بسم الله الرحمن الرحيم

بسمه تعالی

دانشگاه تربیت مدرس

دانشکده علوم پایه

آیین نامه چاپ پایان نامه (رساله) های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان نامه (رساله) های تحصیلی دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس، مبین بخشی از فعالیت های علمی پژوهشی دانشگاه است. بنابراین به منظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه، دانش آموختگان این دانشگاه نسبت به رعایت موارد ذیل متعهد می شوند :

ماده ۲- در صفحه سوم کتاب (پس از برگ شناسنامه)، عبارت ذیل را چاپ کند.

«کتاب حاضر حاصل رساله دکتری نگارنده در رشته ژنتیک است که در سال ۱۳۸۹ در دانشکده علوم پایه دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی سرکار خانم دکتر زهرا-سهیلا سهیلی و مشاوره جناب آقای دکتر مجید صادقی زاده از آن دفاع شده است.»

ماده ۳- به منظور جبران بخشی از هزینه های انتشارات دانشگاه، تعداد یک در صد شمارگان کتاب (در هر نوبت چاپ) را به «دفتر نشر آثار علمی» دانشگاه اهدا کند. دانشگاه می تواند مازاد نیاز خود را به نفع مرکز نشر در معرض فروش قرار دهد.

ماده ۴- در صورت عدم رعایت ماده ۳، ۵۰٪ بهای شمارگان چاپ شده را به عنوان خسارت به دانشگاه تربیت مدرس، تادیه کند.

ماده ۵- دانشجو تعهد و قبول می کند در صورت خودداری از پرداخت بهای خسارت، دانشگاه می تواند خسارت مذکور را از طریق مراجع قضایی مطالبه و وصول کند؛ به علاوه به دانشگاه حق می دهد به منظور استیفای حقوق خود، از طریق دادگاه، معادل وجه مذکور در ماده ۴ را از محل توقیف کتابهای عرضه شده نگارنده برای فروش، تامین نماید.

ماده ۶- اینجانب حسن اکرمی دانشجوی رشته ژنتیک مقطع دکتری تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می شوم.

نام و نام خانوادگی: **حسن اکرمی**

دانشگاه‌تربیت مدرس

دانشکده علوم زیستی

رساله دوره دکتری رشته: زیست شناسی گرایش: ژنتیک مولکولی

بررسی اثر کاهش بیان ژن *PlGF* در سلولهای اپیتلیال رنگدانه ا ی شبکیه انسانی (RPE) جهت مهار نو- رگزایی مشیمیه

نگارش

حسن اکرمی

استاد راهنما

دکتر زهرا-سهیلا سهیلی

استاد مشاور

دکتر مجید صادقی زاده

خرداد ۱۳۸۹

بعضی ها مثل آسمان آبیند و مثل سبزه سبز

بعضی ها مثل چشمه زلالند و مثل درخت پربار

بعضی مثل خورشید می تابند و زنده می کنند، زندگی می بخشند و زندگی می آموزند

بعضی هم درختند پربار، چشمه اند زلال، آسمانند آبی، خورشیدند گرمابخش و سبزه اند سبز سبز.

تقدیم به

پدرم، که قطره قطره مرکب قلمم، یادگار عرق جبین اوست

مادرم که محبت هایش همواره پرپروازم بوده است

برادرم که هرگز از یادش نمی کاهم.

همسرم که همواره یاور و پشتیبانم بوده است

پسرم که روشنایی بخش زندگیم بوده و همیشه در قلبم جای دارد

و تمام اساتید گرانقدر که به من آموختند چگونگی بهتر زیستن را

تشکر و قدردانی

با سپاس فراوان از استاد گرامی سرکار خانم دکتر زهرا-سهیلا سهیلی که راهنمایی این پایان نامه را بر عهده داشته و با مساعدت و راهنمایی های بیدریغ شان در طول انجام رساله، مرا یاری نمودند.

همچنین با سپاس و قدردانی از استاد گرامی جناب آقای دکتر مجید صادقی زاده که مشاوره این پایان نامه را بر عهده داشته و با مساعدت و مشاورت های همیشگی و ارزنده شان مرا یاری نمودند.

با سپاس از جناب آقای دکتر حمید احمدیه که از مشاورت های ارزنده ایشان در طول انجام رساله برخوردار بودم.

با قدردانی از سرکار خانم دکتر مژگان رضایی و همکارانش در بانک چشم جمهوری اسلامی ایران که در تهیه نمونه چشم طی انجام رساله، از هیچ مساعدتی به اینجانب دریغ ننمودند.

با سپاس از جناب آقای دکتر جلیل پاکروش که در تهیه پرده آمنیوتیک از جفت جنینی، مرا یاری و مساعدت نمودند.

با سپاس از جناب آقای شهرام سمیعی و همکارانش در سازمان انتقال خون که از مساعدت ایشان در طول انجام رساله برخوردار بودم.

با سپاس از تمامی اساتید گرانقدر که طی دوران تحصیل از هیچ مساعدتی به اینجانب دریغ ننمودند

با سپاس از دوستان و عزیزانی (خصوصا آقای حسین اسدی) که صمیمانه مرا در طول انجام این رساله یاری رساند.

چکیده

استحاله سنی ماکولا[1] (AMD) ، شایع ترین علت کاهش بینایی در افراد بالای۶۰ سال، در کشورهای پیشرفته است. اکثر موارد، کاهش شدید بینایی ناشی از AMD ، به دلیل تغییرات ترشحی ماکولا روی می دهد. در نوع تر بیماری، نو- رگزایی مشمیه[2] (CNV) و در نتیجه خونریزی زیر شبکیه، باعث از دست دادن بینایی می شود.

سلول های اپی تلیال رنگدانه ای شبکیه[3] (RPE) در حفظ ونگهداری و عملکرد طبیعی شبکیه نقش مهمی دارند.

با استفاده از روشهای مهندسی بافت، پرده آمنیوتیک، به عنوان بستری برای کشت سلول های RPE و جایگزین کردن آنها با سلولهای RPE آسیب دیدۀ در شبکیه چشم مطرح گردیده است. ما روشی را برای کشت سلول های RPE روی پرده آمنیوتیک استفاده کردیم. الگوی بیان ژن در سطح رونویسی مارکرهای اختصاصی سلولهای RPE، شامل ژن های *RPE65* ، *CRALBP* ، *CD68* ، *Tyrosinase* ،*VEGF* که در عملکرد طبیعی سلولهای RPE نقش دارند، با استفاده از روش Real-time PCR کمی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج بررسی بیان کمی نشان داد که رونویسی ژنهای *RPE65*، *CD68* و *VEGF* در سلولهای RPE کشت شده بر سطح پردۀ آمنیوتیک نسبت به سلولهای RPE کشت شده بر سطح ظروف کشت پلاستیکی افزایش داشته اند. از طرفی کشت سلولهای RPE بر سطح پردۀ آمنیوتیک تأثیری بر بیان ژن های *CRALBP* و تیروزیناز ندارد. این نتایج نشان می دهد که پرده آمنوتیک مانع از تمایززدایی سلول های RPE می شوند.

تعدادی فاکتور مهم در مسیر آبشاری رگزایی وجود دارند. با وجود این، نقش اصلی VEGF ، در شروع نو- رگزایی[4] و بیماری های ترشحی چشم مشخص شده است. مهار طویل مدت VEGF عوارض منفی از قبیل افزایش فشار خون و ترمبوزیس را در بیماران ایجاد می کند. میانکنش VEGF با VEGFR-1 به واسطه PlGF القا می شود، به همین جهت *PlGF* به عنوان ژن کاندید برای مهار نو- رگزایی در مشمیه مورد بررسی قرار گرفت.

در این تحقیق نشان داده شد که مهار PlGF در سلولهای RPE اثری بر تکثیر سلولی و مرگ برنامه ریزی شدۀ سلولی ندارد. همچنین اختلاف محسوسی در بیان ژنهای *RPE65, CRALBP* and *tyrosinase* در سلولهای RPE تیمار شده با siRNA علیه ژن *PlGF*، در مقایسه با سلولهای RPE تیمار شده با scrambled-siRNA و سلولهای RPE بدون تیمار، مشاهده نشد.

[1] **Age related macular degeneration**
[2] **Choroidal neovascularization**
[3] **Retinal pigment epithelium**
[4] **Neovascularization**

مهار بیان ژن *PlGF* در سلول های RPE موجب کاهش چشم گیری در رگزایی در in vitro بوسیله سلول های HUVECs شد. همچنین مطالعه بیان کمی رونویسی ۸۴ ژن کلیدی درگیر در رگزایی حاکی از تغییر بیان ۲۰ ژن پس از فرونشانی بیان ژن *PlGF* در سلولهای RPE دارد که در بین آنها ۱۲ ژن افزایش و ۸ ژن (علاوه بر ژن *PlGF*) کاهش بیان را نشان می دادند.

کلمات کلیدی:

اپی تلیال رنگدانه ای شبکیه (RPE)، *PlGF* ، تخریب وابسته به سن ماکولا (AMD) , siRNA ، پرده آمنیوتیک، نو- رگزایی مشمیه (CNV).

فهرست مطالب

فصل اول ۱

مقدمه ۱

۱-۱ استحاله وابسته به سن ماکولا ۲

۱-۲. سلول های اپی تیلیال رنگدانه ای شبکیه ٤

۱-۳. عملکرد پروتئین RPE65 در چرخه بینایی ۱۲

۱-٤ نقش پروتئین متصل شونده به رتینالدهید سلولی در چرخه بینایی ۱۵

۱-۵ رگزایی ۱۵

۱-۵-۱. عوامل دخیل در رگزایی ۱۷

۱-٦. فاکتور رشد جفتی ۲۲

۱-۷ روشهای درمان بیماری استحاله وابسته به سن ماکولا ۲٤

۱-۷-۱. انعقاد توسط نور لیزر ۲٤

۱-۷-۲. درمان فتودینامیک ۲۵

۱-۷-۳. پرتو درمانی ۲۵

۱-۷-۴. جراحی ۲۵

۱-۷-۵. پیوند شبکیه ۲٦

۱-۷-۶ پیوند سلول های RPE ۲۷

۱-۷-۷. مهندسی بافت RPE ۲۸

۱-۷-۸. درمان دارویی ۲۹

۱-۸. اهداف ۳۰

فصل دوم ۳۱

مواد و روش‌ها ۳۱

۲-۱. تهیه محلول ها و بافرهای مورد نیاز ۳۲

۲-۱-۱. آنتی بیوتیک ۳۲

۲-۱-۲. سرم جنین گوساله ۳۲

۲-۱-۳. محلول Trypsin/EDTA ۳۲

۲-۱-۴. آنزیم دیسپاز ۳۲

۲-۱-۵. بافر سالین نرمال ۳۳
۲-۱-۶. بافر TBE ۳۳
۲-۱-۷. رنگ تریپان بلو ۳۳
۲-۱-۸. رنگ متیل گرین ۳۳
۲-۱-۹. محیط Mounting Medium ۳۳
۲-۱-۱۰. بافرها و محلولهای مورد استفاده در SDS-PAGE ۳٤
۲-۱-۱۱. تهیه محیط کشت DMEM-F12 (۱:۱) ۳۵
۲-۲. روش ها ۳۵
۲-۲-۱ تهیه کره های چشم انسانی ۳۵
۲-۲-۲. مرحله جداسازی سلولهای RPE از کره چشم ۳۵
۲-۲-۳ کشت سلول های RPE ۳٦
۲-۲-۴ شمارش سلولی و محاسبه درصد بقا ۳۷
۲-۲-۵. کشت و تکثیر سلولهای آندوتلیال سیاهرگ بند ناف ۳۸
۲-۲-۶. کشت سلول‌های RPE روی پرده آمنیوتیک ۳۹
۲-۲-۷. استخراج RNA کل ۳۹
۲-۲-۸ تعیین غلظت RNA ٤۰
۲-۲-۹. تهیه ژل آگارز و الکتروفورز آن ٤۱
۲-۲-۱۰. واکنش رونویسی معکوس ٤۱
۲-۲-۱۱ واکنش رونویسی معکوس برای سیستم PCR Array ٤٤
۲-۲-۱۲. واکنش زنجیره ای پلی مریزاسیون (PCR) ٤٦
۲-۲-۱۳. طراحی پرایمر ٤٦
۲-۲-۱۴. روش انجام Real time RT-PCR ۵۰
۲-۲-۱۵. روش انجام سیستم Real time PCR Array ۵۳
۲-۲-۱۶. تداخل در بیان ژن از طریق استراتژی RNAi ۵۵
۲-۲-۱۷. آماده سازی نمونه برای فلوسایتومتری ۵۷
۲-۲-۱۸ ایمونوسیتوشیمی ۵۷
۲-۲-۱۹. لکه گذاری وسترن ۵۸
۲-۲-۲۰. آزمون الایزا برای تکثیر سلولی ٦۲
۲-۲-۲۱. آزمون الایزا برای مشاهده مرگ سلولی ٦۳
۲-۲-۲۲. روش انجام آزمون الایزا برای پروتئین VEGF ٦٤
۲-۲-۲۳ رگزایی ٦۵

فصل سوم..... ٦٦

نتایج..... ٦٦
۳-۱ کشت سلول های RPE..... ٦٧
۳-۱-۱. مرحله نمونه گیری..... ٦٧
۳-۱-۲. مرحله جداسازی سلولهای RPE..... ٦٧
۳-۲ شناسایی سلولهای RPE..... ٧١
۳-۲-۱ ایمونوسیتوشیمی..... ٧١
۳-۲-۲ بیان ژن..... ٧٥
۳-۳. کشت سلول های RPE روی پرده آمنیوتیک..... ٧٧
۳-٤. بررسی کمی رونویسی ژنهای عملکردی و تمایزی روی پرده آمنیوتیک..... ٧٩
۳-٥. فرونشانی بیان ژن PlGF با استفاده از فن آوری RNAi..... ٨٢
۳-۵-۱. بررسی کمی رونویسی ژنهای عملکردی و تمایزی پس از فرونشانی بیان ژن PlGF..... ٩٠
۳-۵-۲. بررسی کمی مرگ برنامه ریزی شده در سلولهای RPE پس از فرونشانی بیان ژن PlGF..... ٩٢
۳-۵-۳ بررسی کمی تکثیر سلولی در سلولهای RPE پس از فرونشانی بیان ژن PlGF..... ٩٢
۳-۵-۴. کاهش ترشح پروتئین VEGF در سلولهای RPE پس از فرونشانی بیان ژن PlGF..... ٩٦
۳-٦. مطالعه رگزایی..... ٩٨
۳-۷. پروفایل بیانی ژنهای مسیر رگزایی، پس از فرونشانی بیان ژن PlGF..... ١٠٠

فصل چهارم..... ١٠٧

بحث و نتیجه گیری..... ١٠٧
٤-١. مقدمه..... ١٠٨
٤-٢. سلول های RPE..... ١٠٨
۴-۲-۱. کشت سلول های RPE..... ١٠٨
۴-۲-۲. شناسایی سلول های RPE..... ١١٠
۴-۲-۳. کشت سلول های RPE بر روی پردهٔ آمنیوتیک..... ١١١
٤-۳ رگزایی..... ١١٣
۴-۳-۱. درمان رگزایی پاتولوژی با مهار VEGF..... ١١٣
۴-۳-۲. نقش PlGF در مهار رگزایی پاتولوژی..... ١١٤
۴-۳-۳. مهار PlGF و رگزایی..... ١١٤
٤-٤. تاثیر فرونشانی PlGF بر روی بیان ژنهای مسیر رگزایی..... ١١٨
٤-٥. پیشنهادات..... ١١٩

منابع ۱۲۱

ضمیمه ۱۳۱

فهرست جداول

جدول ۲-۱: master mix جهت سنتز cDNA ۴۶
جدول ۲-۲: مخلوط حذف DNA ژنومی در واکنش رونویسی معکوس برای PCR Array System ۴۸
جدول ۲-۳: تهیه مخلوط کیت RT در واکنش رونویسی معکوس برای PCR Array System ۴۸
جدول ۲-۴: مواد مورد نظر برای انجام PCR ۵۰
جدول ۲-۵: مراحل واکنش PCR . (* دمای اتصال با توجه به نوع پرایمرها متغیر است.) ۵۰
جدول ۲-۶: توالی و مشخصات پرایمرهای طراحی شده و طول قطعات تکثیری ۵۱
جدول ۲-۷: master mix برای واکنش real-time PCR ۵۴
جدول ۲-۸: سیکل های واکنش real time RT-PCR ۵۴
جدول ۲-۹: تهیه مخلوط واکنش Real time RT- PCR ۵۶
جدول ۲-۱۰: مراحل آزمایش Array System Real time RT- PCR ۵۶
جدول ۲-۱۱: ترکیب و نحوه تهیه ژل بالا و پایین در SDS-PAGE ۶۲
جدول ۳-۱: میزان Ct واکنش PCR کنترل (PPC) ۱۰۴
جدول ۳-۲: میزان CtGDC که بیشتر از ۳۵ (N/A) است. در نتیجه آلودگی به DNA ژنومی وجود نداشت. ۱۰۴
جدول ۳-۳: میزان اختلاف Ct کنترل واکنش رونویسی معکوس (RTC) و کنترل واکنش PCR ۱۰۴
جدول ۳-۴: ژن هایی که پس از فرونشانی ژن PlGF تغییر بیان داشته اند ۱۰۷

فهرست شکل‌ها

شکل ۱–۱: نمای برش میانی چشم انسانی به همراه بزرگنمایی شبکیه..... ۵
شکل ۱–۲: نمای لایه‌های مختلف شبکیهٔ چشم انسان..... ۷
شکل ۱–۳: سلولهای تک لایه RPE با ظاهر شش وجهی و سنگفرشی (۶۰)..... ۸
شکل ۱–۴: چرخهٔ بینایی در مهره داران..... ۱۵
شکل ۱–۵: شمای خانوادهٔ VEGF که گروهی از فاکتورهای رشد می باشند ،..... ۲۰
شکل ۱–۶: مسیر های سیگنال دهی که توسط VEGF فعال می شوند (۴۰)..... ۲۲
شکل ۳–۱: نمای سلول های RPE A) بلافاصله پس از جداسازی از کرهٔ چشم..... ۷۲
شکل ۳–۲: نمای سلول های RPE A) پس از گذشت یک هفته..... ۷۲
شکل ۳–۳: نمایی از اشکال مختلف سلول های RPE..... ۷۳
شکل ۳–۴: سلول های RPE که با آنتی بادی RPE65 و با روش ایمونوسیتوشیمی شناسایی شده اند..... ۷۶
شکل ۳–۵: سلول های که با آنتی بادی سایتوکراتینو با روش ایمونوسیتوشیمی شناسایی شده اند..... ۷۷
شکل ۳–۶: الکتروفورز محصول PCR..... ۷۹
شکل ۳–۷: نمایی از پرده آمنیوتیک و سلولهای RPE که روی آن کشت شده اند..... ۸۱
شکل ۳–۸: منحنی های تکثیر کمی استاندارد GAPDH..... ۸۳
شکل ۳–۹: نمودار کمی بیان ژنهای RPE65 ، CRALBP، CD68، VEGF و تیروزیناز..... ۸۴
شکل ۳–۱۰: ساختارهای ثانویه توالی mRNA..... ۸۶
شکل ۳–۱۱: میزان ترانسفکشن الیگونوکلئوتیدهای siRNA به سلولهای RPE..... ۸۷
شکل ۳–۱۲: منحنی های تکثیر کمی PlGF. بالا: A) منحنی تکثیر، B) منحنی استاندارد..... ۸۹
شکل ۳–۱۳: نمودار کاهش بیان ژن PlGF..... ۹۰
شکل ۳–۱۴: فرونشانی بیان پروتئین خانواده ژنی PlGF بوسیله siRNA..... ۹۲
شکل ۳–۱۵: نمودار کمی بیان ژنهای RPE65 ،و... در سلولهای تیمار شده با PlGF-siRNA..... ۹۴
شکل ۳–۱۶: نمودار کمی مرگ برنامه ریزی شده سلولی..... ۹۶
شکل ۳–۱۷: نمودار تکثیر سلولی در سلولهای تیمار شده با PlGF-siRNA ۹۷
شکل ۳–۱۸: نمودار کمی مرگ برنامه ریزی شده سلولی در سلولهای تیمار شده با PlGF-siRNA..... ۹۸
شکل ۳–۱۹: نمودار میزان ترشح پروتئین VEGF..... ۱۰۰
شکل ۳–۲۰: نمودار کاهش رگزایی در سلولهای HUVECs..... ۱۰۲
شکل ۳–۲۱: توزیع سیکل آستانه (Ct) واکنش های Real-Time RT-PCR..... ۱۰۶
شکل ۳–۲۲: میزان تغییر بیان ژنها در سلولهای RPE تیمار شده با siRNA..... ۱۰۸
شکل ۳–۲۳: ژنهای AKT1..... ۱۰۹

۱ فصل اول

مقدمه

۱ـ۸. استحاله وابسته به سن ماکولا

استحاله وابسته به سن ماکولا[1] (AMD)، شایع ترین علت اختلال بینایی در اشخاص بالاتر از ۵۵ سال است و گمان می‌رود که ۳۰ درصد افراد بالای ۶۵ سال را نیز درگیر می‌کند. این بیماری هر ساله باعث نابینا شدن ۱۶۰۰۰ نفر می‌شود (۱).

معمول‌ترین نوع بیماری AMD نوع خشک[2] وتحلیل برنده می‌باشد که با از دست رفتن تدریجی دید مرکزی در یک چشم آغاز شده و در نهایت هر دو چشم را درگیر می‌کند. در بیماری AMD نوع تر[3] کاهش بینایی ناشی از AMD، به دلیل تغییرات ترشحی[4] ماکولا روی می دهد. افزایش نفوذپذیری عروق و رگزایی ناشی از بیماری AMD نوع تر، بواسطهٔ فاکتور رشد اندوتلیالی عروقی[5] (VEGF) ایجاد می‌شود. نوع تر یا ترشحی بیماری AMD، تمامی علائم نوع خشک را دارا بوده مضاف بر اینکه خونریزی در نواحی داخل و اطراف ماکولا نیز دیده می شود. خونرنریهایی که صورت می‌گیرد جذب نشده و تهاجم بافت فیبری- عروقی از مشیمیه و عروق خونی شبکیه می‌تواند سریعا منجر به از دست رفتن دید مرکزی شود (۲).

شیوع بیماری AMD با افزایش سن، بیشتر می‌شود. گمان می‌رود که فاکتورهای وراثتی و محیطی بر روی علت این بیماری اثر داشته باشند. مطالعات غیرمستقیم، شامل مطالعه بر روی دو قلوها و مطالعه بر روی خانواده‌هایی که وفور این بیماری در آن‌ها بیشتر می باشد، نشان داده است که عوامل وراثتی از اهمیت خاصی در ابتلا به این بیماری برخوردار می باشند. این فرضیه با کشف ژنهایی بر روی کروموزوم ۱ و کروموزوم ۱۰ که نقش مهمی را در این بیماری بازی می‌کنند، تأیید گردید. این بیماری مراحل مختلفی دارد، در مرحلهٔ اولیه، اجسام دروزن[6] و تغییرات رنگدانه‌ای در سلولها مشاهده می‌شود و مقداری از دید از دست می رود. مشاهده شده است که استفاده از ویتامین E و C و روی می‌تواند پیشروی این مرحله را به تأخیر بیندازد. مرحلهٔ دوم و مرحلهٔ پایانی این بیماری، نوع تر است که به دلیل

[1] Age related macular degeneration
[2] Dry-AMD
[3] Wet-AMD
[4] Exudative
[5] Vascular Endothelial Growth Factor
[6] Drusen bodies

تشکیل عروق خونی جدید یا نو- رگزایی مشمیه[1] (CNV)، منجر به از دست رفتن کامل بنیایی می‌شود. شبکه‌ای از عروق خونی، شبکیه را تغذیه می‌کنند. یکی از این شبکه‌ها بر روی سطح شبکیه واقع شده است و دیگری در عمق شبکیه (بر روی سطح خارجی غشاء براش) قرار دارد. عروق خونی غیر طبیعی در بیماری AMD از شبکهٔ عمقی‌تر عروق خونی که گردش خون مشیمیه[2] خوانده می‌شود، ناشی می‌شود. این عروق مسیر خود را از درون غشاء براش باز کرده و در زیر اپی تلیال رنگدانه ای شبکیه[3] (RPE) گسترش می‌یابند. خون و مایعات از آنها نشت کرده و باعث می‌شود تا سلولهای گیرنده های نوری[4] تخریب شده و ماکولا از سلولهایی که در زیر آن وجود دارد جدا شود (۳).

سایر سلولها، شامل آنهایی که عروق خونی را حمایت می‌کنند و برخی سلولها که مربوط به سیستم ایمنی می‌باشند نیز در فرآیند بیماری AMD درگیر می‌باشند. همچنین تعدادی از مولکول‌ها که فعالیت‌های تمام سلولهای لازم برای رشد عروق خونی را تنظیم می‌کنند نیز در فرایند بیماری AMD دخیل می‌باشند. به عنوان مثال، مقدار ترشح فاکتور رشد فیبروبلاستی بازی (FGF2[5] یا bFGF[6])، در بیماریهای تخریب کننده شبکیه افزایش پیدا می‌کند. در نو-رگزایی‌های نیز که در بیماری AMD در لایه سلولهای RPE رخ می‌دهد، تجمع بالایی از این فاکتور رشد فیبروبلاستی دیده شده است. زیرا bFGF نقش بالقوه‌ای در توسعهٔ نو- رگزایی مشمیه دارد. bFGF می‌تواند به طور مستقیم نو-رگزایی را القا کند زیرا باعث افزایش ترشح VEGF شده و تکثیر سلولهای اندوتلیالی نیز متعاقب آن افزایش پیدا می‌کند (۴).

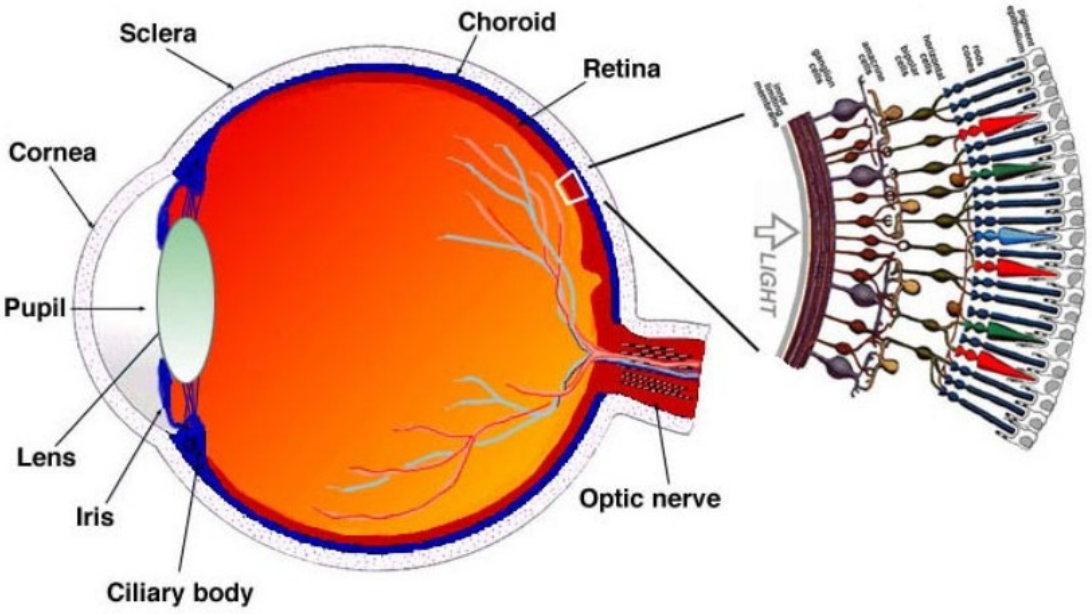
مطالعات اخیر نشان داده است که التهاب موضعی و فعال شدن سیستم کمپلمان نیز در میان سایر علل مؤثر در بیماریزایی AMD از نقش به سزایی برخوردار است. همچنین رنگدانه‌های بیس-رتینوئید[7]، از جمله A2E که به صورت لیپوفوشین در سلولهای RPE تجمع پیدا می‌کنند در پیشروی بیماری AMD اثر گذار می باشند (۵). طی بیماری AMD، سلولهای RPE تا حدی رنگدانه های خود را از دست داده و کوتاهتر می‌شوند. همچنین، این سلولها در قسمت هایی از شبکیه کاملا از بین رفته، در حالی که در نقاط دیگر بر روی یکدیگر تجمع پیدا می‌کنند. رسوباتی نیز به نام اجسام دروزن در ما بین لایهٔ سلولهای RPE و غشاء براش شکل می‌گیرد که منجر به تغییر شکل و تخریب آن نواحی می‌گردد (۳، ۶). از علائم اصلی تخریب ماکولا، تار و غیر واضح شدن دید مرکزی می‌باشد. اشیاء و اجسام ممکن است به صورت کج و زاویه دار و یا کوچکتر از اندازهٔ واقعی‌شان و خطوط صاف ممکن است به صورت

[1] Choroidal neovascularization
[2] Choroidal circulation
[3] Retinal pigment epithelium
[4] Photoreceptor cells
[5] Fibroblastic Growth Factor
[6] Basic Fibroblastic Growth Factor
[7] Bis -retinoid

مواج یا خمیده به نظر برسند. بیماران ممکن است در مرکز میدان دید خود نقطهٔ کور (یا سیاهی) را ببینند. درمان‌هایی که برای نوع تر بیماری وجود دارد، نمی‌تواند بینایی را به فرد برگرداند بلکه فقط پیشروی و روند آسیب بیشتر به دید مرکزی را کند می‌کند (۷).

۱ ۲. سلول های اپی تیلیال رنگدانه ای شبکیه

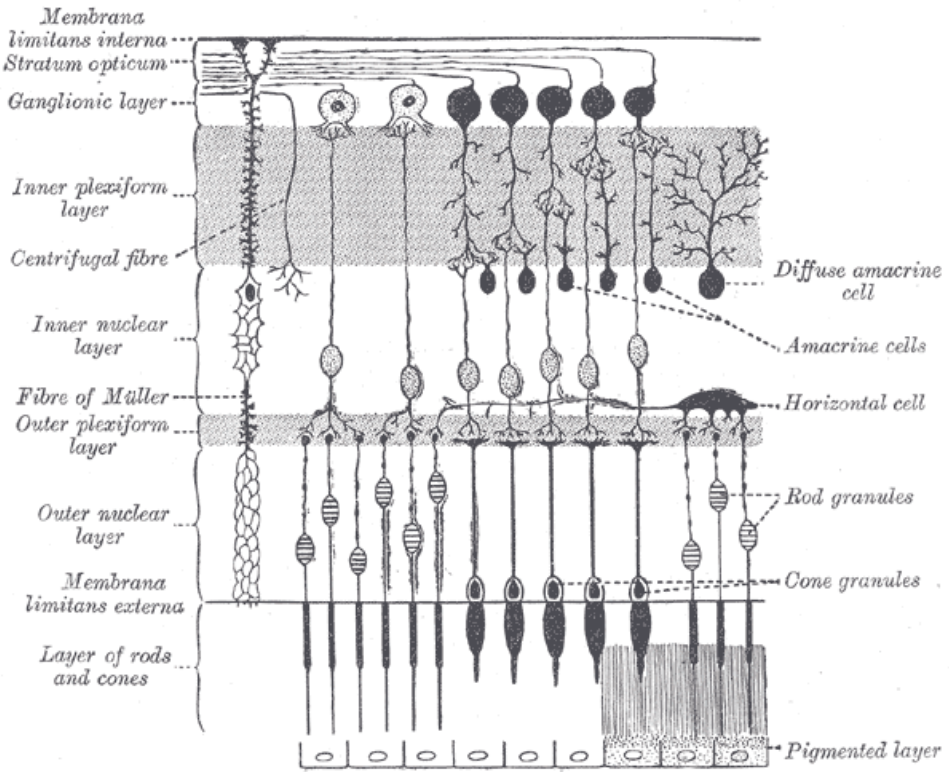
در ناحیه داخلی و انتهایی چشم، زیر سلولهای گیرنده های نوری، یک تک لایه از سلولهای اپی تیلیال رنگدانه ای شبکیه (RPE) قرار گرفته است (شکل۱-۱). که گیرنده های نوری را تغذیه می‌کند و خود این سلولها توسط عروق خونی مشیمیه تغذیه می‌شوند(۶، ۸).



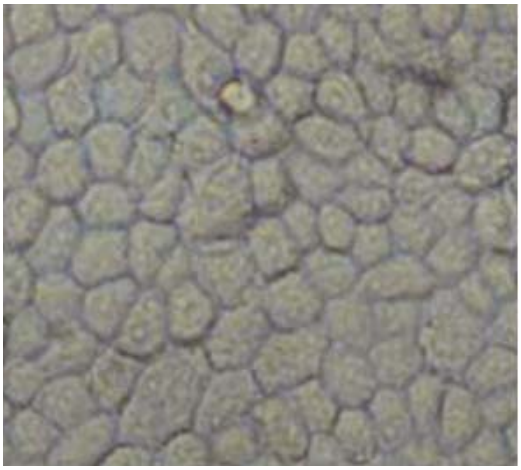
شکل ۱–۱: نمای برش میانی چشم انسانی به همراه بزرگنمایی شبکیه

سلولهای اپی تیلیال رنگدانه ای شبکیه (RPE) متشکل از یک تکه لایه سلولهای مکعبی ساده می‌باشد که ما بین مویرگهای مشیمیه و شبکیهٔ حسی- عصبی واقع شده است (شکل۱-۲). در یک چشم طبیعی، سلولهای RPE به صورت شش وجهی می‌باشند و در کنار یکدیگر همانند سنگفرش قرار گرفته‌اند (شکل۱-۳). اندازهٔ سلول RPE به سن فرد و محل قرارگیری سلول بر روی شبکیه بستگی دارد. سلولهای RPE در ماکولای افراد جوان، طولی به اندازهٔ ۱۴ میکرومتر و قطری معادل ۱۰ تا ۱۴ میکرومتر دارند. منشاء سلولهای RPE از اکتودرم عصبی می‌باشد. سلولهای RPE به رنگ قهوه‌ای خال خال می‌باشند که این رنگ به دلیل حضور ملانین[1] و سایر رنگدانه ها از جمله گرانولهای لیپوفوشین[2] می‌باشند (۶). با افزایش سن، گرانولهای لیپوفوشین در سلول های RPE تجمع پیدا کرده که خود می‌تواند منشاء تعدادی از ناهنجاریهای چشمی باشد. سلولهای RPE از یک قطبیت ساختاری و عملکردی برخورد می‌باشند که آنها را قادرمی سازد تا وظائف بسیار تخصص یافته‌ای را انجام دهند. غشاء سلول RPE از سطوح متفاوت فوقانی و تحتانی- جانبی برخوردار است (۸).

[1] Melanin
[2] Lipofuscin



شکل ۱–۲: نمای لایه‌های مختلف شبکیهٔ چشم انسان



شکل ۱–۳: سلولهای تک لایه RPE با ظاهر شش وجهی و سنگفرشی (۶۰)