

طراحی یک مدل آزمایشگاهی رگزایی در ماتریکس سه بعدی فیبرین برای مطالعه عوامل مؤثر در رگزایی

کامران منصوری*؛ دکتر منوچهر میرشاهی**؛ دکتر علی اکبر پور فتح الله***؛ دکتر زهیر محمد حسن***

چکیده

سابقه و هدف: آنژیوژنز نقش بسیار مهمی در پدیده‌های فیزیولوژیکی (نظیر رشد جنین و ترمیم بافتی) و پاتولوژیکی (نظیر رتینوپاتی دیابتی، آرتریت، رشد غدد سرطانی و متاستاز) ایفا می‌کند. بررسی و ارزیابی رشد سلول‌های اندوتلیال و نهایتاً تشکیل رگ‌های جدید در شرایط *in vivo* با مشکلات و پیچیدگی‌های زیادی همراه است.

مواد و روش‌ها: به منظور غلبه بر این مشکل ما در شرایط آزمایشگاهی (*in vitro*) یک سیستم رگزایی قابل کنترل را طراحی نمودیم که از قابلیت تکرار پذیری بالایی برخوردار است و می‌توان پارامترهای متفاوتی را که در فرایند رگزایی دخالت دارند، مورد مطالعه قرارداد. در این مدل از گویچه‌های پوشیده شده از سلول‌های اندوتلیال مویرگ‌های مغز استخوان انسان به عنوان منشأ سلول‌های اندوتلیال استفاده شد و بدین ترتیب ساختمان سه بعدی لازم برای رشد سلول‌های اندوتلیال و ایجاد رگ توسط ژل فیبرین تأمین گردید.

یافته‌ها: در این روش، ۷-۵ روز بعد از کشت سلول‌های اندوتلیال، رشد و مهاجرت سلول‌ها و در نتیجه تشکیل مویرگ‌ها در میدان میکروسکوپی به صورت انشعاب‌هایی از سلول‌های اندوتلیال منشأ دیده شد.

بحث: به وسیله این مدل، می‌توان مواد ممانعت‌کننده و القاکننده رگزایی را مورد بررسی و مطالعه قرار داد. به عبارت دیگر، این مدل روشی بسیار ساده برای غربال‌گری مواد آنژیوژنیک و آنتی آنژیوژنیک در اختیار قرار می‌دهد.

کلیدواژه‌ها: آنژیوژنز، فیبرین، سلول اندوتلیال

« دریافت: تابستان ۱۳۸۲ پذیرش: تابستان ۱۳۸۴ »

* کارشناس ارشد هماتولوژی، مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه

** Ph.D بیوشیمی، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم، گروه بیوشیمی

*** Ph.D ایمنوهیاتولوژی، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه هماتولوژی

* عهده‌دار مکاتبات: کرمانشاه، بلوار شهید بهشتی، بیمارستان شهدا، آزمایشگاه هماتوپاتولوژی. تلفن: ۰۸۳۱-۸۳۵۴۱۱۳

مقدمه

آنژیوژنز فرایند پیچیده‌ای است که طی آن رگ‌های جدید از جوانه‌زدن رگ‌هایی که از قبل وجود داشته‌اند، ایجاد می‌گردند. تشکیل و رشد رگ‌های جدید نقش بسیار مهمی در پدیده‌های فیزیولوژیکی (نظیر رشد جنین، ترمیم بافتی) و پاتولوژیکی (نظیر رتینوپاتی دیابتی، آرتروز، رشد غدد سرطانی و متاستاز) ایفا می‌کند (۱). در حقیقت رشد غدد سرطانی وابسته به تشکیل رگ‌های جدیدی است که از طریق آن تغذیه و اکسیژناسیون این غدد تأمین می‌گردد (۲ و ۳ و ۴).

عوامل رشد و ترکیبات ماتریکس خارج سلولی نقش مهمی در آنژیوژنز دارند، محرک‌های رگزایی متعددی مانند VEGF^۱ و FGFs^۲ و ... شناسایی شده‌اند که بسیاری از آنها توسط انواع سلول‌های توموری ترشح می‌شوند و نقش بسیار مهمی در رگزایی و متاستاز تومور دارند (۵ و ۶ و ۷).

برای تحقیق در مورد عواملی که در رگزایی مؤثرند و برای به‌دست آوردن اطلاعات بیشتر و درک فرایندهای دخیل در رگزایی مدل‌های متعددی وجود دارد که در ذیل به انواع آنها اشاره می‌شود:

۱- مدل اندازه‌گیری غشای کوریوالانتوییک جوجه (CAM)^۳:

تکنیکی است که توسط جنین‌شناسان استفاده می‌شود که به‌وسیله آن توان رشد عضو پیوندزده شده در روی CAM بررسی می‌شود؛ زیرا جنین اولیه جوجه فاقد سیستم ایمنی است. جنین جوجه پیوند گزانوگراف^۴ از گونه‌های

پستانداران را به خوبی می‌پذیرد و رگزایی آن عضو پیوندی سریع است. رگزایی در این مدل سه تا چهار روز بعد از پیوند اندازه‌گیری می‌شود. به دور از مسایل و مشکلات مربوط به اندازه‌گیری کمی، شایع‌ترین مشکل این روش نتایج مثبت کاذب است که بر اثر زخم یا تحریکات ایجادشده در طول مراحل اولیه آزمایش به وجود می‌آید؛ زیرا پاسخ رگزایی ممکن است نتیجه بهبود زخم یا التهاب باشد. مزیت این مدل آن است که چندین عضو پیوندی می‌تواند در روی یک جنین قرار داده شوند (۸ و ۹).

۲- مدل تشکیل عروق جدید در قرنيه^۵:

در سال ۱۹۷۸، Henkin نشان داد که قرنيه عادی فاقد رگ است و تشکیل رگ‌های جدید بر اثر القای واکنش رگزایی صورت می‌گیرد. در این مدل سلول‌های توموری یا عصاره آنها را در فاصله دو میلی‌متری محل برش قرنيه قرار می‌دهند و در طول مدت ۳۶ ساعت تولید جوانه‌های رگ بررسی می‌گردد. به دلیل عدم وجود خصوصیات نژادی مشابه در گونه‌های مختلف خرگوش و همچنین گرانی و عدم به‌دست آوردن موقعیت یکسان برای آزمایش مواد این روش مشکل است (۸).

Strieter و همکاران نشان دادند که بیان سیتوکین‌هایی مانند اینترلوکین ۸ توسط قرنيه که خاصیت آنژیوژنیک دارد، ممکن است در نتایج آنژیوژنز تأثیر بگذارد (۸).

۳- مدل Pouch assay:

Hamster cheek pouch ارگانی فاقد سیستم ایمنی است؛ زیرا پیوندهای آلورژنیک و گزنوژنیک را به خوبی می‌پذیرد

1. Vascular Endothelial Growth Factor

2. Fibroblast Growth Factors

3. Chicken chorioallantoic membrane

4. Xenograft

5. Corneal Neovascularization Model

صحرائی در ژل کلاژن یا فیبرین در عدم حضور فاکتورهای رشد خارجی قرار داده می‌شود که می‌تواند منجر به ایجاد عروق ریز شعاعی شود (۸).

۸- مدل آمینون انسانی:

در سال ۱۹۸۳، Fuiere و Madri و همکاران از غشای پایه آمینون به عنوان یک سوستر برای اندوتلیوم عروق استفاده کردند و سلول‌های اندوتلیال روی این سوستر تمایز پیدا کرده که می‌توان آنژیوژنز را در این مدل بررسی کرد.

با توجه به وابسته بودن رشد غدد سرطانی به آنژیوژنز و تحلیل و از بین رفتن این غدد توسط مواد آنتی آنژیوژنیک موجود، طراحی یک مدل آزمایشگاهی آنژیوژنز برای مطالعات مورد نظر ضرورت دارد؛ بنابراین به نظر می‌رسد که برای تحقیقات بنیادی و کاربردی و ارائه راه‌کارهای درمانی مناسب مدل آزمایشگاهی آنژیوژنز روشی مناسب و سریع برای مطالعه و غربال کردن عوامل القاکننده و مهارکننده آنژیوژنز باشد (۸).

در این پژوهش یک مدل سه‌بعدی آزمایشگاهی به منظور بررسی مهاجرت سلول‌های اندوتلیال میکرو واسکولار مغز استخوان شرح داده می‌شود.

مواد و روش‌ها

مواد مورد استفاده در این مطالعه عبارت بودند از: فیبرینوژن انسانی (سیگما)، ترومبین انسانی (سیگما)، رپتیلاز (سیگما)، محیط کشت سلول MCDB131 (سیگما)، ESGF^۳ (سیگما)، آپروتینین (Bayer) و Cytodex-3- microcarriers (سیگما).

و پیوند بدون برانگیختن سیستم ایمنی رشد خواهد کرد. اندازه‌گیری کمی در این مدل به وسیله آزمایش مرفومتريک برش‌های آماده شده هیستولوژیکی متناسب رگزایی انجام می‌شود و در این مدل از کاشتن سلول‌های توموری استفاده می‌گردد (۸).

۴- روش کیسه هوایی:

این روش در سال ۱۹۵۳ توسط selge و همکاران پیشنهاد گردید که برای ارزیابی و دیدن رگزایی تومورهای پیوندشده به کیسه هوایی مورد استفاده قرار گرفت. در این مدل ابتدا کیسه هوایی با تزریق ۱۵-۱۰ میلی‌لیتر هوا به پشت موش صحرائی ایجاد می‌شود، به طوری که فرایند رگزایی قابل دیدن و ارزیابی باشد (۸).

۵- روش اندازه‌گیری پنجره مزانتريک^۱:

در این مدل مواد مورد آزمایش در روی بافت نرمال دارای رگ بررسی می‌شود و رگزایی در این مدل وابسته به سلول‌های ماست سل اتولوگوس^۲ است (۸).

۶- اندازه‌گیری سه‌بعدی در محیط سه بعدی ژل:

روش‌های مختلفی برای اندازه‌گیری سه بعدی رگزایی در محیط ژل وجود دارد، به طوری که در سال ۱۹۸۵، Ingber و Folkman از فیبرونکتین و در سال ۱۹۸۹، Kubota و همکاران از Matrigel استفاده کردند که در این مدل‌ها از کشت سلول‌های اندوتلیال روی این ژل‌ها برای تشکیل رگ استفاده شد (۸).

۷- مدل حلقه آئورت موش صحرائی:

رشد شعاعی عروق ریز به سادگی در حلقه آئورت موش صحرائی که در ژل فیبرین یا کلاژن کشت داده شود، دیده می‌شود. در این مدل که توسط Nicosia در سال ۱۹۹۰ مورد استفاده قرار گرفت، حلقه‌های آئورتیک موش

آپروتینین (Trasyol) به محیط کشت رویی و ژل فیبرین اضافه شد و پس از ۷-۵ روز انکوباسیون پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و CO₂ ۵ درصد فرایند رگ‌زایی بررسی گردید.

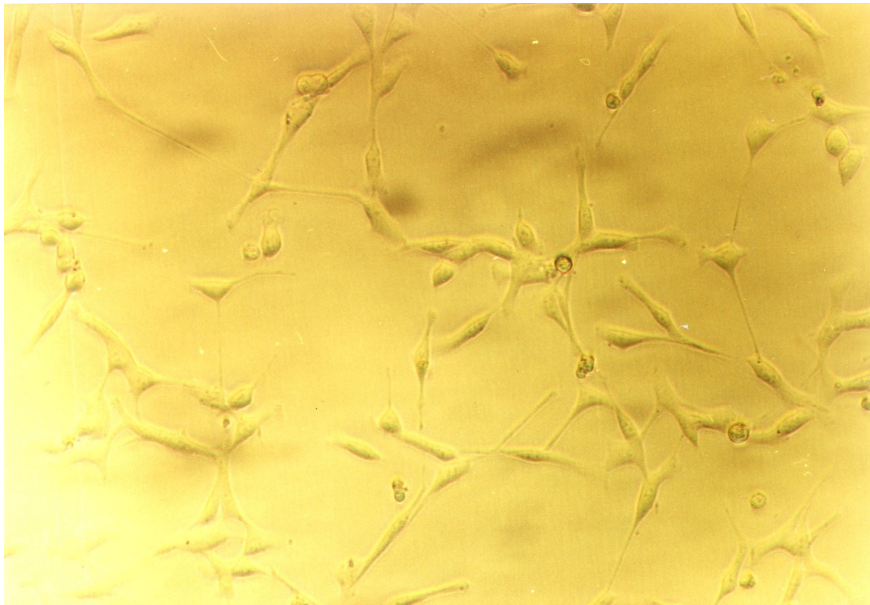
یافته‌ها

در طول کشت دودمان HBMEC در محیط کشت MCDB131 حاوی ESGF (شکل ۱) مشخص شد که مقدار مناسب ESGF برای رشد این دودمان سلولی ۴ درصد می‌باشد. غلظت پروتئین پودر فیبرینوژن توسط روش برادفورد تعیین شد و غلظت پروتئین آن ۰/۲ میلی‌گرم در هر میلی‌لیتر به دست آمد؛ یعنی به ازای هر ده میلی‌گرم پودر فیبرینوژن دو میلی‌گرم فیبرینوژن و بقیه آن نمک بود که با استفاده از کیسه دیالیز مقدار فیبرینوژن مصرفی در مقابل محیط MCDB131 دیالیز گردید. سپس غلظت بهینه فیبرینوژن برای ایجاد ماتریکس تعیین شد که در این مدل غلظت مناسب فیبرینوژن به منظور ایجاد یک ماتریکس مناسب ۲/۵ میلی‌گرم در هر میلی‌لیتر بود. مرحله بعد شامل به دست آوردن ضخامت مناسب ژل فیبرین بود. میزان ضخامت این ژل بایستی به گونه‌ای باشد که سلول‌ها قادر به تخریب و مهاجرت در داخل آن باشند و در عین حال رؤیت و عکس‌برداری سلول‌ها و پدیده رگ‌زایی توسط میکروسکوپ معکوس امکان‌پذیر باشد (شکل ۲). بدین ترتیب ضخامت مناسب ژل در این مدل دو میلی‌متر به دست آمد که به منظور دستیابی به آن در هر پلیت ۲۴ خانه‌ای مقدار ۳۰۰ میکرولیتر محلول فیبرینوژن اضافه شد.

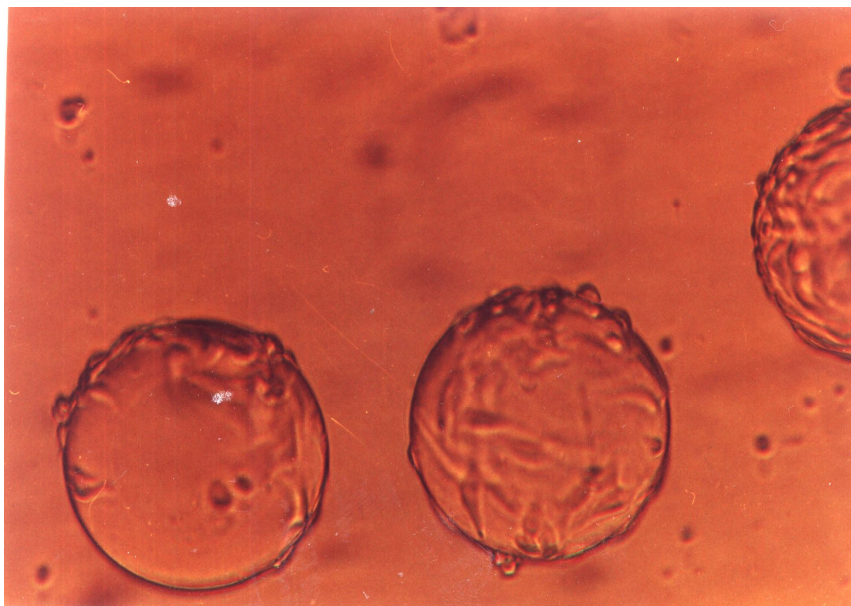
در مرحله بعد نسبت مناسب سلول‌ها به ذرات حامل

آماده‌سازی ذرات: ذرات cytodex-3-microcarriers به مدت ۸ الی ۱۰ ساعت در PBS قرار گرفتند تا متورم شوند. ذرات متورم شده به مدت ۱۵ دقیقه در فشار ۲۰-۱۵ پوند بر اینچ مربع اتوکلاو شدند و سپس در زیر هود استریل، بافر فسفات از محیط حذف گردید و به جای آن محیط MCDB131 حاوی چهار درصد ESGF اضافه شد و محصولات به دست آمده تا هنگام استفاده در یخچال ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد.

روش کار برای طراحی مدل و تعیین شرایط مطالعه رگ‌زایی: نخست دودمان سلولی HBMEC^۱ در فلاسک ۵۰ میلی‌لیتری کشت سلولی کشت داده شد. پس از آن که سلول‌ها سطح فلاسک را پوشاندند و تعداد آن‌ها در فلاسک کشت سلولی به بیش از یک میلیون رسید، با استفاده از تریپسین - EDTA ۲/۵ درصد این سلول‌ها به صورت سوسپانسیون در آورده شدند. سپس به منظور گردهمایی سلول‌ها در یک نقطه از ذرات cytodex - 3- microcarriers استفاده شد. بدین ترتیب که سلول‌ها به ذرات cytodex-3-microcarriers پوشیده از ژلاتین اضافه و سپس به مدت ۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO₂ انکوبه شدند. پس از کنترل چسبیدن سلول‌ها به ذرات cytodex (که با میکروسکوپ صورت می‌گیرد)، ذرات پوشیده از سلول با محلول فیبرینوژن (با غلظت ۲/۵ mg/ml) مخلوط شدند و به آن‌ها ترومبین (با غلظت ۲ IU/ml) و یا رپتیلاز اضافه شد و مخلوط حاصل بلافاصله در ماکروپلیت کشت سلول تقسیم گردید. بعد از تشکیل ژل فیبرین، محیط کشت کامل (MCDB131 و ESGF) به هر چاهک اضافه شد. گفتنی است مقدار ۲۰۰ IU/ml



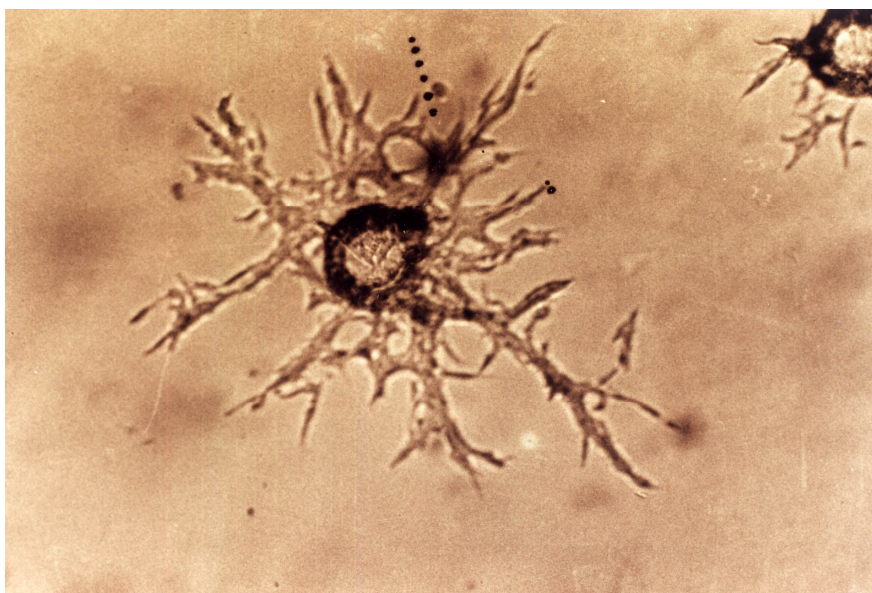
شکل ۱- سلول‌های HBMEC در محیط کشت سلولی



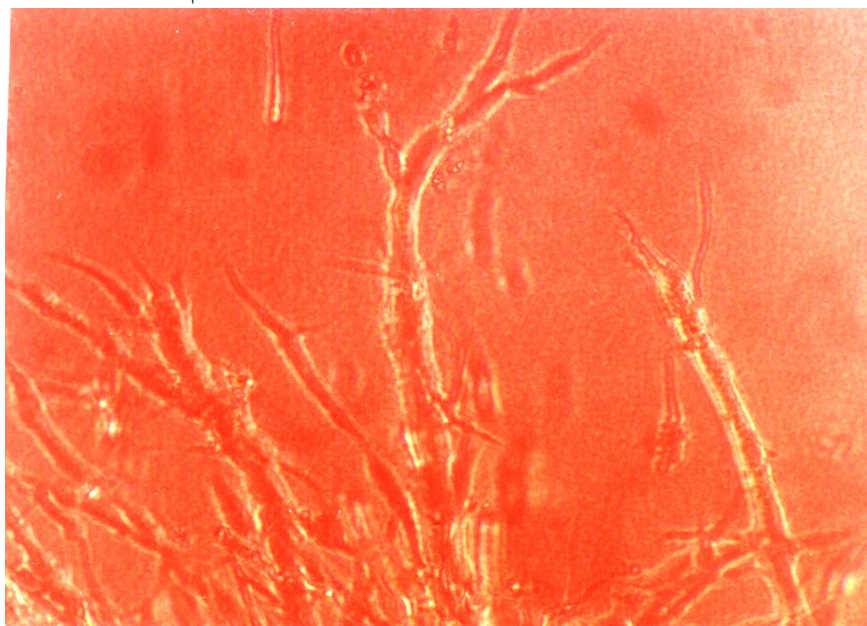
شکل ۲- ذرات Cytodex-3-microcarriers پوشیده از سلول که در ژل فیبرین قرار گرفته‌اند.

۲ IU/ml و میزان رپتیلاز ۱۰۰ میکرولیتر تعیین شد و چون سلول‌ها دارای فعالیت فیبرینولیتیک بالایی بودند، به محیط کشت رویی و محلول فیبرینوژن ۲۰۰ IU/ml آپروتینین (Trasylol) اضافه شد. پس از انجام این مراحل پلیت کشت سلولی به مدت ۵ تا ۷ روز در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO_2 انکوبه شد. در روزهای

تعیین شد که طی آن مشخص شد این نسبت برابر ۳۰ به یک است. مرحله بعد شامل به دست آوردن غلظت مناسب ترومبین و رپتیلاز بود، به طوری که ذرات حامل پوشیده از سلول بعد از اضافه کردن ترومبین و رپتیلاز به سرعت در ژل گیر کند و محیط اطراف آن‌ها را ژل فیبرین احاطه نماید. در این مدل غلظت مناسب ترومبین



شکل ۳- رگزایی مشاهده شده در مدل Cytodex-3-microcarriers (روز پنجم ، بزرگنمایی ۲۵۰)



شکل ۴- رگزایی مشاهده شده در مدل Cytodex-3-microcarriers (روز پنجم ، بزرگنمایی ۴۰۰)

مطالعه ترکیبات مهارکننده رگزایی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است.

روش‌های مختلفی برای مطالعه فرایند رگزایی در شرایط *In vitro* و *In vivo* پیشنهاد شده است. مدل طراحی شده به ما این امکان را می‌دهد که پاسخ‌های سلول‌های اندوتلیال مغز استخوان را در ماتریکس سه‌بعدی فیبرین مورد مطالعه قرار دهیم. از سوی دیگر،

نخستین انکوباسیون سلول‌های متصل به ذرات حامل شروع به تکثیر و جوانه‌زدن نمودند، به گونه‌ای که در روزهای ۵ تا ۷ فرایند رگزایی به‌طور کامل و به‌صورت شعاعی مشاهده گردید (شکل‌های ۳ و ۴).

بحث

با توجه به وابسته بودن رشد غدد سرطانی به آنژیوژنز و تحلیل و از بین رفتن آن‌ها توسط مواد آنتی‌آنژیوژنیک،

فعال مولکولی مثل واکنش اینتگرین و لیگاندهای اینتگرین با متالوپروتئیناز و فعال کننده پلاسمینوژن و سوبسترای آن و همچنین مهارکننده‌های سلول - ماتریکس می‌باشد (۱۱۰).

سیستم فیبرینولیتیک نیز شامل فرایندهایی است که در آن پلاسمینوژن غیرفعال تحت اثر فعال کننده‌های پلاسمینوژن به آنزیم فعال، یعنی پلاسمین تبدیل می‌شود. فعال کننده‌های پلاسمینوژن نیز سرین پروتئازهایی هستند که از نظر ایمنولوژیکی به دو نوع t-PA^۱ و UPA^۲ تقسیم می‌شوند.

t-PA تمایل خیلی زیادی به ژل فیبرین دارد و از آنجاکه t-PA توسط سلول‌های اندوتلیال ساخته و ترشح می‌شود و به‌طور مؤثر در لیز لخته فیبرین که در آن سلول‌های اندوتلیال قرار گرفته، نقش دارد.

پلاسمین تولیدشده در سطح سلول علاوه بر فعال کردن پروتئین‌های ماتریکس، pro-UPA^۳ یا Sc-PA^۴ را که توسط سلول ترشح می‌شود به U-PA یا t-PA^۵ تبدیل می‌کند. با توجه به اینکه گیرنده‌های پلاسمینوژن و اوروکیناز در سطح سلول وجود دارد، آنزیم تولیدشده در این سیستم از اثر خنثی‌کنندگی مهارکننده‌های فیزیولوژیکی در امان می‌ماند.

با توجه به مراحل بیولوژیکی آنژیوژنز یعنی

- ۱- تجزیه غشای پایه عروق توسط سلول‌های اندوتلیال،
- ۲- مهاجرت سلول‌های اندوتلیال با هضم فیبرین،
- ۳- تکثیر سلول‌های اندوتلیال و ۴- تشکیل ساختمان لوله‌ای جدید از آنجا که فعالیت فیبرینولیتیک و

با استفاده از این روش می‌توان واکنش سلول‌های مختلف نسبت به هم و یا نقش آن‌ها را در آنژیوژنز به‌تنهایی و یا همراه با هم مورد بررسی و مطالعه قرار داد.

تشکیل فیبرین نخستین پدیده‌ای است که بر اثر فعال شدن سیستم انعقادی خون در اطراف تومورهای توپر و آسیب‌های بافتی مانند زخم صورت رخ می‌دهد. در حقیقت تراوش فیبرینوژن محلول از پلاسمای به فضاهای خارج رگی و تبدیل آن به فیبرین نامحلول، سطحی را در دسترس قرار می‌دهد که در فرایند رگ‌زایی به عنوان یک ماتریکس موقتی عمل می‌کند.

در شرایط فیریولوژیکی سلول‌های اندوتلیال پوشش‌دهنده جدار داخلی رگ‌ها یا مویرگ‌ها، منشأ سلول‌های اندوتلیال در فرایند آنژیوژنز را تشکیل می‌دهند. براساس این واقعیات، در مدل پیشنهادی از فیبرینوژن خالص شده و تبدیل آن به فیبرین نامحلول به عنوان یک ماتریکس سه‌بعدی استفاده گردید. فیبرین حاصل بستر لازم را برای رشد و مهاجرت سلول‌های اندوتلیال در دسترس قرار می‌دهد.

حرکت سلول‌های اندوتلیال که به‌وسیله ماتریکس خارج سلولی (فیبرین تشکیل شده) تنظیم می‌گردد، نیازمند تشکیل کمپلکس سلول-ماتریکس با واسطه اینتگرین و بعد جدا شدن آن می‌باشد. چرخه تکراری اتصال برگشت پذیر اینتگرین / ماتریکس و به دنبال آن جدا شدن عناصر اسکلت سلولی به همراه تجزیه محدود ماتریکس باعث پیشروی حاشیه سلول متحرک می‌شود؛ بنابراین حرکت سلولی، حاصل هماهنگی کمپلکس‌های

1. tissue-plasminogen activator

2. Urokinase-plasminogen activator

3. pro-urokinase plasminogen activator

4. Single chain-Plasminogen activator

5. Two chain urokinase-Plasminogen activator

پرتولیتیک اطراف سلولی جهت پیشرفت دو مرحله به هر حال، مدل آنژیوژنز طراحی و ارایه شده در این ابتدایی رگزایی ضروری است، در این مدل تحقیق شرایط مناسبی را برای مطالعه و بررسی فعالیت فیبرینولیتیک و پرتولیتیک لازم برای رگزایی عوامل دخیل در رگزایی و مکانیسم عمل آنها توسط آپروتین (Trasylo) کنترل گردید (۱۶-۱۲) فراهم می‌آورد.

منابع

1. Risau, W. Mechanism of angiogenesis. *Nature* 1997; 386:671-674.
2. Szpaderska L.A., Merwin JR, Anderson, J.M, Kocher, O., Van Itallie, EM, and Madri, JA. Distinct patterns of angiogenesis in oral and skin wounds. *J Dert Res* 2005; 84:309-314.
3. Folkman, J. Angiogenesis in cancer, rheumatoid and other disease. *Nature Med* 1995; 1(1); 1:27-31.
4. Ellis, LM, Bauer T, Brown LF, McDonagh J. Angiogenesis and metastasis. *Eur J Cancer* 1996; 32A:2451-60.
5. Minchenko A, Bauer T, Salceda S, and Cargo J. Hypoxic stimulation of vascular endothelial growth factor expression in vivo and in vitro. *Lab Invest* 1994; 71:374-79.
6. Beck J and Damore PA. Vascular development, cellular and molecular regulation. *FASEB J* 1997; 11:365-73.
7. Boedefeld II, K.I.Bland, and M.J.Heslin. Recent insights in to angiogenesis, apoptosis, invasion and metastasis. *Ann Surg oncol* 2003; 10:839-851.
8. Cockerill GW. Angiogenesis: models and modulators, *Int Rev Cytol* 1995; 159:113-59.
9. Tufan AC, Tufan NS. The chick embryo chorioallantoic membrane as a model system for the study of tumor angiogenesis, invasion and development of anti-angiogenic agents. *Current Cancer Drug Targets* 2005; 5(4): 361-6.
10. Bussodiuo F, Mautovani A, Persico G. Molecular mechanism of blood vessel formation. *Trends Biochem Sci* 1997; 22:251-56.
11. Dvorak HF, Harvey VS, Estrella P, Brown LF, Dvorak AM. Fibrin containing gels induce angiogenesis. Implications for tumor stroma generation and wound healing. *Lab Invest* 1987; 57:673-86.
12. Peper MS, Brown PD and Giavazzi. Role of the matrix metaloproteinase and plasminogen activator-plasmin systems in angiogenesis. *Arteriosclerosis Thrombosis Vascular Biology* 2001; 21:1104.
13. Saskela O, Bonfanti R, Furie B, Wagner DD. Associated plasminogen activation: regulation and physiological function. *Ann Rev Cell Biol* 1998; 4:93-126.

14. Keristensen P, Bugge TH, Suh TT, Flick MJ. Urokinase-type plasminogen activator and its receptor: new target or anti-metastatic therapy. *Trends Pharmacol Sci* 1994; 15:25-29.
15. Kooistra T, Schrauwen Y, and Emeis J. Regulation of endothelial cell t-PA synthesis and release. *Int J Hematol* 1994; 59:233-55.
16. Collen A, Hanemaaijer R, Lupu F, Quax PHA, Lent VN, Grimbergen J. Membrane-type matrix metalloproteinase - mediated angiogenesis in a fibrin-collagen matrix. *Blood* 2003; 101(5):1810-17.