بسم الله الرحمن الرحيم

وزارت علوم، تحقیقات و فناوری
پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری

پایان نامه کارشناسی ارشد
رشته زیست شناسی سلولی و مولکولی

بررسی اثر پلیمر polyHEMA به عنوان بستر کشت سلولی بر روی مورفولوژی ، رشد و تمایز سلول های پوششی رنگدانه دار شبکیه انسان (RPE)

نگارش
فاطمه ناظم رعایا

استاد راهنما
دکتر زهرا-سهیلا سهیلی
دکتر عبدالخالق دیزجی

استاد مشاور
دکتر شهرام سمیعی

بهمن ۹۰

"حق استفاده از مفاد پایان نامه برای پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری محفوظ است "

« سپاس و ستایش خدای را که نام هایش پاک، نعمت هایش سرشار و احسانش وافر است»

تقدیم به دو عشق پاک زندگی ام :

پدر بزرگوار و مادرم مهربانم

که مهرشان بنایی شد برای تلاش پر شورم در کسب دانش

تقدیم به همسر عزیزم که حامی و سنگ صبورم بوده است

تشکر و سپاسگزاری می کنم از :

جناب دکتر حمید احمدیه معاونت پژوهشی مرکز تحقیقات چشم دانشگاه شهید بهشتی که ما را از حمایت های همه جانبه خودشان بهره مند کردند.

اساتید راهنمای گرانقدرم سرکار خانم دکتر زهرا–سهیلا سهیلی و آقای دکتر عبدالخالق دیزجی به پاس تمام راهنمایی ها و زحمات بی شائبه و دلسوزانه خود در جهت به نتیجه رسیدن این پایان نامه داشته اند.

جناب دکتر شهرام سمیعی که با مشاوره ها و راهنمایی های فکری و عملی خود نقش قابل توجهی را در پیشبرد هر چه بهتر این کار ایفا کردند.

.

کارشناس محترم گروه سرکارخانم شمیلا درویش علیپور که صبورانه اصول اولیه کار در آزمایشگاه و تکنیک کشت سلول را به من آموختند.

از همکار ارجمندم آقای باقری که در پیشبرد این رساله کمک های ارزشمندی به اینجانب داشته اند.

از کارشناسان محترم آزمایشگاه بیوشیمی خانم ها عباسی، واصلی و گرشاسبی به خاطر همه زحمات و راهنمایی هایشان تشکر می کنم.

از خانواده ام به ویژه پدر و مادر گران قدرم و همسر عزیزم که همواره مشوق و حامی من در تحصیل علم و دانش هستند و شرایط و امکانات لازم را برایم فراهم می کنند، تشکر و قدردانی می کنم.

چکیده فارسی :

هدف:بافت پوششی رنگدانه دار شبکیه (RPE[1]) به صورت تک لایه بین فوتورسپتور ها و رگ های خونی قرار گرفته است. سلول های RPE نقش مهمی را در حفظ و نگهداری عملکرد نرمال شبکیه به عهده دارد.

PolyHEMA[2] یک پلیمر هیدروفوب است که مانع از اتصال سلول های پستانداران بر سطح خود می شود. این پلیمر نرم و انعطاف پذیر جزء اصلی ساختار لنز های تماسی است.

در مطالعه حاضر اثرپلیمر polyHEMA به عنوان بستر کشت سلولی بر روی رشد و تمایز سلول های پو ششی رنگدانه دار شبکه انسان بررسی شد.

روش ها : سلول های RPE جداشده از کره های چشم اجساد انسانی در سنین جنینی تا نوزادی زیر سه سال (که بیش از ۲۴ ساعت از زمان مرگ آن ها نگذشته بود) از بانک چشم جمهوری اسلامی ایران تهیه شد و در محیط DMEM/F12 غنی شده با ۱۰٪ سرم جنین گوساله (FBS) کشت داده شدند .پلیمر polyHEMA در اتانل ۹۵٪ تهیه شد (۱۲ mg/ml)، اجازه داده شد تا در زیر هود بیولوژیک خشک شود بعد از استریل شدن با UV ، سطح پلیمر با PBS شسته شد . سلول های RPE در پاساژ ۲-۵ بر روی سطوح کشت کوت شده با پلیمر و سطوح کشت پلی استیرن (به عنوان کنترل)در ظروف کشت ۲۴ خانه تحت سه محیط DMEM/F12, DMEM/F12+10%FBS , DMEM/F12+30%AFکشت شدند. مورفولوژی سلول های RPE کشت شده بر روی پلیمر در یک دوره زمانی مشخص بررسی شد . سرعت تکثیر و مرگ سلولی توسط الیزا بررسی شد . از تست MTT برای بررسی تعداد سلول های زنده استفاده شد .بررسی مارکر های سلول های RPE و مارکر های سلول های پروژنیتور – عصبی به وسیله تکنیک ایمونوسیتوشیمی انجام شد . استخراج RNA از نمونه های کشت شده بر روی پلیمر و پلی استیرن انجام شد و به دنبال ساخت cDNA بررسی مارکر های سلول های RPE ، مارکر های سلول های شبکیه و مارکر های سلول های پروژنیتوری –عصبی توسط تکنیک Real Time PCR بررسی شد.

نتایج :نتایج نشان می دهند که سلول های کشت شده بر روی پلیمر تشکیل تعداد زیادی کلنی می دهند که با گذشت زمان کلنی ها به یکدیگر متصل شده و تشکیل کلنی واحد بزرگی را می دهد.کلنی های پیگمانته توانای بازیابی در محیط پلی استیرن را دارند.تعداد سلول های زنده بر روی سطح پلیمر و پلی استیرن مشابه و مرگ سلولی بر روی پلیمر وپلی استیرن قابل چشم پوشی است اما تکثیر سلولی در نمونه های پلیمر خیلی کمتر از پلی استیرن است.بیان مارکر های سلول های RPE و سلول های پروژنیتوری – عصبی توسط ICC شناسای شد وبیان مارکر های سلول های RPE ، سلول های شبکیه و سلول های پروژنیتوری – عصبی توسط Real Time PCR محاسبه گردید.

[1] Retinal Pigment Epitelum
[2] Poly 2 Hydroxy Etil Metacrylate

بحث و نتیجه گیری : polyHEMA یک پلیمر هیدروفوب غیر چسبنده است . وقتی سلول های RPE بر روی پلیمر کشت می شوند قادر به چسبیدن به سطح پلیت سلولی نیستند بنابر این به یکدیگر متصل می شوند و تشکیل تعداد زیادی کلنی می دهند .بعد از دو روز ، کلنی ها به شدت بزرگ و پیگمانته می شوند . بازیابی کلنی ها در سطح پلی استیرن، کشت تک لایه ای را حاصل می کند . پلیمر، القا کننده مرگ سلولی در سلول های RPE نبوده است و تکثیر نیز صورت نمی گیردبه نظر می رسد کشت سلول ها بر روی پلیمر، سلول ها را در فاز G0 قرار می دهد . بنابراین تکثیر سلولی کمتر از کنترل است . داده های ارائه شده در این تحقیق نشان دادند که، بیان مارکرهای سلول RPE در نمونه های سلول های کشت شده برروی پلیمر حفظ ماهیت RPE توسط پلیمررا نشان می دهد و نیز بیان مارکر های سلول های پروژنیتوری در سلول های کشت شده بر روی پلیمر نشان می دهد که پلیمر polyHEMA به منظور حفظ و گسترش سلول های پروژنیتوری – عصبی مفید است.

کلید واژه : سلول های RPE ، پلیمر polyHEMA ، مایع آمنیوتیک ، سلول های پروژنیتوری

فهرست کلی

عنوان	صفحه
فصل اول : مقدمه	۱
فصل دوم : بررسی منابع	۲۶
فصل سوم : مواد و روش ها	۳۰
فصل چهارم : نتایج	۵۸
فصل پنجم : بحث ، نتیجه گیری وپیشنهادات	۸۹
منابع و ماخذ	۱۰۵

فهرست تفضیلی

عنوان صفحه

فصل اول: مقدمه ۱

۱-۱:چشم ۲

۱-۲ :شبکیه ۲

۱- ۳: سلول های گانگلیونی ۴

۱-۳-۱ : THY1 ۴

۱-۴: سلول های دوقطبی ۵

۱-۴-۱: PKCα. ۵

۱-۵ : سلول های آماکراین ۶

۱-۵-۱ :CRABP1,CRABP2 ۷

۱-۶ : سلول های افقی ۷

۱-۷: سلول های فوتورسپتور ۸

۱-۸ : سلول های رنگدانه دار شبکیه (RPE) ۸

۱-۸-۱: مارکر های سلول های RPE ۱۱

۱-۸-۱-۱: سیتوکراتین ۱۱

۱-۸-۱-۱-۱: سیتوکراتین ۸/۱۸. ۱۲

۱-۸-۱-۲: RPE65 ۱۲

۱- ۹ : بیماری های شبکیه چشم ۱۳

۱-۹-۱- بیماری Age Related macula Degenerative(AMD) ۱۳

۱-۹-۲ :رتینیت پیگمنتوزا (RP) ۱۴

۱-۱۰: مهندسی بافت ۱۵

۱-۱۰-۱: داربست ۱۵
۱-۱۰-۱-۱: بیومواد طبیعی ۱۷
۱-۱۰-۱-۱-۱: پلیمر پروتئینی ۱۷
۱-۱۰-۱-۱-۲ : پلیمر پلی ساکارید ۱۸
۱-۱۰-۱-۲: بیومواد سنتزی ۱۸
۱-۱۰-۱-۲-۱: پلیمر polyHEMA ۱۹
۱-۱۰-۲ :مایع آمنیوتیک (AF) ۲۱
۱-۱۱: PAX6. ۲۲
۱-۱۲: CHX10 ۲۳
۱-۱۳: Nestin ۲۴
۱-۱۴: Tyrosinase ۲۵

فصل دوم مروری بر مطالعات انجام شده ۲۶
هدف از مطالعه ۲۹

فصل سوم: مواد و روش ۳۰
۳-۱: محلول ها ۳۱
۳-۱-۱ :بافر PBS (Phosphat Buferred Salin10x) ۳۱
۳-۱-۲ :FBS(Fetal Bovine Serum) ۳۱
۳-۱-۳: Trypsin/EDTA ۳۲
۳-۱-۴: DMEM/F12. ۳۲
۳-۱-۵ آنزیم دیسپاز ۳۳
۳-۱-۶ :فانگوزین ۳۳
۳-۲ :تشریح چشم ۳۴
۳-۲-۱ : تعویض محیط کشت ۳۵

۳-۲-۲ :پاساژسلولی ۳۵
۳-۲-۳ : فریز کردن سلولی ۳۶
۳-۲-۴ : بازیابی سلولی ۳۷
۳-۳ : پلیمر polyHEMA ۳۷
۳-۴ : الیزای تکثیر سلولی ۳۸
۳-۵ : الیزای مرگ سلولی ۴۰
۳-۶ :MTT ۴۲
۳-۷ :ایمونوسیتوشیمی (ICC) ۴۳
۳-۸ : استخراج RNA ۴۶
۳-۸-۱ سنجش RNA ۴۷
۳-۸-۱-۱ : اسپکتوفوتومتری ۴۸
۳-۸-۱-۲: الکتروفرز با ژل اگارز ۴۸
۳-۸-۱-۲-۱: ژل اگارز ۱٪ ۴۸
۳-۸-۱-۲-۲ :TBE0.5X ۴۸
۳-۸-۱-۲-۳ : Loading Dye ۴۹
۳-۹ : طراحی پرایمر ۵۰
۳-۱۰: سنتز CDNA ۵۱
۳-۱۱ :Conventional RT-PCR. ۵۲
۳-۱۲ :Real Time PCR ۵۵
۳-۱۲-۱ :آنالیز داده ها ۵۷

فصل چهارم : نتایج ۵۸
۴-۱ : بررسی مورفولوژی سلول هایRPE کشت شده برروی پلیمر polyHENA در طی ۶ روز ۵۹
۴-۲ : بازیابی سلول هایRPE کشت شده برروی پلیمر polyHENA ۶۳
۴-۳ بررسی تکثیر سلولی در سلول های RPE کشت شده بر روی پلیمر polyHEMA ۶۶
۴-۴ : بررسی تکثیر سلول هایRPE بعد از بازیابی از روی پلیمرpolyHEMA ۶۷
۴-۵ : بررسی مرگ سلول های RPE کشت شده بر روی پلیمرpolyHEMA ۶۸
۴-۶ : بررسی تعداد سلول های زنده بر روی پلیمر polyHEMA توسط MTT ۷۰
۴-۷ :ایمونوسیتوشیمی ژنهای پروژنیتوری وژنهای مخصوص سلول RPE ۷۱

۴-۸: Conventional PCR ۷۸
۴-۹: Real Time PCR ۷۹
۴-۹-۱ : منحنی استاندارد ۷۹
۴-۹-۲ :نمودارهای بیان کمی ژن ها ۸۳

فصل پنجم: بحث و نتیجه گیری ۸۹
۵-۱: بحث ۹۰
پیشنهادات ۱۰۴
فهرست منابع ۱۰۵

فهرست جداول

جدول ۳-۱: آنتی بادی های اولیه و ثانویه ۴۶
جدول۳-۲: میکس اولیه تهیه شده برای سنتز CDNA ۵۱
جدول ۳-۳: میکس ثانویه تهیه شده برای سنتز CDNA ۵۱
جدول ۳-۴: مواد لازم جهت انجام Conventional PCR ۵۲
جدول ۳-۵ : برنامه دمایی Conventional PCRبرای ژن GAPDH ۵۳
جدول ۳-۶ : برنامه دمایی Conventional PCR برای ژن THY1,Nestin,PKCα ۵۳
جدول ۳-۷ :دستور برنامه دمایی Conventional PCR برای ژن PAX6 ۵۳
جدول ۳-۸ :برنامه دمایی Conventional PCR برای ژن CRABP1,CRABP2 ۵۴
جدول ۳-۹ :برنامه دمایی Conventional PCR برای ژن Tyrosinase ۵۴
جدول۳-۱۰ : برنامه دمایی Conventional PCRبرای ژن CHX10 ۵۴
جدول ۳-۱۱ : دستور میکس Real Time ۵۵
جدول ۳-۱۲: برنامه دمایی Real Time PCR برای ژن GAPDH ۵۵
جدول ۳-۱۳: برنامه دمایی Real Time PCR برای ژن THY1 ۵۶
جدول ۳-۱۴: برنامه دمایی Real Time PCR برای ژن Tyrosinase ۵۶
جدول ۳-۱۵: برنامه دمایی Real Time PCR برای ژن CRABP1 ۵۶
جدول ۳-۱۶ : برنامه دمایی Real Time PCR برای ژن PKCα,Nestin, ۵۶
PAX6,CRABP2

جدول ۴-۱ :ایمونوسیتوشیمی مربوط به سیتوکراتین ۷۱
جدول ۴-۲ :ایمونوسیتوشیمی مربوط به RPE65 ۷۳
جدول ۴-۳ :ایمونوسیتوشیمی مربوط به پروتئین Pax6 ۷۴
جدول ۴-۴ : ایمونوسیتوشیمی مربوط به پروتئین Chx10 ۷۵

فهرست شکل ها و نمودارها

شکل ها

شکل ۱-۱ : لایه های مختلف شبکیه چشم ۳
شکل۱-۲ : ورود نور در لایه های مختلف شبکیه ۳
شکل ۱-۳ : از بین رفتن دید مرکزی در بیماری AMD ۱۳
شکل ۱-۴ : نمای فیزکی پلیمر polyHEMA ۲۰
شکل ۴-۱: سلول های RPE کشت شده بر روی پلیمر polyHEMA بعد از ۲ ساعت ۵۹
شکل ۴-۲ : سلول های RPE کشت شده بر روی پلیمر polyHEMA بعد از۲۴ ساعت ۶۰
شکل ۴-۳ : سلول های RPE کشت شده بر روی پلیمر polyHEMA بعد از ۴۸ ساعت ۶۰
شکل ۴-۴ : سلول های RPE کشت شده بر روی پلیمر polyHEMA بعد از۷۲ ساعت ۶۱
شکل ۴-۵ : سلول های RPE کشت شده بر روی پلیمر polyHEMA بعد از۹۶ ساعت ۶۲
شکل ۴-۶ : سلول های RPE کشت شده بر روی پلیمر polyHEMA بعد از۱۲۰ ساعت ۶۲
شکل ۴-۷ : سلول های RPE کشت شده بر روی پلیمر polyHEMA بعد از ۱۴۴ ساعت ۶۳
شکل ۴-۸ : بازیابی سلول های RPE کشت شده بر روی پلیمر polyHEMA بعد از۲۴ ساعت ۶۴
شکل ۴-۹ : بازیابی سلول های RPE کشت شده بر روی پلیمر polyHEMA بعد از ۴۸ ساعت ۶۴
شکل ۴-۱۰: بازیابی سلول های RPE کشت شده بر روی پلیمر polyHEMA بعد از۷۲ ساعت ۶۵
شکل ۴-۱۱: بازیابی سلول های RPE کشت شده بر روی پلیمر polyHEMA بعد از۹۶ ساعت ۶۵
شکل ۴-۱۲ : ایمنوسیتوشیمی سلول های RPE; برای شناسایی پروتئین سیتوکراتین در سلول های کشت شده بر روی polyHEMA همراه با ۱۰٪ FBS ۷۲
شکل ۴-۱۳ : ایمنوسیتوشیمی سلول های RPE; برای شناسایی پروتئین سیتوکراتین در سلول های کشت شده بر روی polyHEMA همراه با ۳۰٪ AF. ۷۲
شکل ۴-۱۴: ایمنوسیتوشیمی سلول های RPE; برای شناسایی پروتئین سیتوکراتین در سلول های کشت شده بر روی polyHEMA ۷۲

شکل ۴-۱۵ :ایمنوسیتوشیمی سلول های RPE; برای شناسایی پروتئین RPE65 در سلول های کشت شده بر روی polyHEMA همراه با ۱۰٪ FBS ۷۳
شکل ۴-۱۶: ایمنوسیتوشیمی سلول های RPE; برای شناسایی پروتئین RPE65 در سلول های کشت شده بر روی polyHEMA همراه با ۳۰٪ AF. ۷۳
شکل ۴-۱۷: ایمنوسیتوشیمی سلول های RPE; برای شناسایی پروتئین Pax6 در سلول های کشت شده بر روی polyHEMA همراه با ۱۰٪ FBS ۷۴
شکل ۴-۱۸: ایمنوسیتوشیمی سلول های RPE; برای شناسایی پروتئین Pax6 در سلول های کشت شده بر روی polyHEMA همراه با ۱۰٪ FBS ۷۴
شکل ۴-۱۹ : ایمنوسیتوشیمی سلول های RPE; برای شناسایی پروتئین Pax6 در سلول های کشت شده بر روی polyHEMA همراه با ۳۰٪AF ۷۵
شکل ۴-۲۰ : ایمنوسیتوشیمی سلول های RPE; برای شناسایی پروتئین Pax6 در سلول های کشت شده بر روی polyHEMA ۷۵
شکل ۴-۲۱ : ایمنوسیتوشیمی سلول های RPE; برای شناسایی پروتئین Chx10 در سلول های کشت شده بر روی polyHEMA همراه با ۱۰٪ FBS ۷۶
شکل ۴-۲۲ : ایمنوسیتوشیمی سلول های RPE; برای شناسایی پروتئین Chx10 در سلول های کشت شده بر روی polyHEMA همراه با ۳۰٪ AF ۷۶
شکل ۴-۲۳ : ایمنوسیتوشیمی سلول های RPE; برای شناسایی پروتئین Chx10 در سلول های کشت شده بر روی polyHEMA ۷۶
شکل ۴-۲۴ : ایمنوسیتوشیمی سلول های RPE; برای شناسایی پروتئین Nestin در سلول های کشت شده بر روی polyHEMA همراه با ۱۰٪ FBS ۷۷
شکل ۴-۲۵ : ایمنوسیتوشیمی سلول های RPE; برای شناسایی پروتئین Nestin در سلول های کشت شده بر روی polyHEMA همراه با ۳۰٪ AF ۷۷
شکل ۴-۲۶ : ایمنوسیتوشیمی سلول های RPE; برای شناسایی پروتئین Nestin در سلول های کشت شده بر روی polyHEMA ۷۸
شکل ۴-۲۷ : الکتروفرز مربوط به ژن های PKCα,GAPDH, PAX6,CRABP2,Tyrosinase,Nestin,THY1 ۷۸
شکل ۴-۲۸: الکتروفرز مربوط به ژن هاCRABP1,CHX10 ۷۹
شکل ۴-۲۹ :منحنی استاندارد رسم شده برای CRABP1 ۸۰
شکل ۴-۳۰ : منحنی استاندارد رسم شده برای ژن CRABP2 ۸۰
شکل ۴-۳۱ : منحنی استاندارد رسم شده برای ژن GAPDH ۸۰

شکل ۴-۳۲ : منحنی استاندارد رسم شده برای ژن PKCα ۸۱
شکل ۴-۳۳ : منحنی استاندارد رسم شده برای ژن Tyrosinase ۸۱
شکل ۴-۳۴ : منحنی استاندارد رسم شده برای ژن CHX10 ۸۱
شکل ۴-۳۵ : منحنی استاندارد رسم شده برای ژن Nestin ۸۲
شکل ۴-۳۶ : منحنی استاندارد رسم شده برای ژن THY1 ۸۲
شکل ۴-۳۷ : منحنی استاندارد رسم شده برای ژن PAX6 ۸۲

نمودارها

نمودار ۴-۱ : بررسی الیزای تکثیر سلولی ۶۷
نمودار ۴-۲: بررسی الیزای تکثیر سلولی بعداز بازیابی سلول ها از polyHEMA ۶۸
نمودار ۴-۳ :بررسی الیزای مرگ سلولی ۶۹
نمودار ۴-۴ : بررسی تعداد سلول های زنده توسط MTT ۷۰
نمودار ۴-۵ : بررسی بیان کمی ژن ها در حالت FBSپلیمر نسبت به FBSپلی استیرن ۸۳
نمودار ۴-۶ : بررسی بیان کمی ژن ها در حالت DMEMپلیمر نسبت به DMEMپلی استیرن ۸۵
نمودار ۴-۷ : بررسی بیان کمی ژن ها در حالت۳۰٪ AF پلیمر نسبت به۳۰٪ AFپلی استیرن ۸۶
نمودار ۴-۸ : بررسی بیان کمی ژن ها در حالت FBS,AFپلیمرو FBS,AF پلی استیرن نسب ۸۷
DMEMپلی استیرن

فصل اول

مقدمه

۱-۱ چشم :

در طی روند تکاملی موجودات زنده چشم نیز مانند دیگر اندام ها از ساده ترین نوع خود در موجودات ابتدایی به پیچیده ترین و مجهزترین ساختارها برای جذب و پردازش نور و تبدیل آن به تصاویر قابل مشاهده نظیر آنچه که انسان از آن برخوردار است، تکامل پیدا کرده است. در اکثر مهره داران عملکرد چشم به این صورت است که نور پس از ورود به داخل چشم بر روی لایه ای از سلول های حساس به نور به نام شبکیه در پشت چشم تابانده می شود. سلول های مخروطی و استوانه ای موجود در شبکیه نور را گرفته و آن را به سیگنال های عصبی تبدیل می کنند. این سیگنال ها سپس از طریق عصب بینایی به مغز فرستاده می شوند. چشم هایی با این عملکرد، ساختاری کروی دارند که درون آن ها با ماده ای شفاف و ژلاتینی به نام مایع زجاجیه (vitreous humour)[1] و نیز یک لنز با قابلیت تنظیم پر شده است. میزان نوری که وارد چشم می شود به واسطه انقباض و انبساط ماهیچه های عنبیه که منجر به تغییر قطر مردمک می گردد، تنظیم می شود (Rama,2008) .

چشم در پستانداران از جمله انسان اندامی کروی شکل به قطر حدود ۲۴ میلی متر است که در حفره ای به نام کاسه چشم در جمجمه واقع شده و توسط ماهیچه هایی در این ناحیه حفظ و حرکاتش کنترل می شود. همچنین لایه ضخیمی از بافت چربی چشم را در بر می گیرد که وظیفه محافظت از چشم را بر عهده دارد.چشم از سه لایه اصلی قرنیه ، شبکیه و صلبیه تشکیل شده است .شبکیه در پشت چشم مابین صلبیه و زجاجیه قرار دارد و مسئول جمع آوری نور است. . ماکولا قسمت مرکزی و خلفی شبکیه وحاوی بیشترین تجمع سلول های فوتورسپتوری و مسئول بینایی دقیق و با دقت بالا در چشم است (نوین) .

۱-۲ شبکیه :

شبکیه بافت حساس به نور است که در قسمت خلفی چشم وجود دارد . و پس از دریافت نور آبشاری از وقایع شیمیایی و الکتریکی در آن ایجادمی شود که بالاخره به صورت پالس عصبی به مغز فرستاده و تصویر ایجاد می شود. در مهره داران در طی دوران جنینی شبکیه و عصب بینایی از تکامل مغز ایجاد می شوند در نتیجه به عنوان بخشی از سیستم عصبی مرکزی به شمار می آیند. شبکیه از سلول های گانگلیون، آماکرین دوقطبی، افقی، فوتورسپتور و پوششی رنگدانه ای تشکیل شده است که این سلول ها در سه لایه مجزا قرار می گیرند :

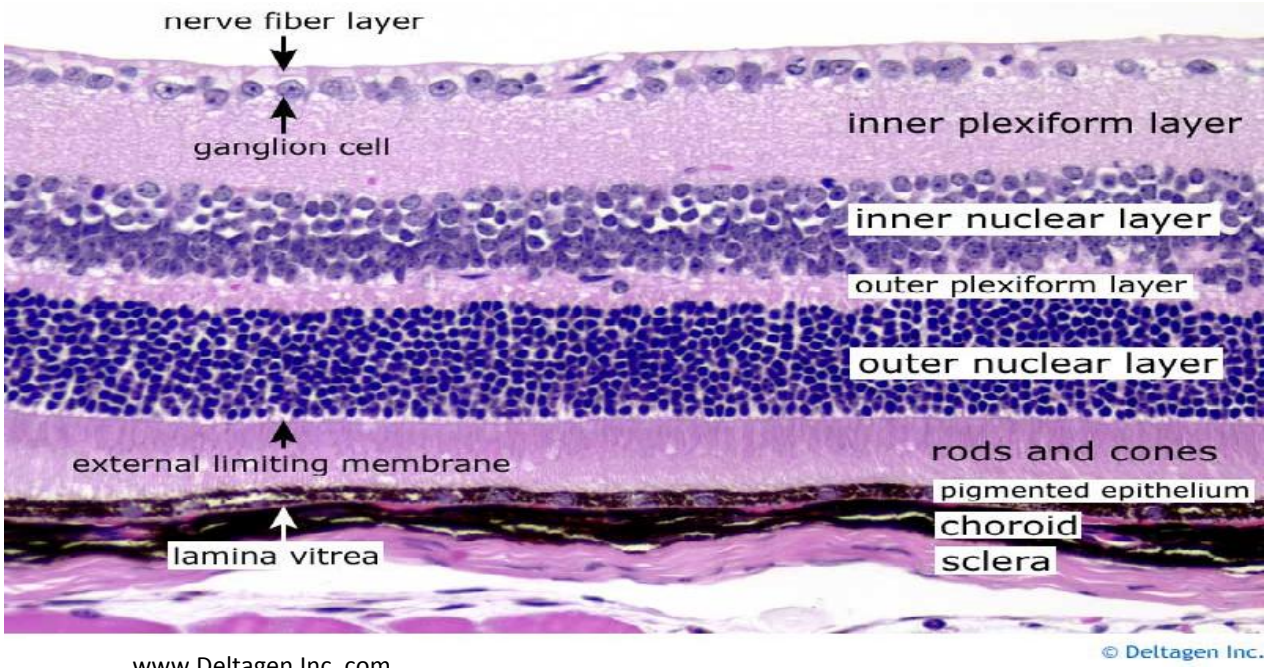
۱) لایه داخلی : nerve fiber layer (حاوی اکسون گانگلیون) ganglion cell layer (ایجاد کننده رشته عصبی)(حاوی هسته سلول های گانگلیون و اکسون عصب های بینایی)

۲) لایه میانی : (inner plexiform layer (سیناپس های بین سلول های گانگلیون و دوقطبی وآماکرین ها در این لایه رخ می دهد), inner nuclear layer(اغلب سلول های دو قطبی در این لایه وجود دارند) ,

[1] vitreous humour

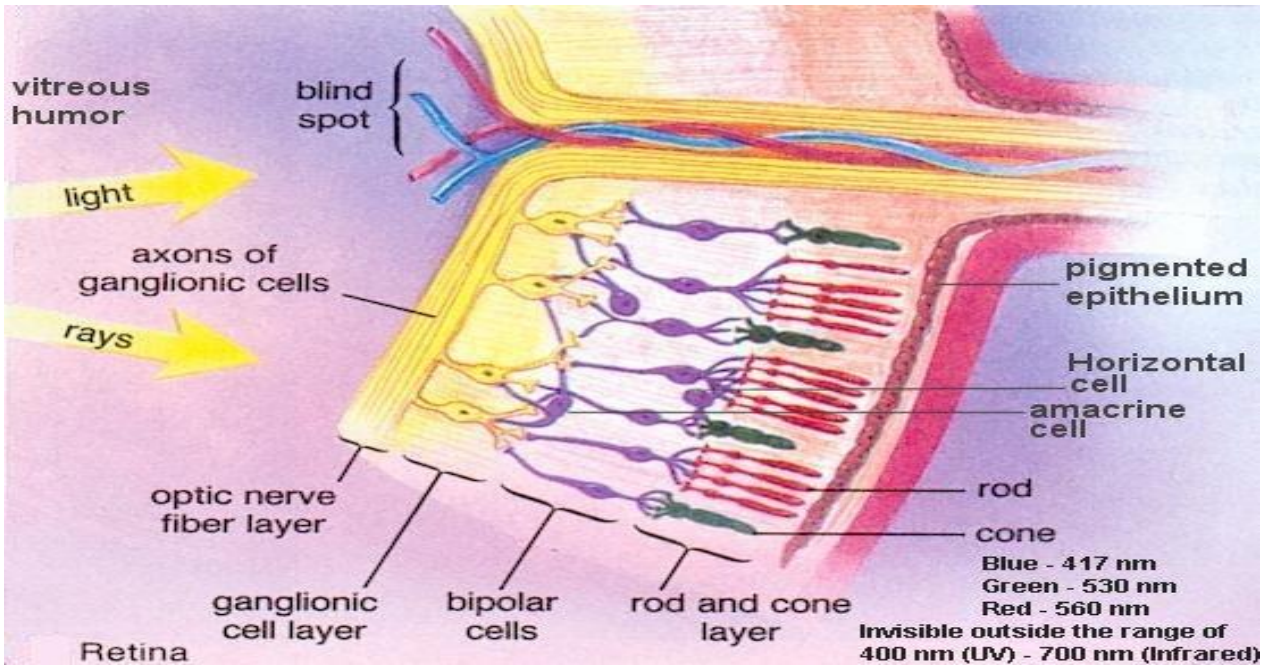
outer plexiform layer(سیناپس ها بین سلول های فوتو رسپتور هاو دو قطبی ها رخ می دهد) , outer nuclear layer , outer limiting membrance (این لایه شامل سلول های دوقطبی, آماکرینی و افقی است).

۳) لایه خارجی(photoreceptor layer , RPE cell)(Lamba,2008 ; Strauss,2005)



www.Deltagen Inc. com

شکل ۱-۱ : لایه های مختلف شبکیه



شکل ۱-۲ : ورود نور در لایه های مختلف شبکیه

۱-۳ سلول های گانگلیون :

سلول های گانگلیونی نوعی نرون هستند که در داخلی ترین لایه چشم قرار دارند و از طریق دو نرون واسط یعنی سلول های دوقطبی وآماکرینی اطلاعات بینایی را از گیرنده نوری دریافت می کند و به چندین ناحیه در تالاموس – هیپو تلاموس و مغز میانی انتقال می دهند . سلول های گانگلیونی به طور قابل توجه از نظر اندازه ارتباطات سلولی و پاسخ به تحریکات بینایی متنوعند ولی تمام آن ها یک خصوصیت مشترک دارند و آن وجود یک اکسون بلند است که تا مغز کشیده شده است. این اکسون،عصب بینایی، کیاسم بینایی و دستگاه بینایی را بوجود می آورد . حدود ۱/۲ تا ۱/۵ میلیون سلول گانگلیون در شبکیه چشم انسان وجود دارد . با توجه به ۱۰۵ میلیون گیرنده نوری در شبکیه به طور متوسط هر سلول گانگلیون از حدود ۱۰۰ سلول استوانه ای و مخروطی پیام در یافت می کند. البته این اعداد در بین افراد وابسته به موقعیت سلولها در شبکیه تا حد زیادی متفاوتند . در مرکز شبکیه یک گیرنه نوری با ۵ سلول گانگلیون در ارتباط است در حالی که در انتها یک سلول گانگلیون از هزاران گیرنده نوری اطلاعات را در یافت می کند .در هنگام استراحت سلول ها به طور خودکار پتانسیل عمل رابه میزان پایه ایجاد می کنند. تحریک این سلول ها منجر به میزان افزایش پتانسیل عمل و مهار آن ها منجر به کاهش میزان پتانسیل عمل می شود .بیشتر این سلول ها تولید کننده گلوتامات هستند و تعداد کمی هم ممکن است از نیتریک اکسید به عنوان انتقال دهنده عصبی یا تنظیم کننده عصبی استفاده کنند (neuronbank; wikipedia) .

۱-۳-۱ THY1 :

نام دیگر این ژن CD90 است که توسط گانگلیونها بیان می شود . این ژن ،گلایکو پروتئینی را کد می کند که حفاظت شده است ، KD ۳۷-۲۵جرم دارد و به مقدار زیادی N گلیکوزیله است و از طریق گلیکوفسفاتیدیل اینوزیتول به غشاء لنگر انداخته است. این گلیکو پروتئین یک دومین ایمونو گلوبیین Vشکل دارد . این پروتئین در بسیاری از انواع سلول ها از جمله سلول های T ، تیموسیت ها ،سلول های اندو تلیالی و فیبروبلاست بیان می شود . Thy1 به عنوان پروتئین نشانگر انواع سلول های بنیادی و اکسون نورون های بالغ مورد استفاده است. این پروتئین در سیستم عصبی، غالباً نرونها دیده می شود اما برخی از سلول های گلیالی نیز در آخر مرحله ی تمایزشان آنرا بیان می کنند. بیان ترجیحی Thy1 در سیناپتوزوم ها و حضور آن درنرون ها همراه سیناپتوزوم ها و بلوغ شیمیایی و مورفولوژیکی مغز بیانگر نقش Thy1 در تشکیل سیناپس می باشد.(Wikipedia; Genomics 3) Thy1 همچنین بر روی مورفولوژی، تکثیر و مهاجرت و تمایز فیبرو بلاستها اثر دارد و نیز در رشد زایده های نرونی، باز تولید عصب – آپاپتوز – متاستاز- التهاب و فیبروز دخالت دارد. عملکرد Thy1 کاملا شناخته شده است اما احتمالا در میانکش سلول – سلول و سلول – ماتریکس نقش دارد (Seki,1985; wikipedia) .

۱-۴ سلول های دوقطبی:

سلول های دو قطبی نرون هایی بین فوتورسپتور و سلول های گانگلیونی هستند که پیام عصبی را از فوتورسپتور دریافت و به طور مستقیم یا غیر مستقیم به سلول های گانگلیونی می فرستند . این سلول ها بر اساس مورفولوژی ، خصوصیات بیوشیمیایی، عملکرد و غیره در گروه های متفاوتی تقسیم بندی می شوند . این سلول ها قادر هستند با سلول های فوتورسپتور مخروطی یا استوانه ای سیناپس داشته باشند (بر اساس نو عشان تنها با یکی از این دو نوع سیناپس دارند) . آن ها بر اساس نوع فوتورسپتوری که باآن سیناپس دارند به دو گروه دو قطبی مخروطی و دوقطبی استوانه ای تقسیم شده اندکه از نظر مورفولوژی تاکنون ۱۰ نوع مختلف دوقطبی مخروطی و تنها یک نوع دوقطبی استوانه ای در شبکیه موش شناخته شده است. یکی از تفاوت های بیوشیمیایی بین دو نوع سلول دو قطبی مخروطی و استوانه ای حضور میزان فراوان ایزومر α آنزیم Pkc در سلول های دو قطبی استوانه ای است در حالی که در سلول های دو قطبی مخروطی وجود ندارند هم چنین سلول های دو قطبی قادر به دریافت سیناپس از سلو لهای افقی نیز هستند. این سلول ها سیناپس های دریافتی از فوتورسپتور ها یا سلول های افقی را به گانگلیون هابه صورت مستقیم یا غیر مستقیم (به واسطه آماکرین ها) می فرستند .سلولهای دوقطبی استوانه ای نمی توانند به صورت مستقیم با گانگلیون ها در تماس باشند آن ها ابتدا پیام خود را از طریق پالس به سلول های آماکرینی میدهند سپس پیام مورد نظر یا به طور مستقیم از طریق آماکرین ها یا با فعال شدن دوقطبی مخروطی توسط آماکرین ها به گانگلیونها منتقل می شود .در تاریکی فوتورسپتور ها گلوتامات را آزاد می کنند که موجب خاموش شدن سلول های دو قطبی می شود (Morrow,2008) .

۱-۴-۱ PKCα:

Pkc یک پروتئین سیتوپلاسمی است که دارای عملکرد در فرایند های فیزیولوژیک و پاتوفیزیولوژیک در شبکیه است که نقش مهمی در انتقال سیگنال دارد.Pkcα یک مارکر سیتوپلاسمی در سلول های دوقطبی (bipolar) است. نام دیگر این پروتئین PRKCA است که به طور اختصاصی در جسم سلولی و به میزان فراوان تری در دندریت های منشعب شده وجود دارد. در حالی که هیچ یک از دیگر ایزوفرم های Pkc در سلول های دوقطبی یافت نشده است و به همین دلیل به عنوان مارکر اختصاصی برای شناسایی سلول های دو قطبی ار نوع استوانه ای استفاده می شود. Pkcα در سلول های دوقطبی استوانه ای به میزان فراوانی وجود دارد در حالی که این پروتئین در سلول های دوقطبی مخروطی وجود ندارد (Usuda,1991) .
Pkcα جزو خانواده ی سرین/ ترئونین کینازها است که برای فعال شدن به یون ca و پیامبر دوم DAG (دی آسیل گلیسرول) و فسفاتیدیل کولین نیازمند است. اعضا این خانواده طیف وسیعی از پروتئین ها را

فسفریله می کنند و در مسیر های سیگنالینگ سلول های در حال تقسیم دخالت دارند .اعضا این خانواده نقش مهمی در ارتباطات سلولی، انتقالات سلولی و کنترالات سلولی دارند . این آنزیم از کیناز های بسیار مهم در مسیر سیگنالی است که با فسفریله کردن پروتئین های خاص موجود در مسیر سیگنالی ، عملکرد آن ها را تغییر داده و به این ترتیب فرایند فیزیولوژیکی و متابولیکی درون سلول را تنظیم می کند . به عنوان مثال یکی از فعالیت هایی که Pkcα وابسته به یون ca در سلول های دو قطبی انجام می دهد تنظیم تشکیل و سازمان دهی فیلافت اکتین در محل سیناپس سلولی است که این عمل در ایجاد تغییرات مورفولوژیکی متناسب با نوع پاسخ به شرایط مختلف تاریکی یا مواجه با نور در پایانه های سیناپسی سلول دو قطبی ضروری است . همچنین این سلول ها برای عملکرد خاص خود به دو دسته سلول خاموش و روشن تقسیم می شوند . سلول های روشن آن دسته از سلول های دوقطبی هستند که در نتیجه پاسخ فتورسپتورها به نور فعال می شوند به این صورت که در پاسخ به نور فتورسپتورها هایپرپلاریزه شده و رها سازی گلوتامات کم می شود. این سلول ها که در تاریکی هایپرپلاریزه بودند دپلاریزه و فعال می شوند. همه ی سلول های دوقطبی استوانه ای از نوع روشن هستند و سلول های خاموش آن هایی هستند که در نتیجه ی پاسخ فتورسیپتور به نور غیر فعال می شوند به این صورت که وقتی در پاسخ به نو فتورسپتور ها هایپرپلاریزه شده و رها سازی گلوتامات کم می شود (Usuda,1991) .

۱-۵ سلول های آماکرینی:

سلول های آماکرینی نرون های هستند که در قسمت میانه شبکیه در لایه هسته ای داخلی و لایه سلول های گانگلیونی شبکیه است. این نرون ها با اکسون های سلول های دو قطبی و دندریت سلول های گانگلیونی سیناپس دارند و ۷۰٪ پیام عصبی توسط سلول های گانگلیونی از طریق این نرون ها فرستاده می شود. آماکرین ها از نظر مورفولوژی، بیوشیمیایی ، عملکرد و پراکندگی در شبکیه متنوعند.هر سلول با توجه به مورفولوژی خاص خود عملکرد متفاوت و اختصاصی از سلول مجاور خود ایفا می کند. ۴۰ نوع از این سلول ها شناخته شده است که اغلب اکسون خود را از دست داده اند (Christy Job,1998) . هر نوع سلول با نوع خاصی از سلول دوقطبی در تماس است و هر کدام ناقل عصبی خاص خود را رها می کند. از نظر مورفولوژی این سلول ها دندریت گسترده دارند. این سلول ها همانند سلول های افقی نقش مهاری دارند در واقع این سلول ها مکمل عملکرد سلول های افقی هستند و با ترشح ناقل عصبی Gly, GABA پیام در یافتی از سلول های دو قطبی را مهار می کنند که این مهار تحت مکانیسم به نام Lateral inhibition است که برای کنتراست و وضوح تصویر لازم است . نقش دیگر این سلول ها تنظیم حساست دید در نور کم است . همه سلول های آماکرینی به عنوان میانجی سیگنال دریافتی از سلول های استوانه ای در نور کم