خون
فصلنامه پژوهشی
دوره ۱۲ شماره ۳ پاییز ۹۴ (۲۵۴-۲۴۴)

مقاله پژوهشی

# چگونگی تکوین سلول‌های شبکیه از طریق انتقال ژن *PAX6* به سلول‌های $CD133^+$ به دست آمده از بند ناف انسان

سحر بالاقلی[۱]، صدیقه امینی کافی‌آباد[۲]، زهرا سهیلا سهیلی[۳]، شهرام سمیعی[۴]، حمید احمدیه[۵]، مژگان رضایی کنوی[۶]، مهین نیکوگفتار ظریف[۷]، نارسیس دفتریان[۶]

## چکیده

### سابقه و هدف

سلول‌های بنیادی $CD133^+$ بند ناف، زیر گروهی از سلول‌های خونساز را تشکیل می‌دهند. ثابت شده که این سلول‌ها از توانایی تمایز خوبی به سمت سلول‌های عصبی برخوردار هستند. ژن *PAX6* جزیی از خانواده چند ژنی *PAX* و از فاکتورهای رونویسی است. ژن *PAX6* ژن کنترل‌کننده اصلی تکامل چشم و اندام‌های حسی بافت‌های اپیدرمی و عصبی می‌باشد. هدف از این مطالعه، بررسی روند تمایزی سلول‌های $CD133^+$ به دست آمده از بند ناف که ژن *PAX6(5a)* به آن‌ها انتقال یافته است بود.

### مواد و روش‌ها

در یک مطالعه تجربی، ابتدا سلول‌های تک هسته‌ای خون بند ناف به وسیله فایکول جدا شدند، سپس سلول‌های $CD133^+$ موجود در آن با روش MACS جدا و در محیط کشت Stem Span کشت داده شدند. سپس به منظور ساخت ویروس، وکتور ناقل ژن *PAX6* و وکتورهای کمکی(pMD2G ، psPAX2) به سلول‌های HEK293T ترانسفکت شدند. پس از تغلیظ ویروس و تیتر کردن آن، سلول‌های $CD133^+$ با تیتر مطلوب ویروس آلوده شدند. سلول‌های حاوی ویروس مورد نظر، از نظر وجود پروتئین‌های PAX6 ، Rhodopsin ، Chx10 ، Thy1 و Nestin توسط روش ایمنوسایتوشیمی ارزیابی شدند.

### یافته‌ها

پس از دو هفته پروتئین‌های Thy-1 ، Chx10 ، Nestin و PAX6 در سلول‌های آلوده شده بیان شدند. هم چنین بیان مارکرهای Rhodopsin و Nestin در سلول‌های کنترل مشاهده شد.

### نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این مطالعه بیانگر تمایز سلول‌های $CD133^+$ به سلول‌های پروژنیتوری عصبی و سلول‌های شبه عصبی شبکیه از جمله سلول‌های گانگلیونی می‌باشد.

**کلمات کلیدی:** پروتئین PAX6 ، آنتی‌ژن CD133 ، خون بند ناف

*تاریخ دریافت : ۹۳/ ۲/ ۶*
*تاریخ پذیرش : ۹۳/۱۲/۹*

۱- کارشناس ارشد خون‌شناسی ـ مرکز تحقیقات انتقال خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون و پایگاه منطقه‌ای آموزشی انتقال خون تهران ـ تهران ـ ایران
۲- مؤلف مسئول: متخصص آسیب‌شناسی بالینی و تشریحی ـ دانشیار مرکز تحقیقات انتقال خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران ـ صندوق پستی: ۱۱۵۷-۱۴۶۶۵
۳- PhD بیوشیمی ـ استادیار پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و تکنولوژی زیستی ـ تهران ـ ایران
۴- کارشناس ارشد بیوشیمی ـ مربی مرکز تحقیقات انتقال خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران
۵- فوق تخصص شبکیه ـ استاد مرکز تحقیقات چشم دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی ـ تهران ـ ایران
۶- فوق تخصص شبکیه ـ دانشیار مرکز تحقیقات چشم دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی ـ تهران ـ ایران
۷- PhD هماتولوژی و بانک خون ـ مرکز تحقیقات انتقال خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران



[ Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-09-13 ]

## مقدمه

امروزه با وجود پیشرفت‌های حاصل شده در علم چشم پزشکی، هنوز بیماری‌های ناشی از تخریب سلول‌های شبکیه به جهت ایجاد نابینایی برگشت ناپذیر، بزرگترین دغدغه چشم پزشکان محسوب می‌شود. از میان این بیماری‌ها، تخریب ماکولا وابسته به سن(Age = AMD related macular degeneration) که شایع‌ترین عامل نابینایی در بیماران بالای ۶۰ سال است و هم چنین رتینیت پیگمنتوزا (Retinit pigmentoza = RP) که شایع‌ترین بیماری دژنراتیو وراثتی در شبکیه است، را می‌توان نام برد. لازم به ذکر است که در هر دو مورد سلول‌های Retinal Pigment Epithelium (RPE)، فتورسپتورهای مخروطی(Cone photoreceptor) و فتورسپتور استوانه‌ای (Rod photoreceptor) تخریب می‌شوند(۱). متاسفانه درمان‌های کنونی تنها توانسته‌اند سیر پیشرفت بیماری را کند کنند، بدیهی است که این گونه درمان‌ها برای مراحل پیشرفته بیماری کارآیی ندارد. به همین دلیل امروزه توجه محققان به درمان‌های ترمیمی و جایگزینی سلول‌های شبکیه معطوف شده است، در میان این درمان‌ها، روش‌های استفاده از سلول‌های بنیادی بسیار مورد توجه قرار گرفته است(۳، ۲).

از زمانی که کارآیی استفاده از خون بند ناف در درمان بیماری‌های خونی اثبات شد، فکر ایجاد بانک خون‌های بند ناف شکل گرفت. با ایجاد تشکیلات و برقراری استانداردهای جهانی، محققان به گام‌های بلندتری می‌اندیشند که یکی از آن‌ها دسترسی به سلول‌های سایر بافت‌ها از طریق تمایز سلول‌های موجود در بند ناف است. امروزه ثابت شده سلول‌های موجود در بند ناف به جهت اولیه‌تر بودن نسبت به سلول‌های بنیادی به دست آمده از بالغین، پتانسیل دگر تمایزی خوبی دارند(۶-۴). در این مطالعه سلول‌های بنیادی $CD133^+$ موجود در خون بند ناف انسان، به عنوان منبعی جهت دستیابی به انواع سلول‌های شبکیه مورد بررسی قرار گرفته است.

با توجه به آن که تمایز سلول بنیادی به تعادل حساسی بین فاکتورهای داخلی و خارجی نیاز دارد، در این مطالعه با القای بیان ژن *PAX6* در سلول‌های بنیادی خونساز $CD133^+$ به دست آمده از بندناف علاوه بر اثر محیط، تاثیر این ژن نیز به عنوان یک فاکتور داخلی اثرگذار بررسی شد.

ژن *PAX6* جزیی از خانواده چند ژنی *PAX* و از فاکتورهای رونویسی است. پروتئین‌های حاصل از این خانواده در تکامل اولیه جانوران و برای اختصاصی شدن بعضی بافت‌های خاص ضروری هستند. از میان ژن‌های این خانواده ژن *PAX6* به عنوان ژن کنترل‌کننده برای تکامل چشم و اندام‌های حسی بافت‌های اپیدرمی و عصبی خاص که همگی منشاء اکتودرمی دارند، محسوب می‌شود(۸، ۷).

ژن *PAX6* ژن کنترل‌کننده در تکوین چشم بوده و در تشکیل عدسی، عنبیه، شبکیه و قرنیه نقش اساسی دارد(۱۰، ۹). شواهدی وجود دارد که نشان می‌دهد *PAX6* در بافت‌های آسیب‌دیده چشم بیان می‌شود تا به ترمیم این بافت‌ها کمک کند. هم چنین دیده شده تنظیم مصنوعی بیان *PAX6* می‌تواند منجر به القای بازسازی بافت آسیب دیده چشم شود(۸، ۷). ژن *PAX6* دارای دو ایزوفرم می‌باشد که در این مطالعه از ایزوفرم *PAX6(5a)* استفاده شده است. این ایزوفرم دارای ۱۴ آمینو اسید اضافی نسبت به ایزوفرم دیگر این ژن *PAX(5b)* می‌باشد که توسط اگزون 5a کد می‌شود و به نظر می‌رسد نقش مؤثرتری در تکوین سلول‌های چشم بازی می‌کند(۱۱).

هدف این طرح بررسی اثر ژن *PAX6(5a)* بر سلول‌های خونساز $CD133^+$ به دست آمده از خون بند ناف انسان بود. سلول‌های $CD133^+$ به علت پتانسیل بالایی که در تمایز به سلول‌های بافت‌های مختلف از جمله سلول‌های عصبی داشته‌اند، بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند.

هم چنین در مطالعه‌ها دیده شده که سلول‌های $CD133^+$ به دست آمده از مغز استخوان به تعمیر RPE کمک می‌کنند و در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۷ بر روی خون بند ناف انجام شد، مشاهده گردید که سلول‌های رده منفی (Negative Lineage) موجود در بند ناف در *in vivo* به سلول‌های عصبی شبکیه متمایز می‌شوند(۱۲). ژن *PAX6(5a)* به واسطه وکتور(لنتی ویروس) به این سلول‌ها منتقل شده سپس مسیرهای تمایزی سلول مورد بررسی قرار می‌گیرد.



[ Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-09-13 ]

## مواد و روش‌ها

*جداسازی سلول‌های $CD133^+$ از خون بند ناف:*

در یک مطالعه تجربی برای جداسازی سلول‌های تک هسته‌ای، نمونه خون بند ناف که حجمی حدود ۱۵۰ میلی‌لیتر دارد با نسبت یک به یک با بافر هنکس رقیق و با نسبتی حدود یک به دو تا یک به سه(فایکول: خون بند ناف) روی فایکول برده شد. برای این کار از محلول فایکول با دانسیته ۰۷۷/۱ استفاده شد.

بدین ترتیب که از محلول فایکول مقدار ۳ تا ۴ میلی‌لیتر در یک لوله فالکون ۱۵ میلی‌لیتری ریخته، سپس سوسپانسیون سلولی را آرام به آن اضافه نموده و به مدت ۴۰ دقیقه با دور g ۴۰۰ سانتریفوژ می‌شود. بعد از این که زمان سانتریفوژ پایان یافت، محتویات لوله فالکون به ۴ قسمت مجزا از هم تقسیم می‌شود که از پایین به بالا عبارتند از: ۱- گلبول‌های قرمز ۲- فایکول ۳- لایه سلول‌های تک هسته‌ای ۴- پلاسما با برداشت لایه سلول‌های تک هسته‌ای. سلول‌ها به حالت سوسپانسیون در آورده شده و از نمونه خون بند ناف جدا شدند. در مرحله بعد ۲۰۰ لاندا محلول بلوکه کننده به سلول‌ها اضافه شد، ۵ دقیقه بعد ۲۰۰ لاندا $CD133^+$ microbead Ab به لوله اضافه شد و به مدت یک ساعت در ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس سوسپانسیون سلولی به ستون(MACS = Magnetic activated cell sorting) منتقل شد. در مرحله بعد ستون از دستگاه جدا شده و محتویات آن به یک لوله فالکون منتقل شد سپس لوله فالکون سانتریفوژ شد و سلول‌های حاصل در محیط مخصوص Stem Span و حاوی ۴۰ ng TPO + ۵۰ ng FLT3 + ۵۰ ng SCF کشت داده شدند. در نهایت جهت ارزیابی درجه خلوص سلول‌های $CD133^+$ جدا شده، فلوسایتومتری با استفاده از آنتی‌بادی‌های آنتی CD34 و آنتی CD133 انجام شد.

*انتقال سازه نوترکیب لنتی -PAX6 و پلاسمیدهای کدکننده پروتئین‌های پوششی و ساختاری ویروس به سلول‌های $T$ ۲۹۳:*

تقریباً حدود۲۴ ساعت پیش از آلوده‌سازی(Transfection)، سلول‌های T ۲۹۳ کشت شبانه داده شدند تا به تراکم سطحی ۷۰٪ برسند. آلوده‌سازی هم‌زمان پلاسمید نوترکیب لنتی -PAX6 ، پلاسمید PMD2 (کد کننده پروتئین‌های پوششی) و پلاسمید PAX2 (کد کننده پروتئین‌های ساختاری gag و pol) توسط روش کلسیم فسفات انجام شد. محیط کشت پس از ۱۲ ساعت تعویض شد.

*تغلیظ ذرات ویروسی و تعیین تیتر ویروسی:*

پس از ۷۲ ساعت از جمع‌آوری محیط کشت، محیط رویی سلول‌ها که حاوی ویروس‌های تولید شده است، جمع‌آوری و سوسپانسیون ویروسی حاصل از دوره‌های مختلف کار با هم مخلوط شد. در مرحله بعد ۶۰۰۰ Peg (Polyethylene glycol) با غلظت نهایی ۸٪ به محلول اضافه شد. سپس محلول را به مدت ۱/۵ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده و بعد از این مدت محلول برای ۱۵ دقیقه در g ۷۰۰۰ سانتریفوژ شد. در نهایت به میزان ۰/۰۱ حجم اولیه PBS ۱ X اضافه و در ۷۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره شد. به منظور تعیین تیتر ویروس‌های تولید و تغلیظ شده، سلول‌های T ۲۹۳ با رقت‌های مختلف ویروس(از ۱/۲ تا ۱/۴۰۹۶) آلوده و پس از ۴۸ ساعت میزان بیان پروتئین گزارشگر GFP ( green fluorescent protein) توسط میکروسکوپ فلورسنت بررسی شد.

*آلوده‌سازی سلول‌های $CD133^+$ جهت بررسی‌های مورفولوژیکی:*

میزان ۴۰۰ میکرولیتر از تیتر مورد نظر ویروس در ۱ ویال حاوی محیط کشت Stem Span + ۵۰ ng SCF + ۵۰ ng Flt3 + ۴۰ ng TPO تهیه و تعداد ۵۰۰۰۰۰ سلول به آن اضافه شد، پس از یک ساعت انکوباسیون در انکوباتور $CO_2$ ، محتویات ویال‌ها به پلیت ۶ خانه‌ای منتقل شده و ۱۶۰۰ میکرولیتر محیط Stem Span به چاهک‌ها اضافه شد.

۱- میزان ۲۰۰ میکرولیتر از تیتر مورد نظر در ویال ۰/۵ و در محیط کشت Stem Span + ۵۰ ng SCF + ۵۰ ng Flt3 + ۴۰ ng TPO تهیه و تعداد ۱۰۰۰۰۰ سلول به آن اضافه شد. پس از یک ساعت انکوباسیون در انکوباتور $CO_2$ ، محتویات ویال‌ها به چاهک‌های پلیت ۲۴ خانه‌ای منتقل شده و ۸۰۰ میکرولیتر محیط Stem Span به چاهک‌ها



[ Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-09-13 ]

اضافه شد.

*تیمار سلول‌های ترانسداکت شده با آنتی‌بیوتیک پرومایسین:*

برای حذف سلول‌های ترانسداکت نشده، بعد از گذشت ۳ روز از ترانسداکشن یک بار محیط سلول‌ها تعویض شد (روز سوم). روز بعد(روز چهارم) سلول‌های ترانسداکت شده به مدت ۶ روز در مجاورت آنتی‌بیوتیک پرومایسین با غلظت ۰/۴ µg/mL قرار گرفتند.

*آزمایش ایمنوسیتوشیمی:*

این آزمایش در چاهک‌های پلیت ۲۴ خانه‌ای انجام شد به این ترتیب که:

تعداد ۵۰۰۰۰ سلول در هر چاهک ریخته شد. روز بعد محیط رویی چاهک‌ها تخلیه شده و هر چاهک با ۵۰۰ میکرولیتر PBS شستشو داده شد.

سلول‌های موجود در هر چاهک با متانول به مدت ۵ دقیقه تثبیت شدند. میزان ۵۰۰ میکرولیتر از محلول(۱٪ PBS – blocking TritonX100/BSA) به هر چاهک اضافه شد و ۲۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. بعد از تخلیه محلول blocking آنتی‌بادی اولیه(بر علیه مارکرهای اختصاصی سلولی از قبیل: Rabbit AntiThy1 IgG ، Rabbit AntiRhodopsin IgG ، Rabbit AntiCHX10 IgG ، Gout Rabbit AntiNestin IgG ، Anti Pax6 IgG) به هر چاهک به جز چاهک کنترل اضافه شد و پلیت یک شب در ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد.

روز بعد آنتی‌بادی اولیه تخلیه و هر چاهک سه بار و هر بار به مدت ۳ دقیقه با PBS شستشو داده شد. آنتی‌بادی ثانویه(بر علیه Fc آنتی‌بادی اولیه از قبیل: Gout Anti Rabbit antibody ، Donkey Anti gout Antibody) که کونژوگه به FITC (Fluorescein Isothiocyanat) می‌باشد، به همه چاهک‌ها از جمله چاهک کنترل اضافه و به مدت ۴۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد.

نکته آن که برای جلوگیری از خنثی‌شدن FITC در مقابل نور، پلیت در فویل پیچیده شد. بعد از این زمان آنتی‌بادی ثانویه تخلیه و هر چاهک سه بار و هر بار به مدت ۱ دقیقه با PBS شستشو داده شد. در این زمان DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindole) و mounting media (رنگ زمینه) اضافه شد و بعد از ۵ دقیقه چاهک‌ها با میکروسکوپ فلورسانس از نظر بیان مورد بررسی قرار داده شدند.

## یافته‌ها

*بررسی خصوصیات مورفولوژیکی رده سلولی $CD133^+$ توسط مشاهدات میکروسکوپی با میکروسکوپ معکوس:*

پس از جداسازی و کشت سلول‌های $CD133^+$ در محیط کشت اختصاصی Stem Span ، این سلول‌ها از نظر مورفولوژی بررسی شدند. مشخص شد که تعدادی از سلول‌های $CD133^+$ در محیط کشت به صورت سلول‌های گرد غیر چسبنده و تعدادی دارای زوائد کوچک و نیمه چسبنده هستند که به مرور زمان تعداد این سلول‌های نیمه چسبنده زائده‌دار افزایش می‌یابد(شکل ۱).

*تایید حضور مارکرهای سطحی اختصاصی سلول‌های بنیادی $CD133^+$ با استفاده از آنتی‌بادی اختصاصی و دستگاه فلوسایتومتری:*

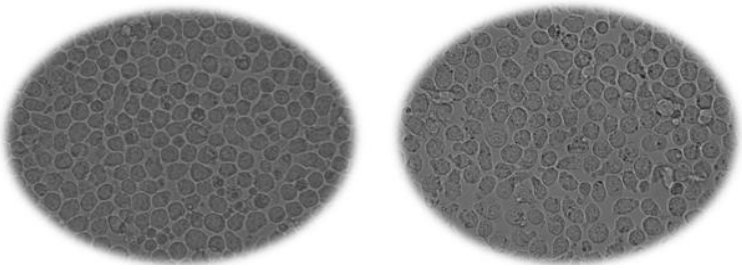
پس از مشاهدات میکروسکوپی، این سلول‌ها از نظر بیان مارکر $CD133^+$ و $CD34^+$ مورد بررسی قرار گرفت. حضور ۹۰٪ مارکر CD133 و ۹۵٪ مارکر CD34 تاییدکننده سلول‌های $CD133^+$ می‌باشد.

*تعیین تیتر لنتی ویروس حاوی GFP با استفاده از سلول HEK293T :*

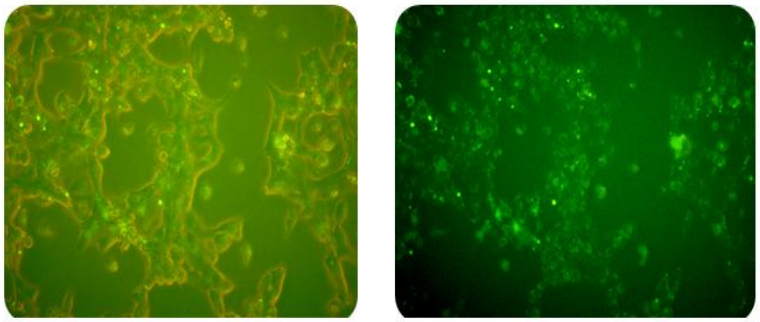
بعد از مجاورت سلول‌های $CD133^+$ با رقت‌های مختلف ویروس طبق آن چه که توضیح داده شد، این سلول‌ها ۳ روز بعد از ترانسداکشن از نظر بیان GFP در رقت‌های مختلف مورد ارزیابی قرار گرفتند و مشاهده شد که در رقت ۱/۲ ، سلول‌ها تحت تاثیر غلظت بالای ویروس آسیب دیده بودند. در رقت ۱/۴ نیز سلول‌ها تا حدودی آسیب دیده بودند. رقت ۱/۸ بهترین کارآیی ویروس و کمترین آسیب را به همراه داشت گر چه در رقت‌های بالاتر ۱/۱۶ تا ۱/۶۴ بیان GFP وجود داشت ولی بالاترین کارآیی در رقت ۱/۸ مشاهده شد(شکل ۲).



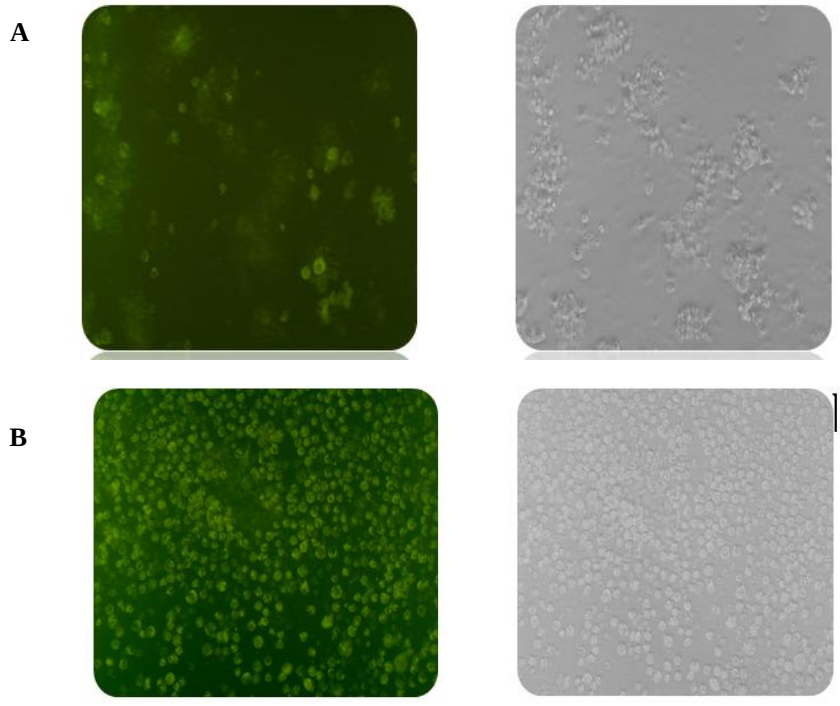
[ Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-09-13 ]



**شکل ۱: سلول‌های $CD133^+$ جدا شده از بند ناف ۲ روز بعد از جداسازی نشان‌دهنده جمعیتی از سلول‌های غیر چسبنده و نیمه چسبنده می‌باشد. (بزرگ‌نمایی X ۴۰۰)**



**شکل ۲: سلول‌های HEK293T ۳ روز بعد از مجاور شدن با رقت ۱/۸ ویروس نشان‌دهنده بالاترین میزان بیان GFP و کمترین آسیب سلولی می‌باشد(بزرگ نمایی X ۲۰۰)**




**شکل ۳: تصویر A: سلول‌های $CD133^+$ ۳ روز بعد از مجاورت با رقت ۱/۴ لنتی ویروس حاوی GFP نشان‌دهنده بیان GFP و آسیب در اثر دوز بالای ویروس می‌باشد تصویر B: سلول‌های $CD133^+$ ۳ روز بعد از مجاورت با رقت ۱/۸ لنتی ویروس حاویGFP نشان‌دهنده بالاترین میزان بیان GFP و کمترین آسیب سلولی می‌باشد(بزرگ نمایی X ۲۰۰)**



[ Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-09-13 ]

*تعیین تیتر لنتی ویروس حاوی GFP با استفاده از سلول HEK293T:*

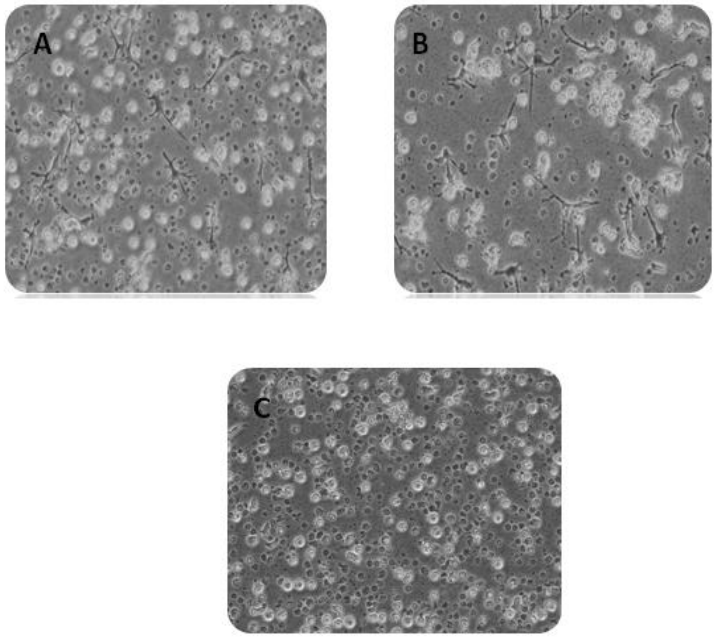
بعد از مجاورت سلول‌های $CD133^+$ با رقت‌های مختلف ویروس طبق آن چه که توضیح داده شد، این سلول‌ها ۳ روز بعد از ترانسداکشن از نظر بیان GFP در رقت‌های مختلف مورد ارزیابی قرار گرفتند و مشاهده شد که در رقت ۱/۲ ، سلول‌ها تحت تاثیر غلظت بالای ویروس آسیب دیده بودند. در رقت ۱/۴ نیز سلول‌ها تا حدودی آسیب دیده بودند. رقت ۱/۸ بهترین کارآیی ویروس و کمترین آسیب را به همراه داشت گر چه در رقت‌های بالاتر از ۱/۱۶ تا ۱/۶۴ بیان GFP وجود داشت ولی بالاترین کارآیی در رقت ۱/۸ مشاهده شد(شکل ۲).

*تایید تیتر لنتی ویروس GFP دار با استفاده از سلول‌های هدف:*

بعد از به دست آوردن تیتر مطلوب ویروس GFP دار با استفاده از سلول‌های HEK293T برای اثبات کارآیی این رقت بر سلول‌های هدف، این سلول‌ها با رقت مطلوب ویروس GFP دار(۱/۸) و دو رقت بالا و پایین‌تر از آن (۱/۱۶ ، ۱/۴) مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج نشان‌دهنده کارآیی مطلوب در رقت ۱/۸ بود. ضمن آن که در رقت‌های ۱/۱۶ و ۱/۴ نیز بیان GFP مشاهده می‌شد ولی در رقت ۱/۴ سلول‌ها تا حد زیادی تحت تاثیر ویروس آسیب‌دیده بودند و GFP در رقت ۱/۱۶ بسیار ضعیف بیان شده بود(شکل ۳).

*بررسی تغییرات مورفولوژیکی بعد از ترانسداکت سلول‌های $CD133^+$ با رقت ۱/۸ ویروس حاوی ژن PAX6:*

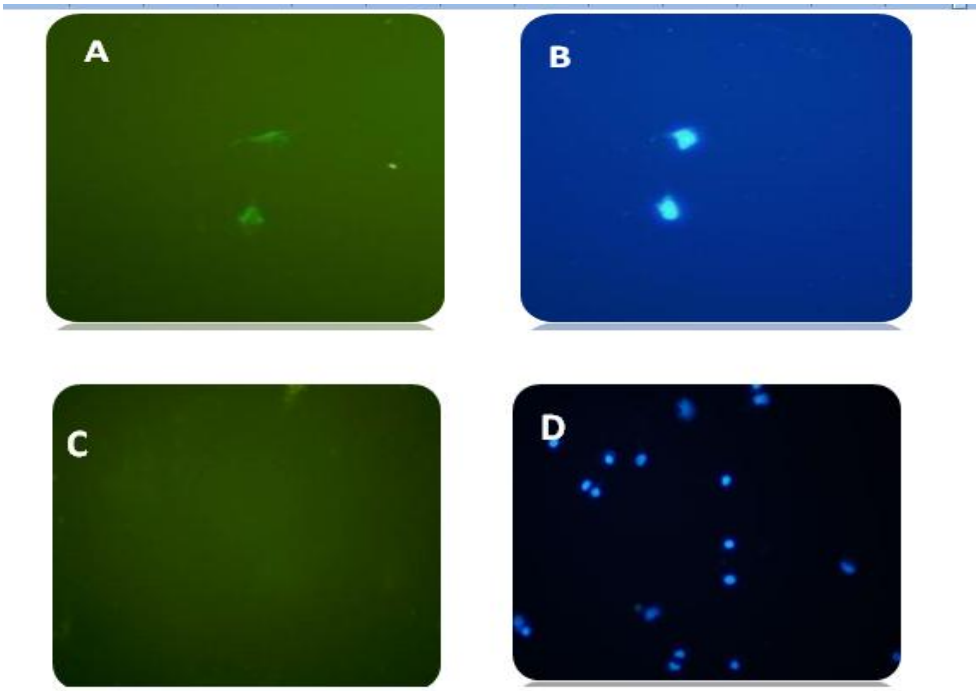
سلول‌های $CD133^+$ در مجاورت تیتر مورد نظر ویروس حاوی ژن *PAX6* قرار داده شد. بعد از آن هر ۲۴ ساعت تغییرات بررسی و ثبت گردید. نتایج نشان‌دهنده ایجاد تغییرات مورفولوژیکی از ۴۸ ساعت بعد از آلوده‌سازی بود. ۲ روز پس از آلوده‌سازی، سلول‌های $CD133^+$ زوائد مویی شکلی که از یک قطب سلول کشیده می‌شد در آوردند. روز سوم سلول‌های تعویض محیط شده و از روز چهارم این سلول‌ها در مجاورت پرومایسین قرار داده شدند. همان طور که مشاهده می‌شود، پس از سه روز مجاورت با پرومایسین سلول‌های آلوده شده قابل افتراق از سلول‌های آلوده نشده (درحال مرگ) هستند(شکل ۴).



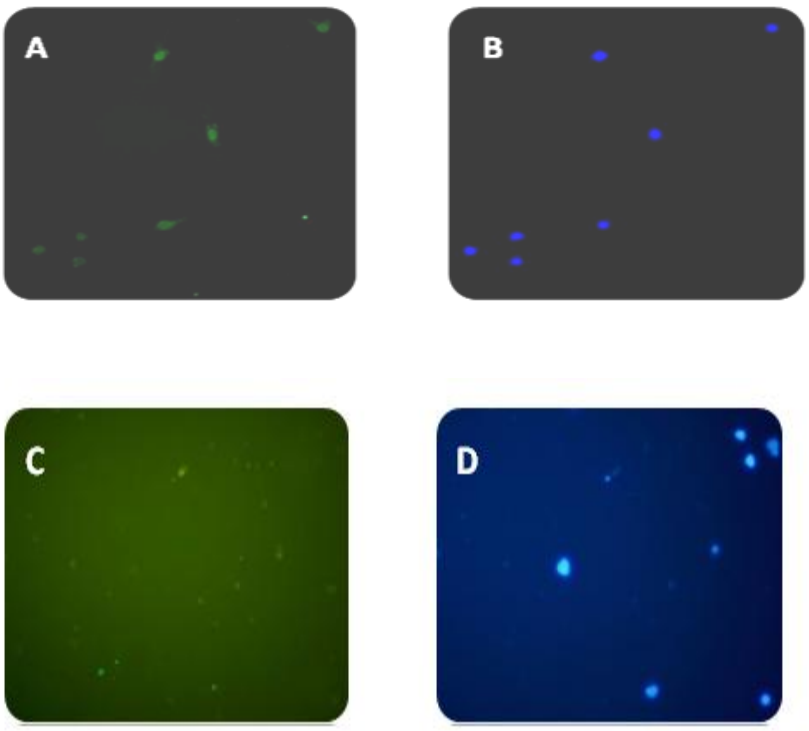

**شکل ۴: سلول‌های $CD133^+$ ۱۴ روز پس از آلوده‌سازی با ویروس حاوی ژن *PAX6* و ۷ روز پس از مجاورت با آنتی‌بیوتیک پرومایسین(A,B) کنترل ۷ روز پس از مجاورت با آنتی‌بیوتک پرومایسین(C)**



[ Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-09-13 ]




**شکل۵: سلول‌های آلوده شده با ویروس حاوی ژن *PAX6* پروتئین Chx10 را به صورت هسته‌ای(irregular) بیان می‌کنند(B:DAPI)،(A:FITC)، کنترل (C,D)(بزرگ‌نمایی ۲۰۰X)**




**شکل ۶: سلول‌های آلوده شده با ویروس حاوی ژن *PAX6* پروتئین PAX6 را به صورت هسته‌ای بیان می‌کنند(A:FITC) (B:DAPI)، کنترل (C,D) (بزرگ نمایی ۲۰۰ X)**



[ Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-09-13 ]

*ارزیابی بیان پروتئین‌های Chx10 ، Thy-1 ، Nestin ، Rhodopsin ، PAX6 در سلول‌های آلوده شده با ویروس حاوی ژن PAX6 با استفاده از آزمایش ایمنوسیتوشیمی (ICC):*

جهت ارزیابی بیان پروتئین‌های Chx10 ، Thy-1 ، Nestin ، Rhodopsin ، PAX6 در سلول‌های آلوده شده با ویروس حاوی ژن *PAX6* ، این سلول‌ها ۶ روز پس از مجاورت با پرومایسین تثبیت شده و با استفاده از آزمایش ICC مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج نشان‌دهنده بیان پروتئین‌های Chx10 ، PAX6 و Ty-1 در گروه آزمون و بیان پروتئین‌های Rhodopsin و Nestin هم در گروه آزمون و هم در گروه شاهد بود(شکل‌های ۵ و ۶).

## بحث

همان طور که در مقدمه عنوان شد، بیماری‌هایی از قبیل ماکولای وابسته به جنس(AMD)، رتینیت پیگمنتوزا و گلوکوما که همگی شبکیه چشم را درگیر می‌کنند، علل شایع نابینایی در دنیا هستند و درمان‌های مربوط به این بیماری‌ها تنها سیر صعودی آن‌ها را کند می‌کند. از این رو امروزه جهت درمان قطعی این بیماری‌ها محققان به روش‌های سلول درمانی متوسل شده‌اند. پیرو این هدف در این تحقیق سلول‌های $CD133^+$ به دست آمده از بند ناف به دلیل ظرفیت بالا برای تمایز به سلول‌های عصبی انتخاب شده و ژن *PAX6(5a)* که ژن اصلی کنترل کننده تکوین چشم می‌باشد به این سلول‌ها با استفاده از وکتور لنتی ویروس منتقل شد.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که القای ژن *PAX6* به سلول‌های بنیادی $CD133^+$ به دست آمده از بند ناف، باعث القای تمایز به سمت سلول‌های شبه عصبی شبکیه می‌شود.

بیان مارکرهای اختصاصی سلول‌های شبکیه نظیر Thy-1 (به عنوان مارکر اختصاصی سلول‌های گانگلیونی)، Chx10 (به عنوان مارکر اختصاصی سلول‌های دو قطبی و سلول‌های پروژنیتوری شبکیه) و Rhodopsin (به عنوان مارکر اختصاصی سلول‌های فتورسپتوری)، بیانگر وجود جمعیتی هتروژن از سلول‌های عصبی شبکیه می‌باشد(۱۴، ۱۳). هم چنین بیان مارکرهای پروژنیتوری عصبی نظیر Chx10 و Nestin و PAX6 می‌تواند بیانگر وجود جمعیت‌های پروژنیتوری عصبی نیز باشد. با توجه به قابلیت تکثیر بیشتر این نوع سلول‌های پروژنیتوری در مقایسه با سلول‌های سوماتیک نظیر فیبروبلاست که در مطالعه‌های دیگر از نظر دگر تمایز به عصب مورد بررسی قرار گرفته‌اند، این موضوع یک مزیت مهم به حساب می‌آید(۱۵). هم چنین قابلیت تمایز به سلول‌های عصبی با القای تنها یکی از ژن‌های کنترل کننده عصبی در مقایسه با نیاز به به کارگیری چندین فاکتور برای تمایز سلول‌های سوماتیک به سلول‌های عصبی، بیانگر قابلیت انعطاف‌پذیری بیشتر سلول‌های بنیادی در مقایسه با سلول‌های سوماتیک مطالعه شده می‌باشد(۱۶).

اگر چه ژن *PAX6* در تمام سلول‌های Optic Cup شبکیه بیان می‌شود، ولی بیان پایدار این ژن در سلول‌های گانگلیونی و آماکراین مشاهده می‌شود(۱۷). هم چنین مشاهده شده که کاهش بیان *PAX6* با کاهش سلول‌های گانگلیونی و افزایش سلول‌های فتورسپتوری استوانه‌ای همراه است(۱۱). این موارد به همراه بیان واضح Thy-1 در نمونه‌های آزمایش و عدم بیان آن در نمونه‌های کنترل، احتمالاً بیانگر تمایز به سمت سلول‌های شبه گانگلیونی می‌باشد. گرچه بیان Nestin در سلول‌های پروژنیتوری شبکیه و هم چنین سلول‌های گانگلیونی قابل مشاهده است و بدین ترتیب نقض‌کننده نتایج حاصل نمی‌باشد ولی بیان این مارکر در سلول‌های کنترل بیانگر عدم اختصاصیت آن و بیشتر تاییدکننده پتانسیل سلول‌های $CD133^+$ به تمایز به سمت سلول‌های با ماهیت پروژنیتوری عصبی می‌باشد(۱۹، ۱۸). بیان رودوپسین به عنوان مارکر اختصاصی سلول‌های فتورسپتوری هم در سلول‌های کنترل و هم سلول‌های تمایز یافته ممکن است نشان گر تمایز خودبه‌خودی سلول‌های $CD133^+$ آلوده نشده به سمت سلول‌های فتورسپتوری باشد زیرا مشخص شده که بیان PAX6 با کاهش تمایز به سلول‌های فتورسپتوری همراه است(۱۱). PAX6 به موازات Chx10 در سلول‌های پروژنیتوری عصبی شبکیه بیان می‌شود و مشخص شده که ژن *PAX6* اثر تنظیمی بر بیان این ژن دارد(۱۷). هر چند Chx10 اختصاصی سلول‌های دو قطبی نیز می‌باشد ولی در این جا



[ Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-09-13 ]

احتمالاً بیان Chx10 به موازات PAX6 در نمونه‌های آزمایش و عدم بیان آن در نمونه‌های کنترل تاییدکننده وجود سلول‌های پروژنیتوری عصبی شبکیه است، به این علت که بیان پایدار PAX6 همان طور که ذکر شد با افزایش تمایز به سلول‌های گانگلیونی و آماکراین و کاهش تمایز به سمت سلول‌های دو قطبی و فتورسپتوری همراه است(۱۱).

نتایج مطالعه حاضر در راستای مطالعه صورت گرفته در سال ۲۰۱۲ که توسط جیورگتی و همکارانش انجام گرفت می‌باشد در این مطالعه آن‌ها نشان دادند که القای SOX-2 به سلول‌های بنیادی $CD133^+$ با از دست دادن ماهیت خونسازی و تبدیل به سلول‌های شبه عصبی همراه است(۲۰). ژانگ و همکارانش نیز در مطالعه‌ای نشان دادند که تیمار سلول‌های $CD133^+$ با رتینوئیک اسید منجر به تمایز این سلول‌ها به سمت سلول‌های شبه عصبی، سلول‌های آستروسیتی و الیگودندروسیت می‌شود(۲۱). در مطالعه‌ای دیگر که توسط فقیهی و همکارانش در سال ۲۰۰۸ انجام شد، مشخص شد که تیمار سلول‌های $CD133^+$ با staurosporine (STS) باعث تمایز آن‌ها به سلول‌های شبه عصبی و آستروسیت می‌شود(۶). اسلووینسکا و همکارانش نیز در مطالعه‌ای با مجاورت سلول‌های $CD133^+$ و $CD133^-$ به دست آمده از بند ناف با فاکتورهای رشدی نظیر EGF, bFGF و سپس جایگزین کردن آن با FBS نشان دادند که بین دو جمعیت سلول‌های $CD133^-$ و $CD133^+$ از نظر بیان مارکرهای عصبی اختلاف معناداری وجود دارد که نشان‌دهنده پتانسیل بیشتر سلول‌های $CD133^+$ به سمت تمایز به سلول‌های شبه عصبی می‌باشد(۲۲). زانگیاکومی و همکاران نیز در مطالعه‌ای به نقش مؤثر جمعیت $CD34^-$ بند ناف بر تمایز سلول‌های $CD133^+$ به سمت سلول‌های شبه عصبی پی بردند(۲۳). با توجه به مطالعه‌های ذکر شده نتایج مطالعه حاضر نیز تایید کننده پتانسیل سلول‌های $CD133^+$ جهت تمایز به سمت سلول‌های پروژنیتوری عصبی و شبه عصبی می‌باشد.

این مطالعه هم چنین با مطالعه‌های صورت گرفته که اثر ژن *PAX6* را بر سلول‌های مختلف ارزیابی می‌کنند هم‌خوانی دارد. از جمله این مطالعه‌ها می‌توان به موارد زیر اشاره کرد:

در مطالعه‌ای که نوریوکی آزوما و همکارانش در سال ۲۰۰۵ انجام دادند مشخص شد که با انتقال ژن *PAX6* به سلول‌های اپیتلیوم پیگمانته شبکیه(RPE)، این سلول‌ها دچار دگر تمایزی شده و خصوصیات سلول‌های عصبی شبکیه را به دست می‌آورند(۲۴) .

در مطالعه‌ای دیگر لاتی‌تیا کارتیر و همکارانش نشان دادند که آلوده‌سازی سلول‌های Hela با لنتی ویروس حاوی ژن *PAX6* ، منجر به بیان آلفا ۳ توبولین عصبی و در نتیجه تغییرات مورفولوژیکی عصبی می‌شود. این مطالعه از نظر تغییرات مورفولوژیکی اعمال شده توسط ژن *PAX6* با مطالعه حاضر قابل مقایسه است(۲۵).

## نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این مطالعه بیانگر تمایز سلول‌های $CD133^+$ با استفاده از تلقیح ژن *PAX6* به این سلول‌ها به سمت سلول‌های پروژنیتوری عصبی با در نظر گرفتن بیان مارکرهای پروژنیتوری از قبیل Chx10 ، Nestin و PAX6 و هم چنین تمایز به سمت سلول‌های شبه گانگلیونی با در نظر گرفتن تغییرات مورفولوژیکی و بیان مارکرهای اختصاصی گانگلیون نظیر Thy-1 و PAX6 می باشد. جهت تایید قطعی‌تر بیان این مارکرها بهتر است که در مطالعه‌های بعدی بیان این مارکرهای مذکور به صورت مولکولی نیز بررسی شود.

## تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه کارشناسی ارشد مصوب مرکز تحقیقات انتقال خون، مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون می‌باشد که با حمایت مرکز تحقیقات چشم دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی انجام شده است.



[ Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-09-13 ]

## References:


1- Vugler AA. Progress toward the maintenance and repair of degenerating retinal circuitry. Retina 2010; 30(7): 983-1001.
2- 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(Pt 17): 3169-79.
3- Zhao X, Liu J, Ahmad I. Differentiation of embryonic stem cells into retinal neurons. Biochem Biophys Res Commu 2002; 297(2): 177-84.
4- Cui YX, Kafienah W, Suleiman MS, Ascione R. A new methodological sequence to expand and transdifferentiate human umbilical cord blood derived $CD133^+$ cells into a cardiomyocyte-like phenotype. Stem Cell Rev 2013; 9(3): 350-9.
5- Paspala SA, Balaji AB, Nyamath P, Ahmed KS, Khan AA, Khaja MN, *et al*. Neural stem cells & supporting cells - The new therapeutic tools for the treatment of spinal cord injury. Indian J Med Res 2009; 130(4): 379-91.
6- Faghihi F, Mehranjani MS, Mehrjerdi NZ, Baharvand H. Effect of Staurosporine on Neural Differentiation of $CD133^+$ Umbilical Cord Blood Cells. Yakhteh Medical Journal 2008; 10(1): 33-40.
7- Murakami Y, Ogasawara M, Sugahara F, Hirano S, Satoh N, Kuratani S. Identification and expression of the lamprey *Pax6* gene: evolutionary origin of the segmented brain of vertebrates. Development 2001; 128(18): 3521-31.
8- Sansom SN, Griffiths DS, Faedo A, Kleinjan DJ, Ruan Y, Smith J, *et al*. The level of the transcription factor *Pax6* is essential for controlling the balance between neural stem cell self-renewal and neurogenesi PLoS Genet 2009; 5(6): e1000511.
9- Cvekl A, Yang Y, Chauhan BK, Cveklova K. Regulation of gene expression by *Pax6* in ocular cells: a case of tissue-preferred expression of crystallins in lens. Int J Dev Biol 2004; 48(8-9): 829-44.
10- Azuma N, Tadokoro K, Asaka A, Yamada M, Yamaguchi Y, Handa H, *et al*. The *Pax6* isoform bearing an alternative spliced exon promotes the development of the neural retinal structure. Hum Mol Genet 2005; 14(6): 735-45.
11- Hsieh YW, Yang XJ. Dynamic *Pax6* expression during the neurogenic cell cycle influences proliferation and cell fate choices of retinal progenitors. Neural Dev 2009; 4(32): 1-19.
12- Koike-Kiriyama N, Adachi Y, Minamino K, Iwasaki M, Nakano K, Koike Y, *et al*. Human cord blood cells can differentiate into retinal nerve cells. Acta Neurobiol Exp (Wars) 2007; 67(4): 359-65.
13- Huang W, Fileta J, Guo Y, CL G. Downregulation of Thy1 in retinal ganglion cells in experimental glaucoma. Curr Eye Res 2006; 31(3): 265-71.
14- Burmeister M, Novak J, Liang MY, Basu S, Ploder L, Hawes NL, *et al*. Ocular retardation mouse caused by Chx10 homeobox null allele: impaired retinal progenitor proliferation and bipolar cell differentiation. Nat Genet 1996; 12(4): 376-84.
15- Qiang L, Fujita R, Yamashita T, Angulo S, Rhinn H, Rhee D, *et al*. Directed conversion of Alzheimer's disease patient skin fibroblasts into functional neurons. Cell 2011; 146(3): 359-71.
16- Han DW, Tapia N, Hermann A, Hemmer K, Höing S, Araúzo-Bravo MJ, *et al*. Direct reprogramming of fibroblasts into neural stem cells by defined factors. Sell Stem Cell 2012; 10(4): 465-72.
17- Nishina S, Kohsaka S, Yamaguchi Y, Handa H, Kawakami A, Fujisawa H, *et al*. *PAX6* expression in the developing human eye. Br J Ophthalmol 1999; 83(6): 723-7.
18- Qiu G, Seiler MJ, Thomas BB, Wu K, Radosevich M, Sadda SR. Revisiting nestin expression in retinal progenitor cells *in vitro* and after transplantation *in vivo*. Exp Eye Res 2007; 84(6): 1047-59.
19- Yang J, Bian W, Gao X, Chen L, Jing N. Nestin expression during mouse eye and lens development. Mech Dev 1999; 94(1-2): 287-91.
20- Giorgetti A, Marchetto MC, Li M, Yu D, Fazzina R, Mu Y, *et al*. Cord blood-derived neuronal cells by ectopic expression of Sox2 and c-Myc. Proc Natl Acad Sci U S A 2012; 109(31): 12556-61.
21- Jang YK, Park JJ, Lee MC, Yoon B, Yang YS, Yang SE, *et al*. Retinoic acid- mediated induction of neurons and glial cells from human umbilical cord blood-derived hematopoietic stem cells. J Neurosci Res 2003; 75(4): 573-84.
22- Slovinska L, Novotna I, Kubes M, Radonak J, Jergova S, Cigankova V, *et al*. Umbilical cord blood cells $CD133^+/CD133^-$ cultivation in neural proliferation media differentiates towards neural cell lineages. Arch Med Res 2011; 42(7): 555-62.
23- Zangiacomi V, Balon N, Maddens S, Lapierre V, Tiberghien P, Schlichter R, *et al*. Cord blood-derived neurons are originated from $CD133^+$/CD34 stem/progenitor cells in a cell-to-cell contact dependent manner. Stem Cells Dev 2008; 17(5): 1005-16.
24- Azuma N, Tadokoro K, Asaka A, Yamada M, Yamaguchi Y, Handa H, *et al*. Transdifferentiation of the retinal pigment epithelia to the neural retina by transfer of the *Pax6* transcriptional factor. Hum Mol Genet 2005; 14(8): 1059-68.
25- Cartier L, Laforge T, Feki A, Arnaudeau S, Dubois-Dauphin M, Krause KH. *Pax6*-induced alteration of cell fate: shape changes, expression of neuronal a tubulin, postmitotic phenotype, and cell migration. J Neurobiol 2006; 66(5): 421-36.


[ Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-09-13 ]

*Sci J Iran Blood Transfus Organ 2015; 12(3): 244-254*

***Original Article***

# Retinal cells development through transfection of CD133$^{+}$ HSC derived from human cord blood by *PAX6* master gene

***Balagholi S.[1,2], Amini Kafi-Abad S.[1], Soheili Z.S.[3], Samiee Sh.[1], Ahmadiyeh H.[4], Rezaie Kanavi M.[4], Nikougoftar Zarif M.[1,] Daftarian N.[4]***

*[1]Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine, Tehran, Iran*
*[2]Tehran Regional Educational Blood Transfusion Center, Tehran, Iran*
*[3]National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran*
*[4]Ophthalmic Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran*

## Abstract

***Background and Objectives***

Cord blood CD133$^{+}$ stem cells are highly proliferative primitive hematopoietic progenitors. These cells can also differentiate to other cells especially neural cells. The *PAX6* gene belongs to a family of genes that play a critical role in the formation of tissues and organs during embryonic development. The PAX6 protein is thought to activate genes involved in the formation of the eyes, brain and spinal cord (central nervous system), and the pancreas. The purpose of this study was to assess *PAX6 (5a)* gene transfer in cord blood CD133$^{+}$ stem cells and evaluate its effect on differentiation.

***Materials and Methods***

In this experimental study, cord blood stem cells were collected and mononuclear cells isolated by ficoll; then, CD133$^{+}$ cells were obtained using the CD133 MicroBead Kit in combination with the autoMACS Separator. These cells were cultured in Stem Span media. Next, HEK293T packaging cells were co-transfected with PLEX-MCS, PsPAX2, and pMD2G by calcium phosphate method. Lentiviral vectors were collected and concentrated. The appropriate amount of viruses was used to infect CD133$^{+}$ cells. The successful transduced cells were selected by puromycin resistance. After two weeks, the expression of Rhodopsin, CHX10, Thy1, Nestin, and PAX6 proteins was assessed by immunocytochemisrty method.

***Results***

Two weeks after infection, the expression of Rhodopsin, CHX10, Thy1, Nestin, and *PAX6* proteins were detected in treatment cells and the expression of Rhodopsin and Nestin in control cells.

***Conclusions***

The results showed CD133$^{+}$ cells differentiated into progenitor neural like cells and retinal neural like cells including ganglion like cells.

***Key words:*** PAX6 protein, CD133 antigen, Cord Blood

*Received: 26 Apr 2014*
*Accepted: 28 Feb 2015*

*Correspondence:* Amini Kafi-Abad S., MD. Pathologist. Associate Professor of Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine.
P.O.Box: 14665-1157, Tehran, Iran. Tel: (+9821) 88601558; Fax: (+9821) 88601542
E-mail: *s.amini@ibto.ir*



[ Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-09-13 ]