

بررسی تأثیر سلول‌های اپی‌تلیال بر روی رگ‌زایی پرده‌ی آمنیون با استفاده از آزمون حلقه‌ی آئورت رت

حسن نیک‌نژاد^{۱*} (Ph.D)، قاسم یزدان‌پناه^۲ (M.D)، امیر نیک‌بین^۳ (M.D)، فاطمه عاصی‌طهرانی^۱ (M.Sc)، حبیب‌الله پیروی^۱ (M.D)

۱- دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده فناوری‌های نوین پزشکی، مرکز تحقیقات نانو تکنولوژی پزشکی و مهندسی بافت

۲- دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، کمیته پژوهشی دانشجویان

۳- دانشگاه علوم پزشکی کردستان، کمیته پژوهشی دانشجویان

چکیده

سابقه و هدف: در خصوص رگ‌زایی پرده‌ی آمنیون پس از پیوند به عنوان جایگزین قرنیه گزارشات متناقضی وجود دارد. در این مطالعه‌ی برون تن، اثر سلول‌های اپی‌تلیال پرده‌ی آمنیون در القا یا مهار رگ‌زایی مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها: پرده‌های آمنیون با و یا بدون سلول اپی‌تلیال در دو حالت بالابودن سطح اپی‌تلیال و بالابودن سطح مزانشیمال درون پلیت‌های ۱۲ خانه کشت داده شدند. برای بررسی رگ‌زایی، حلقه‌های آئورت رت بر روی پرده‌های آمنیون کشت داده شده قرار گرفتند. داده‌ها به صورت وجود و یا عدم وجود رگ‌زایی طی ۷ روز گزارش شدند. یافته‌ها: زمانی که پرده‌ی آمنیون همراه با سلول‌های اپی‌تلیال بود، در هر دو سطح اپی‌تلیال و مزانشیمال رگ‌زایی دیده نشد. پس از حذف سلول‌های اپی‌تلیال از پرده‌ی آمنیون، در هر دو سطح اپی‌تلیال و مزانشیمال، نفوذ سلول‌های فیبروبلاستی دوکی‌شکل و شبیه اندوتلیال از حلقه‌ی آئورت، بعد از ۲ روز دیده می‌شد. پس از آن سلول‌ها در یک جهت رشد کردند و ساختارهای شبه مویرگی را تا روز هفتم تشکیل دادند. نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان داد که سلول‌های اپی‌تلیال نقش کلیدی در القا و یا مهار رگ‌زایی پرده‌ی آمنیون دارند. هم‌چنین پرده‌ی آمنیون بدون سلول‌های اپی‌تلیال، بستر مناسبی برای رگ‌زایی می‌باشد. خاصیت دوگانه‌ی پرده‌ی آمنیون در رگ‌زایی قابل استفاده در موارد کلینیکی متعددی می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: سلول‌های اپی‌تلیال، پرده‌ی آمنیون، رگ‌زایی، آزمایش حلقه‌ی آئورت

مقدمه

انتشار مایع آمنیونی به داخل آن و یا از دسیدوای زمینه‌ای تامین می‌کند. نزدیک‌ترین لایه از پرده‌ی آمنیون به جنین لایه‌ی اپی‌تلیال آمنیونی می‌باشد که شامل یک لایه‌ی سلولی (سلول‌های اپی‌تلیال) است که به طور یک‌نواخت بر روی غشای پایه قرار گرفته‌اند. غشای پایه بر روی لایه‌ی استرومایی قرار دارد که از لایه‌های به هم فشرده‌ی کلازنی و لایه‌ی

پرده‌ی آمنیون داخلی‌ترین لایه از ۳ لایه‌ی تشکیل‌دهنده‌ی پرده‌های جنینی بوده که شامل یک تک لایه‌ی اپی‌تلیال، یک غشای پایه‌ی ضخیم و یک استرومای بدون رگ می‌باشد. پرده‌ی آمنیون هیچ رگ خونی و عصب‌رسانی ندارد، به همین‌دلیل، مواد مغذی خود را به طور مستقیم به وسیله‌ی

می‌شود، یک استراتژی جدید برای درمان بیماری‌های ایسکمیک قلبی، بیماری‌های عروق مغزی و ترمیم زخم می‌باشد [۱۲،۱۱]. پرده‌ی آمنیون می‌تواند در رگ‌زایی درمانی (به عنوان یک تحریک‌کننده‌ی رگ‌زایی) یا به عنوان مهارکننده‌ی رگ‌زایی پاتولوژیک استفاده شود.

مطالعات زیادی نشان داده‌اند که سلول‌های آمنیونی بعضی از مواد ضد رگ‌زایی شامل ترومبوسپونین-۱، اندوستاتین و هپارین سولفات را بیان می‌کنند. هم‌چنین، تمام چهار مهارکننده‌ی بافتی متالوپروتئازها (TIMP-1، 2، 3 و 4-)، که توانایی زیاد ضد رگ‌زایی دارند، در پرده‌ی آمنیون دیده شده‌اند [۱۳]. در مقابل، گزارشاتی وجود دارد که مشخص می‌کند سلول‌های آمنیونی بعضی فاکتورهای رگ‌زایی شامل فاکتور رشد اندوتلیالی عروقی، اینترلوکین ۸، آنژیوزنین، اینترفرون گاما، اینترلوکین ۶، فاکتور رشد فیبروبلاستی پایه، فاکتور رشد اپیدرمی و فاکتور رشد مشتق از پلاکت را ترشح می‌کنند [۱۴،۱۵].

علاوه بر سلول‌های آمنیونی، دیگر قسمت‌های پرده‌ی آمنیون، رگ‌زایی را تحت تاثیر قرار می‌دهند. در بسیاری از مطالعات، غشای پایه‌ی پرده‌ی آمنیون به عنوان زمینه‌ی رشد برای سلول‌های اندوتلیال در نظر گرفته شده است. پرده‌ی آمنیون تکثیر و تشکیل اتصالات سلول‌های اندوتلیال کشت داده شده را تسهیل می‌کند [۱۶]. ما به تازگی کاشت سلول‌های اندوتلیال بر روی داربست پرده‌ی آمنیون به عنوان یک دیدگاه بالقوه برای مهندسی بافت عروق را گزارش کردیم [۱۷،۱۸]. در مطالعات مختلف، هر دو تاثیر رگ‌زایی و ضد رگ‌زایی پرده‌ی آمنیون مورد بررسی قرار گرفته است [۱۳،۱۵].

در مطالعه حاضر، این فرضیه مد نظر بوده است که سلول‌های اپی‌تلیال آمنیونی به عنوان عامل اصلی دارای نقش در خواص ضد رگ‌زایی و رگ‌زایی پرده‌ی آمنیون می‌باشند. بدین صورت که حضور این سلول‌ها مانع از انجام روند رگ‌زایی، و نبود آن‌ها باعث رویت رگ‌زایی بر روی پرده‌ی آمنیون می‌شود [۱۹،۲۰]. به همین منظور بررسی برون تن رگ‌زایی حلقه‌ی آئورت رت بر روی پرده‌ی آمنیون با

فیبروبلاستی تشکیل شده است. خارجی‌ترین لایه‌ی پرده‌ی آمنیون لایه‌ی اسفنجی بوده که نزدیک‌ترین لایه به کوریون می‌باشد [۱].

سال‌هاست که از پرده‌ی آمنیون به عنوان یک ماده‌ی زیستی برای بازسازی‌های جراحی استفاده می‌شود. این بافت در پیوند پوست، پوشاندن زخم در سوختگی پوست و ترمیم زخم‌های مزمن ساق پا مورد استفاده قرار گرفته است. هم‌چنین، پرده‌ی آمنیون به طور گسترده‌ای در جراحی بازسازی گوش و حلق و بینی در سر و گردن و جراحی‌های حفره‌ی دهانی، مثانه و واژن مورد استفاده قرار گرفته است. هم‌چنین در درمان انسداد پریکارڈ و حتی پیش‌گیری از چسبندگی‌های جراحی مورد استفاده قرار می‌گیرد [۲،۱]. پرده‌ی آمنیون به خاطر توانایی کاهش التهاب و اسکار، دارای اهمیت بوده است [۳،۴]. این غشا هم‌چنین دارای خواص ضد میکروبی و ضد ویروسی [۵،۶] و خاصیت ایمنی‌زایی پایین [۷] می‌باشد.

پرده‌ی آمنیون به عنوان یک داربست که رشد و مهاجرت سلول‌های اپی‌تلیال از منشا‌های مختلف را، مانند اپی‌تلیوم سطح چشم، پشتیبانی می‌کند، مطرح است. هم‌چنین نشان داده شده است که استرومای پرده‌ی آمنیون شامل تعدادی از فاکتورهای رشد، پروتئین‌های گوناگون ضد التهاب و مهارکننده‌های طبیعی بسیاری از پروتئازها می‌باشد [۸].

گزارش‌های بحث‌انگیزی از خصوصیات رگ‌زایی و مهار رگ‌زایی پرده‌ی آمنیون وجود دارد. رگ‌زایی شامل تشکیل مویرگ‌ها از عروق ریز موجود می‌باشد [۹]. رگ‌زایی نقشی اساسی در بسیاری از فرآیندهای طبیعی و پاتولوژیک دارد. رگ‌زایی فیزیولوژیک فاکتور مهم در بهبود زخم و شکستگی، تشکیل جسم زرد، رشد اندومتر، لانه‌گزینی جنین و تشکیل جفت دارد. در مقابل، رگ‌زایی پاتولوژیک در پاتوفیزیولوژی رشد و متاستاز تومور، آرتریت روماتوئید، رتینوپاتی، التهاب مزمن و پسوریازیس نقش دارد [۱۰]. رگ‌زایی درمانی که به عنوان استفاده از عوامل بیولوژیک یا مواد زیست فعال برای تحریک رشد عروق خونی جدید تعریف

سلول‌های اپی‌تلیال آسپیی به غشای پایه‌ی زیر آن‌ها نرسد، به همین دلیل ممکن است در مناطقی تعداد بسیار کمی سلول باقی مانده باشد که در صورت رویت این سلول‌ها، حتی‌الامکان نتایج حاصل از آن بافت مد نظر قرار نمی‌گرفت.

بررسی برون تن رگ‌زایی با استفاده از آزمایش حلقه آئورت رت (rat aortic ring assay) صورت گرفت [۲۲]. حلقه‌های آئورت از آئورت نزولی توراسیک سمت چپ رت‌های ۱۲ هفته‌ای به دست آمد. از رت‌های با وزن ۱۵۰ تا ۲۰۰ گرم استفاده شد که در ۱۲ ساعت نور و ۱۲ ساعت تاریکی و با آب و غذاییکسان نگه‌داری می‌شدند. تمامی پروسه تحقیقاتی به تایید کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی رسید. آئورت جدا شده با استفاده از یک محلول آنتی‌بیوتیکی ۱X (Penicillin-Streptomycin) شسته شد. سپس به قطعات حلقوی با ضخامت ۲ میلی‌متر بریده شد و این قطعات بلافاصله بر روی پرده‌ی آمیون در پلیت‌های کشت از قبل تهیه شده قرار داده شدند و برای ۷ روز نگه‌داری شدند که در این مدت روند انجام رگ‌زایی بر روی آن‌ها بررسی شد. محیط کشت هر ۲ روز تعویض می‌شد.

رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین. نمونه‌های پرده‌ی آمیون فاقد سلول‌های اپی‌تلیال و دارای این سلول‌ها در فرمالین ۱۰٪ به مدت ۲۴ ساعت فیکس شدند. سپس در پارافین قرار داده شده و با استفاده از میکروتوم به ضخامت ۴ میکرومتر بریده شدند و بر روی لام قرار گرفتند. سپس برش‌های بافتی به وسیله‌ی هماتوکسیلین (برای رنگ‌آمیزی هسته‌ها) و پس از شستشو با اتوزین رنگ‌آمیزی شدند و در نهایت با استفاده از میکروسکوپ نوری مورد ارزیابی قرار گرفتند.

نتایج

رنگ‌آمیزی پرده‌ی آمیون در هر دو حالت فاقد سلول و دارای سلول‌های اپی‌تلیال، در زیر میکروسکوپ نوری نشان داد که در بافتی که سلول‌های آن جدا نشده بودند لایه‌ی سلول‌های اپی‌تلیال در سطح به صورت استوانه‌ایا مکعبی با

سلول‌های اپی‌تلیال آمیونی و بدون این سلول‌ها، مورد ارزیابی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

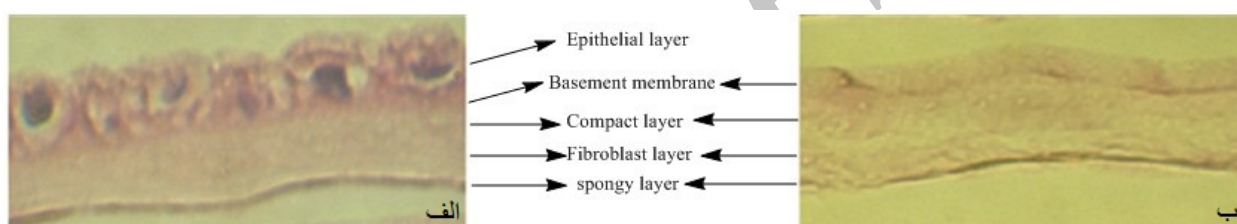
تهیه و آماده‌سازی پرده‌ی آمیون. پس از کسب رضایت آگاهانه، بافت‌های جفت از سزارین‌های انتخابی مادران سالم در هفته‌های ۳۶ تا ۳۸ بارداری از بیمارستان‌های عرفان و آیت‌الله طالقانی تهران تهیه شد. بلافاصله پس از جراحی، پرده‌ی آمیون (۱۲ عدد) در محیطی استریل از جفت جداسازی شده و با بافر فسفات سالین (PBS) شستشو داده شده و در محلول حاوی آنتی‌بیوتیک نگه‌داری شد [۲۱].

مطالعات برون تن. پس از شستشو، پرده‌ی آمیون به دو قطعه تقسیم شد. یک قطعه دست‌نخورده باقی ماند و به قطعات ۲×۲ سانتی‌متری تقسیم شد. برای حذف سلول‌های اپی‌تلیال آمیونی از روی پرده‌ی آمیون، قطعه‌ی دیگر آن در محلول استریل آنزیمی (تریسین-EDTA ۰.۳٪/۰.۳٪ (Sigma-Aldrich)) برای ۱۰ دقیقه قرار داده شد. سپس با بافر فسفات سالین شستشو داده شده و سمت اپی‌تلیال آن به روش مکانیکی (به وسیله‌ی cell scraper) سلول‌زدایی شد. پس از جداسازی سلول‌های اپی‌تلیال، پرده‌ی آمیون بدون این سلول‌ها به قطعات ۲×۲ سانتی‌متر بریده شد. هرکدام از این قطعات با و بدون سلول‌های اپی‌تلیال در کف پلیت‌های ۱۲ خانه به دو صورت بالا بودن سطح اپی‌تلیال و بالا بودن سطح مزانشیمال، پهن شدند. سپس، ۲ میلی‌لیتر از محیط DMEM (Gibco) حاوی ۱۵٪ (Sigma-Aldrich) FBS، 10ng/ml bFGF (Aldrich-Sigma) و ۱٪ پنی‌سیلین - ستریتومایسین، به هر چاهک اضافه شد و پلیت‌ها در انکوباتور کشت سلولی در ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و ۵٪ دی‌اکسیدکربن قرار داده شد. از آنجایی که در مطالعات گذشته غشای پایه‌ی پرده‌ی آمیون به عنوان بستری برای کشت سلول‌های اپی‌تلیال و اندوتلیال مورد استفاده قرار گرفته است و فواید آن دیده شده است، جمع‌آوری سلول‌های اپی‌تلیال به روش هضم آنزیمی و جداسازی مکانیکی به صورتی‌انجام گرفت که علاوه بر حذف

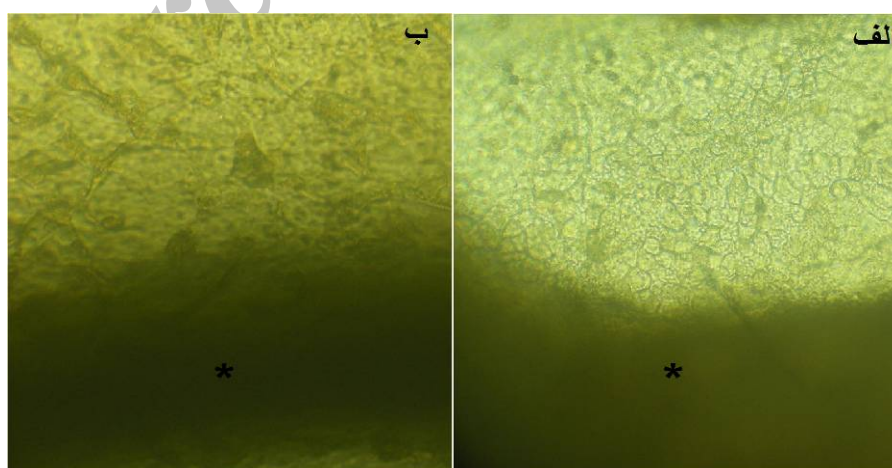
در حالتی که پرده‌ی آمینون دارای سلول‌های اپی‌تلیال بود طی بررسی‌های متوالی در روزهای ۲، ۵ و ۷ در هر دو حالت بالا بودن سطح مزانشیمال و بالا بودن سطح اپی‌تلیال اثری از نفوذ سلول‌های فیبروبلاستی و متعاقب آن جهت‌گیری خاص و تشکیل مویرگ دیده نشد (شکل ۲، الف و ب). از آنجایی که فرضیه‌ی مورد بررسی در این مطالعه این موضوع را بیان می‌کند که خواص ضد آنژیوژنز پرده‌ی آمینون وابسته به سلول‌های اپی‌تلیال آن می‌باشد، لذا پس از نبود هر گونه شواهد آنژیوژنز بر روی هر دو سطح پرده‌ی آمینون دارای سلول‌های اپی‌تلیال، این سلول‌ها با هضم آنزیمی از پرده‌ی آمینون جدا شدند و آزمایش حلقه‌ی آئورت بر روی پرده‌ی فاقد سلول‌های اپی‌تلیال آمینونی صورت گرفت.

هسته‌ی گرد به هم‌راه ۴ لایه‌ی دیگر پرده‌ی آمینون شامل غشای پایه، استروما (که خود متشکل از لایه‌ی فشرده کلاژنی و لایه‌ی فیبرویلاستی است) و لایه‌ی اسفنجی مشاهده می‌شدند (شکل ۱، الف)، در حالی که در نمونه‌ی پرده‌ی آمینون که سلول‌زدایی شده بود، لایه‌ی سلول‌های اپی‌تلیال دیده نمی‌شد (شکل ۱، ب).

در نمونه‌هایی که بافت پرده‌ی آمینون دارای سلول‌های اپی‌تلیال بود، حلقه‌ی آئورت دارای چسبندگی اندک به سطح اپی‌تلیال پرده‌ی آمینون بود، در حالی که زمانی که سلول‌های اپی‌تلیال جدا شده بودند حلقه‌ی آئورت پس از ۲ ساعت به غشای پایه متصل می‌شد. در حالتی که سطح مزانشیمال در دسترس بود، حلقه‌ی آئورت پس از ۲ ساعت چسبندگی قابل قبولی به پرده‌ی آمینون داشت.



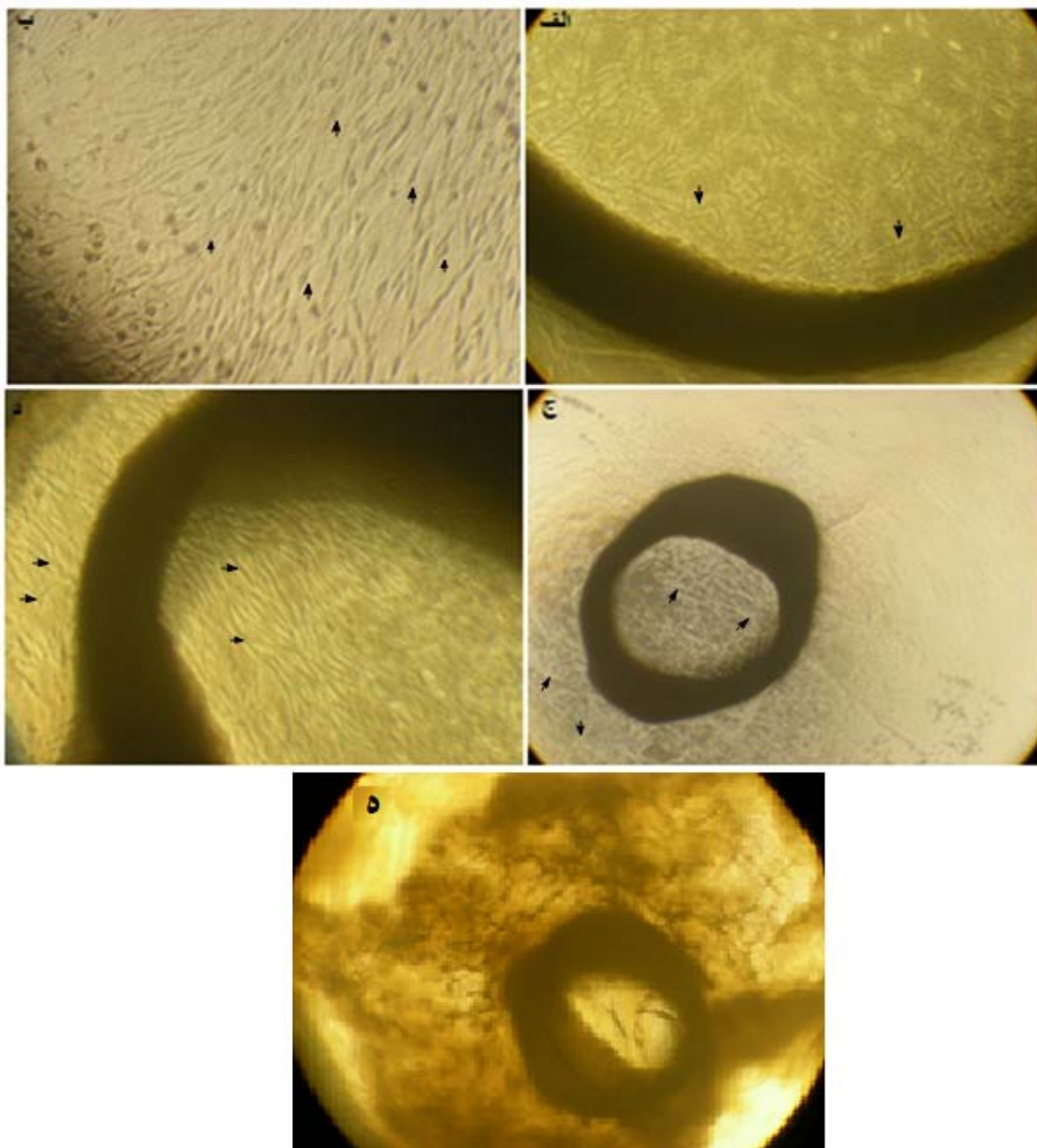
شکل ۱. رنگ آمیزی هماتوکسیلین و اتوزین پرده‌ی آمینون. الف: پرده‌ی آمینون شامل لایه‌ی اپی‌تلیال (حاوی سلول‌های اپی‌تلیال)، غشای پایه، و لایه‌ی استروما، شامل لایه‌ی فشرده و فیبروبلاستی (حاوی سلول‌های آمینونی مزانشیمال)، و لایه‌ی اسفنجی است. ب: پرده‌ی آمینون پس از جداکردن سلول‌های اپی‌تلیال به کمک هضم آنزیمی. (بزرگنمایی $\times 400$)



شکل ۲: پرده‌ی آمینون دارای سلول‌های اپی‌تلیال. در هر دو سطح (الف) اپی‌تلیال و (ب) مزانشیمال، اثری از نفوذ سلول‌های فیبروبلاستی و آنژیوژنز دیده نمی‌شود. سلول‌های اپی‌تلیالی و سلول‌های مزانشیمالی آمینونی در این دو سطح دیده می‌شوند. (*حلقه‌ی آئورت، بزرگنمایی $\times 200$)

رویت بودند که هم در داخل و هم در خارج حلقه آئورت در هر دو سطح اپی تلیالی و مزانشیمالی دیده می شدند (به ترتیب شکل ۳، ج و د). از روز هشتم به بعد دیگر وضعیت شبه مویرگ های تشکیل شده قابل بررسی نبود زیرا پرده ی آمنیون به دور حلقه ی آئورت جمع می شد (شکل ۳، ه). این حالت هم در سطح اپی تلیالی و هم در سطح مزانشیمال دیده می شد.

پس از گذشت ۲ روز از قرار دادن حلقه ی آئورت بر روی پرده ی آمنیون فاقد سلول های اپی تلیالی، در هر دو سطح اپی تلیالی و مزانشیمال، نفوذ سلول های فیبروبلاستی دوکی شکل به پرده ی آمنیون دیده می شد که به تدریج بیش تر شدند و جهت گیری خاص پیدا کردند (به ترتیب شکل ۳، الف و ب). در روز پنجم تشکیل مورفولوژی های مویرگ مانند مشهود بود و در روز هفتم شبه مویرگ های تشکیل شده به خوبی قابل



شکل ۳: مراحل آنژیوژنز حلقه ی آئورت رت بر روی پرده ی آمنیون فاقد سلول های اپی تلیالی آمنیونی. الف: نفوذ سلول های فیبروبلاستی در روز دوم به پرده ی آمنیون در سطح اپی تلیالی فاقد سلول های اپی تلیالی آمنیونی. ب: نفوذ و جهت گیری همسو و مشخص سلول های فیبروبلاستی بر روی پرده ی آمنیون فاقد سلول های اپی تلیالی آمنیونی در سطح مزانشیمی. ج: تشکیل شبه مویرگ های مشخص در روز هفتم در داخل و بیرون حلقه ی آئورت بر روی سطح اپی تلیالی. د: تشکیل ساختار های مویرگ مانند مشخص در روز هفتم در داخل و بیرون حلقه ی آئورت بر روی سطح مزانشیمال. ه: چسبیدن و جمع شدن پرده ی آمنیون به حلقه ی آئورت که امکان بررسی بیشتر روند آنژیوژنز را فراهم نکرد. ساختار های شبه مویرگی تشکیل شده با فلش علامتگذاری شده اند.

بحث و نتیجه‌گیری

آزمایش حلقه‌ی آئورت رت برای بررسی رگ‌زایی و عوامل تاثیرگذار بر آن عموماً به این صورت انجام می‌شود که حلقه‌ی آئورت رت پس از جداسازی و شستشو در ژل‌های فیبرینیا کلاژن گذاشته می‌شود و در محیط کشت قرار داده می‌شود. پس از گذشت یک زمان اولیه (فاز lag)، به تدریج نفوذ سلول‌های فیروبلاستی و سلول‌های شبیه اندوتلیال درون ژل دیده می‌شود که به مرور به مویرگ‌های کوچکی تبدیل می‌شوند که به راحتی قابل تشخیص می‌باشند. این مرحله فاز رشد (growth phase) نام دارد که مدت زیادی به طول نمی‌انجامد. پس از این مرحله به تدریج مویرگ‌ها کم می‌شوند و از تعداد آن‌ها کاسته می‌شود که مرحله‌ی بازگشت (regression phase) نام دارد. کیفیت و طول مدت هر کدام از این مراحل وابسته به عوامل مختلفی از جمله نوع ژل استفاده شده و مواد دیگر موجود در محیط کشت می‌باشد [۲۳، ۲۴].

تاکنون در هیچ مطالعه‌ای از پرده‌ی آمیون به عنوان بستری که می‌توان رگ‌زایی حلقه‌ی آئورت رت را بر روی آن بررسی کرد، استفاده نشده است. لذا در ابتدا در این مطالعه پرده‌ی آمیون به عنوان بستری که می‌توان رگ‌زایی را از طریق حلقه‌ی آئورت بر روی آن ارزیابی کرد، معرفی می‌شود. با استفاده از این بافت می‌توان عوامل موثر در رگ‌زایی را شناسایی و ارزیابی کرد، همچنین با استفاده از پرده‌ی آمیون در این روش می‌توان مدل مناسبی برای بررسی داروهای موثر بر روند رگ‌زایی در دست داشت. در این مطالعه نیز با استفاده از این روش بررسی رگ‌زایی، که شرایط مطالعات برون تن را به مطالعات درون تن نزدیک کرده است، حلقه‌ی آئورت رت بر روی پرده آمیون قرار داده شد تا خواص رگ‌زایی این بافت مورد ارزیابی قرار گیرد. در این مطالعه پس از دو روز (فاز lag) به تدریج نفوذ سلول‌های فیروبلاستی و شبیه اندوتلیال در پرده‌ی آمیون فاقد سلول‌های اپی‌تلیال و در هر دو سطح مزانشیمال و اپی‌تلیال دیده شد که تا روز هفتم، پس از تغییر شکل و جهت‌گیری، به مویرگ‌های تمایز یافته تبدیل شدند (فاز رشد). ولی همان‌طور که در شکل ۴ نشان داده شده

است، پس از ۷ روز به دلیل چسبیدن پرده‌ی آمیون به حلقه‌ی آئورت و نبود امکان پیگیری وضعیت مویرگ‌های تشکیل شده توانایی قضاوت در خصوص فاز بازگشت آزمایش حلقه‌ی آئورت رت در این مدل نبود. در مقابل در پرده‌ی آمیون دارای سلول‌های اپی‌تلیال در هیچ کدام از سطوح این مراحل دیده نشدند.

فرضیه‌ی مورد بحث در این مطالعه، تاثیر سلول‌های اپی‌تلیال آمیونی بر روی رگ‌زایی پرده‌های آمیون تازه‌ای که پس از زایمان آماده شده بودند، می‌باشد. همان‌طور که بیان شد در حضور سلول‌های اپی‌تلیال آمیونی هیچ‌گونه روندی به سمت رگ‌زایی بر روی پرده‌ی آمیون در هر دو سطح اپی‌تلیال و مزانشیمال دیده‌نشده. در مقابل زمانی که این سلول‌ها در عین سالم ماندن غشای پایه از پرده‌ی آمیون جدا شدند، در هر دو سطح اپی‌تلیال و مزانشیمال نفوذ سلول‌های فیروبلاستی و شبیه اندوتلیال در پرده‌ی آمیون دیده شد که در نهایت تا ۷ روز پس از قرار دادن حلقه‌ی آئورت بر روی پرده‌ی آمیون شبه مویرگ‌های تشکیل شده به وضوح دیده می‌شدند.

نمود رگ‌زایی در حضور سلول‌های اپی‌تلیال آمیونی می‌تواند با ترشح پروتئین‌های ضد رگ‌زایی مانند ترومبوسپوندين و مهارکننده‌ی بافتی متالوپروتئازها، اینترلوکین-۱۰، اندوستاتین و اینترلوکین-۱ از این سلول‌ها، توضیح داده شود [۱۳]. این نتایج این موضوع را نشان می‌دهد که عمل‌کرد ضد رگ‌زایی پرده‌ی آمیون که آن را قابل استفاده در پیوند قرنیه کرده است، می‌تواند مربوط به سلول‌های اپی‌تلیال آن باشد. مطالعاتی هستند که مکانیسم‌های خواص ضد رگ‌زایی پرده‌ی آمیون را بر اساس مهار تکثیر و مهاجرت سلول‌های اندوتلیال، مهار تماس سلول-سلول و مهار تشکیل رگ پیشنهاد می‌کنند. در پیوندهای قرنیه، زمانی جراحی موفقیت‌آمیز است که پرده‌ی آمیون دارای سلول‌های اپی‌تلیال مورد استفاده قرار گیرد [۲۵]. گزارش شده است که کدورت حاصل از رگ‌زایی جدید در پیوندهای پرده‌ی

هر دو تاثیر را دارد می تواند آن را مورد مناسبی برای استفاده در طیف وسیعی از کاربردهای کلینیکی قرار دهد.

اگرچه در این تحقیق اثرات پرده‌ی آمینون به صورت برون تن مورد ارزیابی قرار گرفته و نتایج حاصله، از فرضیه مطرح شده حمایت می نماید اما بررسی‌های درون تن برای دستیابی به جزئیات بیشتر ضروری می باشد. در این راستا، روش میکروسکوپی در موجود زنده (Microinital microscopy) روشی تایید شده برای بررسی رگ‌زایی است که در مطالعات آینده باید مورد بررسی قرار گیرد. هم چنین بررسی اثر سلول‌های مزانشیمال پرده آمینون بر رگ‌زایی و اندازه‌گیری فاکتورهای ترشحی دخیل در رگ‌زایی پرده آمینون از اهداف پیش رو خواهد بود.

در این مطالعه نشان داده شد که هنگامی که سلول‌های اپی تلیال آمینونی از پرده‌ی آمینون جدا می شوند این بافت در هر دو سطح اپی تلیالی و مزانشیمی توانایی القای رگ‌زایی در مدل حلقه‌ی آئورت رت در برون تن را دارد. در حالی که حضور این سلول‌ها مانع شکل‌گیری روند رگ‌زایی در هر دو سطح پرده‌ی آمینون می شود که بیانگر این موضوع است که سلول‌های اپی تلیال آمینونی تاثیرات ضد رگ‌زایی خود را از طریق ترشح مواد محلول اعمال می کنند. از این خاصیت دوگانه‌ی پرده‌ی آمینون هم می توان در مواردی که رگ‌زایی باید مهار گردد (مانند متاستاز سلول‌های سرطانی) و هم در تسهیل روند بهبود زخم و ایسکمی‌ها استفاده کرد. مطالعات پیش تری به خصوص به صورت درون تن، برای استفاده‌های کلینیکی از این بافت باید صورت گیرد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از پرسنل محترم اتاق عمل بیمارستان‌های عرفان و آیت‌الله طالقانی تهران به خصوص سرکار خانم دکتر نیرومنش و سرکار خانم یوسفی کمال قدردانی و تشکر به عمل می آید. این مطالعه با حمایت مالی مرکز تحقیقات نانو تکنولوژی پزشکی و مهندسی بافت دانشگاه علوم پزشکی

آمینون به عنوان قرینه زمانی که سلول‌های اپی تلیال حضور داشته باشند، کاهش می یابد [۲۶].

القای رگ‌زایی به وسیله‌ی سمت استرومای پرده‌ی آمینون می تواند با فاکتورهای رگ‌زایی از جمله، فاکتور رشد عروقی اندوتلیالی، اینترلوکین-۸، اینترلوکین-۶، انکوژن وابسته به رشد (Growth related oncogene (GRO))، پروتئین کمواترکتانت مونوسیت-۱ (Monocyte Chemoattractant protein-1)، مولکول چسبندگی داخل عروقی (Intravascular adhesion molecule) و فاکتور مهارکننده‌ی مهاجرت (Migration inhibitory factor)، که از سلول‌های مزانشیمال آمینونی ترشح می شوند، توضیح داده شود [۲۷]. هم چنین وجود مارکرهای سطحی سلول‌های بنیادی شامل Oct3/4, SSEA, Nanog و Sox2 در سلول‌های مزانشیمی پرده‌ی آمینون نشان می دهد که این سلول‌ها پرتوان هستند [۲۸]. در حضور فاکتورهای رشد مثل فاکتورهای رشد فیبروبلاستی، فاکتور رشد ترانسفورم‌کننده-بتا (Transforming Growth Factor-β)، فاکتور رشد اپیدرمی، فاکتور رشد کراتینوسایتی و فاکتور رشد هیپاتوسیتی، که به وسیله‌ی پرده‌ی آمینون ترشح می شوند [۱]، سلول‌های مزانشیمی می توانند به سلول‌های اندوتلیال تمایز یابند [۲۸]. بنابراین، علاوه بر ترشح بسیاری از فاکتورهای رگ‌زایی، سمت استرومایی پرده‌ی آمینون می تواند رگ‌زایی را از طریق تمایز سلول‌های مزانشیمی خود به سلول‌های اندوتلیال، افزایش دهد. هم چنین در راستای نتایج ما تاثیر رگ‌زایی پرده‌ی آمینون بعد از کاشت آن در شکم گزارش شده است [۲۹].

رگ‌زایی به معنی تشکیل عروق جدید از سیستم عروقی موجود می باشد که می تواند هم تاثیرات خوب و هم مضر داشته باشد. این پدیده در تومورها باعث ایجاد متاستاز و تهاجم سرطان به دیگر ارگان‌ها می شود، در حالی که رگ‌زایی در پیوند بافت، سوختگی و ایسکمی می تواند روند بهبود را تسهیل کند. بنابراین هر دو تاثیر رگ‌زایی و ضد آن در شرایط مختلف سودمند هستند و دانستن این موضوع که پرده‌ی آمینون

[15] Burgos H. Angiogenic factor from human term placenta. Purification and partial characterization. *Eur J Clin Invest* 1986; 16:486-493.

[16] Tsai SH, Liu YW, Tang WC, Zhou ZW, Hwang CY, Hwang GY, et al. Characterization of porcine arterial endothelial cells cultured on amniotic membrane, a potential matrix for vascular tissue engineering. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 357:984-990.

[17] Niknejad H, Deihim T, Solati-Hashjin M, Peirovi H. The effects of preservation procedures on amniotic membrane's ability to serve as a substrate for cultivation of endothelial cells. *Cryobiology* 2011; 63:145-151.

[18] Peirovi H, Rezvani N, Hajinasrollah M, Mohammadi SS, Niknejad H. Implantation of amniotic membrane as a vascular substitute in the external jugular vein of juvenile sheep. *J Vasc Surg* 2012; 56:1098-1104.

[19] Niknejad H, Khayat-Khoei M, Peirovi H. Inhibition of MMPs might increase anticancer properties of amniotic epithelial cells. *Med Hypotheses* 2012; 78:690-691.

[20] Paeini-Vayghan G, Peirovi H, Niknejad H. Inducing of angiogenesis is the net effect of the amniotic membrane without epithelial cells. *Im J Med Hypotheses Ideas* 2011;5:16.

[21] Niknejad H, Deihim T, Peirovi H, Abolghasemi H. Serum-free cryopreservation of human amniotic epithelial cells before and after isolation from their natural scaffold. *Cryobiology* 2013; 67:56-63.

[22] Baker M, Robinson SD, Lechertier T, Barber PR, Tavora B, D'Amico G, et al. Use of the mouse aortic ring assay to study angiogenesis. *Nat Protoc* 2011; 7:89-104.

[23] Nicosia RF, Madri JA. The microvascular extracellular matrix. Developmental changes during angiogenesis in the aortic ring-plasma clot model. *Am J Pathol* 1987; 128:78-90.

[24] Nicosia RF, Ottinetti A. Growth of microvessels in serum-free matrix culture of rat aorta. A quantitative assay of angiogenesis in vitro. *Lab Invest* 1990; 63:115-122.

[25] Dua HS, Gomes JA, King AJ, Maharajan VS. The amniotic membrane in ophthalmology. *Surv Ophthalmol* 2004; 49:51-77.

[26] Kim JS, Kim JC, Na BK, Jeong JM, Song CY. Amniotic membrane patching promotes healing and inhibits proteinase activity on wound healing following acute corneal alkali burn. *Exp Eye Res* 2000; 70:329-337.

[27] Hwang JH, Shim SS, Seok OS, Lee HY, Woo SK, Kim BH, et al. Comparison of cytokine expression in mesenchymal stem cells from human placenta, cord blood, and bone marrow. *J Korean Med Sci* 2009; 24:547-554.

[28] Alviano F, Fossati V, Marchionni C, Arpinati M, Bonsi L, Franchina M, et al. Term Amniotic membrane is a high throughput source for multipotent Mesenchymal Stem Cells with the ability to differentiate into endothelial cells in vitro. *BMC Dev Biol* 2007;7:11.

[29] Kesting MR, Loeffelbein DJ, Steinstraesser L, Muecke T, Demtroeder C, Sommerer F, et al. Cryopreserved human amniotic membrane for soft tissue repair in rats. *Ann Plast Surg* 2008; 60:684-691.

شهید بهشتی انجام گردید. نتایج این مقاله برگرفته از پایان‌نامه

کارشناسی ارشد خانم فاطمه عاصی طهرانی می‌باشد.

منابع

[1] Niknejad H, Peirovi H, Jorjani M, Ahmadiani A, Ghanavi J, Seifalian AM. Properties of the amniotic membrane for potential use in tissue engineering. *Eur Cell Mater* 2008;15:88-99.

[2] Kim JC, Tseng SC. Transplantation of preserved human amniotic membrane for surface reconstruction in severely damaged rabbit corneas. *Cornea* 1995; 14:473-484.

[3] Solomon A, Rosenblatt M, Monroy D, Ji Z, Pflugfelder SC, Tseng SC. Suppression of interleukin 1alpha and interleukin 1beta in human limbal epithelial cells cultured on the amniotic membrane stromal matrix. *Br J Ophthalmol* 2001; 85:444-449.

[4] Tseng SC, Li DQ, Ma X. Suppression of transforming growth factor-beta isoforms, TGF-beta receptor type II, and myofibroblast differentiation in cultured human corneal and limbal fibroblasts by amniotic membrane matrix. *J Cell Physiol* 1999; 179:325-335.

[5] Talmi YP, Sigler L, Inge E, Finkelstein Y, Zohar Y. Antibacterial properties of human amniotic membranes. *Placenta* 1991; 12:285-288.

[6] Azuara-Blanco A, Pillai CT, Dua HS. Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction. *Br J Ophthalmol* 1999; 83:399-402.

[7] Niknejad H, Deihim T, Ahmadiani A, Jorjani M, Peirovi H. Permanent expression of midbrain dopaminergic neurons traits in differentiated amniotic epithelial cells. *Neurosci Lett* 2012; 506:22-27.

[8] Grueterich M, Espana EM, Tseng SC. Ex vivo expansion of limbal epithelial stem cells: amniotic membrane serving as a stem cell niche. *Surv Ophthalmol* 2003; 48:631-646.

[9] Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med* 2003; 9:653-660.

[10] Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* 1995; 1:27-31.

[11] Hockel M, Schlenger K, Doctrow S, Kissel T, Vaupel P. Therapeutic angiogenesis. *Arch Surg* 1993; 128:423-429.

[12] Thompson WD, Li WW, Maragoudakis M. The clinical manipulation of angiogenesis: pathology, side-effects, surprises, and opportunities with novel human therapies. *J Pathol* 2000; 190:330-337.

[13] Hao Y, Ma DH, Hwang DG, Kim WS, Zhang F. Identification of antiangiogenic and antiinflammatory proteins in human amniotic membrane. *Cornea* 2000; 19:348-352.

[14] Wolbank S, Hildner F, Redl H, van Griensven M, Gabriel C, Hennerbichler S. Impact of human amniotic membrane preparation on release of angiogenic factors. *J Tissue Eng Regen Med* 2009; 3:651-654.

Effects of epithelial cells on amniotic membrane angiogenic properties using rat aortic ring assay

Hassan Niknejad, (PhD)*¹; Ghasem Yazdanpanah, (MD)²; Amir Nikbin, (MD)³; Fatemeh A. Tehrani, (MSc)¹, Habibollah Peirovi (MD)¹

1 - School of Advanced Technologies in Medicine & Nanomedicine and Tissue Engineering Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

2 - Students' Research Committee, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

3 - Students' Research Committee, Kordestan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran

(Received: 19 Dec 2012; Accepted: 19 Oct 2013)

Introduction: There are controversial reports about angiogenesis of the amniotic membrane after transplantation as cornea substitute. Inducing or inhibitory effects of amniotic epithelial cells on angiogenesis of the amniotic membrane were evaluated in this *in vitro* study.

Materials and Methods: The scraped and non-scraped amniotic membranes were cultured in 12-wells plates in two positions of epithelial side up and mesenchymal side up. In order to evaluate angiogenesis, rat aortic rings were placed on the cultured amniotic membranes. Results were reported as presence or absence of angiogenesis within 7 days.

Results: When the amniotic membrane was intact, no formation of capillary like structures or angiogenesis was seen on both sides of the amniotic membrane. In contrast, after removing the amniotic epithelial cells, infiltration of fibroblastic cells from rat aortic ring was seen on both epithelial and mesenchymal sides of amniotic membrane after 2 days. Afterward, the cells started directional out-growth and initiated formation of capillary like structures up to day 7.

Conclusion: This study showed that epithelial cells have a key role in angiogenic or anti-angiogenic properties of the amniotic membrane. In addition, acellular amniotic membrane (without epithelial cells) is a proper substrate for angiogenesis and neovascularization. These dual effects on angiogenesis make the amniotic membrane useful in several clinical situations.

Keywords: Epithelial cells, Amniotic membrane, Angiogenesis, Aortic ring assay

* Corresponding author: Fax: +98 21 22439847; Tel +98 21 22439848
niknejad@sbmu.ac.ir

How to cite this article:

Niknejad H, Yazdanpanah G, Nikbin A, Tehrani F, Peirovi H. Effects of epithelial cells on amniotic membrane angiogenic properties using rat aortic ring assay. koomesh. 2014; 15 (3) :372-379

URL http://www.koomeshjournal.ir/browse.php?a_code=A-10-1686-1&slc_lang=fa&sid=1