

Human Retinal Pigmented Epithelium cells (hRPE) Potential for Retinal Regeneration Induction Trough Simulating Retinal Vascular Membrane (RVM) Using Fibrin Sealant Scaffold

Dabbaghi R, MS¹; Soliemani M, PhD¹; Rezaei Kanavi M, MD²; Balagholi S, PhD^{3*}; Karami S, MS³; Ahmadiyeh H, MD⁴

¹Department of Hematology, faculty of Allied Medicine, Tarbiat modares University of Medical Sciences, Tehran, Iran; ²Ocular Tissue Engineering Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran; ³Department of Hematology, School of Allied Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran; ⁴Ophthalmic research center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

* Corresponding author: saharbalagholi@gmail.com

Purpose: Retina regeneration through reprogramming process is an interesting topic for the retinal disorders and regeneration study. This phenomenon naturally happens in a few of amphibians even if the neural retina is completely removed by surgery. Studies show the critical role of FGF2 factor and RVM microenvironment in retinal regeneration. Thus, this study pays particular attention to regeneration potential of human RPE cell under the influence of the fibrin glue 3D structure as FGF2 reservoir and RVM like space.

Methods: hRPE cells were isolated from donor eyes of two adult humans. The cells were encapsulated with three concentrations of fibrin glue (FG1:42mg/dl, FG2:84mg/dl, FG3:126mg/dl) and FBS treated with 20% concentration was considered as control. Gene expressions of *PAX6*, *MMP2*, *RPE65*, *ACTA2*, *CRX*, *Thy-1*, *NogoA*, and *Integrin-B1* were analyzed, using real-time PCR.

Results: Gene expression of *Integrin B1* and *Thy-1* were significantly higher in FG1-treated cells compared to controls. Also, *PAX6* gene expression in FG1 concentration compared to control and FG3 showed a significant increase, while expression of *MMP2* gene expression at FG1 concentration showed a higher expression level than other concentrations, but only significant compared to FG3. *RPE65* expression in FG1, FG2 concentrations shows a significant increase compared to control; *ACTA2* gene expression was lower than 3 concentrations compared to control, but it was not significant. Also, expression of *NogoA* gene showed a significant decrease in FG1 concentration compared to control and FG3. In addition, the expression of the *CRX* gene was negative in all treatments and control. The immunocytochemistry results indicate that *PAX6* protein is not expressed in incubated specimens and controls in adult RPE cells, but these cells express specific proteins such as *RPE65*, *cytokeratin8.18* in both control and incubated specimens are positive.

Conclusion: Adult RPE cells at the concentration of FG1 (42 mg/dl) maintain certain adult characteristics, but exhibited signs of multipotency, which could indicate the potential of these cells for retinal tissue regeneration. This effect appears to be due to the presence of adhesion molecules such as *Fibronectin* and *Laminin* in fibrin glue that simulates the RVM like space, as well as the creation of an FGF2 reservoir and its localization, which leads to an increase of the *PAX6* gene expression.

Keywords: Fibrin Glue, Retinal Pigmented Epithelium Cells, Retinal Vascular Membrane

- Bina J Ophthalmol 2018; 23 (3): 201-208.

پتانسیل القای بازسازی شبکیه توسط سلول‌های اپیتلیوم پیگمانته شبکیه چشم انسان (hRPE) از طریق شبیه سازی غشای عروقی شبکیه (RVM) با استفاده از چسب فیبرینی

رسول دباغی^۱، دکتر مسعود سلیمانی^۲، دکتر مژگان رضایی کنوی^۳، دکتر سحر بالاقلی^۴، سمیرا کرمی^۵ و دکتر حمید احمدی^۶

هدف: بررسی پتانسیل القای بازسازی شبکیه توسط سلول‌های اپی‌تلیوم پیگمانته شبکیه چشم انسان با استفاده از چسب فیبرینی به عنوان مکانی برای ذخیره فاکتور (FGF2) fibroblast growth factor و تقلید فضای غشای عروقی شبکیه.

درجه سانتی‌گراد و CO₂ ۵ درصد انکوبه شد. کلیه آزمایش‌ها روی سلول‌های RPE پاساژهای ۵-۳ صورت گرفت.

ساخت چسب فیبرینی

سه کیسه کرایو که از انتقال خون تهیه شده بودند، مخلوط و تعیین غلظت شدند. (رقت اولیه: ۴۲۰ mg/dl). رقت‌های ۱۲۶:۳، ۸۴:۲، ۴۲:۱ mg/dl، FG از منبع اصلی تهیه شد. برای تولید چسب فیبرینی، از ترومبین اتولوگ استفاده گردید. به منظور نزدیک بودن فرایند تولید چسب فیبرینی به حالت طبیعی در بدن، عمل مجاورت ترومبین با غلظت‌های مختلف چسب فیبرینی در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت.

تهیه ترومبین از پلاسما

ترومبین اتولوگ، با اضافه کردن کلسیم گلوکونات با غلظت ۱ g/ml به پلاسما با نسبت ۱/۴ (یک حجم کلسیم گلوکونات به ۴ حجم پلاسما) بعد از ۱ ساعت انکوبه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به دست آمد و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره گردید^{۲۳،۲۸}.

انکپسوله کردن سلول‌های RPE با بستر چسب فیبرینی

تعداد ۵۰۰۰۰ سلول برای ارزیابی‌های مولکولی در فلاسک‌های T۲۵ و تعداد ۱۰۰۰۰ سلول برای بررسی‌های ایمونوسایتوشیمی برای پلیت ۲۴ خانه‌ای در نظر گرفته شد. این مقادیر سلولی به غلظت‌های مورد نظر اضافه گردید و پس از یکنواخت شدن، ترومبین برای ایجاد ساختار سه‌بعدی به آن‌ها اضافه شد. به این ترتیب سلول‌ها با بستر فیبرینی انکپسوله شدند. میزان ترومبین برای ایجاد چسب فیبرینی، ۱۰ درصد حجم کلی بود. سلول‌ها پس از ۵ روز از نظر بیان فنوتایپی و ژنوتایپی مورد بررسی قرار گرفتند.

ارزیابی ایمونوسایتوشیمی

سلول‌های انکپسوله شده با غلظت ۱ FG از نظر بیان پروتیین‌های ۸/۱۸، cytokeratin، RPE۶۵، PAX۶ مورد ارزیابی قرار گرفتند. برای این کار ابتدا هر چاهک با ۵۰۰ میکرولیتر PBS شستشو داده شد. سپس با استفاده از متانول ۱۰- درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه فیکس شد. هر چاهک ۳ بار با PBS شستشو گردید. میزان ۳۰۰ میکرولیتر از محلول بلاکینگ در هر چاهک ریخته شد و ۲۰ دقیقه انکوبه گردید. محلول بلاکینگ، تخلیه شده و یک بار با PBS شستشو داده شد. آنتی‌بادی اولیه (Santa Cruz Biotechnology, Texas, USA) به مدت یک شب در

سلولی)، عروق و جایگاهی برای انباشت عوامل رشد می‌باشد. در این میان اثر عامل FGF۲ در مطالعات متفاوتی روی بازسازی اعصاب نخاعی و شبکه به اثبات رسیده است. سلول‌های RPE پس از جدا شدن از لایه بروکس با چسبندگی مجدد به بستر RVM و تحت تاثیر عامل رشد FGF۲ انباشت شده در این بستر منجر به راه‌اندازی مسیرهایی می‌شوند که افزایش بیان PAX۶ به عنوان ژن اصلی مورد نیاز در فرایند بازسازی را به دنبال دارد^{۴-۶}. در مورد اهمیت ژن PAX۶ در فرایند بازسازی نیز نشان داده شده است که خاموش شدن این ژن منجر به عدم بازسازی شبکه و حالتی شبیه به PVR می‌شود که در حیوانات مورد مطالعه قرار گرفته است^۲.

پژوهش‌هایی که به مقایسه فرایندهای بازسازی در انسان و مهره‌داران اولیه پرداخته‌اند نشان‌دهنده کاهش توانایی بازسازی و انعطاف‌پذیری طی روند تکامل می‌باشند که به کسب ویژگی‌های منحصر به فرد در انسان منجر شده‌اند. مطالعات متعددی نشان‌دهنده توانایی بازسازی در بافت‌های مختلف انسان می‌باشد بنابراین به نظر می‌رسد این ویژگی در انسان باقی‌مانده و با تغییر شرایط و به خصوص ریزمحیط‌ها می‌توان این توانایی را به بدن بازگرداند^۵.

در این تحقیق با توجه به الگوی موجود در حیوانات دوزیست و با استفاده از چسب فیبرینی به عنوان مکانی برای ذخیره عامل FGF۲ و هم‌چنین تقلید فضای RVM، درصد شبیه‌سازی این محیط بر آمده و به بررسی ویژگی‌های سلول‌های RPE بعد از قرار گرفتن در این محیط پرداخته‌ایم.

روش پژوهش

کشت سلول‌های RPE

گلوب چشم دو فرد بزرگسال فوت شده از بانک چشم جمهوری اسلامی ایران تهیه شده و روی پلیت تمیز قرار داده شد، با تیغ از وسط چشم یک برش عمودی و برش دیگر عمود بر برش قبلی ایجاد شد تا بافت چشم به صورت چهار پر باز شود. قسمت‌های سیاه رنگ که حاوی سلول‌های RPE می‌باشند با پنس جدا شده و در آنزیم دیسپاز ۲ درصد (Gibco, Invitrogen corporation, Japan) قرار داده شد. محلول حاوی دیسپاز و بافت مربوطه به مدت یک ساعت در انکوباتور قرار داده شد. بعد از این مدت، محلول حاوی سلول و آنزیم، سانتریفوژ گردید. رسوب حاصل از سانتریفوژ به فلاسک T۲۵ که حاوی (GIBCO-BRL, MEM/F۱۲ Eggenstein, Germany) و ۲۰ درصد FBS (GIBCO-BRL, Eggenstein, Germany) می‌باشد منتقل شد و در دمای ۳۷

Real-time hexamer و کیت سنتز cDNA (آریا طوس) و واکنش PCR کمی با استفاده از مستر میکس sybr green (آریا طوس) صورت گرفت. متغیرهای PCR عبارت بودند از denaturation (یک چرخه در ۹۵ °C به مدت ۱۵ دقیقه) و ۴۰ چرخه به ترتیب در denaturation (۹۵ °C به مدت ۱۵ ثانیه) amplification (۶۴-۵۶ °C به مدت ۱۷ ثانیه) و quantification (۷۲ °C به مدت ۲۵ ثانیه). تمامی آزمایشات به صورت سه‌تایی انجام شدند و مقادیر بیان mRNA به صورت $2^{-\Delta\Delta CT}$ محاسبه گردید. برای نرمالیزه کردن مقادیر به دست آمده، از GAPDH به عنوان شاهد داخلی استفاده شد. توالی پرایمرها برای Real-time PCR در جدول ۱ نمایش داده شده است.

دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با سلول‌ها انکوبه شد. بعد از این زمان هر چاهک سه بار و هر بار به مدت ۳ دقیقه با محلول PBS شستشو داده شد. آنتی‌بادی ثانویه (Santa Cruz Biothecnology, Texas, USA) به مدت ۴۵ دقیقه با سلول‌ها مجاور گردید. بعد از این زمان چاهک‌ها سه بار با PBS شستشو داده می‌شود و از DAPI (Santa Cruz Biothecnology, Texas, USA) برای رنگ کردن هسته‌ها و در انتها از میکروسکوپ Olympus IXY۱ برای مشاهده سلول‌ها استفاده شد.

Real-time RT-PCR

واکنش رونویسی معکوس با استفاده از پرایمر Random

توالی پرایمرهای مورد استفاده در آنالیز بیان ژن به روش qRT-PCR

پرایمر	توالی	طول محصول
RPE65 (F)	5'ACCACAGAAGGTTTCATCCG 3'	163
RPE65 (R)	5'AGGGCATTGTCAGTAACCTC 3'	
GAPDH (F)	5'GAAGGTGAAGGTCGGAGTC 3'	226
GAPDH (R)	5'GAAGATGGTGATGGGATTTTC 3'	
PAX6 (F)	5'CGGTGAATGGGCGGAGTTATG3'	137
PAX6 (R)	5'GGGAAGTGAAGTGGACTGACAC3'	
MMP2(F)	5'TGGCAAGTACGGCTTCTGTC3'	180
MMP2(R)	5'TTCTTGTCGCGGTCTAGTC 3'	
α SMA(F)	5'CCCTTGAGAAGAGTTACGAGTTG3'	192
α SMA (R)	5'GGACATTGTTAGCATAGAGG 3'	
Integrin B1 (F)	CGCGCGGAAAAGATGAATTTAC	120
Integrin B1 (R)	TCCACATGATTTGGCATTTC	
NogoA (F)	GCGTAACAGCCTACATTGCC	193
NogoA (R)	GTGCAGTTCACATGACCAAGAG	
CRX	GAGTCCAGGGTTTCTGTTG	154
CRX	CATCTGTGGAGGGTCTTGGG	
Thy-1	GTGAAAAGTGGGGGCTCC	120
Thy-1	GTTTCATGGTTCTGGGATCTC	

گروه شاهد افزایش معنی‌داری نشان داد. بیان ژن PAX6 در غلظت FG1 نسبت به گروه شاهد و FG3 افزایش معنی‌داری نشان داد. بیان ژن MMP2 در غلظت FG1 سطح بالاتری از بیان را نسبت به سایر غلظت‌ها نشان داد که فقط در مقایسه با غلظت FG3 معنی‌دار بود. بیان ژن RPE65 نیز در غلظت‌های FG1، FG2 افزایش معنی‌داری را نسبت به گروه شاهد نشان داد. ضمن آن که در هر سه غلظت، کاهش در بیان ژن ACTA2 نسبت به گروه شاهد مشاهده گردید اما این کاهش بیان معنی‌دار نبود. بیان ژن NogoA نشان‌دهنده کاهش معنی‌داری در غلظت FG1 نسبت به گروه شاهد و FG3 می‌باشد. ضمن آن که بیان ژن CRX در همه نمونه‌ها منفی بود.

تحلیل آماری

به منظور بررسی نتایج حاصل از بررسی بیان ژن (Real-time PCR) و مقایسه چندتایی (multiple comparison) بین گروه‌ها از آزمون کروסקال-والیس استفاده شد. کلیه آزمون‌ها به صورت سه‌تایی صورت گرفت و تحلیل‌ها توسط نرم‌افزار آماری SPSS ویرایش ۲۲ انجام شد. مقدار P کوچک‌تر از ۰/۰۵ معنی‌دار تلقی گردید.

یافته‌ها

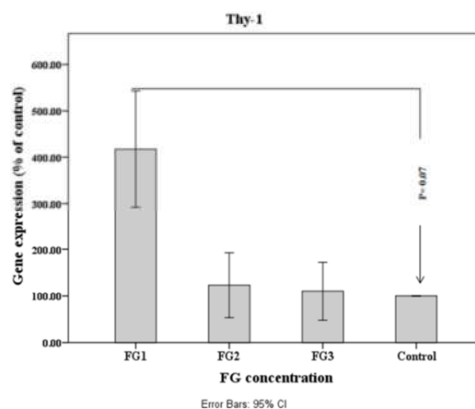
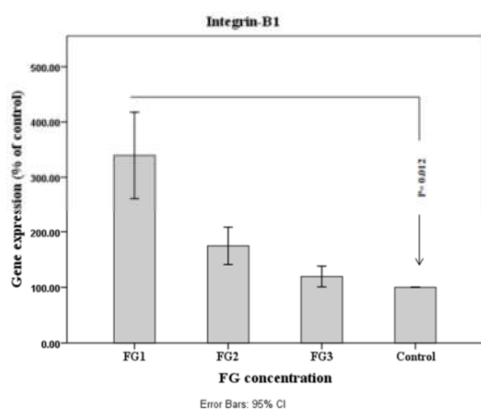
نتایج بیان ژن

بیان ژن‌های Integrin B1، Thy-1 در غلظت FG1 نسبت به

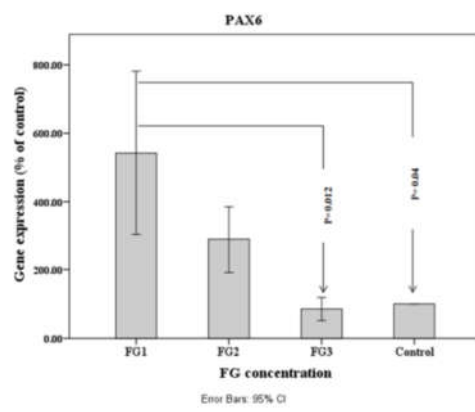
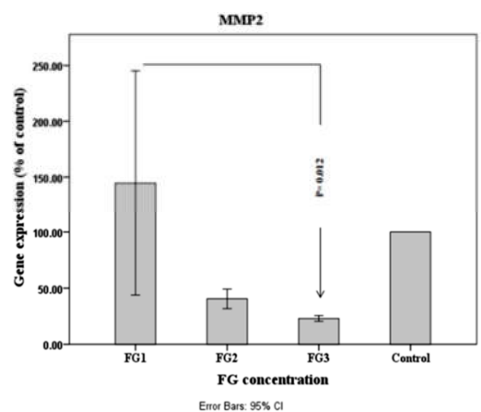
نتایج بررسی ایمنوسایتوشیمی

بزرگسال بود. این سلول‌ها از نظر بیان مارکرهای
 RPE65، cytokeratin ۸/۱۸ در نمونه‌های گروه شاهد و نمونه‌های
 انکپسوله شده مثبت بودند.

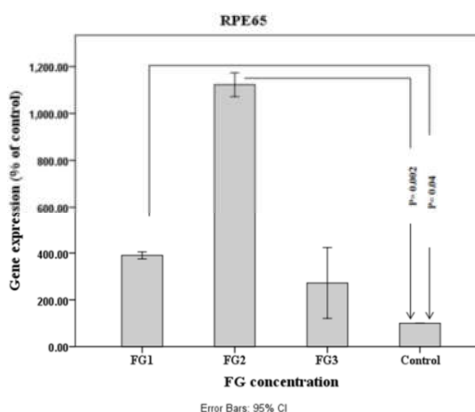
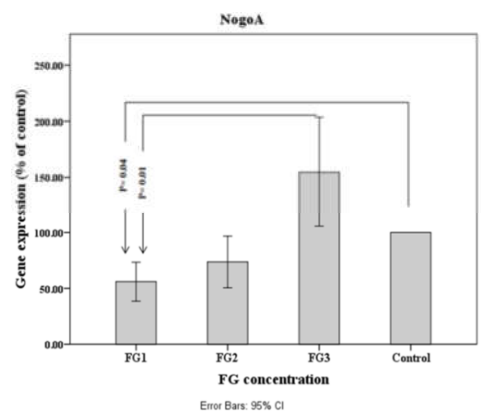
نتایج نشان‌دهنده عدم بیان مارکرهای PAX6 در نمونه‌های
 تحت انکپسوله شده با غلظت FG1 و شاهد در سلول‌های RPE



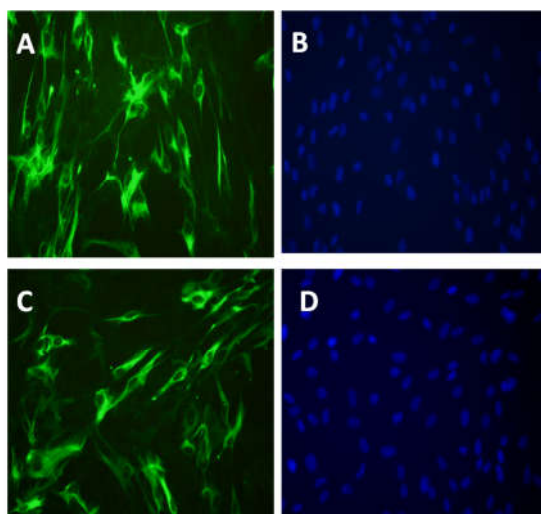
تصویر ۱- بیان ژن‌های Integrin B1، Thy-1 در غلظت FG1 نسبت به گروه شاهد افزایش معنی‌داری نشان داد.



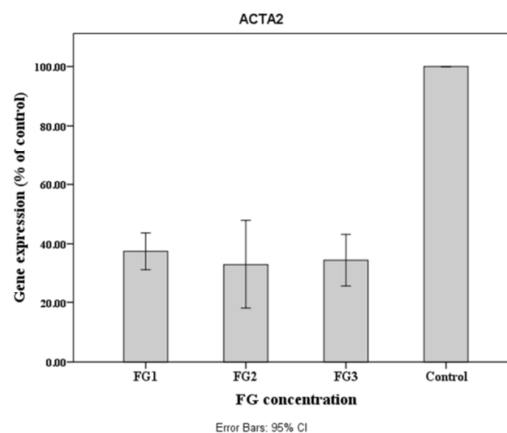
تصویر ۲- بیان ژن PAX6 در غلظت FG1 نسبت به شاهد و FG3 افزایش معنی‌داری نشان داد. ژن MMP2 در غلظت FG1 سطح بالاتری از بیان را نسبت به
 سایر غلظت‌ها نشان داد که در مقایسه با غلظت FG3 معنی‌دار بود.



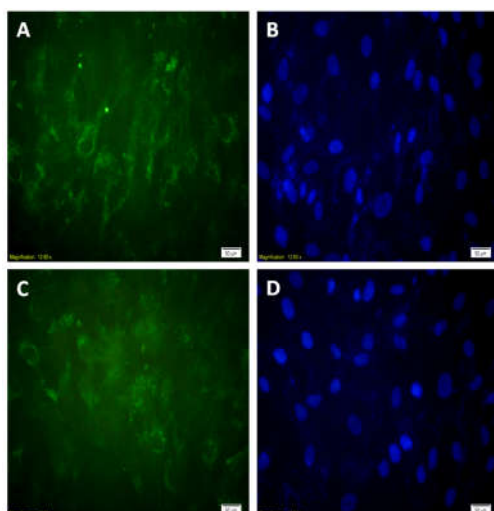
تصویر ۳- ژن RPE65 در غلظت‌های FG1، FG2 افزایش معنی‌داری را نسبت به شاهد نشان داد. بیان ژن NogoA نشان‌دهنده کاهش معنی‌داری در غلظت
 FG1 نسبت به شاهد و FG3 بود.



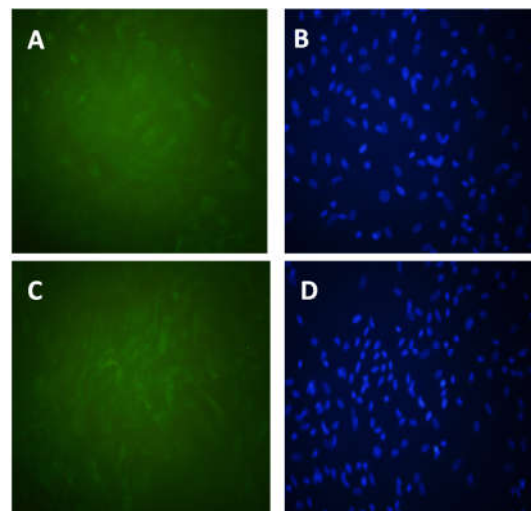
تصویر ۵- سلول‌های RPE بزرگسال پروتیین اختصاصی Cytokeratin $\lambda_1\lambda_8$ را در سلول‌های انکپسوله شده با غلظت (A=FITC, B=DAPI) و FG λ_1 و (C=FITC, D= DAPI) شاهد بیان کردند (بزرگ‌نمایی ۲۰۰ برابر)



تصویر ۴- بیان ژن ACTA2 در هر سه غلظت نسبت به شاهد کاهش نشان داد اما این کاهش بیان معنی‌دار نبود.



تصویر ۷- سلول‌های RPE بزرگسال پروتیین اختصاصی RPE65 را در سلول‌های انکپسوله شده با غلظت (A=FITC, B=DAPI) و FG λ_1 (C=FITC, D= DAPI) شاهد بیان کردند (بزرگ‌نمایی ۲۰۰ برابر)



تصویر ۶- سلول‌های RPE بزرگسال پروتیین PAX6 را در نمونه‌های انکپسوله شده با غلظت (A=FITC, B=DAPI) و FG λ_1 (C=FITC, D= DAPI) شاهد بیان نکردند (بزرگ‌نمایی ۲۰۰ برابر)

کاهش بیان مارکر α SMA اشاره نمود.

در این مطالعه با توجه به اهمیت عامل FGF2 و غشای عروقی شبکیه (RVM) در القای بازسازی شبکیه، چسب فیبرینی به عنوان بستری برای انباشت و محافظت از عامل FGF2 و شبیه‌سازی فضای RVM در غلظت‌های مختلف مورد ارزیابی قرار گرفت. در این مورد مطالعه A Sahni^۷ و همکاران^۷ نشان دادند که چسب فیبرینی می‌تواند از هضم آنزیمی FGF2 جلوگیری نموده و منجر به پایداری آن در محیط شود. هم‌چنین مطالعه Chu^۸ و همکاران^۸ نشان داد

بحث

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که سلول‌های RPE بالغ در غلظت FG λ_1 (۴۲ mg/dl) ضمن حفظ ماهیت خود، نشانه‌هایی از pluripotency را بروز می‌دهند که می‌تواند نشان‌دهنده توانایی این سلول‌ها در بازسازی بافت شبکیه باشد. این الگوی بیان ژن با مطالعات صورت گرفته در بررسی ژن‌های دخیل در بازسازی شبکیه در حیوانات دوزیست هم‌خوانی دارد که از آن جمله می‌توان به افزایش بیان PAX6، Integrin B1، MMP2 هم‌زمان با

که چسب فیبرینی به عنوان منبع ذخیره برای FGF محسوب می‌شود به طوری که در این مطالعات به منظور شبیه‌سازی فضای سه‌بعدی از چسب فیبرینی برای پایداری این عامل استفاده شد. در مطالعه دیگری که توسط Wilson و همکاران^۹ صورت گرفت، با توجه به وجود پیوندهای FGF در چسب فیبرینی به منظور دارورسانی و حمل این عامل رشد، از چسب فیبرینی استفاده شد. علاوه بر نقش چسب فیبرینی به عنوان منبع ذخیره عامل FGF₂، این بستر سه‌بعدی از نظر داشتن مولکول‌های دخیل در چسبندگی مانند فیبرونکتین و لامینین نقش مهمی در القای بازسازی بازی می‌کنند. مولکول لامینین نیز به عنوان عاملی مهم در فرایند بازسازی معرفی شده است تا جایی که القای بازسازی به واسطه این مولکول در سلول‌های RPE قورباغه ثابت شده است.^۷ کشت سلول‌های RPE در *in vitro* بر روی بسترهای سه‌بعدی مختلف نشان داده که تنها لامینین قادر به القای دگر تمایز در این سلول‌ها می‌باشد.^۴

به نظر می‌رسد با وجود گیرنده‌های FGF₂ در چسب فیبرینی، این بستر به عنوان جایگاهی برای ذخیره و جلوگیری از پرتولیز این عامل عمل می‌کند. این ویژگی در کنار شبیه‌سازی فضای RVM به واسطه وجود مولکول‌های چسبندگی لامینین و فیبرونکتین در چسب فیبرینی موارد مورد نیاز برای القای بازسازی توسط سلول‌های RPE را فراهم می‌کند و منجر به افزایش بیان ژن‌های دخیل در فرایند بازسازی نظیر PAX6 می‌شود. در مطالعه حاضر، مارکر PAX6 در سطح ژن و پروتئین بررسی شد. در این خصوص افزایش بیان ژن PAX6 در غلظت FG1 مشاهده گردید. ضمن آن که بیان این ژن در دو غلظت بعدی نیز نسبت به گروه شاهد افزایش داشت. به نظر می‌رسد ساختار سه‌بعدی غلظت FG1 شرایط مناسب‌تری را برای القای بازسازی ایجاد نموده است زیرا با افزایش سفتی بستر سه‌بعدی در غلظت‌های FG2 و FG3، بیان ژن PAX6 کم‌تر می‌شود. با این حال بیان پروتئین PAX6 در هیچ کدام از تیمارها و گروه شاهد مشاهده نشد. در این مورد این احتمال مطرح می‌شود که یا سطح پروتئین کم‌تر از حدی است که با تست ایمونوسایتوشیمی قابل ارزیابی باشد و یا اصلاحاتی در پروتئین رخ داده که منجر به عدم تشخیص توسط آنتی‌بادی مربوطه گردیده است. در مورد اهمیت بیان ژن PAX6 در القای بازسازی مطالعات بسیاری صورت گرفته تا جایی که ثابت شده آسیب به شبکه بدون افزایش بیان PAX6 در حیوانات دوزیست منجر به حالتی شبیه به PVR می‌شود.^۷ در مطالعه MM Casco-Robles و همکاران^۲ خاموش شدن ژن PAX6 منجر به حالتی شبیه به PVR شد و از

تمایز جلوگیری کرد.

با توجه به حفظ ماهیت سلول‌های RPE و بیان مارکر اختصاصی RPE65 در سطح ژن و نیز پروتئین، همزمان با افزایش بیان ژن PAX6، القای فرایند بازسازی محتمل است. در این رابطه Md. Rafiqul Islam و همکاران - نشان دادند RPE‌های سمندر آبی (newts) برای القای بازسازی به حالت‌های سلول‌های بنیادی بر نمی‌گردد بلکه مارکرهای اختصاصی را حفظ کرده و ویژگی چندگانه (multipotency) به دست می‌آورد. Inami W و همکاران^۳ نیز نشان دادند افزایش انواع ۱ و ۲ ژن PAX6 منجر به القای حالت برنامه‌ریزی مجدد (Reprogramming) می‌شوند و به نظر می‌رسد که افزایش بیان این ژن نشان‌دهنده تمایز به سمت سلول‌های عصبی شبکه می‌باشد. Casco-Robles و همکاران^۲ در مطالعه‌ای افزایش بیان PAX6 بدون تمایز میوفیبروبلاستی (عدم افزایش بیان α SMA) را عامل اصلی القای برنامه‌ریزی مجدد و به دنبال آن بازسازی در این گونه حیوانی می‌دانند.

در مطالعه حاضر افزایش بیان PAX6 و کاهش بیان مارکر α SMA به عنوان مارکر تمایز فیبروبلاستی می‌تواند نشان‌دهنده القا حالت برنامه‌ریزی مجدد در مواجهه با این بستر سه‌بعدی در غلظت FG1 باشد. ضمن آن که افزایش بیان MMP2 در این غلظت نیز تایید کننده این مساله می‌باشد. در این خصوص Araki و همکاران^۴ نشان دادند که افزایش بیان MMPs اولین مرحله القای حالت برنامه‌ریزی مجدد و در نتیجه بازسازی می‌باشد. افزایش بیان PAX6 در FG1 در مقایسه با FG2، FG3، احتمالاً به این علت می‌باشد که این غلظت ضمن ایجاد فضای سه‌بعدی به دلیل نفوذپذیری و ایجاد ارتباطات بین‌سلولی، زمینه مناسبی را برای ایجاد بازسازی القا می‌کند. Araki در مطالعه خود به نقش RVM در روند بازسازی شبکه اشاره نمود. RVM فضایی شامل مویرگ‌های خونی و ماتریکس خارج سلولی است که منجر به رشد پروژنیوتورها و پیشرفت فرایند بازسازی می‌شود.^۴ با توجه به ماهیت چسب فیبرینی، تقلید حالت RVM در این بستر سه‌بعدی دور از انتظار نیست. مطالعه Islam^۱ نیز نشان داد که بعد از رتینکتومی، لایه بروکس به علت گشاد شدن عروق پیچ می‌خورد و جریان خون افزایش می‌یابد که این وضعیت شبه‌التهابی در ایجاد ناحیه RVM نقش دارد.

نکته قابل توجه دیگر در این مطالعه افزایش بیان مولکول چسبندگی integrin B1 در غلظت FG1 می‌باشد. در این راستا Ju YE و همکاران^{۱۰} توانایی بازسازی سلول‌های عصبی را در فیبرین حاصل از خون گوساله، انسان و ماهی مقایسه نمودند و نتایج آن‌ها

صورت گرفت. بیان ژن CRX در هیچ کدام از نمونه‌ها مشاهده نشد ولی بیان ژن Thy-۱ در غلظت FG۱ نسبت به گروه شاهد افزایش معنی‌داری نشان داد. این مساله می‌تواند احتمال تمایز به سمت سلول‌های گانگلیونی در نتیجه القای بازسازی به وسیله چسب فیبرینی را مطرح کند ولی اثبات این قضیه نیاز به بررسی‌های بیش‌تری دارد.

نتیجه‌گیری

تغییر ریزمحیط شبکیه و شبیه‌سازی فضای RVM توسط چسب فیبرینی می‌تواند توانایی بازسازی را در سلول‌های RPE از حالت بالقوه به بالفعل تغییر دهد. از آن جایی که چسب فیبرینی را می‌توان به صورت اتولوگ تهیه نمود و این محصول خطر بروز پاسخ‌های ایمنی و مضر را به همراه ندارد، می‌توان آن را به عنوان گزینه مناسبی برای القای بازسازی شبکیه در انسان در نظر گرفت.

نشان داد که فیبرین به دست آمده از ماهی بهتر می‌تواند گسترش دندریت و آکسون‌های سلول‌های عصبی را فراهم آورد؛ آن‌ها نشان دادند که آنتی‌بادی‌های بلوکه‌کننده اینتگرین منجر به کاهش شکل‌گیری ویژگی‌های عصبی می‌شود و به این ترتیب اهمیت اتصالات اینتگرین و سیگنال‌های حاصل از آن را در تمایز و شکل‌گیری سلول‌های عصبی نشان دادند. بنابراین افزایش PAX۶ هم‌زمان با کاهش SMA و افزایش مارکرهای MMP۲ و B۱ integrin می‌تواند احتمال القای برنامه‌ریزی مجدد و بازسازی را در غلظت FG۱ قوت ببخشد. بررسی‌های صورت گرفته در رابطه با بیان ژن NogoA نشان‌دهنده کاهش معنی‌دار بیان این ژن در غلظت FG۱ نسبت به FG۳ و گروه شاهد می‌باشد. کاهش بیان این ژن احتمال القای بازسازی در غلظت FG۱ را قوت می‌بخشد زیرا در مطالعات فراوانی ثابت شده که محصول این ژن اثر ممانعتی در القای بازسازی بعد از آسیب ایجاد می‌کند.

برای مشخص کردن نوع تمایز، بررسی ژن‌های CRX و Thy-۱

منابع

1. Islam MR, Nakamura K, Casco-Robles MM, et al. The newt reprograms mature RPE cells into a unique multipotent state for retinal regeneration. *Sci Rep* 2014;4:6043.
2. Casco-Robles MM, Islam MR, Inami W, et al. Turning the fate of reprogramming cells from retinal disorder to regeneration by Pax6 in newts. *Sci Rep* 2016;6:33761.
3. Inami W, Islam MR, Nakamura K, et al. Expression of two classes of pax6 transcripts in reprogramming retinal pigment epithelium cells of the adult newt. *Zoolog Sci* 2016;33:21-30.
4. Araki M. A novel mode of retinal regeneration: the merit of a new *Xenopus* model. *Neural Regen Res* 2014;9:2125-2127.
5. Barbosa-Sabanero K, Hoffmann A, Judge C, et al. Lens and retina regeneration: new perspectives from model organisms. *Biochem J* 2012;447:321-334.
6. Grigoryan EN, Markitantova YV. Cellular and molecular preconditions for retinal pigment epithelium (rpe) natural reprogramming during retinal regeneration in urodela. *Biomedicines* 2016;4.
7. Sahni A, Baker CA, Sporn LA, et al. Fibrinogen and fibrin protect fibroblast growth factor-2 from proteolytic degradation. *Thromb Haemost* 2000;83:736-741.
8. Chu H, Gao J, Chen CW, et al. Injectable fibroblast growth factor-2 coacervate for persistent angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011;108:13444-13449.
9. Wilson D, Feldman D, Thompson JA. Fibrin Glue as a Matrix for a-FGF Delivery in vivo," Trans. of the 19th Annual Meeting of the Soc. for Biomaterials.
10. Ju YE, Janmey PA, McCormick ME, et al. Enhanced neurite growth from mammalian neurons in three-dimensional salmon fibrin gels. *Biomaterials* 2007;28:2097-2108.