



Lysophosphatidic Acid Effect on Improvement of Follicular Development and Increasing the Expression of Vascular Endothelial Growth Factor during Human Tissue Culture and after Transplantation

ARTICLE INFO

Article Type

Original Research

Authors

Mohammadi Z.¹ PhD,
Hayati Roodbari N.¹ PhD,
Parivar K.¹ PhD,
Salehnia M.^{*2} PhD

How to cite this article

Mohammadi Z, Hayati Roodbari N, Parivar K, Salehnia M. Lysophosphatidic Acid Effect on Improvement of Follicular Development and Increasing the Expression of Vascular Endothelial Growth Factor during Human Tissue Culture and after Transplantation. Pathobiology Research. 2019;22(4):189-196.

¹Biology Department, Basic Science Faculty, Science & Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
²Anatomy Department, Medical Sciences Faculty, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

*Correspondence

Address: Anatomy Department, Medical Sciences Faculty, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
Tel: +98 (21) 82883562
Fax: +98 (21) 88013030
salehnim@modares.ac.ir

Article History

Received: August 11, 2019
Accepted: December 8, 2019
ePublished: December 21, 2019

ABSTRACT

Aims The aim of the present study was to evaluate the effects of lysophosphatidic acid (LPA) supplementation of human ovarian tissue culture media on the morphology of tissue and alteration in angiogenesis by expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) after transplantation.

Materials & Methods In the present experimental study, the human ovarian tissues (n=8) after collection from female-to-male transsexual people, were cut into small fragments (n=98). Then, vitrified-warmed and cultured 24 hours in two groups in the presence and absence of LPA, and finally they were transplanted to γ -irradiated mice (n=13). After two weeks the morphology of tissues was studied by hematoxylin and eosin staining and VEGF protein was detected by immunohistochemistry. The expression of *VEGF* gene was evaluated by real time RT-PCR.

Results The morphology of both transplanted tissues was well preserved and follicles at different developmental stages were seen in all studied groups. Significantly a higher expression of *VEGF* gene was observed in the LPA-treated group compared to the non-treated once (p<0.05). Several blood vessels were shown positive reactions for VEGF antibody as green color in stroma of ovarian tissue sections in all studied groups.

Conclusion Supplementation of human ovarian tissue culture media with LPA before transplantation could increase the expression of *VEGF* gene related to angiogenesis.

Keywords Lysophosphatidic Acid; Angiogenesis; Vessel Endothelial Growth Factor; *In Vitro* Culture; Ovary; Xenograft

CITATION LINKS

[1] Ovarian tissue cryopreservation and transplantation ... [2] Expectations and limitations of ovarian ... [3] Observational study of the development and ... [4] Xenotransplantation of cryopreserved human ovarian ... [5] Developmental status: Impact of short-term ischemia on ... [6] Early massive follicle loss and apoptosis in heterotopically grafted ... [7] Reducing ischaemic damage in rodent ... [8] Review of factors affecting the growth and survival of ... [9] Ovarian function and spontaneous pregnancy after ... [10] Current success and efficiency of autologous ... [11] bFGF and VEGF improve the quality of vitrified-thawed ... [12] An in vitro study on oocyte and follicles of transplanted ovaries ... [13] Angiopoietin-1 and-2 and vascular endothelial growth factor ... [14] Isoform 111 of vascular endothelial growth factor ... [15] Orthotopic and heterotopic ovarian tissue ... [16] The effect of erythropoietin in preventing ischemia-reperfusion ... [17] Angiogenesis in ectopic ovarian xenotransplantation ... [18] Supplementation of culture media with ... [19] Effect of lysophosphatidic acid on the follicular development and ... [20] Lysophosphatidic acid as a novel cell survival/apoptotic ... [21] Expression of factors involved in apoptosis and cell survival is correlated ... [22] Lysophospholipid signaling in the function and pathology of the ... [23] Lysophosphatidic acid (LPA) signaling in human and ... [24] LPA receptors: Subtypes and biological ... [25] LPA receptor signaling: Pharmacology, physiology, and ... [26] LPA signaling during vascular ... [27] Altered expression of lysophosphatidic ... [28] Lysophosphatidic acid up-regulates expression ... [29] Bioactive lysolipids in cancer ... [30] Short term culture of vitrified human ... [31] Human ovarian tissue vitrification/warming ... [32] The effect of lysophosphatidic acid during in ... [33] Lysophosphatidic acid in vascular development ... [34] Autotaxin stabilizes blood vessels and is ... [35] Autotaxin, a secreted lysophospholipase ... [36] Autotaxin regulates vascular ... [37] Hypoxia enhances LPA-induced HIF-1 α and ... [38] Lysophosphatidic acid upregulates vascular endothelial ... [39] Lysophosphatidic acid (LPA) and ... [40] Evidence for a role of capillary pericytes in vascular ... [41] Lysophosphatidic acid increases in vitro ... [42] Activation of hypoxia-inducible factor-1 α is ... [43] Biological roles of lysophosphatidic acid ...

اثر لیزوفسفاتیدیک اسید بر بهبود کیفیت تکوین فولیکولی و نیز افزایش بروز ژن فاکتور رشد اندوتلیال عروقی طی کشت بافت تخمدان انسانی و سپس پیوند آن

زینب محمدی PhD

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

نسیم حیاتی‌رودباری PhD

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

کاظم پریوار PhD

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

مژده صالح‌نیا PhD

گروه آناتومی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

چکیده

اهداف: هدف مطالعه حاضر بررسی اثرات لیزوفسفاتیدیک اسید (LPA) در محیط کشت بافت تخمدان انسانی بر مرفولوژی و نیز رگ‌زایی با تغییر در بروز فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (VEGF) پس از پیوند بود.

مواد و روش‌ها: در مطالعه تجربی حاضر، بافت تخمدان از افراد تغییر جنسیتی (۸ نفر) جمع‌آوری شد و سپس به صورت قطعات کوچک (۹۸ قطعه) بریده شد و بعد از انجماد-ذوب به مدت ۲۴ ساعت در دو گروه در غیاب و حضور LPA کشت و سپس به ۱۳ موش اشعه گاما زده شده پیوند شدند. بعد از دو هفته برای مطالعه بافت‌ها از نظر مورفولوژی از رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین استفاده شد و پروتئین VEGF از طریق ایمونوهیستوشیمی بررسی شد. بیان ژن VEGF نیز با Real time RT-PCR ارزیابی شد.

یافته‌ها: ساختار بافت‌های پیوندی طبیعی و فولیکول‌ها در مراحل مختلف تکوینی و با اندازه‌های مختلف در تمامی گروه‌های مورد مطالعه قابل مشاهده بود. در مطالعات مولکولی میزان بیان ژن VEGF در گروه تیمار با LPA افزایش معنی‌داری در مقایسه با گروه بدون تیمار داشت ($p < 0.05$). واکنش مثبتی برای آنتی‌بادی VEGF در دیواره عروق خونی موجود در بافت استرومای تخمدان به صورت رنگ سبز در همه گروه‌ها دیده شد.

نتیجه‌گیری: به‌کارگیری LPA در کشت بافت تخمدان انسانی قبل از پیوند می‌تواند باعث افزایش بروز ژن VEGF مرتبط به آنژیوژنز در بافت پیوندی شود.

کلیدواژه‌ها: لیزوفسفاتیدیک اسید، رگ‌زایی، فاکتور رشد اندوتلیال عروقی، کشت در قیسه، تخمدان، زئوگرافت

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۵/۲۰

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۹/۱۷

نویسنده مسئول: salehnm@modares.ac.ir

مقدمه

امروزه میزان ابتلا به سرطان در میان زنان افزایش یافته است و درمان‌های رایج از جمله شیمی‌درمانی با خطر بروز ناباروری و نارسایی زودرس تخمدان پس از درمان همراه هستند. بنابراین توجه به کیفیت زندگی پس از درمان و حفظ باروری اهمیت به‌سزایی دارد. یکی از روش‌های حفظ باروری در این بیماران انجماد بافت

تخمدان است. در این روش بخشی از کورتکس تخمدان توسط لپاراسکوپ خارج و منجمد می‌شود و پس از درمان قطعی به‌منظور بازگشت باروری و عملکرد هورمونی بافت منجمد و ذوب‌شده به بدن شخص پیوند زده می‌شود [1-3].

کشت و پیوند بافت تخمدان‌های منجمدشده تکنیکی است که توانایی تکوین و رشد فولیکول‌ها را مقدور می‌کند. نتایج به‌دست‌آمده از این تکنیک‌ها در بافت تخمدان انسانی به دلیل سائز بزرگ بافت تخمدان، تراکم استرومای تخمدان و دوره طولانی فولیکوژنز بحث برانگیز است [4]. یکی از نگرانی‌هایی که پس از پیوند بافت تخمدان منجمد-ذوب‌شده وجود دارد ایسکمی است. تا زمان رگ‌زایی مجدد بافت ایسکمی سبب از بین رفتن دو سوم فولیکول‌ها می‌شود [5-7]. به‌خصوص در انسان که کورتکس تخمدان فشرده و متراکم است این موضوع می‌تواند بر روی رشد فولیکول‌ها، عملکرد هورمونی و حفظ قدرت باروری اثر بگذارد [4]. از آنجا که پیوند قطعات بافت تخمدان بدون آناستوموز عروقی انجام می‌شود، نفوذ و شکل‌گیری مجدد عروقی بافت برای بقای فولیکول‌ها و نیز طول عمر عملکردی بافت پیوندی بسیار اساسی است و این زمان می‌تواند ۳ تا ۷ روز پس از پیوند طول بکشد [8,9]. از عوامل مهم رگ‌زا که در بافت تخمدان وجود دارد و یا از جریان خون به آن می‌رسد می‌توان به فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (VEGF) اشاره کرد [9, 10]. در تحقیقات متعددی نشان داده شده است که پس از پیوند بافت تخمدان میزان این فاکتور افزایش یافته و باعث ایجاد عروق خونی در بافت پیوندی شده است [11-14]. *دمیستر* و همکاران نیز نشان دادند که VEGF به‌عنوان یک فاکتور رشدی باعث ایجاد عروق جدید در بافت پیوندی شده است [15]. *زندوکیلی* و همکاران نیز اخیراً با به‌کارگیری این ترکیب در بافت‌های پیوندی تخمدان نشان دادند که VEGF با کمک در تشکیل عروق جدید در لایه تکای فولیکول‌های بزرگ و نیز در شکل‌گیری جسم زرد نقش فعالی دارد و باعث افزایش تکوین فولیکولی شده است [12].

از طرفی اخیراً سعی شده است با به‌کارگیری فاکتورهای متعددی باعث افزایش رگ‌زایی در بافت‌های تخمدان پیوندی شوند تا بتوان از ایسکمی بافت ناشی از کمبود اکسیژن که می‌تواند باعث تخریب تعداد زیادی از فولیکول‌های تخمدانی بشود جلوگیری کرد [16, 17]. این فاکتورها یا در حین پیوند به همراه بافت پیوندی به کار گرفته می‌شوند و یا اینکه قبل از پیوند به مدت کوتاهی بافتی که قرار است پیوند شود به همراه فاکتور مورد نظر کشت می‌شود. از جمله این فاکتورها لیزوفسفاتیدیک اسید (LPA) است [18, 19]. لیزوفسفاتیدیک اسید یک لیپید ساده است که در بسیاری از فرآیندهای بیولوژیکی از جمله بقا، آپوپتوز، تکثیر، تمایز، مهاجرت و چسبندگی انواع سلول‌ها مانند سلول‌های پروژنیاتور عصبی، آستروسیت و الیگودندروسیت‌ها در سیستم عصبی، سلول‌های اندوتلیال در طول شکل‌گیری عروق، سلول‌های سیستم تولیدمثل، سلول‌های استئوبلاست در طول تکوین استخوان و سلول‌های سیستم ایمنی شرکت دارد [20-23].

میلی لیتر استرپتوماپسین نگهداری شد [30].

انجماد شیشه‌ای و ذوب تخمدان

انجماد شیشه‌ای قطعات بافت تخمدان با استفاده از محلول ضدیخ (EFS40) انجام شد [30]. محلول انجمادی از ۴۰٪ اتیلن گلیکول، ۳۰٪ فایکول ۷۰ (وزنی/حجمی) و ۱ مول ساکارز تشکیل و با ۲۰٪ سرم آلبومین انسانی تکمیل شده است.

سپس هر قطعه به‌طور مجزا به کرایوتیوب و در نهایت به تانک حاوی نیتروژن مایع منتقل شد. ذوب به روش سریع و به کمک محلول‌های ساکارز نزولی انجام شد [30].

کشت و پیوند بافت تخمدان انسانی

به‌منظور کشت قطعات بافت تخمدان انسانی در دو گروه بدون LPA (۴۹ قطعه بافتی) و با حضور ۲۰ میکرومولار LPA (۴۹ قطعه بافتی) از ظروف کشت ۹۶ خانه مخروطی شکل استفاده و در داخل هر خانه ۳۰۰ میکرولیتر از محیط کشت α -MEM ریخته شد [19]. نمونه‌ها در محیط کشتی که حاوی ۱۰۰ واحد بین‌المللی بر میلی‌لیتر محلول پنی‌سیلین (Gibco؛ انگلستان)، ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر محلول استرپتوماپسین (Gibco؛ انگلستان)، ۱٪ انسولین ترانسفرین و سلنیوم (ITS)، ۱۰۰ μ m بر میلی‌لیتر هورمون تحریک‌کننده فولیکولی (FSH؛ Gibco، انگلستان) و ۱۰٪ حجمی-حجمی سرم آلبومین انسانی بود به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷°C و دارای ۵٪ دی‌اکسیدکربن کشت شدند [19]. سپس قطعات بافت کشت‌شده به بدن موش‌های اشعه گاما زده و پیوند شدند و پس از ۱۴ روز بافت‌های پیوندی جمع‌آوری شد و مورد بررسی قرار گرفت.

آماده‌سازی و نگهداری موش‌های اشعه گاماخورده

در این مطالعه از موش سوری ماده نژاد NMRI استفاده شد. تمام پروتکل‌های به‌کاررفته در بخش حیوانی این مطالعه مورد تایید کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات (IR.IAU.SRB.REC.1397.119) بود. موش‌ها در زمان آزمایش سنی بین ۸ تا ۱۰ هفته داشتند و در بخش رادیوتراپی بیمارستان شهدای تجریش تحت تابش اشعه گاما (طبق پروتکل) به شکل تمام بدن، به میزان ۷/۵ گری به مدت ۷ دقیقه قرار گرفت. سپس حیوانات به اتاقک مخصوص و ایزوله که از پیش آماده شده بود، منتقل شدند. غذا، آب، قفس و پوشال مورد استفاده اتوکلاو و به آب حیوانات آنتی‌بیوتیک اضافه شد [31].

روش پیوند زئوگرافت بافت قشری تخمدان انسان

ابتدا موش گیرنده به کمک تزریق داخل صفاقی مخلوطی از ۱۰٪ کتامین و ۲۰٪ زایلازین بیهوش شد. سپس محل جراحی با الکل ۷۰٪ شست‌وشو داده و ۲ قطعه بافت قشری تخمدان انسانی کشت‌شده به ناحیه عضله پشت هر موش ماده پیوند زده شد. در هر گروه، ۲۶ قطعه بافت قشری تخمدان به ۱۳ موش اشعه‌خورده پیوند زده شد. سپس موش‌ها به مدت ۱۴ روز از زمان پیوند نگهداری شدند. شایان ذکر است که تمامی عمل‌های جراحی و تزریقات تحت شرایط استریل انجام شد. در پایان روز چهاردهم موش‌های دریافت‌کننده پیوند به روش جابه‌جایی مهره‌های گردنی کشته شدند و بافت

لیزوفسفاتیدیک اسید دارای شش گروه اصلی از رسپتورها شامل LPAR1-LPAR6 است و از طریق اتصال رسپتورها به هتروداپیم‌های پروتئین که عبارتند از $G_{i/o}$ ، $G_{12/13}$ و $G_{\alpha q}$ عمل می‌کند و آشناری از سیگنال‌های داخل سلولی را به راه می‌اندازد [24, 25]. این رسپتورها در ارگان‌ها و سلول‌های مختلف بیان می‌شوند. برای مثال LPAR3 و LPAR4 در ارگان‌های سیستم تولیدمثل مانند رحم و تخمدان و رسپتورهای LPAR1-LPAR3 در سلول‌های گرانولوزای جسم زرد بیان می‌شوند [20]. یکی از مهم‌ترین عملکردهای LPA نقش آن در تکوین عروق جنینی است و طی تشکیل عروق خونی باعث رشد رگ جدید از آنژیوبلاست‌ها می‌شود [26]. *واسنایسکی* و *کلاوک پوتاکا* گزارش کردند که LPA از طریق بروز فاکتور رشد اندوتلیالی عروقی باعث آنژیوژنز می‌شود [27]. علاوه بر این در مطالعات دیگری نیز مشخص شده است که LPA با تنظیم ترشح اینترلوکین ۶ و ۸ در تشکیل عروق جدید در شکل‌گیری جسم زرد، تکوین جفت و نیز رحم نقش دارد [28]. *هیسانو* و *هلا* نیز تایید کردند که LPA به‌عنوان یک واسطه در تنظیم رگ‌زایی طی مهاجرت سلولی و رشد و تکوین بافت عمل می‌کند [29]. با توجه به اهمیت بهبود شرایط پیوند بافت تخمدان به‌گونه‌ای که باعث افزایش بقا و تکوین فولیکولی و کاهش تخریب فولیکولی بشود و با عنایت به نقش‌های مهم LPA، محمدی و همکاران در مطالعه قبلی خود به اثرات LPA بر تکوین و میزان زنده‌ماندن فولیکول‌ها پرداختند و نتایج قبلی نشان داد که این فاکتور باعث بهبود میزان بقا و رشد فولیکولی پس از پیوند می‌شود [18]. اما تاکنون گزارشی مبنی بر به‌کارگیری این فاکتور در خصوص بهبود رگ‌زایی بافت تخمدان انسانی پس از کشت و پیوند آن دیده نشده است، بنابراین هدف از این مطالعه بررسی اثرات کشت بافت تخمدان انسانی در حضور LPA و سپس پیوند زئوگرافت آن در موش بر مورفولوژی بافت پیوندی و نیز رگ‌زایی با تغییر در بروز VEGF به‌عنوان یک فاکتور تنظیمی در رگ‌زایی بود.

مواد و روش‌ها

کلیه مواد مصرفی در این مطالعه از شرکت سیگماآلدردیج آلمان فراهم شده است.

جمع‌آوری بافت تخمدان انسانی

با توافق آگاهانه از ۸ فرد تغییرجنسیت‌داده در محدوده سنی ۳۵-۱۸ سال (میانگین ۲۶ سال) که سابقه هیچ‌گونه بیماری ارثی، هورمونی و یا مداخله‌کننده در مطالعه را نداشتند، پس از تایید کمیته اخلاق پزشکی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس با شماره ارجاع ۵۲۳/۸۸۳ و تکمیل فرم رضایت بیمار، نمونه‌های بافت تخمدان تحت شرایط استریل در محیط L15 به آزمایشگاه منتقل شدند. سپس نمونه تخمدان با استفاده از اسکالپل به صورت نوارهای باریک کوچک با ابعاد تقریبی ۱×۲ میلی‌متر بریده شد و در محیط L15 حاوی ۱۰٪ حجمی-حجمی سرم آلبومین انسانی، ۱۰۰ واحد بین‌المللی پنی‌سیلین بر هر میلی‌لیتر و ۱۰۰ میکروگرم بر

Perimer3 طراحی شدند و توسط نرم افزار Blast به منظور اطمینان از اختصاصی بودن محل جفت شدن پرایمر مورد ارزیابی قرار گرفتند و سپس ساخته و خریداری شدند (Generay Biotech; چین). مشخصات مربوط به پرایمر VEGF و ژن مرجع β -action در جدول ۱ آورده شده است. واکنش Real time RT-PCR با کیت سایبرگرین RT-PCR (یکتا تجهیز؛ ایران) و در دستگاه Step one ABI (Step one ABI؛ انگلستان) انجام شد. شرایط دمایی انجام واکنش به این شرح بود: دمای 94°C در زمان ۵ دقیقه به منظور باز شدن کامل دو رشته؛ در مرحله تکثیر، دمای 95°C به مدت ۱۵ ثانیه؛ دمای 58°C به مدت ۳۰ ثانیه؛ دمای 72°C برای ۳۰ ثانیه و یک سیکل با دمای 72°C با زمان ۱۰ دقیقه برای تکمیل رشته‌های نیمه ساخته. برای هر نمونه یک تیوب کنترل منفی گذاشته و در آن به جای cDNA از آب استریل استفاده شد. در هر گروه سه تکرار آزمایش مستقل انجام شد.

جدول ۱) فهرست پرایمرها

ژن	شماره	توالی پرایمر	طول محصول (جفت باز)
β -actin	NM-001101.3	Forward: 5'-TCAGAGCAAGAGGGCATCC-3' Reverse: 5'-GGTCATCTTCTCACGGTTGG-3'	۱۸۷
VEGF	XM-016955597	Forward: 5'-GCCTTGCTGCTGCTCTACCTC-3' Reverse: 5'-GGGTACTCTGGAAGATGTC-3'	۱۶۱

تجزیه و تحلیل اطلاعات

نتایج با استفاده از نرم افزار SPSS 24 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. تمامی داده‌های کمی به شکل میانگین آماری ارائه شد. داده‌های جمع‌آوری شده با کمک آزمون تحلیل واریانس یک طرفه و post hoc Duncan's Multiple Range Test مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. سطح معنی داری $p < 0.05$ برای مقایسه بین گروه‌ها در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

ارزیابی مورفولوژی بافت تخمدان انسانی قبل و پس از پیوند در حضور و غیاب LPA

ریخت شناسی بافت تخمدان انسانی پس از ۲۴ ساعت کشت و ۱۴ روز پس از پیوند با رنگ آمیزی هماتوکسیلین-اُوزین در شکل ۱ نشان داده شده است. مشاهدات حاصل از این رنگ آمیزی تفاوت خاصی را در ساختار تخمدان‌ها نشان نداد و ساختار بافت تخمدان در گروه‌های پیوندی به خوبی حفظ شده بود و فولیکول‌ها در مراحل مختلف تکوینی در تمامی گروه‌های مورد مطالعه قابل مشاهده بودند. فولیکول‌هایی با اندازه کوچک (بدوی و اولیه) و با سایز بزرگتر (ثانویه و پره انترال) در حال رشد در گروه‌های پیوندی مشاهده شدند.

ارزیابی مورفولوژیک بافت تخمدان انسانی با استفاده از رنگ آمیزی هماتوکسیلین-اُوزین

مطالعه مورفولوژیک بافت تخمدان منجمد-ذوب شده قبل و بعد از پیوند در حضور و غیاب LPA انجام شد (۲۰ قطعه بافت تخمدان برای هر گروه). نمونه‌های جمع‌آوری شده در هر مرحله در محلول بوئن به مدت ۱۲ ساعت ثابت شدند. سپس قطعات بافت تخمدان در درصد‌های صعودی اتانول (از ۷۰ تا ۱۰۰٪) آب‌گیری و در داخل پارافین فرو برده شدند. از بلوک‌های پارافینی تهیه شده برش‌های بافتی توسط میکروتوم و به صورت سریالی با ضخامت ۵ میکرومتر زده شد. برش‌ها با روش هماتوکسیلین و اُوزین رنگ آمیزی و در زیر میکروسکوپ نوری مشاهده شدند.

ارزیابی ایمنو هیستوشیمی بافت تخمدان انسانی پس از پیوند

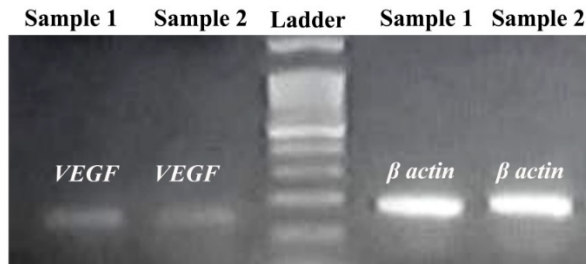
ارزیابی ایمنو هیستوشیمی برای بررسی بیان پروتئین آنژیوژنیک VEGF پس از پیوند در حضور و غیاب LPA انجام شد (۳ نمونه برای هر گروه و از هر نمونه یک برش). پس از تهیه بلوک‌های پارافینی و برش‌گیری ابتدا پارافین‌زدایی لام‌ها انجام شد. سپس برای بازیابی آنتی‌ژن برش‌ها در بافر سیترات ($\text{pH}=6$) در دمای 100°C به مدت ۱۰ دقیقه جوشید و سپس با بافر فسفات (PBS) شست‌وشو شد. سپس آنتی‌بادی اولیه آنتی VEGF (IgG) یا آنتی‌بادی rabbit polyclonal immunoglobulin G (E lab Science؛ چین) با نسبت ۱ به ۱۰۰ روی نمونه‌ها ریخته و به مدت ۲۴ ساعت در یخچال قرار داده شد. سپس آنتی‌بادی ثانویه یا آنتی‌بادی goat anti-rabbit IgG کوئزوگه با فلورسئین‌ایزوتیوسیانان (E lab Science؛ چین) با نسبت ۱ به ۱۰۰ در محیط تاریک روی نمونه‌ها ریخته شد. سپس در فور 37°C به مدت ۲ ساعت قرار داده و بعد با PBS شست‌وشو شد و هسته‌ها با پروپیدیوم‌پدید (PI) رنگ آمیزی شدند و در نهایت با میکروسکوپ فلورسنت مورد بررسی قرار گرفتند. در هر گروه سه تکرار آزمایش مستقل انجام شد.

بررسی بیان ژن VEGF در بافت تخمدان انسانی

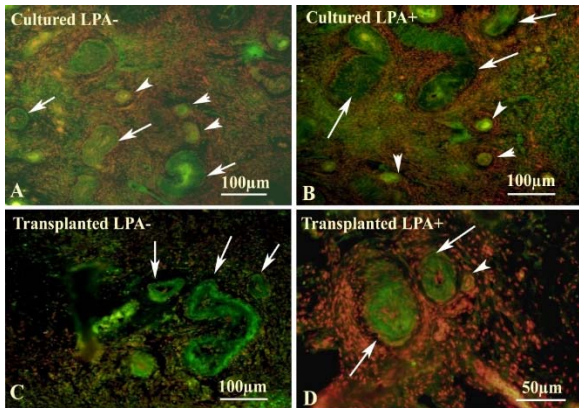
به منظور استخراج RNA نمونه‌های تخمدان‌های کشت شده در حضور و غیاب LPA پس از کشت (قبل از پیوند) و نیز پس از دو هفته پیوند جمع‌آوری شدند (برای هر گروه ۳ قطعه بافتی و در هر گروه سه تکرار آزمایش مستقل) و در چهار گروه مورد بررسی قرار گرفتند. تمامی گروه‌های مورد مطالعه توسط اسپکتروفوتومتر سنجیده شد. استخراج و سپس غلظت آن توسط اسپکتروفوتومتر سنجیده شد. برای ساخت cDNA از کیت فرمنتاز استفاده شد. مخلوط واکنش در دمای 42°C به مدت یک ساعت قرار داده شد. سپس انکوباسیون به مدت ۵ دقیقه در دمای 70°C انجام و cDNA حاصل تا زمان واکنش Real time RT-PCR در فریزر -80°C نگهداری شد.

واکنش Real time RT-PCR

ابتدا توالی mRNA مربوط به ژن از سایت NCBI استخراج شد. پرایمرها با استفاده از نرم افزارهای آنالیز مانند Oligo analyze



شکل ۲ ژل الکتروفورز محصول PCR؛ نمونه ۱ مربوط به گروه بدون تیمار و نمونه ۲ مربوط به گروه تیمار با LPA است و از Ladder 100 در محصول PCR استفاده شد.



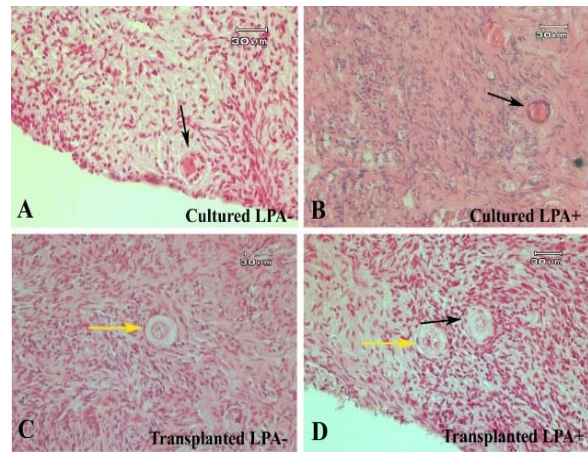
شکل ۳ تصاویر میکروسکوپ فلوروسنت بافت تخمدان انسانی با رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی آنتی بادی ضد VEGF؛ گروه کشت شده در غیاب LPA (A)؛ گروه کشت شده در حضور LPA (B)؛ گروه پیوند شده در غیاب LPA (C)؛ گروه پیوند شده در حضور LPA (D)؛ (فلش های سفید نشان دهنده عروق بزرگ و سر فلش های سفید نشان دهنده عروق کوچک با واکنش مثبت به رنگ سبز براق برای آنتی بادی VEGF هستند. رنگ آمیزی هسته با PI انجام شد.)

بحث

از آنجا که یکی از معضلات عمده در پیوند بافت تخمدان ایجاد ایسکمی و عدم تشکیل عروق خونی جدید است، محققین راه های مختلفی را برای حل مساله پیشنهاد داده اند [8, 15-17] که در مطالعه حاضر از فاکتور LPA استفاده شد و نتایج نشان داد که بافت های پیوندی تیمار شده با LPA تکوین مناسبی از فولیکول ها را نشان دادند و در مطالعه محمدی و همکاران با هدف بهبود کیفیت بافت تخمدان انسانی پیوند شده با به کارگیری LPA درصد بالایی از فولیکول های نرمال که تکوین بالایی نیز داشتند در گروه تیمار شده با LPA دیده شد [18] که این امر می تواند مربوط به عملکردهای مختلف LPA باشد.

LPA به عنوان یک فاکتور ضد مرگ سلولی و یا فاکتور زنده مانی باعث تثبیت بقای سلولی می شود و به دنبال خود می تواند باعث افزایش درصد فولیکول های نرمال شود. در مطالعات مرتبط دیگر نیز نقش ضد آپوپتوزی LPA در خصوص سلول های دیگر به اثبات رسیده است [20-23].

یکی دیگر از نقش های مهم LPA این است که می تواند به عنوان فاکتور رشد و یا تکثیر عمل کند که باعث تکثیر سلول های



شکل ۱ تصاویر میکروسکوپ نوری بافت تخمدان انسانی رنگ آمیزی شده با هماتوکسیلین و ائوزین پس از کشت و پیوند در حضور و غیاب LPA، (A) گروه کشت شده در غیاب LPA (B)؛ گروه کشت شده در حضور LPA (C)؛ گروه پیوند شده در غیاب LPA (D)؛ گروه پیوند شده در حضور LPA (فلش های سیاه فولیکول اولیه و فلش زرد فولیکول بدوی را نشان می دهند.)

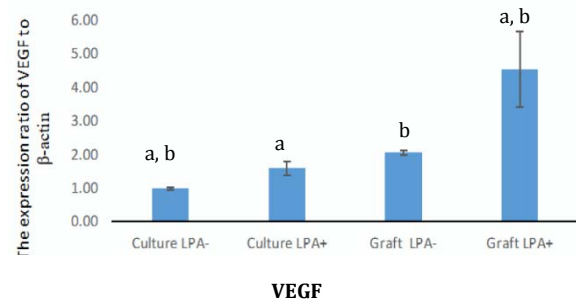
ارزیابی بیان ژن مرتبط با آنژیوژن در گروه های مطالعه

میزان بیان نسبی ژن VEGF به ژن مرجع beta-actin مربوط به گروه های مورد مطالعه در نمودار ۱ ارایه شده است. نسبت بیان ژن VEGF در گروه های تیمار شده با LPA قبل و بعد از پیوند به ترتیب ۱/۵۹±۰/۲۱ و ۴/۵۴±۱/۱۳ و برای گروه تیمار نشده با LPA قبل و بعد از پیوند به میزان ۰/۹۷±۰/۰۴ و ۲/۰۵±۰/۰۵ بود که افزایش معنی داری در گروه تیمار شده با LPA در مقایسه با گروه دیگر نشان داد (p<۰/۰۵).

ژل الکتروفورز محصول PCR در شکل ۲ ارایه شده که از Ladder 100 در محصول PCR استفاده شده است.

ارزیابی ایمونوهیستوشیمی VEGF

بیان پروتئین VEGF قبل و بعد از پیوند در حضور و غیاب LPA در شکل ۳ ارایه شده است. واکنش مثبتی (به رنگ سبز) برای این پروتئین در دیواره عروق خونی موجود در بافت استرومای تخمدان در همه گروه ها دیده شد و به نظر می رسد که میزان واکنش در گروه های تحت تیمار با LPA بیشتر است.



نمودار ۱ مقایسه میزان بیان نسبی ژن VEGF به ژن مرجع beta-actin مربوط به گروه های مورد مطالعه؛ (a) وجود اختلاف معنی دار با گروه متناظر بدون LPA (p<۰/۰۵)؛ (b) وجود اختلاف معنی دار گروه های پیوند شده با گروه کشت شده متناظر (p<۰/۰۵)

که LPA با تنظیم ترشح اینترلوکین ۶ و ۸ در شکل‌گیری عروق جدید و به‌خصوص در شکل‌گیری جسم زرد، تکوین جفت و رحم نیز نقش دارد [28]. ریورالوپیز و همکاران در سال ۲۰۰۸ با استفاده از روش غشای کوریوآلانتوئیک جوجه نشان دادند که LPA در این سیستم منجر به آنژیوژنز می‌شود [39]. اوکوداریا و همکاران در سال ۲۰۱۰ نشان دادند که LPA بیان فاکتور VEGF را در تخمدان القا می‌کند که مکانیزم آن هنوز به‌طور دقیق مشخص نشده است [43].

نتیجه‌گیری

به‌کارگیری LPA در محیط کشت بافت تخمدان انسانی می‌تواند باعث بهبود کیفیت بافت پس از پیوند و نیز افزایش بروز ژن VEGF مرتبط به آنژیوژنز در آن شود.

تشکر و قدردانی: از زحمات جناب آقای پوربیرانوند کارشناس گروه علوم تشریح دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس که در مطالعه حاضر کمک‌های تکنیکی زیادی کرده‌اند تشکر و قدردانی می‌شود.

تاییدیه اخلاقی: بخش انسانی مطالعه حاضر در کمیته اخلاق دانشگاه تربیت مدرس با شماره ارجاع ۵۲۵/۸۸۳ و بخش حیوانی آن در کمیته اخلاقی دانشگاه آزاد واحد علوم و تحقیقات با شماره IR.IAU.SRB.REC.1397.119 تایید شده است.

تعارض منافع: هیچ‌گونه تعارض منافی وجود ندارد.

سهم نویسندگان: زینب محمدی (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/روشناس/پژوهشگر اصلی/تحلیلگر آماری (۴۰٪)؛ نسیم حیاتی رودباری (نویسنده دوم)، پژوهشگر کمکی (۱۰٪)؛ کاظم پریور (نویسنده سوم)، پژوهشگر کمکی (۱۰٪)؛ مژده صالح‌نیا (نویسنده چهارم)، نگارنده مقدمه/روشناس/پژوهشگر اصلی/نگارنده بحث (۴۰٪).

منابع مالی: مطالعه حاضر بخشی از رساله دکتری تخصصی زیست‌شناسی سلولی و تکوینی دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران است که با حمایت مالی موسسه ملی توسعه تحقیقات علوم پزشکی ایران انجام شده است.

منابع

- 1- Kim S, Lee Y, Lee S, Kim T. Ovarian tissue cryopreservation and transplantation in patients with cancer. *Obstet Gynecol Sci*. 2018;61(4):431-42.
- 2- Donfack NJ, Alves KA, Araújo VR, Cordova A, Figueiredo JR, Smitz J, et al. Expectations and limitations of ovarian tissue transplantation. *Zygote*. 2017;25(4):391-403.
- 3- Jones GL, Hughes J, Mahmoodi N, Greenfield D, Brauten-Smith G, Skull J, et al. Observational study of the development and evaluation of a fertility preservation patient decision aid for teenage and adult women diagnosed with cancer: The Cancer, Fertility and Me research protocol. *BMJ Open*. 2017;7(3):e013219.
- 4- Dittrich R, Lotz L, Fehm T, Krüssel J, Von Wolff M, Toth B, et al. Xenotransplantation of cryopreserved human ovarian tissue—a systematic review of MII oocyte maturation and discussion of it as a realistic option for restoring fertility after cancer treatment. *Fertil Steril*. 2015;103(6):1557-65.
- 5- Xie Sh, Zhang X, Chen W, Xie Ch, Chen W, Cheng P, et al. Developmental status: Impact of short-term ischemia on

فولیکولر و گرانولوزا می‌شود و این امر تکوین و رشد فولیکول‌ها را به دنبال خواهد داشت و به‌طور مشابه LPA همین نقش را در خصوص سلول‌های دیگر داشته و باعث تکثیر سلولی شده است [32]. علاوه بر دلایل ذکرشده به نقش مهم دیگر LPA نیز می‌توان اشاره کرد و آن تحریک آنژیوژنز و تشکیل عروق خونی جدید در بافت پیوندی است [28, 33-39]. با تشکیل عروق خونی جدید از یک‌سو از اثرات مخرب ایسکمی کاسته می‌شود که خود می‌تواند بقای فولیکول‌های موجود را افزایش دهد و از سوی دیگر شکل‌گیری عروق جدید می‌تواند در بلوغ، رشد و تکوین فولیکول‌های کوچک به سمت فولیکول‌های بزرگ موثر باشد، چراکه شکل‌گیری و رشد لایه تکای فولیکولی وابسته به عروق جدید است. یکی از فاکتورهای مهم دخیل در آنژیوژنیز فاکتور رشد اندوتلیال عروقی است که در بافت تخمدان نیز تولید می‌شود و یا از طریق سیستماتیک به آن می‌رسد [12, 40] و در مطالعات گذشته دیده شده است که به علت‌های گوناگون در بافت‌های پیوندی میزان این فاکتور افزایش می‌یابد [10-14]. زندوکیلی و همکاران نیز اخیراً با به‌کارگیری این ترکیب در بافت‌های پیوندی تخمدان نشان دادند که VEGF با کمک در تشکیل عروق جدید در لایه تکای فولیکول‌های بزرگ و نیز در شکل‌گیری جسم زرد نقش فعالی داشته و باعث افزایش تکوین فولیکولی شده است [12].

در بخش دیگری از نتایج مطالعه حاضر، نتایج مولکولی نیز نشان داد که میزان بیان ژن VEGF در گروه تیمار شده با LPA قبل و بعد از پیوند نسبت به گروه فاقد LPA به‌طور معنی‌داری افزایش دارد و البته با روش ایمنو‌هیستوشیمی نیز بروز این پروتئین در گروه‌های مورد مطالعه تایید شد. اگرچه انجام این تکنیک به شکل کیفی بود، اما به نظر می‌رسد که واکنش بیشتری در گروه تحت تیمار با LPA دیده شد. به عبارتی نتایج مطالعه حاضر نشان داد که LPA به‌عنوان فاکتوری موثر در جلوگیری از ایسکمی و نیز کمک به ایجاد عروق خونی جدید پس از پیوند بافت تخمدان عمل کرده است. این عملکرد به‌طور مستقیم با تکثیر سلول‌های اندوتلیال و ایجاد جوانه‌های عروقی جدید انجام می‌شود. در همین ارتباط هو/نگ و همکاران نشان دادند که LPA سبب مهاجرت سلول‌های اندوتلیال شده و با افزایش بیان ماتریکس متالوپروتئیناز منجر به تکثیر سلول‌های اندوتلیال در محیط کشت می‌شود [41].

از سوی دیگر به نظر می‌رسد که LPA به شکل غیرمستقیم با تولید فاکتورهای موثر دیگر دخیل در آنژیوژنز باعث شکل‌گیری عروق جدید شود. یکی از این فاکتورهای مهم که به اثبات رسیده است و توسط LPA القا می‌شود، فاکتور رشد اندوتلیالی عروقی است [37-40]. در همین ارتباط *واسنایسکی و وکلاوک پوتاکا* گزارش کردند که LPA از طریق بروز فاکتور رشد اندوتلیالی عروقی باعث آنژیوژنز می‌شود [27]. لی و همکاران نشان دادند که LPA سبب القای ساخت فاکتور VEGF می‌شود که این فرآیند توسط فاکتور فاکتور ۱ القای هیپوکسی (Hypoxia-Inducible Factor-1A) میانجی‌گری می‌شود [42]. علاوه بر این در مطالعات دیگری نیز مشخص شده است

- 21- Sinderewicz E, Grycmacher K, Boruszewska D, Kowalczyk-Zięba I, Staszkiwicz J, Ślęzak T, et al. Expression of factors involved in apoptosis and cell survival is correlated with enzymes synthesizing lysophosphatidic acid and its receptors in granulosa cells originating from different types of bovine ovarian follicles. *Reprod Biol Endocrinol*. 2017;15(1):72.
- 22- Ye X. Lysophospholipid signaling in the function and pathology of the reproductive system. *Hum Reprod Updat*. 2008;14(5):519-36.
- 23- Wocławek-Potocka I, Rawińska P, Kowalczyk-Zieba I, Boruszewska D, Sinderewicz E, Waśniewski T, et al. Lysophosphatidic acid (LPA) signaling in human and ruminant reproductive tract. *Mediators of inflammation*. 2014;2014:649702.
- 24- Choi JW, Herr DR, Noguchi K, Yung YC, Lee CW, Mutoh T, et al. LPA receptors: Subtypes and biological actions. *Ann Rev Pharmacol Toxicol*. 2010;50:157-86.
- 25- Yung YC, Stoddard NC, Chun J. LPA receptor signaling: Pharmacology, physiology, and pathophysiology. *J Lipid Res*. 2014;55(7):1192-214.
- 26- Sheng X, Yung YC, Chen A, Chun J. LPA signaling during vascular development. *Development*. 2015;142(8):1390-5.
- 27- Wasniewski T, Woclawek-Potocka I. Altered expression of lysophosphatidic acid receptors, in association with the synthesis of estrogens and androgens in type 1 endometrial cancer biology. *Gynecol Endocrinol*. 2018;34(5):422-7.
- 28- Chen SU, Chou CH, Lee H, Ho CH, Lin CW, Yang YS. Lysophosphatidic acid up-regulates expression of interleukin-8 and -6 in granulosa-lutein cells through its receptors and nuclear factor- κ B dependent pathways: Implications for angiogenesis of corpus luteum and ovarian hyperstimulation syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008;93(3):935-43.
- 29- Hisano Y, Hla T. Bioactive lysolipids in cancer and angiogenesis. *Pharmacol Ther*. 2019;193:91-8.
- 30- Ramezani M, Salehnia M, Jafarabadi M. Short term culture of vitrified human ovarian cortical tissue to assess the cryopreservation outcome: Molecular and morphological analysis. *J Reprod Infertil*. 2017;18(1):162-71.
- 31- Abdollahi M, Salehnia M, Salehpour S, Ghorbanmehr N. Human ovarian tissue vitrification/warming has minor effect on the expression of apoptosis-related genes. *Iran Biomed J*. 2013;17(4):179-86.
- 32- Boruszewska D, Sinderewicz E, Kowalczyk-Zieba I, Grycmacher K, Woclawek-Potocka I. The effect of lysophosphatidic acid during in vitro maturation of bovine cumulus-oocyte complexes: Cumulus expansion, glucose metabolism and expression of genes involved in the ovulatory cascade, oocyte and blastocyst competence. *Reprod Biol Endocrinol*. 2015;13(1):44.
- 33- Teo ST, Yung YC, Herr DR, Chun J. Lysophosphatidic acid in vascular development and disease. *IUBMB Life*. 2009;61(8):791-9.
- 34- Tanaka M, Okudaira Sh, Kishi Y, Ohkawa R, Iseki S, Ota M, et al. Autotaxin stabilizes blood vessels and is required for embryonic vasculature by producing lysophosphatidic acid. *J Biol Chem*. 2006;281(35):25822-30.
- 35- Van Meeteren LA, Ruurs P, Stortelers C, Bouwman P, Van Rooijen MA, Pradere JP, et al. Autotaxin, a secreted lysophospholipase D, is essential for blood vessel formation during development. *Mol Cell Biol*. 2006;26(13):5015-22.
- 36- Yukiura H, Hama K, Nakanaga K, Tanaka M, Asaoka Y, Okudaira Sh, et al. Autotaxin regulates vascular follicular survival of whole ovarian transplantation in a rabbit model. *PLoS One*. 2015;10(8):e0135049.
- 6- Liu J, Van Der Elst J, Van Den Broecke R, Dhont M. Early massive follicle loss and apoptosis in heterotopically grafted newborn mouse ovaries. *Hum Reprod*. 2002;17(3):605-11.
- 7- Israely T, Nevo N, Harmelin A, Neeman M, Tsafirri A. Reducing ischaemic damage in rodent ovarian xenografts transplanted into granulation tissue. *Hum Reprod*. 2006;21(6):1368-79.
- 8- Parsley WM, Perez-Meza D. Review of factors affecting the growth and survival of follicular grafts. *J Cutan Aesthet Surg*. 2010;3(2):69-75.
- 9- Demeestere I, Simon P, Buxant F, Robin V, Fernandez SA, Centner J, et al. Ovarian function and spontaneous pregnancy after combined heterotopic and orthotopic cryopreserved ovarian tissue transplantation in a patient previously treated with bone marrow transplantation: Case report. *Hum Reprod*. 2006;21(8):2010-4.
- 10- Pacheco F, Oktay K. Current success and efficiency of autologous ovarian transplantation: A meta-analysis. *Reprod Sci*. 2017;24(8):1111-20.
- 11- Kang BJ, Wang Y, Zhang L, Xiao Z, Li SW. bFGF and VEGF improve the quality of vitrified-thawed human ovarian tissues after xenotransplantation to SCID mice. *J Assist Reprod Genet*. 2016;33(2):281-9.
- 12- Zand-Vakili M, Golkar-Narenji A, Mozdziak PE, Eimani H. An in vitro study on oocyte and follicles of transplanted ovaries treated with vascular endothelial growth factor. *J Turk Ger Gynecol Assoc*. 2017;18(4):167-73.
- 13- Cho IA, Lee YJ, Lee HJ, Choi IY, Shin JK, Lee SA, et al. Angiopoietin-1 and -2 and vascular endothelial growth factor expression in ovarian grafts after cryopreservation using two methods. *Clin Exp Reprod Med*. 2018;45(3):143-8.
- 14- Labied S, Delforge Y, Munaut C, Blacher S, Colige A, Delcombel R, et al. Isoform 111 of vascular endothelial growth factor (VEGF111) improves angiogenesis of ovarian tissue xenotransplantation. *Transplantation*. 2013;95(3):426-33.
- 15- Demeestere I, Simon P, Emiliani S, Delbaere A, Englert Y. Orthotopic and heterotopic ovarian tissue transplantation. *Hum Reprod Updat*. 2009;15(6):649-65.
- 16- Kolusari A, Okyay AG, Koçkaya EA. The effect of erythropoietin in preventing ischemia-reperfusion injury in ovarian tissue transplantation. *Reprod Sci*. 2018;25(3):406-13.
- 17- Israely T, Dafni H, Nevo N, Tsafirri A, Neeman M. Angiogenesis in ectopic ovarian xenotransplantation: Multiparameter characterization of the neovasculature by dynamic contrast-enhanced MRI. *Magnetic Reson Med*. 2004;52(4):741-50.
- 18- Mohammadi Z, Hayati Roodbari N, Parivar K, Salehnia M. Supplementation of culture media with lysophosphatidic acid improve the follicular development of human ovarian tissue after xenotransplantation into back muscle of γ -Irradiated mice. *Cell J*. 2020;22(3):358-66.
- 19- Abedpour N, Salehnia M, Ghorbanmehr N. Effect of lysophosphatidic acid on the follicular development and the expression of lysophosphatidic acid receptor genes during in vitro culture of mouse ovary. *Vet Res Forum*. 2018;9(1):59-66.
- 20- Ye X, Ishii I, Kingsbury MA, Chun J. Lysophosphatidic acid as a novel cell survival/apoptotic factor. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Mol Cell Biol Lipids*. 2002;1585(2-3):108-13.

- 40- Redmer DA, Doraiswamy V, Bortnem BJ, Fisher K, Jablonka-Shariff A, Grazul-Bilska AT, et al. Evidence for a role of capillary pericytes in vascular growth of the developing ovine corpus luteum. *Biol Reprod.* 2001;65(3):879-89.
- 41- Hwang SU, Kim KJ, Kim E, Yoon JD, Park KM, Jin M, et al. Lysophosphatidic acid increases in vitro maturation efficiency via uPA-uPAR signaling pathway in cumulus cells. *Theriogenology.* 2018;113:197-207.
- 42- Lee J, Park SY, Lee EK, Park CG, Chung HC, Rha SY, et al. Activation of hypoxia-inducible factor-1 α is necessary for lysophosphatidic acid-induced vascular endothelial growth factor expression. *Clin Cancer Res.* 2006;12(21):6351-8.
- 43- Okudaira Sh, Yukiura H, Aoki J. Biological roles of lysophosphatidic acid signaling through its production by autotaxin. *Biochimie.* 2010;92(6):698-706.
- development via multiple lysophosphatidic acid (LPA) receptors in zebrafish. *J Biol Chem.* 2011;286(51):43972-83.
- 37- Park SY, Jeong KJ, Lee J, Yoon DS, Choi WS, Kim YK, et al. Hypoxia enhances LPA-induced HIF-1 α and VEGF expression: Their inhibition by resveratrol. *Cancer Lett.* 2007;258(1):63-9.
- 38- Lin CI, Chen CN, Huang MT, Lee SJ, Lin CH, Chang CC, et al. Lysophosphatidic acid upregulates vascular endothelial growth factor-C and tube formation in human endothelial cells through LPA1/3, COX-2, and NF- κ B activation-and EGFR transactivation-dependent mechanisms. *Cell Signal.* 2008;20(10):1804-14.
- 39- Rivera-Lopez CM, Tucker AL, Lynch KR. Lysophosphatidic acid (LPA) and angiogenesis. *Angiogenesis.* 2008;11(3):301-10.