ماده وابسته به دوز و زمان است و موجب تغییرات ریخت شناسی و رفتاری می شود (۵).

امروزه در مان جایگزینی شبکه با استفاده از سلول های بنیادی که قابلیت تکثیر داشته و می تواند به سلول های دیگر تمایز یابد شدت بیشتری به خود گرفته است (۶). مطالعات متعددی صورت گرفته است تا بهترین نوع سلول برای پیوند در شبکه مشخص شود. همچنین نحوه قرار گیری سلول های RPE و شبکه به گونه ای است که فضای مناسبی برای تزریق در زیر شبکه را فراهم می سازد. از سلول های متعددی برای تولید سلول های RPE و فوتورسپتور استفاده شده است که عبارتند از سلول های بنیادی شبکه (Retinal Stem Cells)، سلول های بنیادی رنگدانه ای شبکه (Retinal Pigmented Epithelium Stem Cells)، سلول های بنیادی جنینی (Embryonic Stem Cells)، سلول های مجدد برنامه ریزی شده (Induced Pluripotent Stem Cells)، سلول های بنیادی عصبی (Neural Stem Cells)، و سلول های مزانشیمی شامل سلول های بنیادی مغز استخوان (Bone Marrow Stromal Stem Cells) و سلول های بنیادی چربی (Adipose Derived Stem Cells) (۷).

با توجه به اینکه سلول های رنگدانه دار و عصبی شبکه 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

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:

سلول‌های 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 پارافرمالیدید 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. سلول‌ها با آنتی‌بادی اولیه به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه انکوبه شدند، به دنبال آن در آنتی‌بادی ثانویه (Fluorescent isothiocyanate (FITC)) به مدت ۱ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند و در پایان، هسته به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق با پروپیدوم دیدیت (۱:۱۰۰۰) نشان‌دار شد. سلول‌ها در زیر میکروسکوپ فلورسنت (Olympus Optical, Tokyo, Japan) مشاهده شدند. لیست آنتی‌بادی‌های مورد استفاده در جدول ۱ آمده است.

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

روش بررسی

گروه‌های مورد مطالعه:

در یک مطالعه تجربی، تعداد ۲۰ عدد رت آلیینو نژاد ویستار (مؤسسه رازی، ایران، تهران) با وزن ۲۵۰-۲۰۰ گرم در این آزمایش استفاده شد. رت‌ها 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 تأیید شد. رت‌ها بطور تصادفی به گروه‌های زیر تقسیم شدند: (۱) گروه دریافت کننده نوروسفر در فضای زیر شبکیه (n=۱۰) و (۲) گروه درمان نشده به عنوان کنترل (n=۱۰).

مدل تخریب لایه RPE:

پودر سدیم یدید (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 آماده شده با استفاده از سرنگ انسولینی به فضای پشت چشم تزریق شد. روش کار بدین صورت بود که ابتدا

جدول ۱ لیست آنتی‌بادی‌های مورد استفاده برای بررسی ایمونوسیتوشیمی سلول‌های بنیادی مغز استخوان

| آنتی بادی اولیه | میزبان | تیتراژ | سلول | تامین کننده |
|-----------------|--------|--------|--------------------|----------------------|
| فیبرونکتین | موش | ۱:۵۰۰ | بنیادی مغز استخوان | abcam, Cambridge, UK |
| CD90 | موش | ۱:۵۰۰ | تمايز 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 |

۱۰-۷ روز در محیط کشت ظاهر شدند. برای ایمونوسیتوشیمی نوروسفرها ابتدا سلول‌ها در پارافرمالیدید ۴٪ در PBS ثابت شدند، سپس سلول‌ها با آنتی‌بادی اولیه (جدول ۲) به مدت یک شب 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) رنگ آمیزی شد. سلول‌ها توسط میکروسکوپ فلورسنت (Olympus Optical، توکیو، ژاپن) مشاهده شدند.

تولید نوروسفر از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان بر اساس روش Fu L و همکاران انجام شد (۱۰). به طور خلاصه، سلول‌های بنیادی مزانشیمی با تریسین EDTA ۰/۵٪ از کف فلاسک کنده شدند و در فلاسک نجسب 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 فیروبلست عمومی bFGF (سیستم D & R، شرکت، مینیاپولیس، منگنز) و مکمل ۲VB کشت داده شدند. نوروسفرها ظرف

جدول ۲ آنتی‌بادی‌های مورد استفاده در ایمونوسیتوشیمی نوروسفرها

| آنتی بادی اولیه | میزبان | تیتراژ | 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 |

نشان دار کردن سلول‌ها و پیوند سلولی: برای پیوند سلولی آماده شد. برای پیوند ابتدا سلول‌های ۳۰ روز بعد از تزریق سدیم یدید و تأیید مدل، چشم رتها

کشت داده شده با استفاده از نشانگر هسته‌ای BrdU نشان دار

و درون پارافرمالیدید 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 پارافرمالیدید ۴ درصد به مدت یک شب قرار داده شد. در روز بعد نمونه‌ها از درون پارافرمالیدید ۴ درصد خارج و وارد پروسه بافتی شدند. نمونه‌ها با استفاده از پارافین قالب‌گیری شدند. برش عرضی قالب‌ها به ضخامت ۵-۷ 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 اسکلا برداشته شد و نمونه روی لام قرار گرفت و با استفاده از تیغ بیستوری ۴ برش عمودی زده شد. شبکه عصبی از مابقی لایه‌ها جدا شد و لایه RPE از لایه کورویید و اسکلا جدا و روی لام قرار داده شد. بعد از شستشو، بافت مانت شد و در زیر میکروسکوپ فلئورسنس مشاهده شد.

یافته‌ها

کشت سلول‌های بنیادی مغز استخوان:

سلول‌های بنیادی مغز استخوان از بافت مغز استخوان نمونه‌های ۸ هفته‌ای به دست آمد. این سلول‌ها تا پاساژ ۴ کشت داده شدند تا از نظر یکدستی و تعداد، به حد نیاز رسیدند. این سلول‌ها ظاهر دوکی و فیروبلستی شکل داشتند و از سایر سلول‌ها قابل تمایز بودند (شکل ۱ A-E). بررسی ایمونوسیتوشیمی نشان داد که این سلول‌ها نشانگرهای فیرونکتین و نشانگرهای سطحی CD۹۰، CD۱۶۶، CD۴۴، CD۴۴ را بیان می‌کنند اما نشانگرهای سطحی Nestin (نشان دهنده سلول‌های بنیادی خون‌ساز)، GFAP (نشان دهنده سلول‌های عصبی) و همچنین نشان دهنده سلول‌های گلیال را بیان نمی‌کنند.

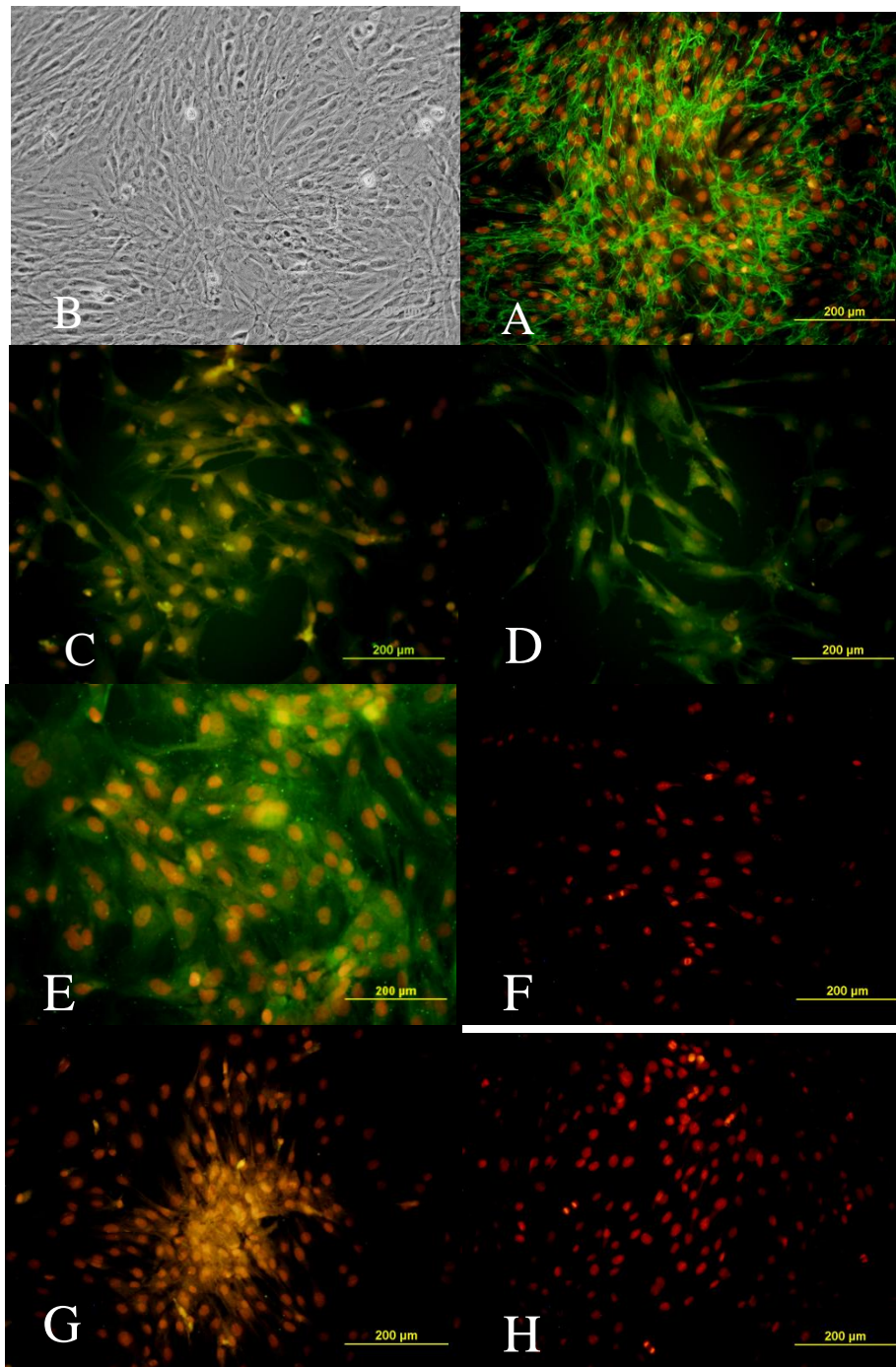
شدند. برای اینکار پودر BrdU در حلال حل شد و به ازای هر ۲/۵ میلی لیتر از محیط کشت مقدار ۷/۸۱ میکرولیتر از BrdU به محیط سلول اضافه شد و به مدت ۷۲ ساعت درون انکوباتور قرار گرفت. نشان دار شدن سلول‌ها به روش زیر تأیید شد.

ابتدا سلول‌ها با پارافورمالیدید 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 $\text{pH} 8.0$ 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 3×10^4 از نوروسفرهای زنده در ۳ میکرو لیتر PBS به فضای زیر شبکه از طریق یک برش کوچک در صلیبه 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 رت‌ها استفاده شد. سپس با استفاده از پنس و قیچی چشم‌ها خارج

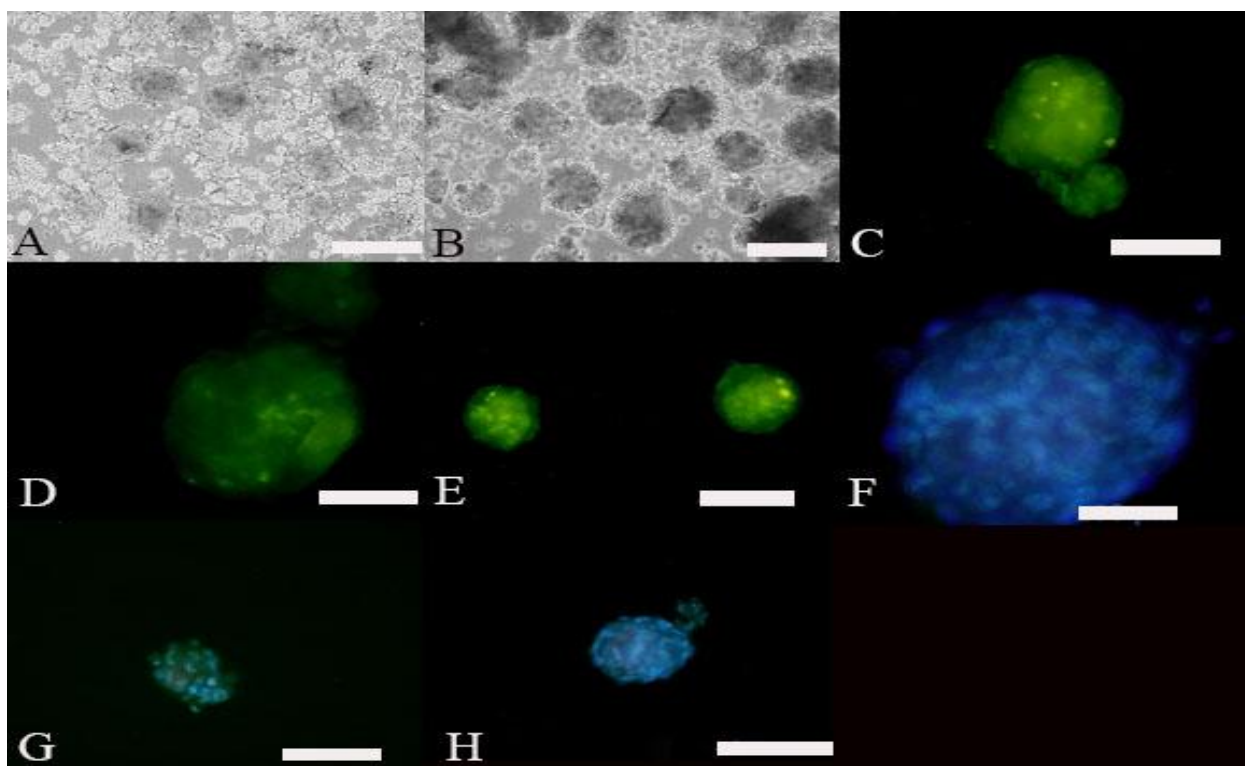


شکل ۱. جداسازی و کشت سلول های بنیادی مشتق از بافت مغز استخوان موش های صحرایی در پاساژ ۴. A-H : نشان دهنده ایمونوسیتوشیمی سلول های بنیادی مغز استخوان با فیبرونکتین. B نشان دهنده تصور فاز کنتراست سلول های بنیادی مغز استخوان است. A-H به ترتیب نشان دهنده مارکرهای CD90، CD166، CD44، CD34، Nestin و GFAP می باشد. نور فلوروسانس مرتبط با آنتی بادی ثانویه کونژوگه به FITC است که به رنگ سبز دیده می شود. هسته سلول ها با استفاده از رنگ هسته ای پروپیدیوم یدید به رنگ قرمز رنگ آمیزی شد. بزرگنمایی A-H : ۲۰۰ میکرومتر

بعد از کشت، توده‌های سلولی در محیط کشت دیده شد (شکل ۲ A و B). 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 نشانگرهای هسته‌ای نشان‌دهنده بنیادین بودن این سلول‌ها یعنی SOX2, Nanog, OCT (شکل ۲ C-E) مشاهده شد. همچنین بیان نشانگرهای سیتوپلاسمی سلول‌های همانند نوروفیلامنت‌های ۶۸، ۱۶۰ و ۲۰۰ (شکل ۲ A-C) دیده شده است.

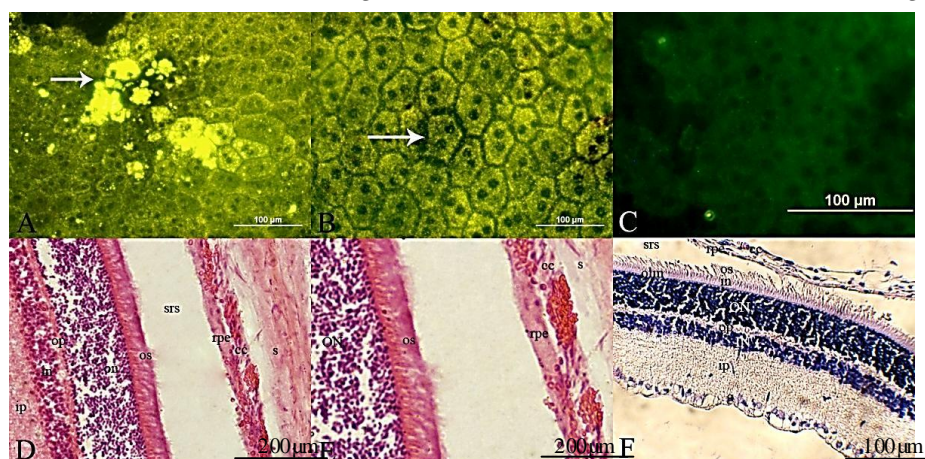
کشت نوروسفر:

برای تبدیل سلول‌های 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 ۱۲ DMEM/F به همراه ۲۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر از EGF و bFGF و ۲۷ B است سوسپانسیون و درون چاهک ۶ خانه‌ای نجسب ریخته شد. بعد از گذشت یک ساعت سلول‌ها شروع به تجمع در اطراف هم کردند و تجمعات سلولی ایجاد شد. یک روز



شکل ۲. تصاویر مورفولوژی و ایمونوسیتوشیمی نوروسفرهای مشتق شده از سلول‌های بنیادی استرومایی مغز استخوان. A و B: نشان‌دهنده مورفولوژی نوروسفرها در روزهای یک و سه بعد از تمایز است؛ C: نشان‌دهنده ایمونوسیتوشیمی نوروسفرها با آنتی‌بادی اولیه علیه Sox2 و آنتی‌بادی ثانویه FITC است. به طور مشابه تصاویر D و E نشان‌دهنده ایمونوسیتوشیمی نوروسفرها با آنتی‌بادی اولیه علیه Oct4 و Nanog است؛ تصاویر F-H نشان‌دهنده ایمونوسیتوشیمی با آنتی‌بادی اولیه علیه نوروفیلامنت ۶۸، ۱۶۰ و ۲۰۰ و رنگ آمیزی هسته‌ای با استفاده از DAPI است؛ بزرگنمایی: ۱۰۰ میکرومتر برای A, B, C, E, G, H و ۲۰۰ میکرومتر برای D, F.

لیوفوشین بود. همچنین سلول های RPE در اثر استفاده از سدیم یدید دچار هایپرتروفی شدند و به صورت چند هسته ای در تصاویر قابل مشاهده بودند (شکل ۳ A). فضای بین سلولی در سلول های RPE دچار پهن شدن شد (شکل ۳ B). در بررسی برش بافتی و رنگ آمیزی با استفاده از رنگ هماتوکسیلین و ائوزین، اختلال در سلول های لایه RPE به شکل افزایش موضعی در تعداد این سلول ها دیده شد (شکل ۳ D و E) همچنین قسمت خارجی سلول های فوتورسپتور نیز دچار به هم ریختگی شده بود (شکل ۳ F).



شکل ۳. تصاویر تغییرات پاتولوژی در آمادش های تک مانع لایه RPE و برش عرضی از شبکه. A-C: تک مانع لایه RPE؛ رسوب بیش از حد ذرات زرد رنگ (فلش) در سیتوپلاسم سلول های چند ضلعی RPE نشان دهنده آسیب این سلول ها است همچنین هایپرتروفی، چند هسته ای شدن و افزایش فاصله بین سلولی (فلش در B) در این سلول ها دیده می شود. افزایش در نور فلوتورسنس سلول های RPE در مقایسه با کنترل به خوبی قابل مشاهده است. D-E: تغییرات در برش عرضی شبکه است. به هم ریختگی در قسمت خارجی فوتورسپتورها و همچنین افزایش در تعداد سلول های RPE نشان دهنده تغییرات در اثر تزریق سدیم یدید است. بزرگمایی A و B: ۲۰۰ میکرومتر، C: ۱۰۰ میکرومتر، D و F: ۲۰ میکرومتر و E: ۴۰ میکرومتر. CC: لایه کوریو کاپیلاری، RPE: لایه رنگدانه دار شبکه، OS: قسمت خارجی فوتورسپتورها، ONL: لایه هسته ای خارجی، Op: لایه شبکه ای خارجی، INL: لایه هسته ای داخلی، GL: لایه سلولی گانگلیونی، SRS: فضای زیر شبکه

مهاجرت سلول های تزریق شده به لایه RPE: هفت روز بعد از پیوند سلول های نورسفر به فضای زیر شبکه، چشم موش های صحرایی خارج شد و بعد از آماده سازی قالب پارافینی، برش هایی به ضخامت ۵-۷ میکرومتر تهیه شد. برش ها برای یافتن سلول های نشان دار شده با نشانگر هسته ای BrdU در لایه RPE و همچنین شبکه عصبی بررسی شدند. برش های مورد بررسی با نشانگر هسته ای DAPI رنگ شد تا سلول های پیوند شده و

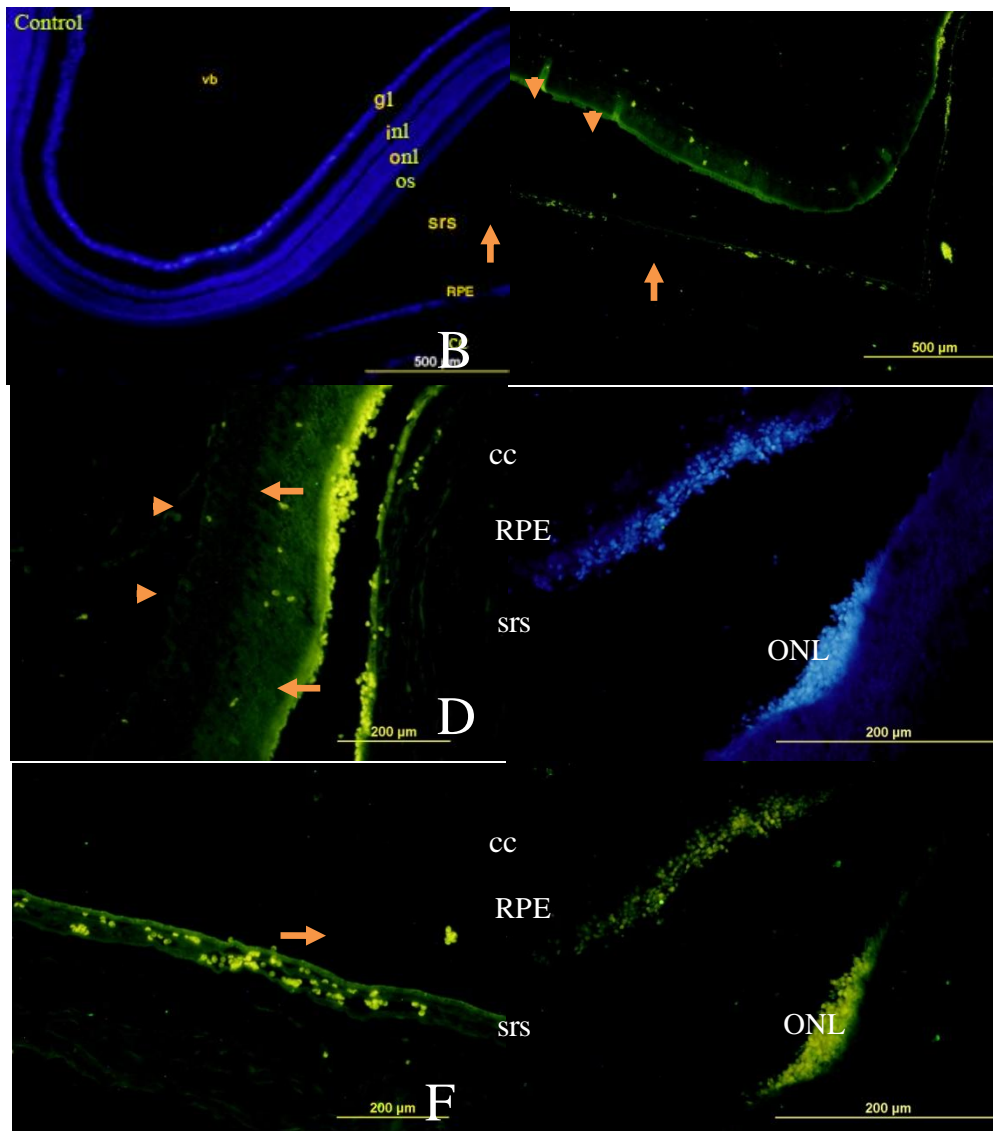
مدل تخریب لایه RPE: استفاده از سدیم یدید به طور انتخابی موجب اختلال در لایه RPE شده و منجر به از دست رفتن تکه ای این لایه و در نهایت تخریب فوتورسپتورها می شود. در این مطالعه سدیم یدید به فضای پشت چشم تزریق شد و ۲۸ روز بعد از تزریق، بررسی شد. در بررسی تک مانع لایه RPE، بعد از ۲۸ روز، تغییر در رنگ فلوتورسانس تعدادی از سلول های RPE دیده شد. به عبارت دیگر؛ در سیتوپلاسم این سلول ها در مقایسه با گروه کنترل (شکل ۳ C) رنگدانه های زرد تا سفید رنگی (شکل ۳ A) دیده شد که نشان دهنده دانه های

مهاجرت سلول های تزریق شده به لایه RPE:

هفت روز بعد از پیوند سلول های نورسفر به فضای زیر شبکه، چشم موش های صحرایی خارج شد و بعد از آماده سازی قالب پارافینی، برش هایی به ضخامت ۵-۷ میکرومتر تهیه شد. برش ها برای یافتن سلول های نشان دار شده با نشانگر هسته ای BrdU در لایه RPE و همچنین شبکه عصبی بررسی شدند. برش های مورد بررسی با نشانگر هسته ای DAPI رنگ شد تا سلول های پیوند شده و

بعد از پیوند سلولی، سلول‌های نوروسفر توانسته بودند در فضای زیر شبکه زنده بمانند و به لایه RPE مهاجرت نمایند.

بعضی از نقاط، سلول‌های تزریق‌شده در لایه کوریو کاپیلاری دیده شدند (شکل E و F). سلول‌های تزریق‌شده هم به صورت نوروسفر و هم بصورت مجزا در برش‌ها دیده شدند (شکل C). به نظر می‌رسد که ۷ روز



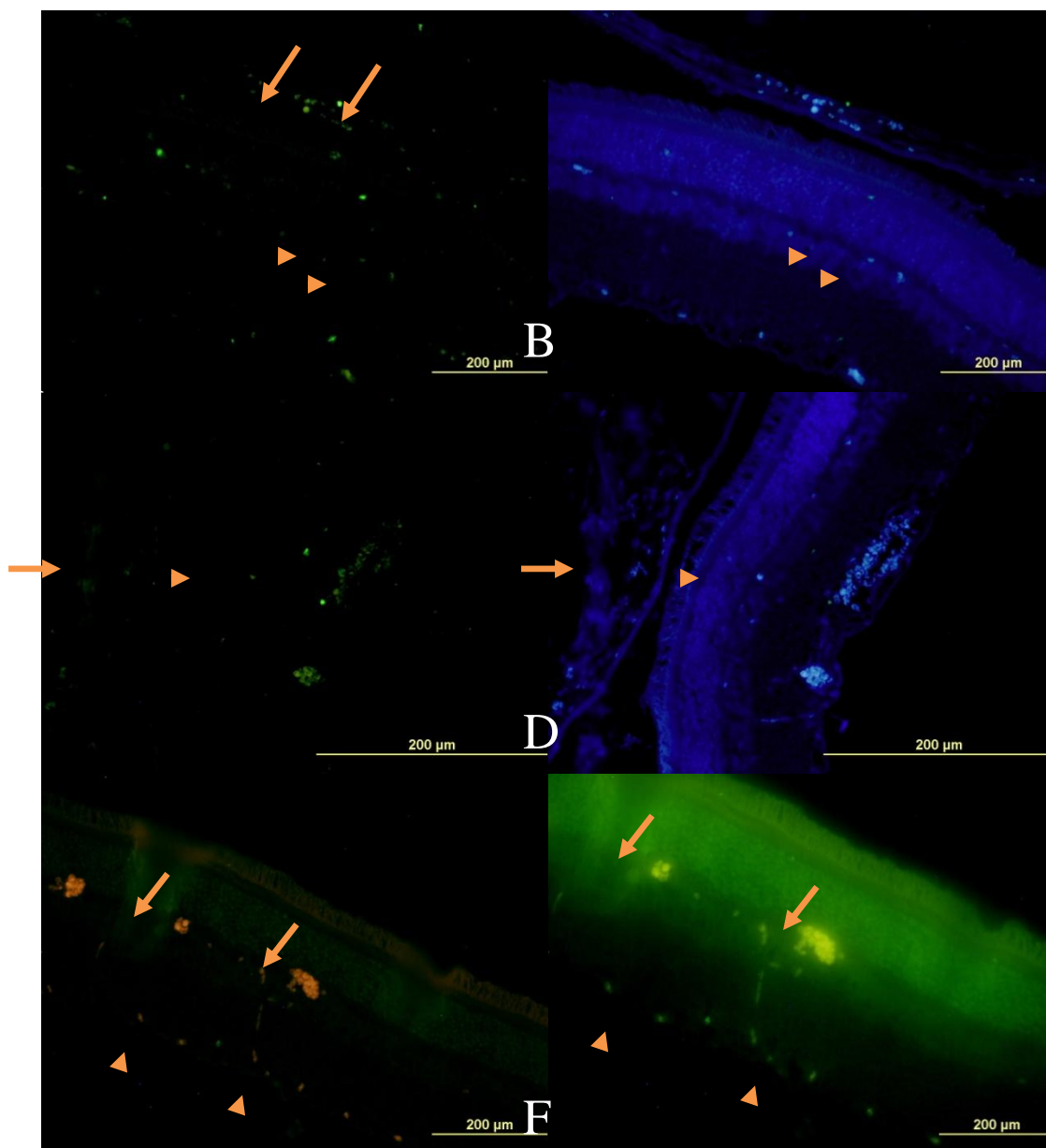
شکل ۴. تصاویر ایمونوهیستوشیمی برش‌های تهیه‌شده از تزریق سلول‌های نوروسفر در فضای زیر شبکه. A: در گروه کنترل آن لایه‌های شبکه با نشانگر هسته‌ای DAPI رنگ آمیزی شدند. B: سلول‌های پیوند شده در لایه RPE (فلش‌ها) و لایه شبکه (نوک فلش‌ها). C-F: تجمع سلول‌های نوروسفر در لایه RPE و لایه شبکه بعد از پیوند در فضای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

مهاجرت به لایه شبکه:

شکل ۵ مهاجرت سلول های نوروسفر نشان دار شده با نشانگر هسته ای BrdU در لایه شبکه را نشان می دهد. همان طور که در شکل ۵ A و B دیده می شود، سلول های نوروسفر هم در لایه RPE (فلش ها) و هم در لایه شبکه قرار داشتند. در شبکه عصبی سلول های تزریق شده در لایه هسته ای داخلی (نوک فلش ها) و گانگلیونی (ستاره ها) دیده شدند. تعداد سلول هایی که در لایه هسته ای داخلی دیده قرار داشتند بیشتر از لایه هسته ای خارجی بود. در این مناطق، سلول های تزریق شده هم به صورت تک سلولی و هم به صورت چند سلولی مشاهده شدند (شکل ۵ A و C). تعدادی از سلول های نوروسفر در مرز بین لایه هسته ای داخلی و لایه شبکه ای خارجی قرار داشتند (شکل ۵ E). نتایج نشان داد که ۷ روز بعد از پیوند سلولی، سلول های نوروسفر توانسته بودند در فضای زیر شبکه زنده بمانند و به لایه شبکه نیز مهاجرت کنند. در شکل ۵ E و F و در مجاورت دو نوروسفر در لایه شبکه ای خارجی (فلش ها)،

سه سلول نشان دار شده با نشانگر هسته ای BrdU دیده شد، یکی از این سلول ها دارای شکل کشیده ای بود و از لایه هسته ای داخلی تا لایه گانگلیونی امتداد داشت (فلش موج دار). به نظر می رسد که این سلول یکی از سلول های نوروسفر است که به سلول شبکه ای تمایز یافته است هر چند که اثبات این موضوع نیاز به بررسی بیشتر و نشانگرهای اختصاصی دارد. در این مطالعه مهاجرت سلول های نوروسفر بعد از تزریق در فضای زیر شبکه به درون زجاجیه دیده نشد.

نتایج این بخش نشان می دهد که ۷ روز بعد از پیوند، سلول های نوروسفر بعد از تزریق به فضای زیر شبکه زنده بودند و به لایه RPE و شبکه عصبی مهاجرت کرده بودند. مهاجرت هم در لایه رنگدانه دار و هم در لایه های شبکه از جمله لایه هسته ای داخلی و لایه گانگلیونی اتفاق افتاده بود. در واقع سلول های تزریق شده در تمامی لایه ها دیده شدند.



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

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 مورد توجه بسیاری از محققین است. از جمله این مواد می‌توان به سدیم یسیدیت و (N-Methyl-D-aspartic acid) NMDA اشاره نمود. این مواد می‌تواند به صورت اختصاصی بافت

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

مطالعات متعددی نشان داده‌است که سدیم یدید به‌طور اختصاصی روی سلول‌های رنگدانه دار شبکه 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 یدید روی این سلول‌ها در مدل‌های حیوانی متعددی از جمله 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 شبکه 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 شبکه‌ای شود و اتصال بین سلول‌های رنگدانه دار را سست نماید. به‌طور کلی امروزه تأثیر اختصاصی سدیم یدید روی سلول‌های رنگدانه دار برای محققین ثابت شده است و برای ایجاد مدل‌های تخریب RPE استفاده می‌شود. (۱۳ و ۱۴).

تغییراتی که در لایه RPE ایجاد می‌شود عبارتست از؛ هایپرتروفی شبکه اندوپلاسمیک صاف، تجمع فاگوزومها، لیزوزومها یا لیزوزومهای ثانویه، تجمع لیزوزومهای غیرطبیعی مثل اجسام میلوئید، رسوب لیپوفوشین، رسوب کریستال‌ها از جمله 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 تورفتگی های 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 شبکه 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 شبکه 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 یدید، 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 در نتیجه اوتوفلوئورسنس این سلول‌ها با شدت

سلول‌ها به سلول‌های فوتورسپتور دارای عملکرد می‌شود و موجب بهبود روند پاسخ‌های نوری سلول‌های فوتورسپتور می‌شود؛ همچنین منجر به تمایز سلول‌های RPE می‌شود (۲۸-۳۰). 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 شبکه زنده می‌مانند و نشانگرهای سلول‌های RPE را نشان می‌دهند (۳۰). سلول‌های بنیادی عصبی به‌عنوان سلول‌های بنیادی بزرگسالان می‌توانند بعد از پیوند با لایه RPE موجود یکی شده و در بین آنها قرار گیرند و لایه جدیدی را به وجود آورند. پیوند سلول‌های پروژنیاتور عصبی به شکل نوروسفر در موش‌ها به داخل زجاجیه موجب مهاجرت، یکی شدن و تمایز نوروسفرهای تزریق شده بعد از گذشت ۷ روز می‌شود (۳۰).

نتیجه‌گیری

در مجموع، پیوند سلول‌های نوروسفر مشتق از بافت مغز استخوان در فضای زیر شبکه‌ای در مدل‌های حیوانی ایجاد شده با سدیم بدیت که منجر به آسیب لایه RPE و همچنین لایه شبکه می‌شود، می‌تواند موجب بقا و مهاجرت سلول‌های پیوند شده شود. بنابراین به نظر می‌رسد که این سلول‌ها توانایی تمایز به سلول‌های مختلف در شبکه را دارند و می‌توانند برای درمان بیماری‌های مرتبط با شبکه 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.

بیشتری در مقایسه با سلول سالم دیده شد. تغییرات شدت نور در تک لایه RPE با گذشت 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 آسیب دیده RPE مهاجرت کردند و در بین سلول‌های 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 به طور کلی دو روش برای تزریق سلول در چشم وجود دارد ۱- تزریق زیر شبکه (subretinal space) و ۲- تزریق به درون زجاجیه. تزریق زیر شبکه نیز به دو صورت قابل انجام است؛ ۱- دسترسی به فضای زیر شبکه از طریق اسکلا و ۲- دسترسی به فضای زیر شبکه از طریق زجاجیه. در روش دو احتمال خونریزی، عفونت و همچنین آسیب به عدسی زیاد است. هر چند که در روش یک نیز این احتمالات وجود دارد اما بسیار کمتر است (۲۳). در واقع تزریق زیر فضای شبکه به دلیل نزدیک بودن به محل آسیب موجب پیوند بهتر و مهاجرت بیشتر سلول‌های پیوند شده می‌شود. از طرفی فضای زیر شبکه محیطی است که از لحاظ ایمنی به سلول‌های تزریق شده واکنش ایمنی نشان نمی‌دهد. در مقابل تزریق درون زجاجیه کمتر تهاجمی است و عمومی‌تر است. با این حال مطالعات نشان می‌دهد که موانع طبیعی از جمله لایه محدودکننده داخلی و همچنین ماتریکس خارج سلولی آن در مهاجرت سلول‌های تزریق شده درون فضای زجاجیه وجود دارد. روش سوم 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 شبکه در موش‌ها منجر به تمایز این

References

- 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.
- Hollyfield JG. Age-Related Macular Degeneration: The Molecular Link between Oxidative Damage, Tissue-Specific Inflammation and Outer Retinal Disease The Proctor Lecture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010; 51: 1276-81.
- Hageman GS, Mullins RF. Molecular composition of drusen as related to substructural phenotype. *Mol Vis* 1999; 5: b71.
- 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.
- 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.
- Li Y, Reza 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.
- Caplan AI, Bruder SP. Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century. *Trends mol med* 2001; 7: 259-64.
- Machalińska A, Lubiński W, Kłós P, Kawa M, Baumert B, Penkala K, et al. Sodium iodate selectively injures the posterior pole of the retina in a dose-dependent manner: morphological and electrophysiological study. *Neurochem Res* 2010; 35: 1819-27.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Jiang W, Chiou GC. Effects of hydralazine on NaIO₃-induced rat retinal pigment epithelium degeneration. *Int J Ophthalmol* 2008; 8: 1504-0.
- 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.
- 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.
- Wang J, Iacovelli J, Spencer C, Saint-Geniez M. Direct Effect of Sodium Iodate on Neurosensory Retina Effect of Sodium Iodate on Neurosensory Retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2014; 55: 1941-53.
- 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.