

## Ocular Safety of Intravitreal Anti Connective Tissue Growth Factor Neutralizing Antibody

Motevasseli T, MD<sup>1</sup>; Daftarian N, MD<sup>2\*</sup>; Rezaei Kanavi M, MD<sup>2</sup>; Ahmadi H, MD<sup>1</sup>; Bagheri A, MSc<sup>3</sup>; Hosseini B, MD<sup>4</sup>; Ansari S, MD<sup>1</sup>; Soheili ZS, PhD<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Ophthalmic Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran; <sup>2</sup>Ocular Tissue Engineering Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran; <sup>3</sup>University of Social Welfare and Rehabilitation Sciences, Tehran, Iran; <sup>4</sup>Central Eye Bank of Iran, Tehran, Iran; <sup>5</sup>National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran

\*Correspondence: nardaftarian@gmail.com

**Purpose:** To determine the maximum safe dose for intravitreal injection of anti-CTGF (IVAC) in rat eyes in order to decrease gene and protein expression of connective tissue growth factor (CTGF) for the treatment of ocular fibrotic disorders.

**Methods:** Forty-five Lister hooded pigmented rats were divided into one of the five groups of 9 rats; 4 out of these 5 groups received different doses of IVAC (2 l); 10 µg/ml in group B, 20 µg/ml in group C, 50 µg/ml in group D, and 100 µg/ml in group E. The sham group (group A) received 2 l of normal saline. Full field electroretinography (ERG) was performed at baseline and on days 7 and 28 after the IVAC injection. At end of the study, the animals were euthanized and the injected eyes were subjected to routine histopathology, immunohistochemistry for glial fibrillary acidic protein (GFAP), and terminal transferase dUTP nick end-labeling (TUNEL) assay.

**Results:** In group E, Baseline scotopic rod b-wave amplitude and maximal combined b-wave amplitude were 111.89±71.2 v and 178.57 ±55.58 v, respectively, which significantly reduced to 79.31 ± 52.59 v and 128.73 ± 41.61 v, respectively, after 28 days (P<0.05). There was no significant reduction in the amplitudes of ERG in other groups that received lower doses of anti-CTGF antibody and in the sham group. Reduction in oscillatory potentials was also noticed after 7 and 28 days in group E (46.24±18.05 v at baseline, 30.03±15.95 v on day 7, P<0.05 and 29.79±12.20 v on day 28, P<0.001) but not in other groups. Photopic ERG responses did not show any significant change in any groups. ImageJ software cell counter indicated that retinal ganglion cells were significantly decreased in group E as compared to other groups. GFAP immune reactivity was not significant in any of the groups. TUNEL test showed inner retinal neural cell apoptosis only in group E.

**Conclusion:** ERG, histopathologic, and apoptotic assays revealed no toxic effects of 10 to 50 µg/ml of IVAC in the rat eyes. The injection of 100µg/ml IVAC, however, caused significant deleterious effects on both retinal function and structure as demonstrated by functional tests, and histopathologic and TUNEL findings.

**Keywords:** Anti-CTGF, GFAP, Intravitreal, Toxicity, TUNEL

• Bina J Ophthalmol 2016; 21 (4): 307-315.

Received: 13 April 2016

Accepted: 3 May 2016

### تعیین حداکثر غلظت ایمن تزریق داخل ویتره Anti-CTGF Neutralizing Antibody در موش بزرگ آزمایشگاهی

دکتر تهمینه متوسلی<sup>۱</sup>، دکتر نارسیس دفتریان<sup>۲</sup>، دکتر مژگان رضایی کنوی<sup>۲</sup>، دکتر حمید احمدیه<sup>۲</sup>، ابودر باقری<sup>۵</sup>، دکتر سید باقر حسینی<sup>۱</sup>، دکتر شبنم انصاری<sup>۱</sup>، دکتر زهرا سهیلا سهیلی<sup>۲</sup>

**هدف:** فاکتور رشد بافت همبند (CTGF: Connective Tissue Growth Factor) دارای خاصیت پروفیبروتیک در بیماری‌های مختلف چشم مانند رتینوپاتی دیابتیک پرولیفراتیو (PDR: Proliferative Diabetic Retinopathy) و پرولیفراتیو ویترورتینوپاتی (PVR: Proliferative Vitreoretinopathy) می‌باشد. در مطالعه آزمایشگاهی (In vitro) نشان دادیم که ۱۰ µg/ml از آنتی‌بادی علیه CTGF به همراه ۰/۸ میلی‌گرم از بواسیزوماب در محیط کشت سلولی RPE (Retinal pigmented epithelium) سبب

کاهش بروز ژن و پروتیین CTGF می‌گردد. در مطالعه حاضر که یک مطالعه In vivo می‌باشد به بررسی حداکثر دوز ایمن Anti-CTGF در زجاجیه (IVAC: Intravitrealinjection of anti-CTGF) در موش بزرگ آزمایشگاهی (Rat) می‌پردازیم. روش پژوهش: ۴۵ موش بزرگ آزمایشگاهی رنگی (پیگمانته) بر اساس مقررات ARVO در چهار گروه، میزان ۲ μ از IVAC را در غلظت‌های ۱۰ μg/ml و ۲۰ μg/ml و ۵۰ μg/ml و ۱۰۰ μg/ml و یک گروه هم به عنوان گروه Sham، ۲ μ از نرمال سالین دریافت کردند. برای تمامی گروه‌ها الکتروترینوگرام (ERG) در روزهای اول و هفتم و بیست و هشتم انجام شد. پس از کشتن موش‌ها، گلوب‌های انوکله شده مورد بررسی‌های پاتولوژی، ایمونوهیستوشیمی (Immunohistochemistry, GFAP) و آزمایش TUNEL (Terminal transferase dUTP nick end-labeling assay) قرار گرفتند.

**یافته‌ها:** در شرایط اسکوتوپیک، آمپلیتود موج b، مربوط به پاسخ گیرنده‌های نوری استوانه‌ای و آمپلیتود موج b در شرایط Maximum Combined در گروه ۱۰۰ μg/ml قبل از تزریق به ترتیب ۱۱۱/۸۹±۷۱/۲ μV و ۱۷۸/۵۷±۵۵/۵۸ بود که به طور معناداری در روز ۲۸ کاهش یافت (به ترتیب ۷۹/۳۱±۵۲/۵۹ μV و ۱۲۸/۷۳±۴۱/۶۱ μV با P<۰/۰۵). در سایر گروه‌ها با مقادیر کم‌تر IVAC و هم‌چنین در گروه شاهد، این اثر مشاهده نشد. کاهش در موج Oscillatory Potential نیز در روزهای ۷ و ۲۸ در گروه ۱۰۰ μg/ml دیده شد (قبل از تزریق: ۴۶/۲۴±۱۸/۰۵ μV و روز هفتم: ۳۰/۰۳±۱۵/۹۵ μV، P<۰/۰۵ و روز ۲۸: ۲۸/۲۰±۲۹/۷۹ μV با P<۰/۰۰۱). در بررسی بافت‌شناسی کاهش معناداری در تعداد سلول‌های گانگلیونی شبکیه در گروه E مشهود بود. در آزمایش GFAP reactivity، در هیچ یک از گروه‌ها نسبت به گروه کنترل اختلاف معناداری دیده نشد و لی در آزمایش TUNEL، آپوپتوزیس در لایه‌های داخلی شبکیه در گروه با غلظت ۱۰۰ μg/ml مشهود بود.

**نتیجه‌گیری:** با توجه به نتایج حاصل از تست ERG، بافت‌شناسی و TUNEL به نظر می‌رسد که تزریق داخل زجاجیه Anti-CTGF با غلظت ۱۰۰ μg/ml در موش بزرگ آزمایشگاهی برای شبکیه مضر می‌باشد. غلظت ۵۰ μg/ml و کم‌تر در مطالعات بعدی که از لحاظ اثربخشی تزریق داخل زجاجیه Anti-CTGF انجام خواهد شد، توصیه می‌گردد.

• مجله چشم‌پزشکی بینا ۱۳۹۵؛ دوره ۲۱، شماره ۴: ۳۰۷-۳۱۵.

• پاسخ‌گو: دکتر نارسیس دفتریان (e-mail: nardaftarian@gmail.com)

دریافت مقاله: ۲۵ فروردین ۱۳۹۵

تایید مقاله: ۱۴ اردیبهشت ۱۳۹۵

- ۱- دستیار چشم‌پزشکی- مرکز تحقیقات چشم- دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی- تهران- ایران
  - ۲- استادیار- چشم‌پزشک- مرکز تحقیقات مهندسی بافت چشم- دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی- تهران- ایران
  - ۳- دانشیار- چشم‌پزشک- مرکز تحقیقات مهندسی بافت چشم- دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی- تهران- ایران
  - ۴- استاد- چشم‌پزشک- مرکز تحقیقات چشم- دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی- تهران- ایران
  - ۵- دانشجوی دکتری ژنتیک- دانشگاه علوم بهزیستی و توانبخشی- تهران- ایران
  - ۶- چشم‌پزشک- فلوشیپ پاتولوژی چشم- بانک چشم جمهوری اسلامی ایران
  - ۷- دانشیار- دکتری PhD ژنتیک- مرکز ملی مهندسی ژنتیک و بیوتکنولوژی- تهران- ایران
- ✉ تهران- پاسداران- بوستان نهم- خیابان پایدارفرد (خیابان امیر ابراهیمی)- پلاک ۲۳- مرکز تحقیقات چشم

#### مقدمه

نورگ‌زایی مانند anti-VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) می‌باشد<sup>۱</sup>. فاکتور رشد بافت همبند (CTGF) نقش بسیار مهمی در تشکیل اسکار و بافت فیبروز و عروق جدید دارد که در سالیان اخیر بسیار مورد توجه و تحقیق قرار گرفته است. CTGF یک پلی‌پپتید غنی از سیستین است که نخستین بار در سلول‌های اندوتلیال ورید نافی انسان کشف گردید و در سلول‌های مختلف از جمله فیبروبلاست‌ها، سلول‌های اپی‌تلیال و سلول‌های عضله صاف ترشح می‌گردد. هم‌چنین CTGF به میزان زیادی در سلول‌های فعال اندوتلیال و روند فیبروز و اسکار یافت می‌شود. این

بیماری‌های مختلف چشمی از جمله PDR، Wet Type ARMD (Age Related Macular Degeneration) و PVR از علل اصلی نابینایی اکتسابی در بیماران به شمار می‌روند. تشکیل بافت‌های فیبروواسکولار و یا ایجاد نورگ‌زایی در بیماری‌های مختلف چشمی سبب کاهش دید به صورت برگشت‌ناپذیر در بیماران می‌شود که در دهه‌های اخیر درمان‌های مختلفی برای پیش‌گیری و درمان این عوارض پیشنهاد شده است. یکی از موثرترین درمان‌ها، استفاده از آنتی‌بادی بر علیه عوامل بیولوژیک موثر در روند فیبروز و یا

می‌گیرند، نورگ‌زایی مهار می‌شود و احتمال فیبروز در شبکیه و TRD افزایش می‌یابد. در بیماران رتینوپاتی دیابتی پرولیفراتیو که قبلاً تحت درمان با Anti-VEGF بودند پس از ویتراکتومی و بررسی زجاجیه، سطح VEGF در زجاجیه آن‌ها بسیار پایین بود ولی سطح CTGF بسیار بالایی در مقایسه با بیمارانی که تحت درمان با Anti-VEGF نبودند، مشاهده شد<sup>۸،۹</sup>. برخی معتقدند با تزریق Anti-VEGF تعادل بین VEGF و CTGF از بین می‌رود و پدیده‌ای به نام Angiofibrotic Switch روی می‌دهد<sup>۹</sup>. در مطالعه باقری و همکاران<sup>۱۰</sup> نیز مهار هم‌زمان VEGF و CTGF در سلول RPE سبب مهار بیش‌تر و شدیدتر روند آنژیوژنز و فیبروز در سلول RPE شده است.

استفاده از Anti-CTGF با نام FG-3019 در بیماری‌های مختلف از جمله نفروپاتی دیابتی مورد تحقیق قرار گرفته که در پیش‌گیری و درمان موثر بوده است<sup>۱۱</sup> ولی در بیماری‌های چشمی هنوز مطالعه‌ای در مدل‌های حیوانی برای بررسی عوارض بر روی شبکیه صورت نگرفته است.

### روش پژوهش

این مطالعه در مرکز تحقیقات چشم دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی در پاییز ۱۳۹۴، بر روی ۴۵ موش بزرگ آزمایشگاهی رنگی انجام شد. حیوانات از موسسه واکسن و سرم‌سازی رازی خریداری شدند که سن ۴-۵ ماه و وزن ۲۵۰-۲۰۰ گرم داشتند. حیوانات در طول مدت مطالعه در ظرف‌های پلاستیکی مخصوص با دسترسی تمام‌مدت به غذای تجاری مخصوص جوندگان و آب تمیز و در شرایط نوری ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی نگهداری شدند. کلیه مراحل شامل انجام الکترورتینوگرافی و هم‌چنین تزریق داخل ویتراکتومی در شرایط بی‌هوشی عمومی انجام گرفت. برای القای بی‌هوشی از تزریق داخل عضلانی ترکیب داروهای کتامین (۵۰ mg/kg) و زایلازین (۵ mg/kg) استفاده شد. پس از بی‌هوش کردن موش‌ها، یک قطره تروپیکامید ۱ درصد جهت گشاد کردن مردمک و یک قطره تتراکاین ۰/۵ درصد برای کاهش ناراحتی در هر دو چشم چکانده شد. جهت جلوگیری از بروز کاتاراکت ناشی از خشکی قرنیه، پلک‌های حیوانات بی‌هوش در تمام مدت توسط ژل چشمی مرطوب نگاه داشته می‌شد. پیش از شروع مطالعه، کلیه حیوانات تحت معاینه قرار گرفتند و در صورت مشاهده هر عارضه در ساختارهای چشم شامل عوارض قرنیه و کاتاراکت، حیوان مذکور از مطالعه حذف می‌گردید. در این مرحله بلافاصله پس از ثبت

ماده اثر ثابت‌شده‌ای در تنظیم پروتئین‌های ماتریکس خارج‌سلولی داشته و هم‌چنین نقش پروفیبروتیک و آنژیوژن‌زیس ایفا می‌کند<sup>۲</sup>. در مطالعه‌ای که توسط Hinton و همکاران<sup>۳</sup> صورت گرفت، در مدل PVR دریافتند که سیتوکین TGF- $\beta$  (Transforming growth factor- $\beta$ ) نقش مهمی در شروع روند فیبروز ایفا می‌کند. آن‌ها نشان دادند که TGF- $\beta$  در زجاجیه در حالت طبیعی به صورت غیرفعال وجود دارد که در تماس با سلول‌های RPE فعال شده و سبب تولید CTGF می‌گردد. در حضور CTGF سلول‌های RPE تبدیل به میوفیبروبلاست و فیبروز شده و منجر به TRD (Tractional Retinal Detachment) می‌شود که طی یک سیکل معیوب این اتفاقات تشدید می‌یابند.

شواهد نشان می‌دهند که سلول‌های RPE نقش مهمی در ایجاد نورگ‌زایی کوروئیدال دارند. عوامل آنژیوژنیک مثل FGF, PDGF, VEGF, TGF- $\beta$  از اپی‌تلیوم پیگمانته شبکیه به سمت کوروئید رفته و در ایجاد CNV مشارکت می‌کنند. Shikun و همکاران<sup>۴</sup> نشان دادند که در سلول‌های RPE و اندوتلیال بیماران مبتلا به CNV membrane، تجمع CTGF وجود دارد. هم‌چنین گزارش کردند که CTGF سبب مهاجرت سلول‌های اندوتلیال کوروئید و ایجاد نورگ‌زایی می‌شوند. از طرفی به طور معمول، CTGF در سلول RPE طبیعی و اندوتلیال کوروئید طبیعی در فرد طبیعی وجود ندارد و ترشح CTGF در سلول RPE نشان‌دهنده پتانسیل فعال کردن اندوتلیوم کوروئید زیرین است.

CTGF، عامل اصلی در روند بهبود زخم، تحریک مهاجرت سلولی، رگ‌زایی (آنژیوژنز) و فیبروز می‌باشد. CTGF سبب رسوب بافتی کلاژن نوع ۱ و فیبرونکتین می‌شود. تجمع مقادیر بالایی از این عامل، در نمونه زجاجیه افراد مبتلا به PVR که تحت ویتراکتومی قرار گرفتند از نقش آن در این بیماری حکایت دارد. دیده شده است که قسمت N-terminal پروتئین در ایجاد PVR دخالت عمده‌ای دارد<sup>۵</sup>.

افزایش گلوکز خون سبب ایجاد تغییراتی در عروق می‌شود که پس از یک دوره پره‌کلینیکال در نهایت منجر به رتینوپاتی دیابتی و عوارض شدید آن بر بینایی می‌گردد. تغییرات عروقی اولیه در رتینوپاتی دیابتی رتینوپاتی شامل: افزایش ضخامت لامینای بازال مویرگ‌ها و از دست رفتن پریسیت‌ها و تشکیل مویرگ‌های آسلولار می‌باشد. مطالعات نشان می‌دهند که CTGF در تغییرات عروقی دیابت نقش مهمی دارد و مهار آن، از پیش‌رفت رتینوپاتی دیابتی پیش‌گیری می‌کند<sup>۶،۷</sup>.

در بیماران مبتلا به دیابت که تحت درمان با Anti-VEGF قرار

۲۰ و ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از Anti-CTGF در سرم فیزیولوژیک استریل تهیه شد. سپس موش‌ها به ۵ گروه ۹ تایی تقسیم شدند. (۱) گروه Sham- Control: متشکل از ۹ موش که تحت تزریق داخل زجاجیه نرمال سالین در یک چشم قرار گرفتند و چشم مقابل به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. (۲) گروه B متشکل از ۹ موش که تحت تزریق داخل زجاجیه به میزان ۲ میکرولیتر از محلول ۱۰  $\mu\text{g/ml}$  (معادل ۲۰  $\text{ng}/\mu\text{l}$ ) قرار گرفت، (۳) گروه C متشکل از ۹ موش که تحت تزریق داخل زجاجیه به میزان ۲ میکرولیتر از محلول ۲۰  $\mu\text{g/ml}$  (معادل ۴۰  $\text{ng}/\mu\text{l}$ ) قرار گرفت، و (۴) گروه D متشکل از ۹ موش که تحت تزریق داخل زجاجیه Anti-CTGF Neutralizing Antibody به میزان ۲ میکرولیتر از محلول ۵۰  $\mu\text{g/ml}$  (معادل ۱۰۰  $\text{ng}/\mu\text{l}$ ) قرار گرفت. (۵) گروه E متشکل از ۹ موش که تحت تزریق داخل زجاجیه ۱۰۰ /ml (معادل ۲۰۰  $\text{ng}/\mu\text{l}$ ) قرار گرفتند. حجم داروی تزریق شده در تمامی چشم‌ها، ۲ میکرولیتر بود. در گروه A، دو میکرولیتر سرم فیزیولوژیک در چشم راست موش‌ها تزریق شد. این گروه به عنوان گروه شاهد در نظر گرفته شد. جهت انجام تزریق ابتدا اسکروتومی توسط یک سرسوزن انسولین انجام گرفت سپس سرنگ همیلتون ۵ میکرولیتری G ۳۰ در یک چهارم بالایی کناری چشم از نقطه‌ای در فاصله یک‌ونیم میلی‌متر پشت لیمبوس وارد کره چشم شد و به صورت مایل به سمت دیسک بینایی هدایت شد. پس از اطمینان از قرار گرفتن نوک سوزن در مرکز زجاجیه، حجم ۲ میکرولیتر از محلول تزریق گردید و به مدت ۲۰ تا ۳۰ ثانیه جهت وارد شدن کامل دارو به زجاجیه، سوزن در محل خود نگه داشته شد. پس از خارج کردن سوزن از چشم، یک قطره کلرآمفینیکل برای جلوگیری از عفونت در چشم ریخته شد<sup>۱۲</sup>.

#### مطالعه هیستوپاتولوژی

در پایان، کلیه موش‌ها با تزریق دوز بالای ترکیب بی‌هوشی اتانازی شدند. سپس چشم موش‌ها از حدقه خارج شد و در محلول فرمالین ۱۰ درصد به آزمایشگاه پاتولوژی بانک چشم ایران ارسال گردید. در آزمایشگاه، نمونه‌ها با قرار گرفتن در درجات مختلف اتانول، آب‌گیری و در پارافین قالب‌گیری شدند. سپس مقاطع به قطر ۵ میکرومتر از آن‌ها تهیه و با رنگ همتاکسیلین و اتوزین رنگ‌آمیزی شدند. برای رنگ‌آمیزی (glial fibrillary acidic protein) GFAP از کیت شرکت داکو استفاده شد. مقاطع بافتی مطابق با دستورالعمل کیت ابتدا به مدت ۵ دقیقه در معرض آنزیم پروتیناز K قرار داده شدند و سپس به مدت ۳۰ دقیقه با آنتی‌بادی ضد GFAP در دمای اتاق انکوبه شدند. از هر چشم، چهار اسلاید

ERGهای پایه، غلظت‌های مختلف Anti-CTGF به شیوه‌ای که در ادامه توضیح داده خواهد شد در زجاجیه موش‌ها تزریق گردید. در روزهای ۷ و ۲۸ پس از تزریق، موش‌ها تحت معاینه قرار گرفتند و الکترورتینوگرام آن‌ها ثبت گردید. در روز ۲۸ پس از انجام معاینات هر حیوان با تزریق دوز بالای ترکیب بی‌هوشی، اتانازی شده و گلوب خارج گردید و در محلول فرمالین ۱۰ درصد قرار داده شده و به آزمایشگاه پاتولوژی ارسال گردید.

#### الکترورتینوگرام

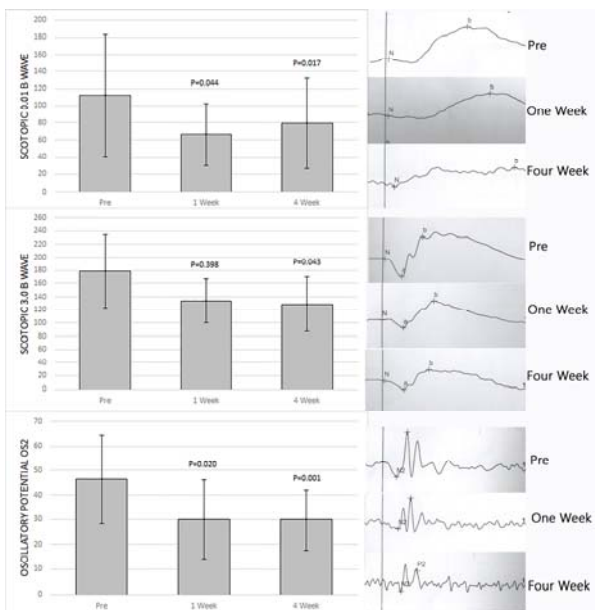
الکترورتینوگرافی با استفاده از دستگاه RETI port و مطابق با استانداردهای تعیین شده توسط انجمن بین‌المللی الکتروفیزیولوژی بالینی بینایی (ISCEV) پیش از انجام تزریقات و در روزهای ۷ و ۲۸ انجام گرفت. الکترورتینوگراف‌ها در شرایط تاریکی با سه شدت نور و در شرایط روشنایی ثبت گردیدند. جهت افزایش دقت مطالعه، الکترورتینوگراف هر دو چشم به صورت هم‌زمان ثبت گردید، هم‌چنین دستگاه به صورت خودکار در هر مورد پنج گراف را ثبت کرده و میانگین آن‌ها را گزارش می‌کرد. جهت کاهش تغییرات، تمامی الکترورتینوگراف‌ها در فاصله ساعت ۸-۱۲ صبح ثبت و در هر نوبت ترتیب حیوانات تقریباً ثابت نگه داشته شدند. مطالعه حاضر با رعایت قوانین مربوط به مطالعات حیوانی طبق دستورالعمل ARVO صورت گرفته است. جهت انجام ERG پس از بی‌هوش کردن حیوانات و حصول اطمینان از حداکثر اتساع مردمک، موش‌ها بر روی صفحه متحرک دستگاه قرار گرفتند و به ترتیب زیر نسبت به نصب الکترودها اقدام گردید: ابتدا دو الکترودهای اصلی از جنس استیل در زیر جلد پشت دو گوش قرار گرفت سپس الکترودهای اتصال به زمین در قسمت پایه دم در زیر جلد قرار داده شد. پس از آزمایش امیدانس دستگاه (امپدانس کم‌تر از ۰/۲ اهم قابل قبول در نظر گرفته شد) و اطمینان از اتصال درست الکترودهای اصلی و اتصال به زمین، الکترودهای فعال با ژل متیل سلولز آغشته و بر روی قرنیه قرار داده شدند. کلیه مراحل آماده‌سازی حیوانات در زیر نور ضعیف قرمز رنگ انجام گرفت. دامنه و زمان امواج a و b با سه شدت نور ۰/۱، ۰/۳، ۱۰  $\text{cd.s/m}^2$  اندازه‌گیری شد. سپس حیوانات برای تطابق با روشنایی به مدت ۱۰ دقیقه در مقابل نور زمینه دستگاه قرار گرفته و پس از آن دامنه و زمان امواج در شرایط روشنایی ثبت گردید.

#### تزریق داخل زجاجیه Anti-CTGF

تزریق داخل زجاجیه Anti-CTGF در شرایط بی‌هوشی عمومی و در زیر میکروسکوپ LOOP انجام گرفت. ابتدا غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰

میکروولت ( $P < 0.05$ ) رسید که این کاهش در سایر گروه‌ها مشاهده نگردید. همچنین در اسکوتوپیک با شدت  $3 \text{ cd.s/m}^2$  نیز در موج b در گروه E مجدداً کاهش معناداری مشهود بود. آمپلیتود موج b از  $178.57 \pm 55.58$  به  $128.73 \pm 41.61$  میکروولت ( $P < 0.05$ ) رسید. در Latency موج b نیز در گروه E افزایش معناداری داشت. به طوری که از  $37.06 \pm 6.19$  به  $43.44 \pm 6.49$  ( $P < 0.05$ ) رسید. در سایر گروه‌ها هیچ کاهش معناداری در آمپلیتود یا افزایش Latency مشاهده نگردید.

پاسخ سلول‌های آماکین در Oscillatory Potential OS2 بیانگر عملکرد لایه‌های داخلی شبکیه می‌باشد پس از ۷ و ۲۸ روز کاهش در گروه E مشخص بود به طوری که در روز اول  $46.24 \pm 18.05$  میکروولت و پس از یک هفته به  $30.03 \pm 15.95$  میکروولت و پس از ۲۸ روز به  $29.79 \pm 12.20$  میکروولت رسید. در فوتوپیک ERG در هیچ یک از گروه‌ها تغییر معناداری مشاهده نشد. بر اساس نتایج ERG به نظر می‌رسد که مقدار  $100 \mu\text{g/ml}$  از نظر عملکرد برای شبکیه مضر می‌باشد (نمودار ۱).



نمودار ۱- نمودار ستونی و نمونه ERG مربوط موج اسکوتوپیک ۰/۰۱ و ۳ و OS2 در گروه E ( $100 \mu\text{g/ml}$ ).

#### نتایج هیستوپاتولوژیک و ایمونوهیستوشیمی

در بررسی کلی برخی موارد التهاب مختصر در محل تزریق مشهود بود ولی به طور کلی در هیچ‌یک از گروه‌ها، اختلاف معناداری با گروه شاهد وجود نداشت (تصویر ۱). اطلاعات مربوط به چشم‌هایی که دچار خون‌ریزی داخل زجاجیه شده بودند از

تهیه شد که دو تا از آن‌ها با هماتوکسیلین و ائوزین و دو اسلاید با GFAP رنگ‌آمیزی شدند. اسلایدها توسط دو پاتولوژیست چشم که از گروه‌بندی موش‌ها اطلاع نداشتند در زیر میکروسکوپ نوری بررسی شدند. سلول‌های لایه گانگلیونی شبکیه توسط نرم‌افزار ImageJ در فاصله حدود  $500$  میکرونی از عصب در محدوده  $200$  میکرون با بزرگ‌نمایی  $40$  برابری شمارش گردید و با استفاده از آزمون آماری One-way ANOVA اختلاف بین گروه‌ها بررسی شد.

#### تست بررسی مرگ سلولی (TUNEL)

Terminal Transferase dUTP Nick End-labeling Assay (TUNEL) بر روی کیت مربوطه طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام گرفت. (In Situ Cell Death Detection Kit; Roche, Germany) برای کنترل مثبت، نمونه با آنزیم DNase grade 1 مخلوط شد و در دمای اتاق به مدت  $10$  دقیقه قرار گرفت و برای کنترل منفی، نمونه با  $10 \mu\text{l}$  از محلول labeled شسته شد و در انکوباتور بدون ترمینال ترانسفراز قرار داده شد. برای شناسایی DNA شکسته شده از Terminal Deoxynucleotidyl Transferase (TdT) استفاده شده و پس از آن نمونه سه بار با محلول PBS شسته شده و در زیر میکروسکوپ فلئورسانس مشاهده گردید. در صورت منفی بودن تست، هیچ یک از لایه‌های شبکیه رنگ نمی‌گرفت و یا به شکل خیلی خفیف بود ولی در صورت مثبت شدن، هسته سلول‌ها به طور واضح رنگ سبز فلورسانس از خود ساطع می‌کردند.

#### روش‌های تجزیه و تحلیل داده‌ها

در این مطالعه با استفاده از میانگین و انحراف معیار، نتایج مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت. برای مقایسه بین گروه‌ها از Linear Mixed Model (LMM) و جهت مقایسه داخل گروه‌ها از LMM دیگری استفاده شد. در این تحلیل از روش Bonferroni استفاده گردید. نسبت آمپلیتود ERG قبل و پس از تزریق محاسبه و افت بیش از  $20$  درصد، قابل اهمیت در نظر گرفته شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزارهای آماری از جمله SPSS ویرایش ۲۲ انجام گرفت.

#### یافته‌ها

##### نتایج الکترونیوگرام

در مقایسه بین ERG در روز اول و پس از تزریق در روزهای ۷ و ۲۸، آمپلیتود موج b اسکوتوپیک  $0.01$  در گروه E به طور واضح کاهش یافت. این مقدار از  $111.89 \pm 71.2$  به  $31.59 \pm 79.52$

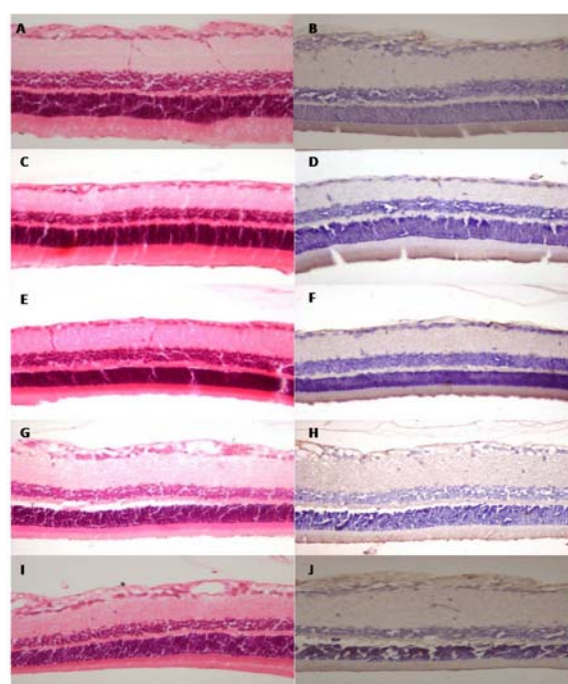
جدول ۱- جزئیات بررسی پاتولوژی در تمام گروه‌ها، گروه A-E طبق توضیحات متن

	Intra retinal Inflammation	Necrosis	Intravitreal hemorrhage	RPE & sensory retinal integrity disruption	Retrolental/ Pre-retinal Fibroinflammatory membrane	Mean GFAP Score
Group A	2	0	3	0	1	1
Group B	3	0	1	0	2	1.7
Group C	2	0	2	0	2	1.6
Group D	3	0	0	0	1	1.5
Group E	1	0	2	2	0	1.4

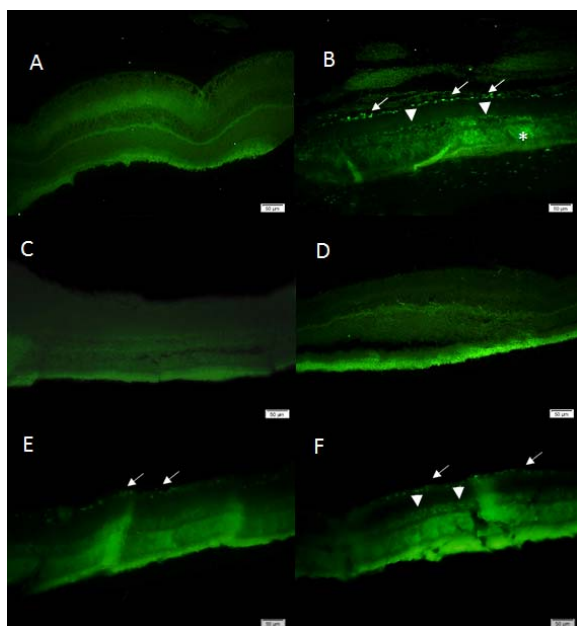
تحلیل حذف گردید. همه گروه‌ها توسط نرم‌افزار ImageJ تحت شمارش سلول‌های گانگلیونی شبکه‌ی قرار گرفتند که تعداد سلول‌ها در گروه E به طور معناداری نسبت به سایر گروه‌ها و گروه شاهد کاهش نشان داد ( $P < 0.05$ ) (نمودار ۲). بین هیچ یک از گروه‌ها از لحاظ GFAP score اختلاف معناداری وجود نداشت. متوسط GFAP score در گروه شاهد ۱/۴، در گروه B ۱/۷، در گروه C ۱/۶ و در گروه D ۱/۲ و در گروه E نیز ۱/۴ بود که اختلاف معناداری بین گروه‌ها مشاهده نگردید (جدول ۱).

### نتایج آزمایش TUNEL

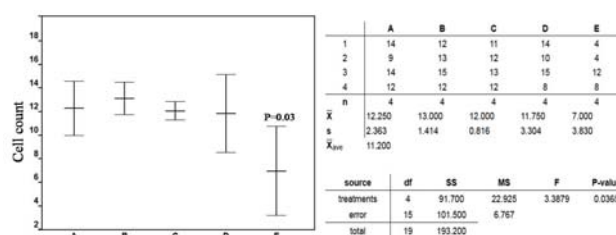
برای بررسی وجود مرگ سلولی در لایه‌های گانگلیون و هسته‌ای داخلی و خارج، آزمایش TUNEL استفاده گردید. تست مثبت در نمونه‌های شبکه‌ی از گروه E به علت آپوپتوزیس در لایه سلول‌های گانگلیونی و هسته‌ای داخلی مشهود بود ولی در سایر گروه‌ها آزمایش منفی بود. نتایج این تست منطبق بر نتایج حاصل از ERG و هیستوپاتولوژی می‌باشد (تصویر ۲).



تصویر ۱- مقایسه لام مربوط به رنگ‌آمیزی H&E و GFAP در بین گروه‌های مختلف که اختلافی بین گروه‌ها مشهود نمی‌باشد. (A) گروه کنترل (H&E)، (B) گروه کنترل (GFAP)، (C) و (D) گروه ۱۰۰ µg/ml (H&E) (E, F, and GFAP) گروه ۲۰ µg/ml (H&E and GFAP)، (G, H) گروه ۵۰ µg/ml (H&E and GFAP) و (I, J) گروه ۱۰۰ µg/ml (magnification X400).



تصویر ۲- نتایج تست TUNEL در گروه‌ها. (A) کنترل منفی (B) کنترل مثبت که رنگ گرفتن لایه سلولی گانگلیون (فلش کوچک) و لایه نوکلئار داخلی (فلش بزرگ) و لایه نوکلئار خارجی (ستاره) مشهود است. (C) گروه ۲۰ µg/ml که منفی می‌باشد. (D) گروه ۵۰ µg/ml که تست منفی می‌باشد و (E, F) دو نمونه از گروه ۱۰۰ µg/ml که لایه‌های سلولی گانگلیون (فلش کوچک) و لایه نوکلئار داخلی (فلش بزرگ) و لایه نوکلئار خارجی (ستاره) مشخصاً مثبت هستند.



نمودار ۲- آنالیز one-way ANOVA مربوط به مقایسه تعداد سلول‌های گانگلیونی در شبکه‌ی بین گروه‌های مختلف که توسط نرم‌افزار ImageJ شمارش شده است. کاهش معنادار تعداد سلول‌های گانگلیونی در گروه E (۱۰۰ µg/ml) مشهود است.

## بحث

بسیاری از بیماری‌های چشمی از جمله CNV, PVR, PDR بیماری‌های چندعاملی (مولتی‌فاکتوریال) بوده و تمام اجزای یک روند ترمیمی کلاسیک شامل التهاب، آنژیوژنز و فیبروز را دارا می‌باشند. CTGF یک عامل فیزیولوژیک مهم در پدیده‌هایی مثل ترمیم زخم، تحریک مهاجرت سلولی و فیبروز است. CTGF از طریق Domain 1 یا IGFBP سبب اتصال ضعیف به IGF-1 شده که روند فیبروتیک شروع می‌شود که این نقش را با رسوب کلاژن تیپ ۱، ۳ و فیرونکتین ایفا می‌کند.<sup>۴</sup> به علاوه CTGF یک محرک قوی برای آنژیوژنز از طریق القا سلول‌های پروژنیاتور CD34+ است.<sup>۱۳</sup>

در مطالعه قبلی ما نشان داده شد که درمان هم‌زمان بواسیزوماب و Anti-CTGF سبب اثر آنتی‌فیبروتیک بیش‌تری به علت مهار بروز CTGF و MMP-2 می‌شود. هم‌چنین نتایج نشان می‌دهند که کاهش CTGF سبب کاهش واضح در بروز ژن VEGF-A می‌گردد.<sup>۱۴</sup> مطالعات نشان می‌دهند که سطح CTGF در داخل زجاجیه با میزان فیبروز مرتبط است.<sup>۱۴، ۱۵</sup> در نتیجه تاثیرات مهم این پروتئین در بیماری‌های مختلف چشمی و بررسی غلظت‌های مختلف برای مطالعات حیوانی ضروری می‌باشد.

در مطالعه حاضر در بررسی غلظت‌های مختلف دارو مشاهده شد که غلظت‌های بالا از این آنتی‌بادی منجر به آسیب به شبکه و کاهش در پاسخ سلول‌های استوانه‌ای (Rod Response) و سلول‌های دوقطبی می‌شوند. کاهش آمپلیتود ERG در گروه E به علت ایجاد اختلال در عملکرد سلول‌های استوانه‌ای می‌باشد. هم‌چنین کاهش در OS2 نیز ناشی از اختلال در لایه‌های داخلی تر شبکه است. این نتایج نشان می‌دهند که این آنتی‌بادی می‌تواند برای شبکه مضر باشد. در شرایط طبیعی میزان بروز پروتئین CTGF بسیار اندک است در نتیجه مقادیر بالا از آنتی‌بادی ممکن است سبب فعال شدن سایر مسیرهای بیولوژیک شوند که اطلاعاتی از این مسیرها در دست نیست.

در بیماران دیابتی، حتی قبل از بروز تظاهرات رتینوپاتی دیابتی، CTGF توسط سلول‌های پریمیست ساخته شده و در زجاجیه افراد دیابتی یافت می‌شود در حالی که در شبکه و زجاجیه افراد طبیعی، این پروتئین یافت نمی‌گردد. CTGF مسئول بسیاری تغییرات عروقی در افراد دیابتی است از جمله ضخیم شدن بازال لامینا و از دست رفتن پریمیست‌ها و آنژیوژنیز که منجر به مراحل مختلف رتینوپاتی دیابتیک می‌شود.<sup>۱۶</sup> Hinton و همکاران معتقدند که سطح N-terminal CTGF در زجاجیه با شدت درگیری در رتینوپاتی دیابتی متناسب است.<sup>۱۶</sup> در تحقیقی که توسط Van و

همکاران<sup>۶</sup> صورت گرفت CTGF به عنوان عامل مهمی در افزایش ضخامت بازال لامینا در مراحل ابتدایی دیابت بود و نشان دادند که در موش‌هایی که یک آلل CTGF غیرفعال دارند به طور معناداری ضخامت لایه بازال افزایش نمی‌یابد. در چشم طبیعی CTGF در اشک، زلالیه و زجاجیه به مقدار اندک وجود دارد و برای متابولیسم طبیعی سلول‌ها لازم است. در نمونه شبکه در یک موش دیابتی، CTGF به طور مشخص افزایش یافت. CTGF در هفته هشتم پس از ایجاد دیابت افزایش یافت در حالی که VEGF تا هفته دهم افزایش نیافته و افزایش شدید هر دو را در هفته ۱۲ مشاهده کردیم. نشان داده شده است که مهار هم‌زمان VEGF و CTGF به طور موثرتری از پیش‌رفت رتینوپاتی دیابتی جلوگیری می‌کند.<sup>۷</sup>

در مطالعات سلولی نشان داده شده است که ترشح CTGF مرتبط با VEGF و TGF- $\beta$  است.<sup>۱۷</sup> VEGF به 3 domain مولکول شکسته نشده و کامل CTGF متصل می‌باشد که همین اتصال سبب مهار VEGF می‌گردد ولی پس از شکسته شدن، مولکول CTGF توسط پروتئاز، VEGF رها شده و به شکل فعال آزاد می‌گردد.<sup>۱۸</sup> در نتیجه استفاده از Anti-VEGF در رتینوپاتی دیابتی منجر به افزایش واکنش در CTGF می‌گردد که به شدت مرتبط با افزایش روند فیبروز و Tractional Retinal Detachment می‌باشد.<sup>۷</sup> در نتیجه نسبت بین این دو پروتئین، تعیین‌کننده شروع روند آنژیوفیبروتیک است.<sup>۹</sup>

در مطالعات پره‌کلینیکال نشان داده شد که هدف، قرار دادن CTGF در کنترل روند فیبروتیک موثر است. مهار هم‌زمان CTGF و VEGF از ایجاد بافت‌های آنژیوفیبروتیک در بیماران رتینوپاتی دیابتی جلوگیری می‌کند.<sup>۹</sup> آنتی‌بادی بر علیه CTGF به طور معناداری سبب کاهش فیبروز و کاهش تولید کلاژن توسط فیبروبلاست‌ها در پاسخ به TGF- $\beta$  می‌گردد.<sup>۱۹</sup>

آپوپتوز نتیجه تکه‌تکه شدن مولکول DNA می‌باشد که از دو مسیر عمده خارجی و داخلی رخ می‌دهد.<sup>۲۰</sup> شروع آپوپتوز به علت آزاد شدن سیتوکین‌های مختلف از سلول‌های آسیب‌دیده و یا سلول‌های تحت استرس است. این سیتوکین‌ها، با ایجاد کموتاکتیک سبب تجمع سلول‌های ماکروفاژ و میکروگلیا می‌شوند. فعال شدن این سلول‌ها سبب القا اثر سمی بر روی سلول‌های گانگلیونی می‌شود.<sup>۲۰</sup> در مطالعات پیشین نشان داده شده است که CCN family می‌توانند از طریق فعال کردن caspase و Fas- ligand منجر به ایجاد آپوپتوز شوند.<sup>۲۱، ۲۲</sup> از بین اعضا خانواده، CCN بیش‌ترین نقش آپوپتوز Cry61 دارد که از طریق اکسیژن فعال Reactive Oxygen Species (ROS) سبب مرگ سلولی

که در پشت ناحیه خون‌ریزی داخل زجاجیه بود دچار آتروفی نشده و سالم به نظر می‌رسید ولی نیمه دیگر چون در معرض غلظت‌های بالاتری از دارو قرار گرفته بود دچار آسیب شدید لایه‌های داخلی شبکیه شده بود.

از محدودیت‌های مطالعه حاضر، عدم بررسی غلظت‌های بین ۵۰  $\mu\text{g/ml}$  و ۱۰۰  $\mu\text{g/ml}$  بود. با توجه به این که مقادیر کم‌تر و مساوی ۵۰  $\mu\text{g/ml}$  سمی نبودند، ایمن در نظر گرفته می‌شوند و غلظت ۱۰۰  $\mu\text{g/ml}$  که معادل دوز داخل زجاجیه ۲۰۰  $\text{ng}/\mu\text{l}$  می‌باشد سمی است ولی در مورد غلظت ۷۵  $\mu\text{g/ml}$  نمی‌توان اظهار نظر نمود و نیاز به بررسی دقیق‌تر دارد.

با توجه به نتایج حاصل از این مطالعه، سوالات بسیاری پیرامون تاثیر آنتی‌بادی CTGF بر بافت‌های چشمی و مسیرهای عملکرد این مولکول در چشم مطرح می‌گردد که نیازمند مطالعات پیش‌تری در آینده است.

#### نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج حاصل از تست ERG، بافت‌شناسی و TUNEL test به نظر می‌رسد که تزریق داخل زجاجیه Anti-CTGF با دوز ۱۰۰  $\mu\text{g/ml}$  در موش بزرگ آزمایشگاهی مضر (توکسیک) می‌باشد. مقدار ۵۰  $\mu\text{g/ml}$  در مطالعات بعدی که از لحاظ اثربخشی تزریق داخل زجاجیه Anti-CTGF انجام خواهد شد، توصیه می‌گردد.

می‌گردد<sup>۲۲،۲۳</sup>. تمام پروتیین‌های مربوط به CCN توسط TGF- $\beta$  و TNF- $\alpha$  تنظیم می‌شوند. دو مولکول CCN1 و CCN2 در برخی از مسیرهای زیستی (بیولوژیک) با هم مشترک هستند و مطالعات نشان می‌دهند که مهار CCN2(CTGF) سبب افزایش بروز CCN1 می‌گردد<sup>۲۳،۲۴</sup>. در این مطالعه دیده شد که غلظت‌های بالای Anti-CTGF منجر به ایجاد آپوپتوز می‌گردد که می‌توان این پدیده را از دو طریق توجیه نمود. این اثر ممکن است به علت افزایش واکنشی در CCN1 به دنبال مهار CCN2 یا همان CTGF باشد و از آنجایی که CCN1 یک عامل آپوپتوتیک قوی است افزایش آن منجر به ایجاد مرگ سلولی در لایه گانگلیونی شده است. نظریه دوم مربوط به پروتیین تنظیم‌کننده TGF- $\beta$  است که این مولکول در فرآیندهایی مثل مهاجرت سلولی، ازدیاد و مرگ سلولی نقش دارد و با مهار CTGF دچار خودتنظیمی مثبت (up regulation) و در نهایت با فعال کردن TNF سبب شروع روند آپوپتوز می‌گردد<sup>۲۲،۲۵</sup>. با توجه به این که ما در بررسی هیستوپاتولوژی، تغییراتی به نفع آسیب شبکیه مشاهده نکردیم به نظر می‌رسد که غلظت‌های مورد استفاده، سمیت شدید و آتروفی واضح ایجاد نمی‌کنند. در تایید این نظریه می‌توان به یکی از موش‌های مورد مطالعه در گروه E که بالاترین غلظت دارو را دریافت کرده بود اشاره نمود. در این نمونه، آتروفی شدید در نیمی از شبکیه در لایه‌های داخلی مشهود بود و در نیمه دیگر شبکیه، خون‌ریزی داخل زجاجیه مانع از جذب دارو توسط شبکیه آن ناحیه شده بود. قسمتی از شبکیه

#### منابع

1. Campochiaro PA. Pathogenesis of proliferative vitreoretinopathy. In: Ryan SJJ, ed. Retina. 3rd ed. St Louis, Mo: Mosby; 2001:2221-2227.
2. Norihiro Nagai, Alena Klimava. CTGF is increased in basal deposits and regulates matrix production through the erk (p42/p44mapk) mapk and the p38 mapk signaling pathways. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009;50:1903-1910.
3. Hinton DR, He S, Jin ML, et al. Novel growth factors involved in the pathogenesis of proliferative vitreoretinopathy. *Eye (Lond)* 2002;16:422-428.
4. Shikun He, Man Lin Jin, Vanessa Worpel, et al. A role for connective tissue growth factor in the pathogenesis of choroidal neovascularization. *Arch Ophthalmol* 2003;121:1283-1288.
5. He S, Chen Y, Khankan R, et al. Connective tissue growth factor as a mediator of intraocular fibrosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;49:4078-4088.
6. Van Geest RJ, Leeuwis JW, Dendooven A, et al. Connective tissue growth factor is involved in structural retinal vascular changes in long-term experimental diabetes. *J Histochem Cytochem* 2014;62:109-118.
7. Bojie Hu, Yan Zhang, Qing Zeng, et al. Intravitreal Injection of Ranibizumab and CTGF shRNA Improves retinal gene expression and microvessel ultrastructure in a rodent model of diabetes. *Int J Mol Sci* 2014;15:1606-1624.
8. Hu BJ, Zeng Q, Liu XL, et al. Influence of intravitreal injection of avastin on the expression of cytokines in fibrovascular membrane in proliferative diabetic retinopathy. *Chin J Exp Ophthalmol* 2013;31:55-59.
9. Van Geest RJ, Lesnik-Oberstein SY, Tan HS, et al. A shift in the balance of VEGF and CTGF by bevacizumab causes the angio-fibrotic switch in proliferative diabetic retinopathy. *Br J Ophthalmol* 2012;96:587-590.
10. Bagheri A, Soheili Z, Ahmadi H, et al. Simultaneous application of bevacizumab and anti-CTGF antibody effectively suppresses proangiogenic and profibrotic factors in human RPE cells. *Molecular Vision* 2015;21:378-390.
11. Adler SG, Schwartz S. Phase 1 Study of Anti-CTGF Monoclonal Antibody in Patients with Diabetes and Microalbuminuria. *Clin J Am Soc Nephrol* 2010;5:1420-1428.



12. Chiu K, Chuen-Chung Chang R, So K. Intravitreal Injection for Establishing Ocular Diseases Model. *J Vis Exp* 2007;8:313.
13. Shimo T, Nakanishi T, Nishida T. Connective tissue growth factor induces the proliferation, migration, and tube formation of vascular endothelial cells in vitro, and angiogenesis in vivo. *J Biochem (Tokyo)* 1999;126:137-145.
14. Kuiper EJ, de Smet MD, van Meurs JC. Association of connective tissue growth factor with fibrosis in vitreoretinal disorders in the human eye. *Arch Ophthalmol* 2006;124:1457-1462.
15. Pastor JC, Rojas J, Pastor-Idoate S, et al. Proliferative vitreoretinopathy: A new concept of disease pathogenesis and practical consequences. *Prog Retin Eye Res* 2015 Jul 21.
16. Hinton D, Spee CH. Accumulation of NH-Terminal Fragment of Connective Tissue Growth Factor in the Vitreous of Patients With Proliferative Diabetic Retinopathy *Diabetes Care* 2004;27:758-764.
17. Van Geest RJ, Klaassen I, Lesnik-Oberstein SY, et al. Vitreous TIMP-1 levels associate with neovascularization and TGF- $\beta$ 2 levels but not with fibrosis in the clinical Course of proliferative diabetic retinopathy. *J Cell Commun Signal* 2013;7:1-9.
18. Inoki I, Shiomi T, Hashimoto G. Connective tissue growth factor binds vascular endothelial growth factor (VEGF) and inhibits VEGF induced angiogenesis. *FASEB J* 2002;16:219-221.
19. Ikawa Y, Ng PS, Endo K, et al. Neutralizing monoclonal antibody to human connective tissue growth factor ameliorates transforming growth factor-beta-induced mouse fibrosis. *J Cell Physiol* 2008;216:680-687.
20. Lo AC, Woo TT, Wong RL, et al. Apoptosis and other cell death mechanisms after retinal detachment: implications for photoreceptor rescue. *Ophthalmologica* 2011; 226 Suppl 1:10-7. doi: 10.1159/000328206. Epub 2011 Jul 22.
21. Juric V, Chen CC, Lau LF. Fas-mediated apoptosis is regulated by the extracellular matrix protein CCN1 (CYR61) in vitro and in vivo. *Mol Cell Biol* 2009;29:3266-3279.
22. Borkham-Kamphorst E, Schaffrath C, Van de Leur E, et al. The anti-fibrotic effects of CCN1/CYR61 in primary portal myofibroblasts are mediated through induction of reactive oxygen species resulting in cellular senescence, apoptosis and attenuated TGF- $\beta$  signaling. *Biochim Biophys Acta* 2014;1843:902-914.
23. Lai CF, Chen YM, Chiang WC. Cysteine-rich protein 61 plays a pro inflammatory role in obstructive kidney fibrosis. *PLOS ONE* 2013;8:e56481.
24. Falke L, Goldschmeding R, Nguyen TQ. A perspective on anti-CCN2 therapy for chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant* 2014;29 Suppl 1:i30-i37.