Investigating the Effect of Fibrin Glue on Morphological Changes in Human Eye RPE Cells

Rezaei Kanavi M, MD[1]; Balagholi S, PhD[2]*; Dabbaghi R, MS[3]; Soleimani M, PhD[3]; Alizadeh S, PhD[2]; Karami S, MS[2]; Kheiri B, MS[1]

[1]Ocular Tissue Engineering Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran; [2]Department of Hematology, School of Allied Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran,Iran; [3]Department of Hematology, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
** Corresponding author: danial1357@yahoo.com*

Purpose: The aim was to examine morphologic alterations of cultured human retinal pigment epithelial (ahRPE) cells when encapsulated with different concentrations of fibrin glue and platelet gel.
Methods: The cultivated ahRPE cells were encapsulated with 84mg/dl concentrations of Fibrin glue and then evaluated for morphological changes.
Results: The cultured ahRPE cells demonstrated dendritiform morphology in early days of encapsulation with FG scaffold. However, after digestion of Fibrin glue, epithelial morphology was again dominant. Electron microscopic result revealed the interconnection between the cell and three-dimensional scaffold.
Conclusion: Based on this study, the interconnection between the RPE cells and Fibrin scaffold led to morphological changes in the RPE cells, which was observed in the first days. However, after Fibrin digestion, the epithelioid morphology was again dominant.

Keywords: Fibrin Glue, RPE Cells, Scaffold

- Bina J Ophthalmol 2017; 22 (4): 264-268. **Received:** 5 March 2017 **Accepted:** 1 April 2017

بررسی اثر چسب فیبرینی بر تغییرات مورفولوژیکی سلول‌های اپی‌تلیوم رنگدانه‌ای شبکیه (RPE) چشم انسان

دکتر مژگان رضایی کنوی[1]، دکتر سحر بالاقلی[2]*، رسول دباغی[3]، دکتر مسعود سلیمانی[4]، دکتر شعبان علیزاده[5]، سمیرا کرمی[6]، بهاره خیری[7].

هدف: بررسی تغییرات مورفولوژی سلول‌های RPE انکپسوله شده با چسب فیبرینی.
روش پژوهش: در مطالعه تجربی حاضر، سلول‌های RPE از چشم استخراج شده و در محیط مناسب کشت داده شدند. سپس توسط چسب فیبرینی با غلظت ۸۴ mg/dl، انکپسوله شده و از نظر تغییرات مورفولوژی مورد بررسی قرار گرفتند.
یافته‌ها: بررسی‌های میکروسکوپی نشان داد چسب فیبرینی، شکل دندرتی فرم را در روزهای نخست القا می‌کند ولی به مرور زمان و پس از هضم بستر فیبرینی مجددا شکل اپیتلیوییدی غالب می‌شود. بررسی‌های میکروسکوپ الکترونی نشان‌دهنده ایجاد اتصالات بین سلول و بستر سه‌بعدی بود.
نتیجه‌گیری: اتصالات بین سلول و بستر فیبرینی منجر به تغییرات مورفولوژی در سلول‌های RPE می‌شود که در روزهای نخست قابل مشاهده است ولی در نهایت، پس از هضم بستر فیبرینی دوباره مورفولوژی اپیتلیوییدی غالب می‌شود.

• مجله چشم‌پزشکی بینا ۱۳۹۶؛ دوره ۲۲، شماره ۴: ۲۶۸-۲۶۴.

• **پاسخ‌گو:** دکتر سحر بالاقلی (e-mail: sahar_balagholi@yahoo.com)
۱- دانشیار- چشم‌پزشک- مرکز تحقیقات مهندسی بافت چشم- دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی- تهران- ایران
۲- دکترای خون‌شناسی آزمایشگاهی و بانک خون- گروه هماتولوژی- دانشکده پیراپزشکی- دانشگاه علوم پزشکی تهران- تهران- ایران
۳- کارشناس ارشد خون‌شناسی آزمایشگاهی و بانک خون- گروه هماتولوژی- دانشکده علوم پزشکی- دانشگاه تربیت مدرس- تهران- ایران

دریافت مقاله: ۱۵ اسفند ۱۳۹۵
تایید مقاله: ۲۰ فروردین ۱۳۹۶

Archive of SID
www.SID.ir

۴- دانشیار- دکترای خون‌شناسی آزمایشگاهی و بانک خون- گروه هماتولوژی- دانشکده علوم پزشکی- دانشگاه تربیت مدرس- تهران- ایران
۵- دانشیار- دکترای خون‌شناسی آزمایشگاهی و بانک خون- گروه هماتولوژی- دانشکده پیراپزشکی- دانشگاه علوم پزشکی تهران- تهران- ایران
۶- کارشناس ارشد خون‌شناسی آزمایشگاهی و بانک خون- گروه هماتولوژی- دانشکده پیراپزشکی- دانشگاه علوم پزشکی تهران- تهران- ایران
۷- کارشناس ارشد آمار زیستی- مرکز تحقیقات مهندسی بافت چشم- دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی- تهران- ایران
تهران- پاسداران- بوستان نهم- خیابان پایدارفرد (خیابان امیر ابراهیمی)- پلاک ۲۳- مرکز تحقیقات مهندسی بافت چشم

مقدمه

فرآورده خونی چسب فیبرینی علاوه بر کاربرد مرسوم خود در طب انتقال خون، امروزه به عنوان پلیمرهای طبیعی درحیطه مهندسی بافت مورد توجه قرار دارد[1]. در مطالعات متعدد، این محصول، به عنوان بسترهای سه‌بعدی مورد استفاده قرار گرفته و ثابت شده که به واسطه وجود مقادیر متغیری از فیبرونکتین TGFb, bFGF, PDGF, ILG, EGF, VEGF در رشد، تمایز و مهاجرت سلول‌ها تاثیرات مثبتی اعمال می‌کند[1]. بسترهای (Scaffold) فیبرینی با توجه به ویژگی زیست تخریب‌پذیری و زیست‌سازگاری به عنوان حامل‌های سلولی و دارویی بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند[2و3]. فیبرینوژن، پروتیینی در خون است که در سیستم انعقادی نقش بسیار مهمی ایفا می‌کند. امروزه ثابت شده که بستر فیبرینی ایجاد شده در محیط زخم، سلول‌ها را تحریک به ترشح ماتریکس خارج‌سلولی می‌کند و تا ایجاد ماتریکس خارج‌سلولی وظیفه حمایت از سلول‌ها را به عهده دارد. این ویژگی نشان داد که این محصول خونی ظرفیت بالایی در مهندسی بافت و درمان‌های احیاکننده دارد[4].

در دهه‌های اخیر، کاربرد درمان‌های احیاکننده در چشم‌پزشکی نیز رواج یافته است. در این بین از سلول‌های رنگدانه‌ای شبکیه Retinal pigmented epithelium (RPE) که در انسجام شبکیه و پیش‌برد سیکل‌های بینایی نقش حیاتی دارند، به منظور پیوند در بیماری‌های تخریب‌کننده شبکیه استفاده شده است[5و6]. با توجه به مشکلاتی مانند عدم جاگیری صحیح و به دنبال آن نشت این سلول‌ها از محل پیوند، به نظر می‌رسد که استفاده از بسترهای سه‌بعدی که منجر به جاگیری صحیح و چسبندگی این سلول‌ها می‌شود می‌تواند نتایج امیدوارکننده‌ای به همراه داشته باشد[7و8].

در این مطالعه با در نظر گرفتن پتانسیل بالای چسب فیبرینی در حفظ ویژگی‌های سلول بعد از پیوند، ابتدا سلول‌های RPE در مجاورت چسب فیبرینی کشت داده شدند. سپس این سلول‌ها از نظر تغییرات مورفولوژی مورد بررسی قرار گرفتند.

روش پژوهش

کشت سلول‌های RPE

دو گلوب چشم از بانک چشم جمهوری اسلامی ایران تهیه و روی پلیت یا گاز تمیز قرار داده شدند که با تیغ از وسط چشم یک برش عمودی و بر برش قبلی برش دیگر عمودی ایجاد شد تا بافت چشم به صورت چهار پر باز شود. قسمت‌های سیاه رنگ حاوی سلول‌های RPE، با پنس جدا شده و در آنزیم دیسپاز ۲ درصد (Gibco, Invitrogen corporation, Japan) قرار داده شدند. 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 DMEM/F۱۲ (Sigma-Aldrich, Munich, Germany) و GIBCO-) (BRL, Eggenstein, Germany ۲۰ درصد FBS می‌باشد منتقل گردید و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و CO2 ۵ درصد انکوبه شد. کلیه آزمایش‌ها روی سلول‌هایRPE پاساژهای ۵-۳ صورت گرفت.

ساخت چسب فیبرینی

تعداد سه کیسه کرایو (که از انتقال خون تهیه می‌شوند) با هم مخلوط شده و تعیین غلظت شدند (مخزن اولیه: ۴۲۰ mg/dl). رقت ۸۴ mg/dl از مخزن (استوک) اصلی تهیه گردید. به منظور ایجاد چسب فیبرینی، از ترومبین حاصل شده از پلاسمای تهیه شده از سازمان انتقال خون استفاده شد. برای نزدیک بودن فرآیند ایجاد چسب فیبرینی به حالت طبیعی در بدن، عمل مجاورت ترومبین با غلظت‌های مختلف چسب فیبرینی در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت.

انکپسوله کردن سلول های RPE با چسب فیبرینی

به منظور انکپسوله شدن سلول‌ها با چسب فیبرینی، ۵ حجم کرایو حاوی ۱۰۰۰۰ عدد سلول RPE به ۲ حجم ترومبین و۱حجم کلسیم کلراید ۴۰ mmol/ml اضافه شد.

بررسی‌های میکروسکوپ معکوس

سلول‌های RPE انکپسوله شده با چسب فیبرینی در فواصل

Archive of SID

www.SID.ir

زمـانی ۱، ۳ و ۵ روز از نظـر تغییـرات مورفولـوژی بـا اسـتفاده از میکروسکوپ معکوس Olympus IX۷۱ مورد بررسی قرار گرفتند.

بررسی‌های ماکروسکوپی

فرایند هضم بسـتر فیبرینـی، در فواصـل ۱و۳و۵ روزه بررسـی گردید و تصویربرداری صورت گرفت.

میکروسکوپ الکترونی

در آمـاده‌سـازی نمونـه‌هـا بـرای تصـویربرداری میکروسـکوپ الکترونی، ابتدا محتویات سلولی تخلیه و هر چاهک ۳ بار و هـر بـار به مدت ۵ دقیقه با PBS شسته شد. سـپس سـلول‌هـا بـه مـدت ۲ ساعت با گلوتاردهید ۲/۵ درصد مجاور گردید. در مرحلـه بعـد، بـه منظور آبگیری سلول‌ها، هر چاهک به مدت ۱۰ دقیقـه در معـرض اتانول با درصدهای ۵۰ و ۶۰ و ۸۰ و ۹۰ و ۱۰۰ قرار گرفت. پس از آن، نمونه‌ها برای تصویربرداری بـا میکروسـکوپ الکترونـی KYKY-EM3200 ارسال شدند.

یافته‌ها

ساخت چسب فیبرینی

با استفاده از کرایو و ترومبین حاصل شده از پلاسـما و کلسـیم کلراید ۴۰ mmol/ml به طور متوسـط بـرای غلظـت ۸۴ mg/dl در مدت زمـان ۳/۲۱ دقیقـه بسـتر منسـجمی از چسـب فیبرینـی در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد ایجاد شد؛ قطر این ساختار سـه‌بعـدی بین ۳-۲/۵ میلی‌متر بود.

کشت و تایید ماهیت سلول‌های RPE

سلول‌های RPE بـا منشـا انسـانی روی سـطوح ظـروف کشـت سـلولی متصـل شـده و مورفولـوژی شـبه‌اپـی‌تلیوییـدی و شبه‌فیبروبلاستی داشتند. این سلول‌ها دارای توانایی مهاجرت روی سطوح دوبعدی بودنـد. نتـایج حاصـل از تسـت ایمونوسایتوشـیمی نشان‌دهنده بیان مارکر RPE۶۵ و تایید ماهیت این سلول‌ها بود.

ارزیابی‌های میکروسکوپ معکوس

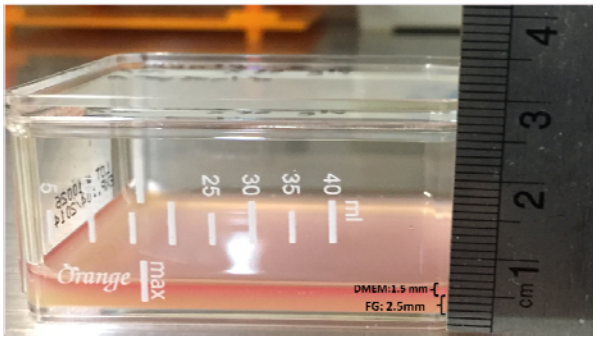
سلول‌هـای RPE در حالـت طبیعـی در محـیط کشـت از نظـر مورفولوژی ناهمگون (هتروژن) بوده و به اشکال شبه‌اپی‌تلیوییـدی، شبه‌عصبی و شـبه‌فیبروبلاسـتی تقسـیم مـی‌شـوند. در تیمارهـای صورت گرفته با چسب فیبرینـی در روزهـای نخسـت، مورفولـوژی شبه‌عصبی و در روزهای انتهـایی، مورفولـوژی شـبه‌اپـی‌تلیوییـدی غالب شدند. تصاویر مربوط به سلول‌های انکپسوله شـده بـا چسـب فیبرینی، نشان دادند که سلول‌های مذکور به مرور زمـان از حالـت گرد (انکپسوله) به مورفولوژی دندریتی فرم یا شبه‌عصبی در بسـتر سه‌بعدی تغییر حالت داده و پس از هضم بستر سه‌بعدی به سـطح دوبعدی فلاسک کشت سلولی مهاجرت نمودنـد و بـه ایـن ترتیـب مورفولوژی اپی‌تلیوییدی غالب شد. در سلول‌هـای گـروه شـاهد در روزهای ۱، ۳ و ۵، شکل (مورفولوژی) اپی‌تلیوییدی غالب بود.

بررسی‌های حاصل از میکروسکوپ الکترونی

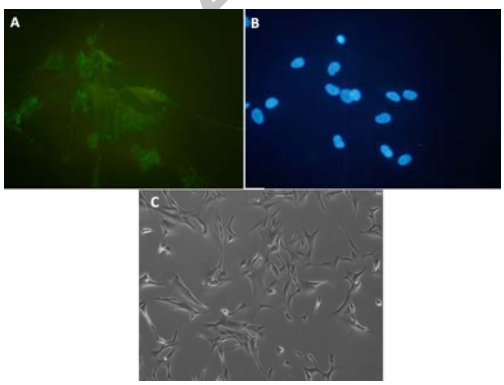
تصاویر حاصل از بررسـی‌هـای میکروسـکوپ الکترونـی در روز سوم نشان‌دهنده ایجاد اتصالات بین سلول‌های انکپسوله شده RPE و بستر سه‌بعدی فیبرینی بود.

ارزیابی‌های ماکروسکوپی

چسب فیبرینی بدون مواد پایدارکننده در غلظت ۸۴ mg/dl در مدت زمان ۵ روز توسط سلول‌های RPE به طور کامل هضم شـد و بقایای فیبرینی در ظروف کشت قابل مشاهده بود.



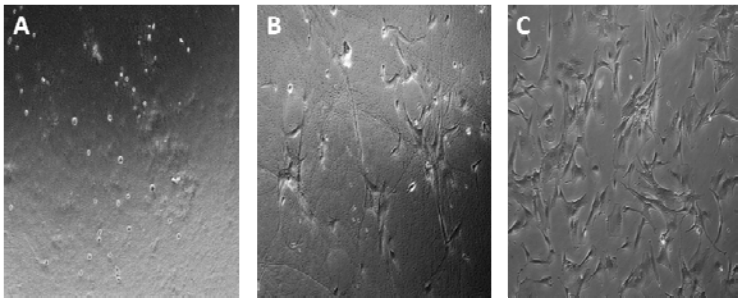
تصویر ۱- قطر بستر فیبرینـی ایجـاد شـده در غلظـت ۸۴ mg/dl بـه طـور متوسط بین ۳-۲/۵ میلی‌متر می‌باشد.



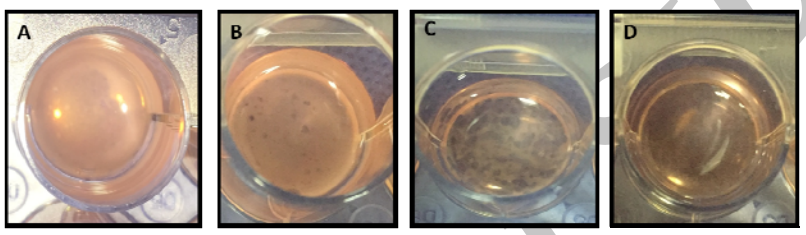
تصویر ۲- سلول‌های RPE از نظـر بیـان مارکرهـای RPE۶۵ مثبـت هسـتند FITC(A),DAPI(B). ایـن سـلول‌هـا در محـیط کشـت مورفولـوژی شبه‌اپی‌تلیوییدی و شبه‌فیبروبلاستی دارند. (c)

Archive of SID

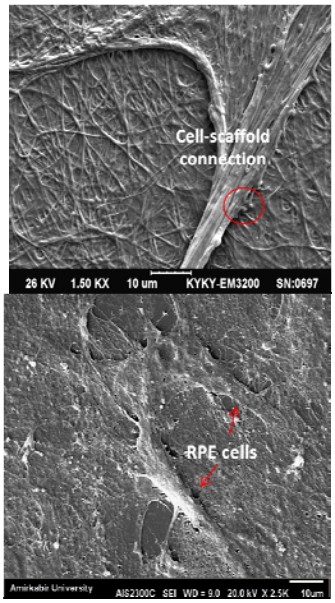
www.SID.ir



تصویر ۳- سلول‌های RPE در روز صفر به حالت گرد انکپسوله شدند (A) سپس تا روز سوم مورفولوژی دندریتیک فرم غالب بود (B) و به مرور زمان و پس از هضم بستر فیبرینی در روز پنجم مورفولوژی شبه‌اپی‌تلیوییدی غالب شد (C). در سلول‌های گروه شاهد در روزهای ۱، ۳ و ۵، مورفولوژی شبه‌اپی‌تلیوییدی غالب بود.



تصویر ۴- هضم مرحله به مرحله چسب فیبرینی با غلظت ۸۴ mg/dl توسط سلول‌های RPE . روز صفر (A) ، روز یک (B) ، روز سه(C)، روز پنج (D)



تصویر ۵- تصاویر نشان‌دهنده ارتباطات بین سلول و بستر فیبرینی بود.

بحث

نتایج حاصل از تصاویر میکروسکوپ الکترونی و معکوس نشان داد که سلول‌های RPE در تعامل با بستر فیبرینی اسکلت سلولی خود را تغییر می دهند که به شکل دندریتی فرم نمایان می‌شود. در این خصوص به نظر می‌رسد با توجه به وجود اتصال‌های (لیگاندهای) اینتگرین در بسترهای فیبرینی مانند RGD موجود در فیبرونکتین، لامینین، ویترونکتین القای این نوع مورفولوژی می‌تواند در اثر تجمع موضعی (لوکالیزه شدن) اینتگرین در غشای سلول‌های RPE و به دنبال آن تغییر اسکلت سلولی باشد و به این علت که سلول به شکل سه‌بعدی و در همه جهات با چسب فیبرینی در ارتباط است، به شکل دندریتیک فرم مشاهده می‌شود. اینتگرین‌ها، عامل اصلی اتصال سلول به ماتریکس خارج سلولی می باشند و این گیرنده در سلول‌های عصبی در برخورد با ماتریکس خارج سلولی(ECM) به طور موضعی بیان شده و مسیرهای سیگنالی را در جهتی پیش می‌برند که منجر به تغییر اسکلت سلولی و رشد اکسون و دندریت‌های سلول‌های عصبی می‌شود[۹]. مطالعه Anderson DH نشان داد که سلول‌های RPE بیان گیرنده‌های اینتگرین β1 را در سطح غشای سلول متمرکز می‌کنند و ارتباط این گیرنده با مولکول‌های چسبندگی مانند فیبرونکتین و فیبرینوژن مسیرهای سیگنالی را در جهتی پیش می‌برند که به تغییر اسکلت سلولی منجر شده و شکل‌گیری میکروویلی‌ها را باعث می‌شود[۱۰]. میکروویلی‌ها در سلول‌های RPE در حالت‌های طبیعی،

Archive of SID
www.SID.ir

سلول‌های گیرنده نوری را احاطه نموده و از این طریق با آن‌ها ارتباط برقرار می‌کنند. این میکروویلی‌ها سطح تماس این سلول‌ها را تا ۳۰ برابر افزایش می‌دهند[11].

نکته مهم دیگر در مورد اینتگرین‌ها، اهمیت اتصال مجدد سلول‌های RPE بعد از پیوند می‌باشد که وابسته به بیان این گیرنده بوده به طوری که تاخیر در اتصال مجدد، با آپوپتوز این سلول‌ها همراه است؛ در زمینه بیماری‌های تخریب‌کننده شبکیه، معمولا لایه بروکس نیز آسیب دیده است. با توجه به وجود اتصال‌های اینتگرین در چسب فیبرینی و ژل پلاکتی می‌توان انتظار داشت که این بسترهای سه‌بعدی مانند پل عمل کرده و به افزایش بیان اینتگرین و در نتیجه افزایش اتصال سلول به لایه بروکس می‌انجامد. در این رابطه Heller JP نشان داد که نشانه اصلی بیماری AMD، تغییر در ماتریکس سه‌بعدی و در نتیجه تغییر لایه بروکس می‌باشد که منجر به کاهش لیگاندهای اینتگرین می‌شود[12]. بنابراین استفاده از بسترهای بیان‌کننده لیگاندهای اینتگرین در این گونه موارد بسیار کمک‌کننده است. در این رابطه بررسی بیان ژن و پروتیین اینتگرین می‌تواند در تایید این مشاهدات کمک‌کننده باشد.

نتیجه‌گیری

تغییرات مورفولوژی مشاهده شده در این مطالعه نشان می‌دهد که سلول‌های انکپسوله شده با رشته‌های چسب فیبرینی ارتباط برقرار می‌کنند و این محصول، پتانسیل ایجاد پل بین سلول‌ها و لایه بروکس را داراست و می‌تواند از نشت و خروج سلول‌ها از ناحیه پیوند جلوگیری نماید، بنابراین اثبات این قضیه نیاز به مطالعات بیش‌تر دارد.

منابع

1. Ho W, Tawil B, Dunn JC, et al. The behavior of human mesenchymal stem cells in 3D fibrin clots: dependence on fibrinogen concentration and clot structure. Tissue Eng 2006;12:1587-1595.
2. Li Y, Meng H, Liu Y, et al. Fibrin gel as an injectable biodegradable scaffold and cell carrier for tissue engineering. Scientific World Journal. picer PP, Mikos AG. Fibrin glue as a drug delivery system. J Control Release 2010;148:49-55.
3. Moroz A, Felisbino SL, Deffune E. Platelet and plasma bioactive scaffolds for stem cell differentiation: what are we missing? Platelets 2014;25:556-557.
4. Ferreira MS, Jahnen-Dechent W, Labude N, et al. Cord blood-hematopoietic stem cell expansion in 3D fibrin scaffolds with stromal support. Biomaterials 2012;33:6987-6997.
5. Lu JT, Lee CJ, Bent SF, et al. Thin collagen film scaffolds for retinal epithelial cell culture. Biomaterials. 2007;28:1486-1494.
6. Stanzel BV, Espana EM, Grueterich M, et al. Amniotic membrane maintains the phenotype of rabbit retinal pigment epithelia cells in culture. Exp Eye Res 2005;80:103-112.
7. Thumann G, Schraermeyer U, Bartz-Schmidt KU, et al. Descemet's membrane as membranous support in RPE/IPE transplantation. Curr Eye Res 1997;16:1236-1238.
8. McHugh KJ, Tao SL, Saint-Geniez M. Porous Poly (e-Caprolactone) Scaffolds for Retinal Pigment Epithelium Transplantation Invest Ophthalmol Vis Sci 2014;55:1754- 1762.
9. Anderson DH, Guérin CJ, Matsumoto B, et al. Identification and localization of a beta-1 receptor from the integrin family in mammalian retinal pigment epithelial cells. Invest Ophthalmol Vis Sci 1990;31:81-93.
10. Sparrow JR, Hicks D, Hamel CP. The retinal pigment epithelium in health and disease. Curr Mol Med 2010;10:802-823.
11. Booij JC, Baas DC, Beisekeeva J, et al. The dynamic nature of Bruch's membrane. Prog Retin Eye Res 2010;29:1-18.
12. Lu JT, Lee CJ, Bent SF, et al. Thin collagen film scaffolds for retinal epithelial cell culture. Biomaterials. 2007;28:1486-1494.

Archive of SID

www.SID.ir