

## مقایسه فراساختار و تجلی ژنی در سلولهای بنیادی لیمبال کشته داده شده،

### ملتحمه، لیمبال و قرنیه نرم‌مال

\* مرضیه ابراهیمی M.Sc., \*\* حسین بهاروند Ph.D., \*\* عباس پیریایی M.Sc., محمد معصومی

\* گروه سلولهای بنیادی پژوهشکده روان

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

وصول: فروردین ماه ۸۵، پذیرش خرداماه ۸۵

### چکیده

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

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

**یافته‌ها:** پس از ۳-۲ هفته، سلولهای کشته شده صفحه‌ای به اندازه تقریبی  $2 \times 2$  سانتی‌متر مریع را بر پرده آمنیوتیک برخene (فاقد سلول) تشکیل دادند. سلولهای کشته شده در تمام مراحل کشته از نظر بیان ژن K3- Oct4+ P63+ Pax6+ و K12+ بودند. بیان ژن K3- و K12+ کانکسین ۴۳ پس از ۱۴ روز کشت ظاهر شد و با افزایش زمان کشت افزایش یافت، در حالی که بیان ژن P63 با افزایش زمان کاهش یافت. مقایسه سلولهای کشته شده با نوع طبیعی آن نشان داد که بافت لیمبال دارای ژنهای PAX6+/Oct4+/K3- /K12- /P63+ و بافت قرنیه دارای ژن Oct4+/PAX6+ /K3+/K12+/P63- و بافت ملتحمه نیز دارای ژنهای K3- /K12+/Oct4+/PAX6+ /P63+ بودند. بررسی فراساختار سلولهای لیمبال کشته شده شباختهای فراوانی بین این سلولها و اپیتلیوم قرنیه طبیعی بود.

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

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

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

## مقدمه

Johnson, ocular Cicatrical pemphigoid, Extensive Recurrent .[۱۰-۱۲] Petrygium

برای بازسازی قرنیه در این بیماران چندین راهکار درمانی ارایه شده است که می‌توان به پیوند پرده آمنیوتیک، پیوند اتوگرافت یا آلوگرافت ناحیه لیمبال و در نهایت پیوند سلولهای لیمبال کشت شده در آزمایشگاه اشاره نمود. روش اخیر وارد مزایای بسیاری از جمله استفاده از بافت لیمبال خود بیمار و حذف احتمال رد پیوند است [۱۵-۱۳]. در حقیقت استفاده از پرده آمنیوتیک به عنوان یک سوبسترانی مناسب در پیوند همزمان با سلولهای بنیادی لیمبال به منظور درمان بیماران با نقص جزئی مؤثر بوده است [۱۹-۱۶]. همچنین موقفيتهای چشمگیری در بازسازی اپیتلیوم قرنیه بدنیال پیوند سلولهای کشت شده لیمبال بر روی پرده آمنیون به دست آمده است [۲۰، ۱۴ و ۲۱].

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

## مواد و روشهای

### محلولها و مواد شیمیایی

محیط کشت Dulbecco's modified Eagle's medium/Ham's F12 (DMEM/F12, 16141-079)، محلول بافر نمکی هنکر (HBSS: Hancs Buffer Salt Solution, 14185-045)، دیسپاز II (FBS) (A9528) و سرم جنین گاو (Grand Island, NY, USA) (Gibco 21331-20) از شرکت Gibco خریداری شد. جنتامایسین (G1387)، هیدروکورتیزون-۸ (H0888)، دی متیل سولفوکسید (DMSO D2650)، فاکتور رشد (hEGF، E9644) اپی-درمال انسانی (Steven-

اپیتلیوم قرنیه که سطح جلویی چشم را پوشش می‌دهد، مشتق از اکتودرم بوده و همواره در سطحی پویا و متعادل قرار دارد، به طوری که سلولهای سطحی آن به حوضچه اشکی ریزش کرده و سلولهای جدید جایگزین آن می‌شوند، عمل پلک زدن سبب تسهیل این روند می‌شود [۱]. سلولهای بنیادی مستقر در ناحیه لیمبال (مرز بین ملتحمه و قرنیه) منبعی از سلولهای ذخیره‌ای برای بازسازی اپیتلیوم قرنیه هستند این سلولها به علت دارا بودن خاصیت خود نوزایی (self-renewal) [۲]، مسئول حفظ تمامیت [۳] و نیز ترمیم اپیتلیوم قرنیه در جراحات و حالات طبیعی هستند [۳ و ۴].

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

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

(۱/۰ درصد) در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد. سپس سلولهای اپی تیالی در محیط حاوی کلرید آمونیوم (۰ درصد) جدا شدند. پس از اطمینان از برهنه بودن غشاء، پرده آمینوتیک در پلیتھای کشت ۶ خانه‌ای به گونه‌ای گسترانیده شد که سطح اپی تیال آن رو به بالا قرار گیرد. سپس یک قطعه از لیمبال در مرکز غشای آمینوتیک قرار گرفت و کشت در حضور DMEM/F12 حاوی (۰ درصد) ES- $\mu\text{g}/\text{ml}$  DMSO  $\mu\text{g}/\text{ml}$  EGF  $\mu\text{g}/\text{ml}$  FCS  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (۵ درصد)، (۳۷ ng/ml) DMSO ، انسولین (۵ ng/ml) (۵ درصد)، (۳۰ ng/ml) A، کلراتوکسین (۰/۵  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )، هیدروکورتیزون (۰/۰  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )، جنتامایسین ( $۵۰ \mu\text{g}/\text{ml}$ )، آمفوتريسین B ( $۱/۲۵ \mu\text{g}/\text{ml}$ ) و ال - گلوتامین ۴ mM در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و تحت شرایط (۵ درصد) CO<sub>2</sub> و ۹۵ درصد اکسیژن صورت گرفت. پس از گذشت ۱۳-۱۵ روز از کشت، قطعه بافتی از کشت بروداشته شد و کشت به مدت ۷ روز در غیاب قطعه ادامه یافت. محیط هر ۳-۲ روز تعویض شد. میزان مهاجرت سلولی توسط میکروسکوپ فازکتراست مورد بررسی شد [۱ و ۷-۱۹]

### بررسی با میکروسکوپ نوری

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

### ایمنوستیوشیمی به منظور بررسی حضور

#### ژنهای کراتین ۳، کانکسین ۴۳، P63 و Oct4

از روش ایمنوستیوشیمی غیرمستقیم به منظور تایید سلولهای کشت شده برای مطالعه ژنهای کراتین ۳ (K3)، کانکسین ۴۳، P63 و Oct4 استفاده شد. ابتدا سلولها در پارافرمالدهید ۴ درصد به مدت ۳۰ دقیقه ثابت شدند و پس از شستشو با بافرسفات PBS: Phosphat Buffer Saline (PBST) (۰ درصد) توسط محلول PBS حاوی ۲/۰ درصد تریتون (Twein X1۰۰) به مدت ۱۰ دقیقه نفوذ پذیر شدند. سپس به منظور حذف

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

**کشت قطعه ای لیمبال بر غشای آمینوتیک برهنه** کره‌های کامل چشم از اجساد ۵۰-۲۰ سال از بانک چشم ایران (تهران) (HIV-HBV-HCV-) تهیه (n=۵) و ناحیه لیمبوس آنها جدا شد و در محیط DMEM/F12 حاوی آنتی بیوتیکهای جنتامایسین ( $۵۰ \mu\text{g}/\text{ml}$ ) و آمفوتريسین B ( $۱/۲۵ \mu\text{g}/\text{ml}$ ) شستشو داده شد. بافت‌های اضافه شامل عنیبه، آندوتلیوم قرنیه، صلبیه و ملتحمه جدا و باقیمانده بافتی پس از شستشو با محیط DMEM/F12 حاوی آنتی بیوتیک به ظرف حاوی آنزیم دیسپاز II (۰/۲U/ml) در HBSS (عارضی از ۳۷ درجه سانتی گراد،  $۵ \mu\text{g}/\text{ml}$  CO<sub>2</sub> و  $۱۰ \text{Ca}^{+2}$  در مدت ۱۰-۱۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد،  $۱ \times ۱ \times ۰ \text{ mm}$  منتقل و به مدت ۱۰-۱۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد،  $۱ \times ۱ \times ۰ \text{ mm}$  استرپتومایسین ( $۵۰ \mu\text{g}/\text{ml}$ ) و آمفوتريسین B ( $۱/۲۵ \mu\text{g}/\text{ml}$ ) و توسط اسکالاپل در قطعات  $۳ \times ۳ \text{ cm}$  شستشو شد. در مدت ۱۰ دقیقه در فریز -۸۰°C برداشته شد و در محیط DMSO (۱/۵M) در فریز -۸۰°C نگهداری شد. در زمان استفاده، غشاء با PBS حاوی آنتی بیوتیک شستشو داده شد و به مدت ۱۵ دقیقه در محلول

غشای آمینوتیک انسانی در زمان سزارین از مادران سالم (HBV-HIV-) به صورت استریل تهیه، و پس از جداسازی کوریون و لايههای زیرین توسط بافرفسفات نمکی (PBS: Phosphat Buffer Saline) حاوی پنی‌سیلین (۱۰۰۰ U/ml) استرپتومایسین ( $۵۰ \mu\text{g}/\text{ml}$ ) و افالاکسوزین (۰/۳ درصد)، شستشو شد و سپس بر نیتروسلولز گسترانیده و در ابعاد  $۳ \times ۳ \text{ cm}$  برداشته شد و در محیط DMSO (۱/۵M) در فریز -۸۰°C نگهداری شد. در زمان استفاده، غشاء با PBS حاوی آنتی بیوتیک شستشو داده شد و به مدت ۱۵ دقیقه در محلول

ضد IgG کونژوگه با پرواکسیداز در رقت ۱/۲۰۰ به منظور بررسی محتوای پروتئینی هر باند استفاده شد و سپس مکان باندها توسط DAB آشکار شدند.

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

بررسی بیان ژنهای ویژه اپی تلیال قرنیه (K12 و K3) و سلولهای بنیادی لیمبال (P63) و نیز Pax6 و Oct4 در نمونه‌های لیمبال طبیعی (Invivo Limbal, L) و کشت شده (In vitro Limbal Culture Epitilium, LCE) اپی تلیال قرنیه طبیعی (In vivo) و اپی تلیال ملتحمه طبیعی (In vivo Cornea, K) (RT-PCR) توسط واکنش نسخه برداری معکوس-Conjunctiva, C صورت گرفت. بدین منظور موجودی RNA سلولها PCR صورت گرفت. پس از استخراج و با استفاده از توسط RNX-PLUS TM استخراج و با استفاده از Revert nid TM H minus و کیت Random Hexamer و پرایمرهای First Strand CDNA Synthesis رشته مکمل cDNA ساخته شد. مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۲ نشان داده شده است. محصولات پس از انجام واکنش PCR بر روی آگارز ۱/۵٪ (Fermentas) از یکدیگر جدا و پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید توسط دستگاه ترانس لومینتوور UV (Uvidio, UK) آشکار شدند.

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

در انتهای به منظور آشکارساختن مکان اتصال آنتی بادیهای اولیه، از آنتی بادی Anti-IgG1 کونژوگه با FITC در رقت ۱/۲۰۰ استفاده و نتیجه توسط میکروسکوپ فلورسنت (Nikon, Japan) مورد بررسی قرار گرفت. نمونه‌های کترول منفی به جای آنتی بادی اولیه در IgG موشی تیمار شدند. پرومیدیوم یداید (PI)<sup>۱</sup> و یا هو خست (33342 μg/ml) به منظور رنگ آمیزی هسته سلولها استفاده شد.

### ایمنوبلات

بافت‌های ملتحمه، قرنیه و لیمبال از بانک چشم ایران تهیه شد. توسط ۵ چرخه فریز و ذوب عصاره سلولی به دست آمد و پس از سنجش غلظت پروتئینی به روش برادفورد میزان ۲۰ μg/ml از هر کدام به ژل ۷/۵٪ پلی اکریل آمید تزریق شد و پس از انجام الکتروفورز، باندهای پروتئینی به کاغذ نیتروسلولز متقل و غشاء توسط ۳ BSA درصد بلاک شد. از آنتی بادیهای ضد K3, P63, Oct4 (جدول ۱) و آنتی بادی ثانویه

جدول ۱ مشخصات آنتی بادیهای مورد استفاده در ایمنوستیتوشیمی

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

### 1. Promidium Iodide

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

Genes	Primer sequences (5'-3')	Size(bp)	Annealing Temperature (°C)	Gene bank accession number
Cytokeratin K3	F: GAG CGG AGC AGG TGG CTTT R: GGT CAG TCT CCA CTT TGA G	۴۲۸	۵۸	NM_057088
Cytokeratin K12	F: TGC GAG CTC TAG AAG AGG CTA R: CCT CGT GGT TCT TCT TCA TGT A	۳۷۸	۶۴	NM_000223
P63	F: CGG ACC TGA GTG ACC CCA T R: TCC GTG ACG TCG TGA GCT T	۴۱۵	۶۲	NM_003722
OCT4	F: CTT GCT GCA GAA GTG GGT GGA GGA A R: CTG CAG TGT GGG TTT CGG GCA	۱۸۷	۶۷	NM_002701
Pax6	F: TCC ATC AGT TCC AAC GGA GAA G R: GTG GAA TTG GTT GGT AGA CAC TG	۲۳۷	۶۲	NM_001604
-actinβ	F: TGC GTG ACA TTA AGG AGA AG R: TGA AGG TAG TTT CGT GGA TG	۲۱۳	۶۰	NM_001101

نانومتر زده شد و بر روی گریدهای ۲۰۰ خانه‌ای منتقل گردید. رنگ آمیزی برشها نیز توسط محلول ۵درصد استات یورانیل، و محلول ۵/۰درصد سیترات سرب انجام شد. جهت تهیه الکترون میکروگرافها، برشهای منفرد توسط میکروسکوپ الکترونی گذاره (Zeiss EM 900) و تحت اختلاف پتانسیل KV ۸۰ مورد بررسی قرار گرفتند و مناطق نظر عکسبرداری شد.

## یافته‌ها

### مورفولوژی سلولهای کشت شده

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

## مطالعه نمونه‌ها با میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM)

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

## مطالعه نمونه‌ها با میکروسکوپ الکترونی کذاره (TEM)

ابتدا نمونه‌ها، توسط محلول گلوتارتالدئید ۲/۵درصد در بافر فسفات ۰.۱M (pH=7.4) به مدت ۲ ساعت ثابت شدند، و بعد از شستشو به مدت ۱/۵ ساعت در محلول ۱ درصد تتراسیداسمیوم قرار گرفتند. برای آبگیری از غلظتها رو به افزایش استن استفاده شد. قالب گیری در رزین اپوکسی انجام گردید. برشهای فوق نازک(Ultra-thin) توسط دستگاه اولترامیکروتوم و با استفاده از تیغ الماس، با ضخامت ۷۰

اصل بیان نشد (جدول ۳ شکل ۲A-C). mRNA شاخص تمایزی اختصاصی قرنیه K3 به فراوانی در اپی تلیال قرنیه مشاهده شد و در ناحیه لیمبال، ملتحمه و یا سلولهای کشت شده بیان نمی شد (جدول ۳ شکل ۲A-C). این در حالی بود که شاخص دیگر؛ سلولهای تمایز یافته قرنیه یعنی K12 در بافت ملتحمه و کشتهای طولانی مدت سلولهای لیمبوسی بیان می گردید و بیانی از آن در بافت لیمبوسی مشاهده نگردید و یا از بیان بسیار پایینی برخوردار بود (جدول ۳ شکل ۲A-C).

مقایسه بافت‌های طبیعی و سلولهای کشت شده از نظر بیان K12 و P63 تفاوت معنی داری بین این دو گروه نشان داد به طوری که بیان افزایش یافته ای از این دو مارکر در سلولهای کشت شده نسبت به نوع طبیعی دیده شد. از سوی دیگر؛ بیان K12 با افزایش مدت زمان کشت افزایش (P<0.05) و P63 کاهش یافت (P<0.01). هرچند که در سلولهای کشت شده به مدت ۷ روز، mRNA کراتین ۱۲ (K12) قابل تشخیص نبود (جدول ۳ و شکل ۲A-C).

## مقایسه بیان شاخصهای سلولی در *In Vivo* و *In Vitro*

برای بررسی بیان شاخصهای اختصاصی قرنیه (K12، K3 و کانکسین ۴۳)، شاخصهای پیشنهادی لیمبال (P63) و ژنهای OCT4 و Pax6 از روش ایمنوستیتوشیمی - با استفاده از آنتی بادیهای منوکلونال اختصاصی (جدول ۱) - و RT-PCR نیمه کمی - با استفاده از پرایمرهای اختصاصی (جدول ۲) - استفاده گردید. آزمایشها در دو گروه الف - بافت‌های طبیعی شامل قرنیه، لیمبال و ملتحمه و ب - سلولهای کشت شده در زمانهای متفاوت شامل روز ۷، ۱۴ و ۲۱ صورت گرفت.

با استفاده از  $\beta$ -اکتین، به عنوان کنترل داخلی، RT-PCR نیمه کمی انجام گرفت و الگوهای بیانی متفاوتی در ژنهای پیشنهادی و مارکرهای تمایزی در نمونه‌های بافتی (*In Vivo*) و سلولهای کشت شده (*In Vitro*) به دست آمد (جدول ۳ شکل ۲A-C). بیان پروتئین هسته‌ایی P63 در بافت اپیتلیال لیمبال، ملتحمه و نیز تمام مراحل کشت سلولی مشاهده شد. در حالی که در سلولهای اپی تلیال قرنیه بیان ضعیفی داشت یا

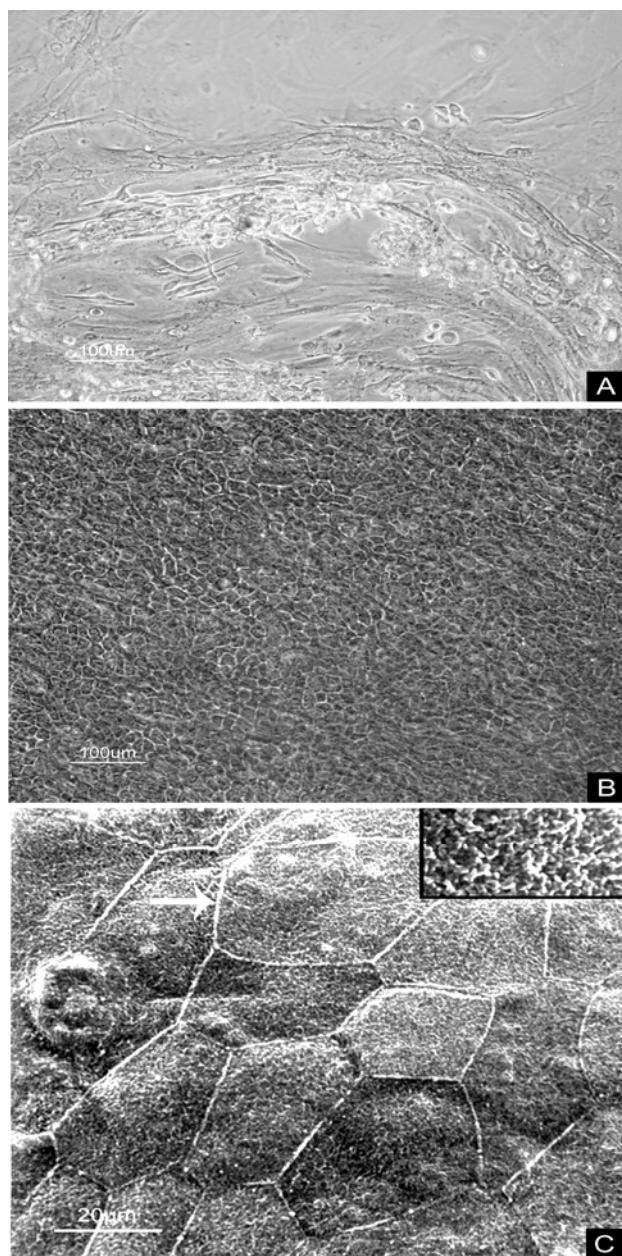
جدول ۲. نتایج RT-PCR نیمه کمی در نمونه‌های بافتی مختلف و زمانهای متفاوت کشت سلولهای لیمبوسی

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

Pax6 از جمله فاکتورهای نسخه برداری است که در تکامل چشم و تنظیم مورفوژنز سلولهای اپیتلیالی موثر است این ژن در ناحیه لیمبال و قرنیه از بیان بالاتری نسبت به ملتحمه برخوردار بود ( $P<0.05$ ) و بیان آن در سلولهای کشت شده نسبت به بافت‌های طبیعی افزایش معنی داری نشان داد (جدول ۳ و شکل ۲A-C). نیز از جمله ژنهایی است که در سلولهای بنیادی جنینی و برخی از سلولهای سرطانی بیان می‌شود. در این مطالعه بین اپیتلیالهای متفاوت یا سلولهای کشت شده در زمانهای متفاوت از نظر بیان OCT4 تفاوتی مشاهده نشد (جدول ۳ شکل ۲A-C). این‌مو بلات با استفاده از آنتی بادیهای ضد K3, P63، Oct4 و CX43 و نیز ایمنوستیتوژنی با استفاده از آنتی بادیهای اختصاصی ضد k3, P63 و CX43 در روز ۷ پس از کشت قابل تشخیص نیست. در روز ۱۴ کشت درصد بسیار کمی از سلولها به بیان این شاخص می‌پردازند و افزایش زمان کشت سبب افزایش تعداد سلولهای مثبت از نظر کانکسین ۴۳ می‌شود (شکل ۳).

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

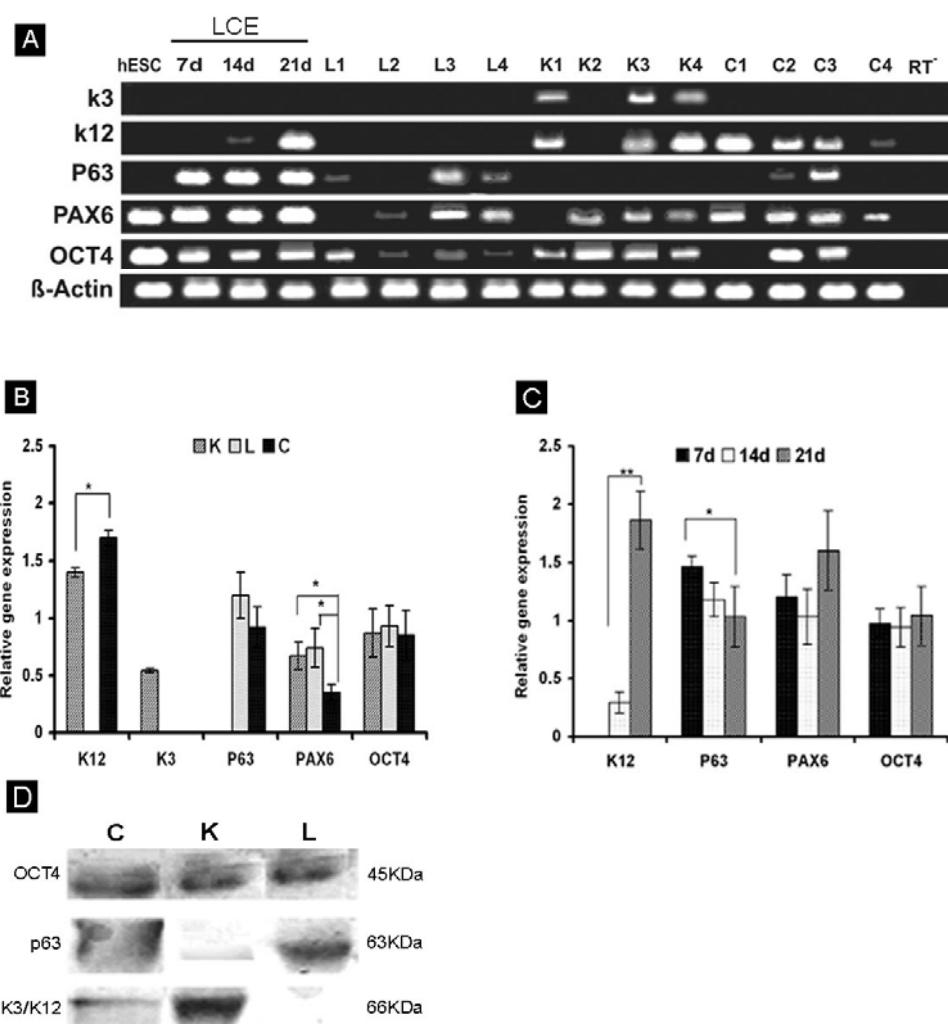
بررسی سطح بالایی (آزاد) سلولهای کشت شده (۱۴ روزه) با میکروسکوپ الکترونی اسکنینگ حضور لایه پیوسته‌ای از سلولهای سطحی سنگفرشی را نشان داد (شکل ۱C)، اندازه سلولها در حدود  $30-20$  میکرومتر محاسبه گردید. این سلولها دارای مرز کاملاً مشخص با یکدیگر بوده و سطحشان توسط میکروویلیهای کوتاه و انگشتی شکل پوشیده شده بود (شکل ۱C). سلولهای سطحی از نظر مورفوژوژی همتای سلولهای اپیتلیالی قرنیه طبیعی انسانی بودند با این تفاوت که میکروویلیها در این سلولها کوتاه‌تر و پهن‌تر از نوع طبیعی بودند.



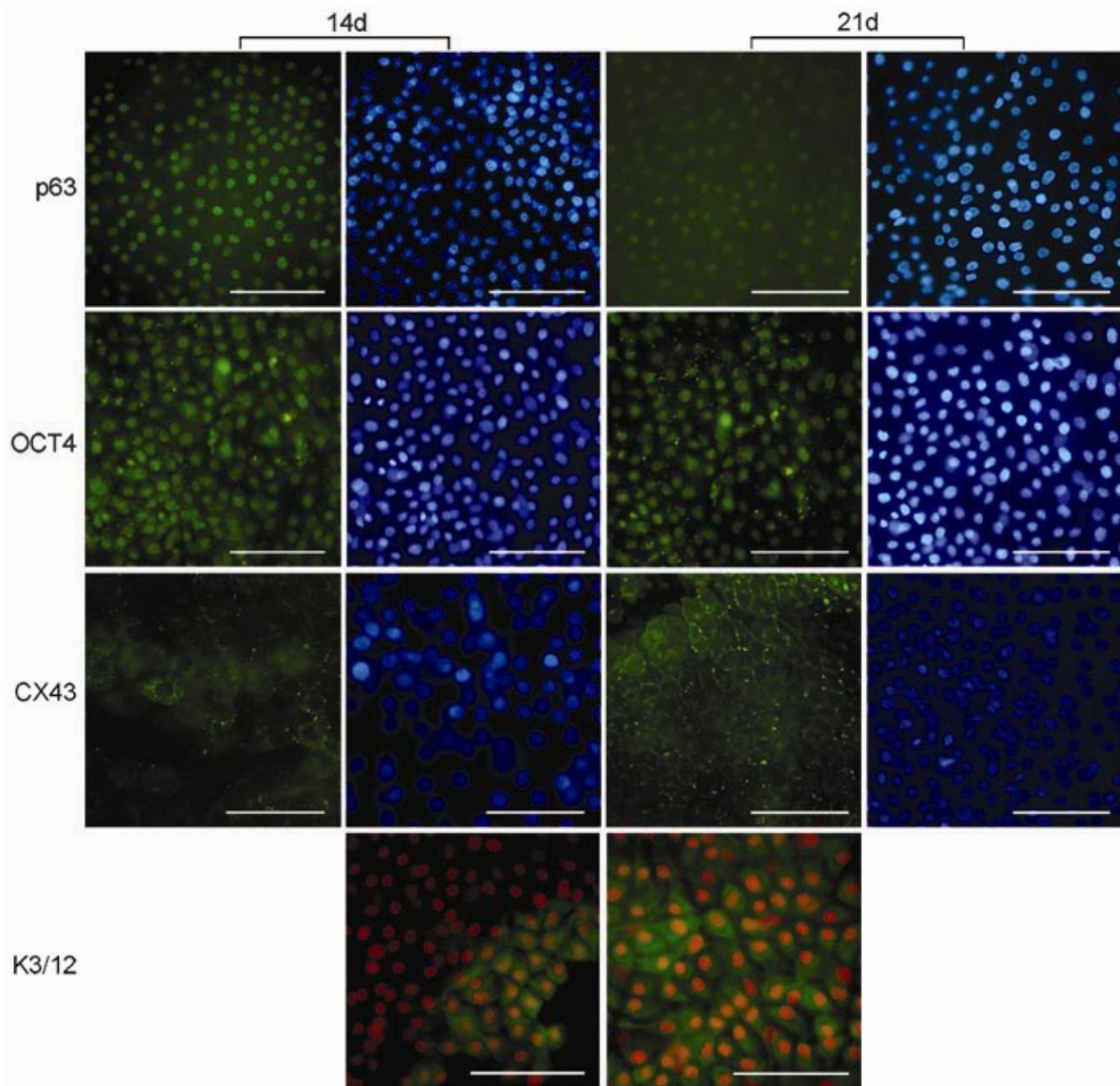
شکل ۱. فتو میکروسکوپ قطعه لیمبال کشت شده بر روی پرده آمنیوتیک (A,B). دو روز پس از کشت سلولهایی کروی شکل در اطراف این قطعه ظاهر شدند و برخی از آنها که شروع به مهاجرت کرده اند حالتی دوکی شکل دارند (A). با گذشت ۲۱ روز سلولها حالتی سنگفرشی و مطبق پیدا کرده و سطحی در حدود  $2*2$  سانتیمتر مربع را پوشانده اند (B). اسکنینگ الکترون میکروسکوپ روز ۱۴ کشت، سلولهای چندوجهی سنگفرشی و دارای میکروویلی را نشان می‌دهد (C) فلاش مرز سلولها را نشان می‌دهد.

جدول ۴. نتایج ایمنوستیتوشیمی و ایمنوبلاط در نمونه‌های بافتی و زمانهای متفاوت کشت سلولهای لیمبوسی

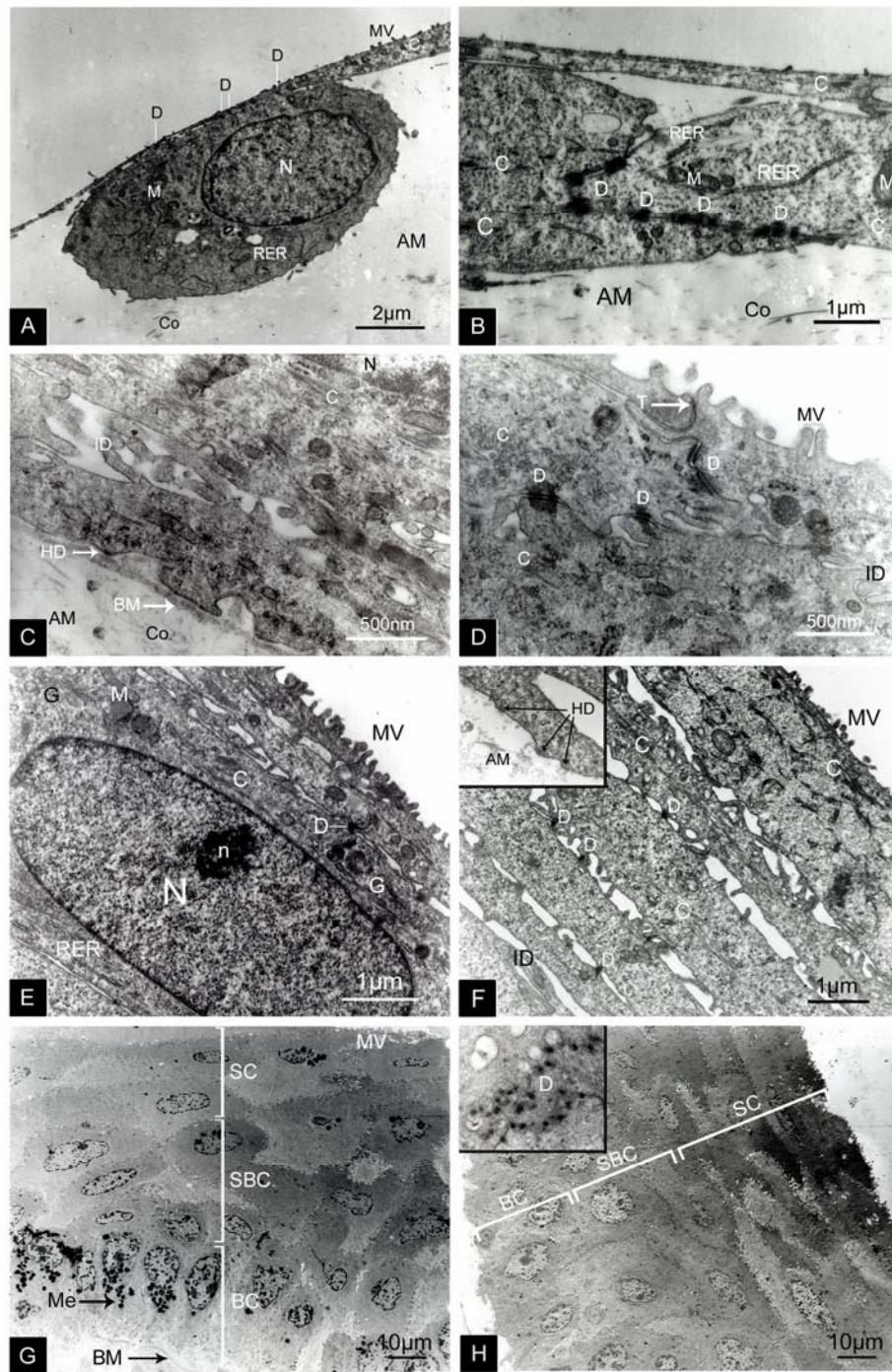
نمونه‌ها	Immunoblot			Cultured Cells	Immunocytochemistry			
	K3/K12	P63	Oct4		K3/K12	Cx43	P63	Oct4
بافت‌ها	+	+	+	7 <sup>th</sup> d	N/D	N/D	N/D	N/D
ملتحمه	+	+	+	14 <sup>th</sup> d	17.60±6.63	7.43±4.28	78.41±7.24	60.27±0.90
لیمبوس	-	+	+	21 <sup>st</sup> d	34.85±8.00	30.20±8.23	64.80±3.83	65.84±0.53
قرنیه	+	+/-	+					



شکل ۲ نتایج بیان ژنهای اختصاصی قرنیه، لیمبال، OCT4، P63 و K3 در نمونه‌های ملتحمه، لیمبال و قرنیه نرمال.(A) تصویر الکتروفورز cDNA ژنهای مربوطه حضور و یا عدم حضور mRNA را برای ژنهای متعلق به چشم (K3, K12, P63, PAX6) و OCT4 (K3, K12, P63, PAX6, OCT4) در ۴ نمونه بافت طبیعی و کشت شده را نشان می‌دهد.(B) نتایج RT-PCR نیمه کمی ژنهای K12, P63, PAX6, OCT4 در بافت‌های طبیعی و (C) در سلولهای لیمبوسی کشت شده را نشان می‌دهد.(D) نتایج ایمنوبلاط در بافت‌های طبیعی. (.)K: بافت قرنیه نرمال, L: لیمبال نرمال, C: ملتحمه نرمال, LCE: سلولهای کشت شده لیمبالی, hESC: سلولهای بنیادی جنینی.



شکل ۳. نتایج رنگ آمیزی ایمنو فلورسنت برای شاخصهای P63، OCT4، کانکسین ۴۳(CX43) و K3/K12 در سلولهای لیمبوسی کشت شده بر پرده آمنیوتیک در روزهای ۱۴ و ۲۱ پس از کشت. هسته سلولها با هو خست ۲۳۲۴۲ رنگ آمیزی شده اند. بار: ۲۰۰  $\mu\text{m}$ .



شکل ۴ ترانسミشن الکترون میکروگراف سلولهای لیمبال کشت شده بر روی پرده آمنیوتیک، که فراساختار سلولهای در حال تمایز را در روزهای ۷ (A,B) ۱۴ (C,D) ۲۱ (E,F) روز پس از کشت، لیمبال طبیعی (G) و قرنیه طبیعی (H) نشان میدهد. AM: پرده آمنیوتیک، BM: پرده آمنیوتیک، Co: سیتوکراتین، C: غشای پایه، D: دستگاه گلزار، G: دسموزوم، HD: همی دسموزوم، ID: زواید سلولی پنجه در پنجه، M: میتوکندری، MV: شبکه آندوپلاسمیک خشن، N: هسته، Me: ملانین، RER: شبکه آندوپلاسمیک خشن، SC: سلولهای مجاور قاعده‌ای، SBC: سلولهای قاعده‌ای، SG: gihd sxpd.

می شد. همچنین مقادیر متنابهی از سایتوکراتین وجود داشت که مقدار آن در سلولهای سطحی بیش از سلولهای قاعده ای بود (شکل E,F<sup>4</sup>). بررسی فراساختار سلولهای کشت شده شباهتهای زیادی بین این سلولها و قرنیه و لیمبال طبیعی نشان داد (شکل G,H<sup>4</sup>، با این وجود تفاوت‌هایی نیز وجود داشت از جمله: فواصل بین سلولی در سلولهای کشت شده بیش از انواع طبیعی بود. و همچنین فراوانی زواید انگشت مانند بین سلولهای مجاور در سلولهای کشت شده بیشتر بود. تعداد دسموزومها نیز در کشت‌های طولانی مدت افزایش می‌یافتد اما همچنان بسیار کمتر از نمونه‌های In Vivo بود. در سلولهای کشت شده لیمبال، سلولهای قاعده ای برپرده آمنیون حالتی کشیده و سنگفرشی داشتند در صورتیکه در لیمبال طبیعی سلولهای قسمت قاعده ای مکعبی شکل بودند (شکل G,H<sup>4</sup>).

## پنجم

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

در این مطالعه به بررسی الگوهای بیان ژنهای P63, K3/12, mRNA در دو سطح پروتئین و mRNA و Pax6 در سطح Oct4 و کانکسین (CX43) در سطح پروتئین، در نمونه‌های بافتی تازه تهیه شده (in Vivo)، لیمبال و ملتحمه پرداخته شد و نتایج با نتایج حاصل از کشت سلولهای لیمبال (in Vitro) بر پرده آمنیوتیک در روزهای ۷، ۱۴ و ۲۱ مقایسه گردید.

مطالعه فراساختار سلولهای کشت شده توسط میکروسکوپ الکترونی ترانسمیشن نیز حضور ۷-۲ لايه سلول مت Shank از اپیتیلیوم سنگفرشی مطبق را نشان داد. تعداد لايه‌های سلولی در کشت‌های ۷ و ۱۴ روزه کم و در کل کشت یکنواخت نبود به این ترتیب که در برخی نواحی گاه تنها یک لايه و در نواحی دیگر به سه لايه سلول می‌رسیدند. سلولهای اپیتیلیال لیمبال کاملاً به هم متصل شده و اتصالات بین سلولی در بین سلولهای مجاور مشاهده شد (شکل ۴A-D). در کشت‌های کوتاه مدت میتوکندری، سیتوکراتین و دسموزومها به مقدار کم وجود داشته و هسته سلولها ظاهری کروی داشتند. همچنین فضاهای بین سلولی وسیعی وجود داشت و استطاله‌های سیتوپلاسمی تشکیل نشده یا بسیار کم بودند. این در حالی است که میکروویلیها در سطح فوقانی در حال تشکیل بودند (شکل ۴A,D). افزایش مدت کشت به ۲۱ روز سبب افزایش تعداد لايه‌های سلولی به ۷ لايه شد. در ناحیه سطحی سلولهای کشیده و سنگفرشی بیش از لايه‌های پایین تر بوده و در سطح آزاد آنها میکروویلیهای متراکمتر و منظمتری مشاهده می‌شد. هسته دوکی شکل در سلولهای سطحی به ندرت دیده می‌شد اما سلولهای لايه‌های پایین تر دارای هسته‌های بیضی یوکروماتین با هستک مشخص بودند. فواصل بین سلولی در ناحیه قاعده ای بیش از ناحیه سطحی بود و به نظر می‌رسید که سلولها در ناحیه فوقانی فشرده تر باشند. زواید انگشتی شکل سلولها که در فضاهای بین سلولی به سمت یکدیگر کشیده شده بودند در برخی نواحی با یکدیگر پنجه در پنجه (Interdigit) شده بودند. سلولها توسط دسموزومها فراوانی به یکدیگر متصل شده و تعداد این اتصالات در لايه‌های فوقانی بیش از لايه‌های تحتانی بود. در کشت‌های طولانی مدت سلولهای بازال به سنتز غشای پایه پرداخته و توسط اتصالات همی دسموزوم به پرده آمنیون متصل می‌شدند در سیتوپلاسم سلولهای قاعده ای اغلب ارگانلهای سلولی، از جمله دستگاه گلزاری، شبکه اندوپلاسمیک خشن و تعداد زیادی میتوکندریهای میله ای شکل دیده

که در سلولهای بنیادی اپیتیلیالی و لیمبالی بیان می‌گردد، فاکتور نسخه برداری هسته ای P63 است که وظیفه مهمی در مورفوژنز و ترمیم اپی تلیوم قرنیه به عهده دارد(۳۴-۳۲). ما حضور این پروتئین را در عصاره‌های بافتی توسط وسترن بلات پیگیری کردیم و حضور آن تنها در ملتجمه و لیمبال مشاهده گردید. این در حالی بود که بیان این پروتئین در تمام مراحل کشت توسط ایمنوسیتوشیمی مشاهده گردید و در کشتهای طولانی مدت سلولهای P63+ کاهش معنی داری می‌یافتد که دلیلی بر تمایز آنها می‌باشد.

یکی دیگر از عوامل موثر در تکوین قرنیه، فعالیت صحیح سلولهای بنیادی لیمبال، مهاجرت سلولهای اپیتیلیال قرنیه، تولید Pax6 و حفظ قرنیه در افراد بالغ، فاکتور نسخه برداری Pax6 است [۳۶-۳۵]. نتایج RT-PCR نشان داد که این پروتئین در قرنیه، لیمبال و ملتجمه بیان می‌شود هرچند که بیان آن در ملتجمه کمتر از دو بافت دیگر است. بیان Pax6 در سلولهای کشت شده بطور معنی داری بالاتر از نمونه‌های Invivo بود. همچنین بیان آن در کشتهای طولانی مدت افزایش می‌یافتد. به نظر می‌رسد که افزایش بیان در سلولهای کشت شده یا در کشتهای طولانی مدت نشان‌دهنده از نقش ویژه این ژن در صحت تمایز و یا حفظ خصوصیات سلولهای اپیتیلیال کشت شده باشد. در یک مطالعه نشان داده شد که در موشهای هتروژن -/+ Pax6+/+ در مقایسه با نوع وحشی آن +/+ Pax6-/- تشكیل کلونیهای LSC کمتر بوده و در تشکیل اپی تلیوم قرنیه دچار نقص می‌شوند [۳۶]. نیز از جمله ژنهایی است که در سلولهای بنیادی جنینی [۳۷] بیان می‌شود. همچنین بیان این ژن در برخی سلولهای سرطانی از جمله کارسینومای سلولهای اپیتیلیال نیز گزارش شده است [۳۸]. نتایج ما نیز نشان داد که این ژن در تمام بافت‌های مورد آزمایش و نیز سلولهای کشت شده بیان می‌گردد و در تمام مراحل هیچ تفاوت بینی این نمونه‌ها دیده نشد. به نظر می‌رسد که بیان این ژن در یک حد پایه در تمام بافت‌های چشمی وجود داشته باشد هرچند که مطالعه بیشتری در این زمینه مورد نیاز است.

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

سیتوکراتینهای K3/K12 از جمله شاخصهای اختصاصی سلولهای اپیتیلیال قرنیه و نه سلولهای لیمبال و ملتجمه ایی در نظر گرفته می‌شوند(۲۶-۲۸). نتایج ما کمی با نظریه فوق متفاوت بود بطوریکه نتایج RT-PCR در نمونه‌های in Vivo نشان داد، بافت لیمبال- K3+/K12-، قرنیه- K3- /K12+ و ملتجمه K3+/K12+ می‌باشند. در سلولهای کشت شده بیان K3 طی ۲۱ روز کشت مشاهده نگردید. این در حالی بود که بیان K12 از روز ۱۴ کشت نمایان گردید و بطور شاخصی در روز ۲۱ افزایش یافت. در این مطالعه از آتنی بادی AE5 که اختصاصی K3 بوده و با K12 نیز واکنش ضعیفی می‌دهد استفاده گردید. بدین ترتیب حضور سلولهای مثبت در ایمنوسیتوشیمی پس از ۱۴ و یا ۲۱ روز کشت و یا حضور باند ضعیف در ملتجمه ممکن است ناشی از حضور سلولهای K12 مثبت باشد. در حقیقت K12 شاخص تمایز سلولهای لیمبال به اپیتیلیال قرنیه می‌باشد(۲۹-۳۰). همراه با افزایش نسبی K3 در سلولهای کشت شده، افزایشی نیز در بیان کانکسین CX43(43) دیده می‌شد. از جمله پروتئینهای تشکیل دهنده اتصالات روزنۀ دار(Gap Junctions) می‌باشد و در کشتهای ۲۱ روزه در مقادیر کم ظاهر گردید. بنظر می‌رسد که عدم حضور CX43 در حفظ خاصیت بنیادی (Stemness) سلولهای لیمبال موثر باشد(۳۱). یکی از شاخصهای پیشنهادی

بین این سلولها و استرومای قرنیه وجود داشت به مرور شفاف تر شده است به طوری که پس از گذشت چند ماه دیگر قابل تشخیص نبود. همچنین مطالعات فراساختاری نشان داد که سلولهای کراتوستیت کاملاً از نظر ترشحی فعال بوده و نیز در زیر سلولهای اپیتلیال غشای پایه‌ای هرچند ناپیوسته تشکیل شده اند [۲۴].

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

## تقدیر و تشکر

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

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

در مطالعه استویبر (Stoiber) و همکاران که از پیوندهای اتوگرافت و آلوگرافت سلولهای بنیادی لیمال کشت شده روی پرده آمنیون برای ترمیم قرنیه بیماران استفاده کرده بودند مشاهده شد که بعد از حدود ۱۴ تا ۲۸ روز سطح قرنیه توسط سلولهای مشتق از لیمال پوشیده شده و پرده آمنیون نیز که در

## References

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

- 385-405.
5. **Davanger M, Evensen A.** Role of the pericorneal papillary **structure in renewal of corneal epithelium.** *Nature.* 1971; 19; 229(5286): 560-1.
  6. **Virender S.** Limbal stem cells in health and disease. *Biosci Report* 2001; 21
  7. **Daniels JT, Dart JK, Tuft SJ, Khaw PT.** Corneal stem cells in review. *Wound Repair Regen* 2001; 9: 483-494
  8. **Wolosin JM, Budak MT, Akinci MA.** Ocular surface epithelial and stem cell development. *Int J Dev Biol* 2004; 48: 981-91
  9. **Grueterich M, Tseng SC.** Human limbal progenitor cells expanded on intact amniotic membrane ex vivo. *Arch Ophthalmol* 2002; 120(6):783-90.
  10. **Puangsrirachern V Tseng SCG.** Cytologic Evidence of corneal disease with limbal stem cell deficiency. *ophthalmology* 1995; 102: 1476-85.
  11. **Ramaesh K, Dhillon B.** Ex vivo expansion of corneal limbal epithelial/stem cells for corneal surface reconstruction. *Europej ophthelol* 2003; 13: 515-24.
  12. **Chen J.J.Y, Tseng SCG.** Abnormal Corneal epithelial wound healing in partial thickness removal of epithelium . In vest ophthalmol vis sci 1991; 22: 19-33.
  13. **Espana EM, Prabhasawat P, Grueterich M, Solomon A, Tseng SC.** Amniotic membrane transplantation for reconstruction after excision of large ocular surface neoplasias. *Br J Ophthalmol* 2002; 86: 640-5.
  14. **Kozomi N, Inatomi T, Quantock AJ.** Amniotic membrane as a substrate for cultivating limbal corneal epithelial cells for autologous transplantation in rabbit. *Cornea* 2000; 19: L65-71.
  15. **Grueterich M, Tseng SC.** Human limbal progenitor cells expanded on intact amniotic membrane ex vivo. *Arch Ophthalmol* 2002; 120(6):783-90.
  16. **Kim JC, Tseng SCG.** Transplantation of preserved human amniotic membrane for surface reconstruction in severly damaged rabbit Corneas, *Cornea* 1995; 14: 473-84.
  17. **Tsubota K, Satake Y, Ohyama M.** Surgical reconstruction of ocular surface in advanced ocular Cicatricial pemphigoid and Stevens – Johnson syndrome. *AM J Ophthalmol* 1996; 122: 38-52.
  18. **Shimazaki J, Yang H-y, Tsubota K,** Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction in patients with chemical and thermal burns. *Ophthalmol* 1997; 104: 2068-76.
  19. **Tseng SCG, Prabhasaeat P, Bartan K.** Amniotic membrane transplantation without limbal allografts for corneal surface reconstruction in patients with limbal stem cell deficiency . *Arch Ophthalmol* 1998; 116: 431-10.
  20. **Li DQ, Chen Z, Song XJ, De Paiva CS, Kim HS, Pflugfelder SC.** Partial enrichment of a population of human limbal epithelial cells with putative stem cell properties based on collagen type IV adhesiveness. *Exp Eye Res*

2005; 80: 581-90

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

- function, and corneal epithelial cell migration in the Pax6 (+/-) mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004; 45:1101-8.
37. **Baharvand H, Ashtiani SK, Taee A, Massumi M, Valojerdi MR, Eftekhari P, et al.** Generation of new human embryonic stem cell lines with diploid and triploid karyotypes. *Dev Growth Differ* 2006; 48:117-28.
38. **Tai MH, Chang CC, Kiupel M, Webster JD, Olson LK, Trosko JE.** Oct4 expression in adult human stem cells: evidence in support of the stem cell theory of carcinogenesis. *Carcinogenesis* 2005; 26:495-502.