Archive of SID

مـجله علمی پژوهشی دانشگـاه علوم پزشـکی زنـجان
دوره ۱۴، شماره ۵۵ ، تابستان ۱۳۸۵، صفحات ۱۷ تا ۲۳

جداسازی سلول‌های اندوتلیال بند ناف انسان و طراحی مدل رگ‌زایی آن در ماتریکس فیبرینی

کامران منصوری*، دکترعباس شیخ‌الاسلامی**، دکترغلامرضا بهرامی***، دکترعلی مصطفایی****
نویسنده‌ی مسئول: کرمانشاه، مرکز تحقیقات بیولوژی دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه amostafaie@kums.ac.ir

دریافت: ۸۴/۱۰/۲۴ پذیرش: ۸۵/۹/۲۰

چکیده

زمینه و هدف: *آنژیوژنز نقش بسیار مهمی در پدیده‌های فیزیولوژیک و پاتولوژیک دارد. بررسی و ارزیابی رشد سلول‌های اندوتلیال و در نهایت تشکیل رگ‌های جدید در شرایط آزمایشگاه با مشکلات و پیچیدگی‌های زیادی همراه است. به منظور غلبه بر این مشکل، در این مطالعه با استفاده از سلول‌های اندوتلیال طبیعی بند ناف انسان یک سیستم رگ‌زایی قابل کنترل با قابلیت تکرارپذیری بالا در شرایط آزمایشگاه طراحی شد. این مدل برای مطالعه‌ی پارامترهای متفاوتی که در فرآیند رگ‌زایی یا مهار آن دخالت دارند، قابل استفاده است.*

روش بررسی: *در این مدل از گویچه‌های پوشیده از سلول‌های اندوتلیال جدا شده از بند ناف انسان به عنوان منشأ سلول‌های اندوتلیال استفاده شده و ساختمان سه بعدی لازم برای رشد سلول‌های اندوتلیال و ایجاد رگ توسط ذرات سیتودکس پوشیده از کلاژن و ژل فیبرین تأمین گردید.*

یافته‌ها: *در این روش، ۱۰ تا ۱۲ روز بعد از کشت سلول‌های اندوتلیال بند ناف انسانی، رشد و مهاجرت سلول‌ها و در نتیجه تشکیل مویرگ‌ها در میدان میکروسکوپی به صورت انشعاب‌هایی از سلول‌های اندوتلیال منشأ، دیده شد.*

نتیجه‌گیری: *به وسیله‌ی این مدل که مدلی قابل کنترل با تکرارپذیری بالا است، می‌توان اثر مواد ممانعت‌کننده و القا کننده‌ی رگ‌زایی را مورد بررسی و مطالعه قرار داد. به عبارت دیگر، این مدل روشی بسیار مناسب جهت غربالگری مواد آنژیوژنیک و آنتی‌آنژیوژنیک در اختیار قرار می‌دهد.*

واژگان کلیدی: رگ زایی، سلول اندوتلیال، بند ناف

مقدمه

شبکه‌ی قلبی- عروقی اولین سیستمی است که در مرحله‌ی گاسترولای جنینی تکامل می‌یابد. سازماندهی اولیه‌ی سلول‌های اندوتلیال که منجر به ایجاد عروق می‌گردد، واسکلوژنز خوانده می‌شود. آنژیوژنز نیز رشد و تکامل عروق جدید از طریق جوانه زدن سلول‌های اندوتلیال عروق موجود می‌باشد (۱). تهاجم موضعی بافت که به وسیله‌ی سلول‌های اندوتلیال در طی فرآیند تشکیل عروق اتفاق می‌افتد، به وسیله‌ی عوامل داخل سلولی و استروما تنظیم شده و نتیجه‌ی آن سازماندهی شبکه‌ی مویرگی است. هنگامی که تحریکات آنژیوژنیک متوقف می‌شود، این سلول‌ها شکلی غیر تهاجمی یافته و به حالت پایدار باز می‌گردند. آنژیوژنز نقش بسیار مهمی در پدیده‌های فیزیولوژیکی نظیر رشد جنین و ترمیم بافت و پدیده‌های پاتولوژیکی نظیر رتینوپاتی دیابتی، آرتریت، رشد توده‌ی سرطانی و متاستاز ایفا می‌کند (۴-۱).

در حقیقت رشد توده‌های سرطانی، وابسته به تشکیل

---

* کارشناس ارشد هماتولوژی، مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی، مربی دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه
** دکترای داروسازی، مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی، مربی دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه
*** دکترای تخصصی فارماکولوژی، مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی، دانشیاردانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه
**** دکترای تخصصی ایمونولوژی، مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی، دانشیار دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه

www.SID.ir

Archive of SID

رگ‌های جدیدی است که از طریق آن تغذیه واکسیژن رسانی این توده‌ها تأمین می‌گردد (۶ ، ۵). ادامه‌ی رشد نئوپلاسم اولیه و متاستاز بستگی به خون رسانی کافی به آن منطقه دارد. فرآیند تشکیل عروق جدید یعنی رگ‌زایی به تومورها این اجازه را می‌دهد که بیشتر از ۱ تا ۲ میلی‌متر مکعب توسعه یابند (۷). برخلاف تومورهای خوش‌خیم که آنژیوژنز کمی دارند و سرعت رشد آن‌ها کند است، تومورهای بدخیم معمولاً دارای عروق زیاد هستند و رشدشان سریع است. در بافت‌های طبیعی و بافت‌های با رشد سریع، به ترتیب، فاکتورهای ممانعت کننده وتحریک‌کننده‌ی رگ‌زایی غالب هستند (۹ ،۸). محرک های رگ‌زایی متعددی مانند فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (Vascular Endothelial Growth Factor [VEGF]) یا فاکتور رشد فیبروبلاستی(Fibroblast Growth Factor [FGF]) شناسایی شده‌اند که بسیاری از آن‌ها توسط انواع سلول‌های توموری ترشح می‌شوند و نقش بسیار مهمی در رگ‌زایی و متاستاز تومور دارند (۱۱،۱۰). جهت بررسی عوامل مختلف آنژیوژنیک و آنتی‌آنژیوژنیک مدل‌های رگ‌زایی متعددی وجود دارد که عبارتند از: مدل اندازه‌گیری غشاء کوریوآلانتوئیک جوجه (Chicken Chorioallantoic Membrane [CAM])، مدل تشکیل عروق جدید در قرنیه، مدل pouch assay، روش کیسه‌ی هوایی، روش اندازه‌گیری پنجره‌ی مزانتریک، روش اندازه‌گیری در محیط سه بعدی ژل، مدل حلقه‌ی آئورت موش صحرایی و مدل آمنیون انسانی(۱۲). سیستم فیبرینولیتیک شامل فرآیندهایی است که در آن پلاسمینوژن غیر فعال تحت تأثیر فعال کننده‌ی پلاسمینوژن به آنزیم فعال یعنی پلاسمین تبدیل می‌شود. فعال کننده‌های پلاسمینوژن، سرین پروتئازهایی هستند که از نظر ایمونولوژیکی به دو نوع t-PA(tissue Plasminogen Activator) و u-PA (urokinase Plasminogen Activator) تقسیم می‌شوند. t-PA تمایل خیلی زیادی به ژل فیبرین دارد و توسط سلول‌های اندوتلیال ساخته و ترشح می‌شود و به طور مؤثری در لیز لخته‌ی فیبرین که در آن سلول‌های اندوتلیال قرار گرفته، نقش دارد. پلاسمین تولید شده در سطح سلول، پروتئین‌های ماتریکس Pro-uPA (Pro urokinase Plasminogen Activator) یا Scu-PA (Single chain urokinase Plasminogen Activator) را که توسط سلول ترشح می‌شوند، علاوه بر فعال کردن به u-PA یا (two chain urokinase Plasominogen Activator) tcu-PA تبدیل می‌کند. با توجه به این که گیرنده‌های پلاسمینوژن و اوروکیناز در سطح سلول وجود دارند، آنزیم تولید شده در این سیستم از اثر خنثی کنندگی مهارکننده‌های فیزیولوژیکی در امان می‌ماند. در این مطالعه‌ی تجربی که در سال ۱۳۸۴ در مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه انجام گرفت، سلول‌های عروق بند ناف طبیعی با کمک آنزیم درشرایط بهینه از نظر زمان اثر و غلظت آنزیم جدا گردید و با استفاده از این سلول‌ها یک مدل رگ‌زایی در ماتریکس سه‌بعدی فیبرین طراحی شد. این مدل اجازه می‌دهد که پاسخ‌های رگ‌زایی سلول‌های اندوتلیال به صورت کمی و کیفی در ماتریکس سه بعدی بررسی شود. این مدل هم چنین مدلی مناسب جهت غربالگری مواد آنژیوژنیک و آنتی آنژیوژنیک است. برای مثال می‌توان با استفاده از آن اثر مواد حاصل از گیاهان دارویی در رگ‌زایی یا مهار آن را بررسی نمود. این مدل که ظاهراً برای اولین‌بار در کشور با استفاده از سلول‌های اندوتلیال برگرفته از بند ناف انسانی طراحی شده، می‌تواند زمینه‌ساز تحقیقات متعدد در زمینه‌ی مکانیسم‌های رگ‌زایی و عوامل تقویت‌کننده و مهار کننده‌ی آن باشد.

روش بررسی

در این مطالعه‌ی تجربی، از فیبرینوژن انسانی(سیگما)، ترومبین(استاگو)، اتیلن دی آمین تترا استیک اسید (Ethylen Diamine Tetra Acetic Acid [EDTA])- تریپسین (سیگما)، کلاژناز نوع ۴ (سیگما)، محیط کشت (سیگما)، DMEM (سیگما)، محیط کشت M/90 (سیگما)، آپروتنین (بایر)، سرم جنین گوساله (FBS)

www.SID.ir

Archive of SID

(گیبکو)، ذرات سیتودکس-۳- میکروکریرز (Cytodex- 3- micro carriers) (فارماسیا) و کلاژن (رُش) استفاده گردید. سلول‌های بندناف نوزاد انسان از اطاق عمل بیمارستان شهدای کرمانشاه در بافر فسفات نمکی (PBS) که حاوی ۱۰۰ واحد بین المللی ([International Unit [IU) در میلی‌لیتر پنی‌سیلین و ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر استرپتومایسین بود، در شرایط استریل جمع‌آوری شد. قسمت‌های آسیب دیده‌ی بند ناف جدا گردید. با آنژیوکت شماره‌ی ۲۱، میزان ۵۰ تا ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط DMEM به داخل سیاه‌رگ بندناف تزریق گردید تا بند ناف کاملاً از خون و ژل وارتون تمیز گردد. بعد از شستشوی بند ناف، قسمت انتهایی آن کلامپ زده شده و مقدار ۱۰ تا ۱۵ میلی‌لیتر کلاژناز با غلظت ۰/۲ درصد اضافه شد و ۲۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفت. کلامپ انتهایی باز گردید و محلول حاوی کلاژناز و سلول‌ها جمع‌آوری شد. ۱۰ میلی‌لیتر محیط DMEM حاوی ۲۰ FBS درصد به آن اضافه شد. مخلوط فوق ۵ دقیقه با شتاب جاذبه‌ی (g)۵۰۰ سانتریفوژ گردید. محلول رویی دور ریخته شد و رسوب سلولی در ۵ میلی‌لیتر محیط DMEM حاوی ۲۰ FBS درصد، ۱۰۰ واحد بین المللی در میلی‌گرم پنی‌سیلین و ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر استرپتومایسین به تعلیق درآمد. تعلیق سلولی در ظرف کشت سلولی ریخته شد و در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و دی‌اکسیدکربن ۵ درصد به‌مدت ۲۴ ساعت انکوبه گردید. سلول‌ها جمع‌آوری و پس از چند بار شستشو، در فلاسک کشت سلولی حاوی محیط M131، هپارین و FBS ۲۰ درصد ریخته شد و در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتیگراد و دی‌اکسیدکربن ۵ درصد به مدت ۴ روز انکوبه گردید تا ظرف کشت سلولی پر شود. جهت آماده‌سازی ذرات حامل، ذرات Cytodex-3-micro carriers به مدت ۱۰ ساعت در PBS قرار گرفتند تا متورم شدند. ذرات متورم شده ۱۵ دقیقه در فشار ۱۵ تا ۲۰ پوند بر اینچ مربع اتوکلاو گردیدند. سپس در زیر هود استریل بافر فسفات تخلیه و به جای آن محیط DMEM حاوی ۲۰ FBS درصد اضافه شد. غلظت مناسب فیبرینوژن به طوری که بتواند لخته‌ی مناسب و محکم فیبرین تشکیل دهد و۱۰ تا ۱۲ روز پایدار باشد، پس از بارها تجربه به دست آمد. سپس فیبرینوژن در غلظت مناسب در PBS حل و یک شب مقابل محیط DMEM دیالیز شد. سلول‌های اندوتلیال جدا شده از سیاه‌رگ بند ناف برای طراحی مدل رگ‌زایی و تعیین شرایط آن در فلاسک‌های ۵۰ میلی‌متری کشت سلولی کشت داده شد. پس از آن‌که سلول‌ها سطح فلاسک را پوشاندند، با استفاده از EDTA – تریپسین ۲/۵ درصد، این سلول‌ها به صورت سوسپانسیون درآمدند و میزان زنده بودن آن‌ها توسط تریپان- بلو بررسی شد (که میزان زنده بودن بیش از ۹۰ درصد بود). سپس به منظور گردهمایی سلول‌ها در یک نقطه، از ذرات حامل Cytodex -3- micro carriers استفاده شد. بدین‌ترتیب که سلول‌ها به ذرات Cytodex-3-micro carriers پوشیده شده از کلاژن اضافه شده و مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتیگراد و دی‌اکسید کربن ۵ درصد انکوبه گردیدند. پس از کنترل چسبیدن سلول‌ها به ذرات حامل که با میکروسکوپ بررسی شد، ذرات پوشیده از سلول با محلول فیبرینوژن با غلظت ۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر مخلوط و به آن ترومبین با غلظت ۳ واحد بین المللی در میلی‌لیتر اضافه شد. مخلوط حاصل بلافاصله در ماکروپلیت کشت سلول تقسیم شد. بعد از تشکیل ژل فیبرین مقدار۲ میلی لیتر محیط کشت کامل (DMEM ، FBS ۲۰ درصد) به هر چاهک اضافه گردید. مقدار ۳۰۰ واحد بین المللی در میلی لیتر آپروتنین (Trasylol) به محیط کشت رویی و ژل فیبرین اضافه شد. پس از ۱۰ تا ۱۲ روز قراردادن پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتیگراد و دی‌اکسید کربن ۵ درصد، فرآیند رگ‌زایی بررسی شد.

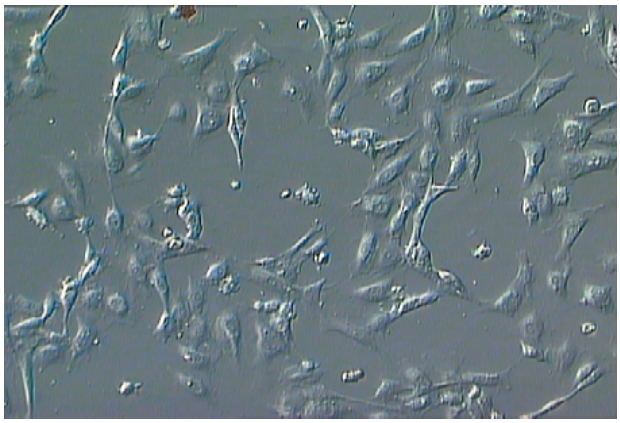
یافته‌ها

پس از جداسازی و به دست آوردن سلول‌های اندوتلیال سیاه‌رگ بند ناف (شکل ۱)، غلظت بهینه‌ی فیبرینوژن جهت ایجاد ماتریکس مناسب تعیین شد. در این مدل غلظت مناسب

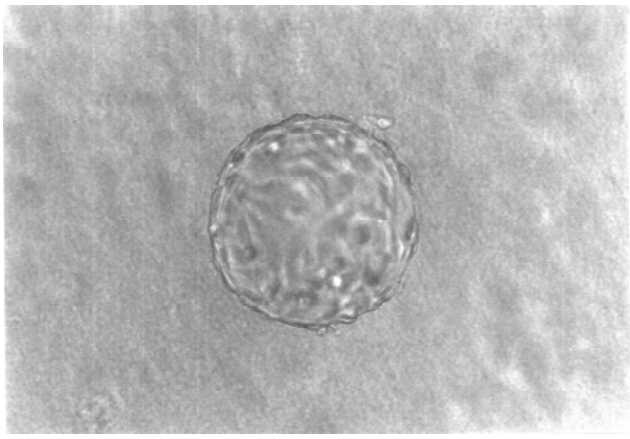
www.SID.ir

Archive of SID

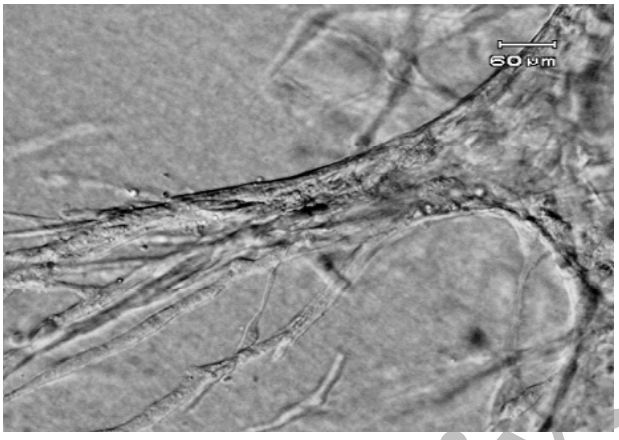
فیبرینوژن به منظور ایجاد ماتریکس مناسب، ۴ میلی‌گرم در هر میلی‌متر بود. مرحله‌ی بعد شامل به دست آوردن ضخامت ژل فیبرین بود. میزان ضخامت ژل فیبرین باید به گونه‌ای باشد که سلول‌ها قادر به تخریب و مهاجرت در داخل آن باشند و ۱۰ تا ۱۲ روز این ماتریکس به خوبی پایدار بماند. بدین ترتیب ضخامت مناسب ژل در این مدل طوری به دست آمد که مقدار ۵۰۰ میکرولیتر محلول فیبرینوژن به هر چاهک اضافه شود. در مرحله‌ی بعد نسبت مناسب سلول‌ها به ذرات حامل تعیین گردید. مشخص شد که نسبت ۴۰ به ۱ نسبت مناسبی است. در آزمون بعدی، غلظت مناسب ترومبین تعیین شد، به طوری که ذرات حامل پوشیده شده و سلول‌ها بعد از اضافه‌کردن ترومبین به سرعت در ژل گیرکرده و محیط اطراف آن‌ها را ژل فیبرین احاطه نماید. در این مدل غلظت مناسب ترومبین با توجه به غلظت فیبرینوژن، ۳ واحد بین‌المللی در میلی‌لیتر تعیین شد. چون سلول‌ها دارای فعالیت فیبرینولیتیک نیز هستند به محیط کشت رویی و محلول فیبرینوژن مقدار ۳۰۰ واحد بین المللی در میلی‌لیتر آپروتنین اضافه شد. پس از انجام این مراحل پلیت کشت سلولی به مدت ۱۰ تا ۱۲ روز در دمای ۳۷ درجه و دی‌اکسیدکربن ۵ درصد انکوبه شد. در روزهای نخستین انکوباسیون، سلول‌های متصل به ذرات حامل شروع به تکثیر و جوانه زدن نمودند به گونه‌ای که در روزهای ۱۰ تا ۱۲ فرآیند رگ‌زایی به طور کامل و به صورت شعاعی مشاهده گردید (اشکال ۳ ، ۲).



شکل۱: سلول‌های اندوتلیال جدا شده از بند ناف در محیط کشت سلول (با بزرگ‌نمایی ۱۰۰)



شکل۲: ذرات حامل سیتودکس به همراه سلول‌های اندوتلیال در لخته‌ی فیبرین (با بزرگ‌نمایی۲۵۰)



شکل ۳: فرایند رگ‌زایی در روز دوازدهم بعد از کشت سلول‌ها روی ذرات حامل سیتودکس (با بزرگ‌نمایی ۴۰۰)

بحث

مدل‌های رگ‌زایی عمدتاً وقت‌گیر و گران قیمت هستند. بعضی از آن‌ها نیاز به رده‌ی سلولی خاصی دارند که ممکن است به راحتی در دسترس نباشد و حمل آن‌ها از مرکز تولید به آزمایشگاه مشکل و وقت‌گیر باشد. بعلاوه اغلب مدل‌های رگ‌زایی نیاز به یک القاء کننده به صورت مصنوعی دارند و از تکنیک بسیار سخت و پیچیده‌ای برخوردار هستند (۱۲). به منظور غلبه بر این مشکلات، در این مطالعه یک مدل رگ‌زایی سه بعدی توسط سلول‌های اندوتلیال برگرفته از بند ناف انسانی طراحی شد. مزایای این مدل نسبت به مدل‌های ذکر شده و مدل‌های اولیه این است که از قابلیت تکرارپذیری بالایی برخوردار است و با توجه به نوع سلول به کار برده شده و ماتریکس سه بعدی فیبرین، شرایط

www.SID.ir

Archive of SID

مطالعه‌ی رگ‌زایی بسیار شبیه به مطالعه‌ی رگ‌زایی در داخل بدن است. هم چنین در این مدل در شروع کار نیاز به القا کننده‌ی رگ‌زایی به صورت مصنوعی نیست. تفاوت این مدل با مدل مشابه دیگر که توسط منصوری و همکاران طراحی شد (۱۳)، در این است که سلول مورد استفاده، سلول‌های طبیعی اندوتلیال برگرفته از بند ناف انسانی است و رده‌ی سلولی نمی‌باشد. به علت این که هر سلول برگرفته از بخش‌های مختلف بدن، فعالیت فیبرینولیتیک و آنژیوژنیک خاص خود را دارد، بنابراین شرایط مطالعه‌ی رگ‌زایی از نظر کنترل فعالیت سیستم فیبرینولیتیک، میزان فیبرینوژن، ضخامت ماتریکس فیبرین، تعداد سلول‌های مورد نیاز که سطح ذرات حامل را کاملاً بپوشانند و دیگر شرایط کشت جهت این سلول باید به دست آید.

این مدل مطالعاتی، به ما این اجازه را می‌دهد که پاسخ‌های سلول‌های اندوتلیال برگرفته از بند ناف انسانی را در ماتریکس سه بعدی فیبرین مورد مطالعه قرار دهیم. با استفاده از این روش می‌توان واکنش سلول‌های مختلف نسبت به هم و یا نقش آن‌ها را در رگ‌زایی به تنهایی و یا همراه با هم مورد بررسی و مطالعه قرار داد. از سوی دیگر تشکیل فیبرین نخستین پدیده‌ای است که در اثر فعال شدن سیستم انعقادی خون در اطراف تومورهای توپر و آسیب‌های بافتی مانند زخم رخ می‌دهد. در حقیقت انتقال فیبرینوژن محلول از پلاسما به فضای خارج رگی و تبدیل آن به فیبرین نامحلول، سطحی را در دسترس قرار می‌دهد که در فرآیند رگ‌زایی به عنوان یک ماتریکس موقتی عمل می‌کند. در شرایط فیزیولوژیک سلول‌های اندوتلیال پوشش دهنده‌ی جدار داخلی رگ‌ها یا مویرگ‌ها منشأ سلول‌های اندوتلیال در فرآیند آنژیوژنز را تشکیل می‌دهند. بر اساس این واقعیت، در مدل پیشنهادی از فیبرینوژن خالص شده و تبدیل آن به فیبرین نامحلول به عنوان یک ماتریکس سه بعدی استفاده گردید. فیبرین حاصل، بستر لازم را برای رشد و مهاجرت سلول‌های اندوتلیال در دسترس قرار می‌دهد. حرکت سلول‌های اندوتلیال که به وسیله‌ی ماتریکس خارج سلولی (فیبرین تشکیل شده) تنظیم می‌گردد، نیازمند تشکیل کمپلکس سلول- ماتریکس با واسطه‌ی اینتگرین و بعد جدا شدن آن می‌باشد. چرخه‌ی تکراری اتصال برگشت‌پذیر اینتگرین/ ماتریکس و به دنبال آن جدا شدن عناصر اسکلت سلولی به همراه تجزیه‌ی محدود ماتریکس باعث پیشروی حاشیه‌ی سلول متحرک می‌شود. بنابراین حرکت سلولی، حاصل هماهنگی کمپلکس‌های فعال مولکولی مثل واکنش اینتگرین ولیگاندی اینتگرین با متالوپروتئاز، فعال‌کننده‌ی پلاسمینوژن و سوبسترای آن و هم چنین مهار کننده‌های سلول- ماتریکس می‌باشد (۱۶-۱۴).

نتیجه گیری

با توجه به ۴ مرحله‌ی بیولوژیکی آنژیوژنز یعنی تجزیه‌ی غشای پایه توسط سلول‌های اندوتلیال، مهاجرت سلول‌های اندوتلیال با هضم فیبرین، تکثیر سلول‌های اندوتلیال و تشکیل ساختمان لوله‌ای جدید و از آن جایی که فعالیت فیبرینولیتیک و پرتئولیتیک اطراف سلولی جهت پیشرفت دو مرحله‌ی ابتدایی رگ‌زایی ضروری است (۲۱-۱۷)، در این مدل فعالیت فیبرینولیتیک و پرتئولیتیک لازم جهت رگ‌زایی توسط غلظت فیبرینوژن و تعیین ضخامت ماتریکس فیبرین به کار رفته و آپروتنین کنترل گردید. به هر حال مدل آنژیوژنز طراحی شده در این تحقیق شرایط مناسبی جهت مطالعه و بررسی عوامل مؤثر در رگ‌زایی و مکانیسم عمل آن فراهم می‌آورد و زمینه‌ساز مطالعات بعدی در این عرصه‌ی مهم خواهد بود.

منابع

1- Ausprunk D.H, Folkman J. Migration and proliferation of endothelial cells in performed and newly formed blood vessels during tumor angiogenesis. ***Microvasc Res.*** 1997; 14: 53- 65.

www.SID.ir

Archive of SID

2- Folkman J. Clinical applications of research on angiogenesis. ***N Engl J Med.*** 1995; 333: 1757- 63.

3- Grant D.S, Kibbey M.C, Kinsella J.L, Sid M.C. The role of basement membrane in angiogenesis and tumor growth. ***Pathol Res Prac.*** 1994; 190: 854- 63.

4- Szpaderska M, J.R. Anderson J.M, Kocher O, Van Itallie E.M , Madri J.A. Distinct patterns of angiogenesis in oral and skin wounds. ***J Dert Res.*** 2005; 84: 309-14.

5- Blood C.H, Zetter B.R. Tumor interactions with the vasculature: angiogenesis and tumor metastasis. ***Biochem Biophys Acta.*** 1990; 1032: 89- 118.

6- Folkman J, Watson K, Ingber D , Hanhan D. Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasm. ***Nature.*** 1989; 339: 58- 61.

7- Ellis I.M, Bauer T, Brown L.F, Mc Donagh J. Angiogenesis and metastasis. ***Eur J Cancer.*** 1996; 32A: 2451- 60.

8- Beck J, Damore P.A. Vascular development , cellular and molecular regulation . ***FASEB J.*** 1997; 11: 365-73.

9- Boedefeld W.M. Recent insights into angiogenesis, apoptosis, invasion and metastasis. ***Ann Surg Oncol.*** 2003; 10: 839- 51.

10- Riseu W. Mechanism of angiogenesis. ***Nature.*** 1997; 386: 671- 4.

11- Auerbach R. Angiogenesis-inducing factors: A review. ***Lymphokines.*** 1981; 4: 64- 88.

12- Gillian W.C. Angiogenesis: Models and modulators. ***Int Rev Cytol.*** 1995; 159: 113- 59.

۱۳- منصوری کامران ، میرشاهی منوچهر ، پورفتح اله علی اکبر ، محمد حسن زهیر. طراحی یک مدل آزمایشگاهی رگ‌زایی در ماتریکس سه بعدی فیبرین برای مطالعه‌ی عوامل مؤثر در رگ زایی. ***مجله بهبود*** ۱۳۸۴؛ سال۹، شماره۳ : صفحات۳۶-۲۷.

14- Bussodiuo F, Mautovani A, Persico G. Molecular mechanism of blood vessel formation. ***Trends Biochem Sci.*** 1997; 22: 251- 6.

15- Cines D.B. Endothelial cells in physiology and in pathophysiology of vascular disorder. ***Blood.*** 1998; 91(10): 3527- 61.

16- Dvorak H.F, Harvey V.S, Estrella P, Brown L.F, Dvorak A.M. Fibrin containing gels induce angiogenesis. Implications for tumor stroma generation and wound healing. ***Lab Invest.*** 1987; 57: 673- 86.

17- Peper M.S. Role of the matrix metalloproteinase and plasminogen activator-plasmin systems in Angiogenesis. ***Arterioscler Thromb Vasc Biol.*** 2001; 21: 1104.

18- Giavazzi R, Albini A, Bussolino F. The biological basis for antiangiogenic therapy. ***Euro J Cancer.*** 2000; 36: 1913-18.

19- Saksela O, Bonfanti R, Fuire B, Wagner D.D. Associated plasminogen activation: regulation and physiological Function. ***Ann Rev Cell Biol.*** 1988; 4: 93-126.

20- Chang W, Park S.H, Ross B.D. Membrane-type matrix metalloproteinase. Mediated angiogenesis in a fibrin-collagen matrix. ***Blood.*** 2003; 101 (S): 1810- 17.

21- Kristensen P, Bugge T.H, Suh T.T, Flick M.J. Urokinase-type plasminogen activator and its receptor: new target or anti-metastatic therapy. ***Trends Pharmacol Sci.*** 1994; 15: 25- 9.

www.SID.ir