بررسی تاثیر 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 فناوری های نوین پزشکی، مرکز تحقیقات نانوتکنولوژی 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 پرده‌یآمنیون، 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 رگ‌زاییپرده‌ی آمنیون دارند. هم‌چنین پرده‌ی آمنیون بدون سلول‌های اپی‌تلیال، بستر مناسبی برای رگ‌زایی می‌باشد. خاصیت دوگانه‌یپرده‌یآمنیون در رگ‌زایی قابل استفاده در موارد کلینیکی متعددی می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: سلول های اپی تلیال، پرده ی آمنیون، رگ زایی، آزمایش حلقه ی آئورت

مقدمه

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 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 رویغشای پایه قرار گرفته‌اند. غشای پایه بر روی لایه‌ی استرومایی قرار دارد که از لایه‌های به هم فشرده‌ی کلاژنی و لایه‌ی

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۱-۲۲۴۳۹۸۴۸ نمابر:۲۲۴۳۹۸۴۷ - ۰۲۱

Email: niknejad@sbmu.ac.ir

تاریخ دریافت:۱۳۹۱/۹/۲۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۷/۲۷

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-21]

فیبروبلاستی تشکیل شده است. خارجی‌ترین لایه‌ی پرده‌ی آمنیون لایه‌ای 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 پریکارد 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 [۴،۳]. این غشا هم‌چنین دارای خواص ضد میکروبی و ضد ویروسی[۶،۵] و خاصیت ایمنی‌زایی پایین[۷] می‌باشد.

پرده‌ی آمنیون به عنوان یک داربست که رشد و مهاجرت سلول‌های اپی تلیال از منشاهای مختلف را، مانند اپی تلیوم 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 فیزیولوژیکیک 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 بیولوژیکیا مواد زیست فعال برای تحریک رشد عروق خونی جدید تعریف 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 ترومبوسپوندین-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، آنژیوژنین، اینترفرون گاما، اینترلوکین ۶، فاکتور رشد فیبروبلاستی پایه، فاکتور رشد اپیدرمی و فاکتور رشد مشتق از پلاکت را ترشح می‌کنند [۱۵،۱۴].

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[۱۸،۱۷]. در مطالعات مختلف، هر دو تاثیر رگ‌زایی و ضد رگ‌زایی پرده‌ی آمنیون مورد بررسی قرار گرفته است [۱۵،۱۳].

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 پرده‌یآمنیون می‌شود [۲۰،۱۹]. به همین منظور بررسی برون تن رگ‌زایی حلقه‌ی آئورت رت بر روی پرده‌ی آمنیون با

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-21]

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

مواد و روش‌ها

تهیه و آماده‌سازی پرده‌ی آمنیون. 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 آمنیون (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 برون‌تن. پس از شستشو، پرده‌ی آمنیون به دو قطعه تقسیم شد. یک قطعه دست‌نخورده باقی ماند و به قطعات ۲×۲ سانتی‌متری تقسیم شد. برای حذف سلول‌های اپی‌تلیال آمنیونی از روی پرده‌ی آمنیون، قطعه‌ی دیگر آن در محلول استریل آنزیمی (تریپسین-EDTA ۰/۰۳٪ (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 آمنیون 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٪ FBS (Sigma-Aldrich)، 10ng/ml bFGF(Aldrich-Sigma)و ۱٪ پنی‌سیلین- سترپتومایسین، 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 آمنیون 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 سلول‌های اپی‌تلیال آسیبی 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 جداشده با استفاده از یک محلول آنتی‌بیوتیکی۱X (Penicillin-Streptomycin) شسته شد. سپس به قطعات حلقوی با ضخامت ۲ میلی‌متر بریده شد و این قطعات بلافاصله بر روی پرده‌ی آمنیون 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-ائوزین. نمونه‌های پرده‌ی آمنیون 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 ائوزین رنگ‌آمیزی شدند و در نهایت با استفاده از میکروسکوپ نوری مورد ارزیابی قرار گرفتند.

نتایج

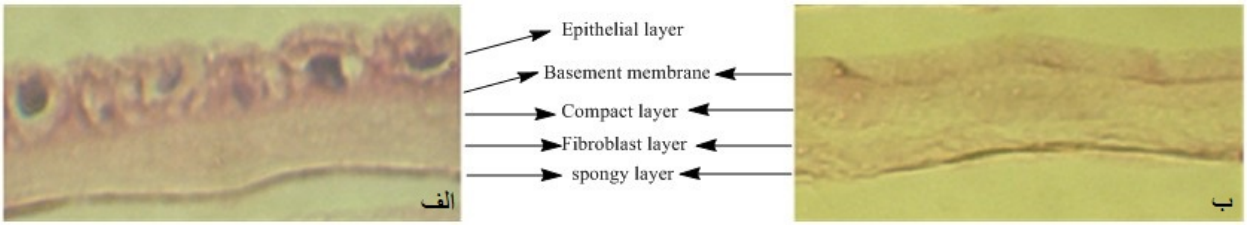
رنگ‌آمیزی پرده‌ی آمنیون در هر دو حالت فاقد سلول و دارای سلول‌های اپی‌تلیال، در زیر میکروسکوپ نوری نشان داد که در بافتی که سلول‌های آن جدا نشده بودند لایه‌ی سلول‌های اپی‌تلیال در سطح به صورت استوانه‌ایبا مکعبی با

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-21]

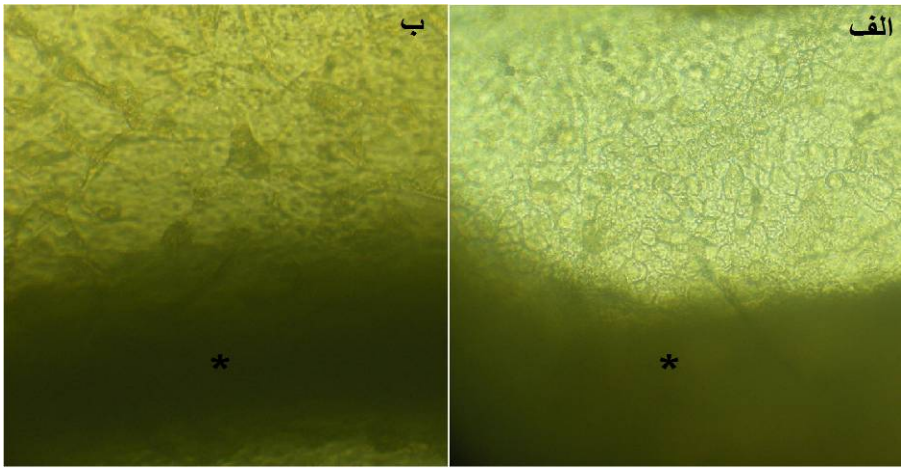
هسته‌ی گرد به همراه ۴ لایه‌ی دیگر پرده‌ی آمنیون شامل غشای پایه، استروما (که خود متشکل از لایه‌ی فشرده کلاژنی و لایه‌ی فیبرویلاستی است) و لایه‌ی اسفنجی مشاهده می‌شدند (شکل ۱، الف)، در حالی که در نمونه‌ی پرده‌ی آمنیون که سلول‌زدایی شده بود، لایه‌ی سلول‌های اپی‌تلیال دیده نمی‌شد (شکل ۱، ب).

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

در حالتی که پرده‌ی آمنیون 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 آمنیون وابسته به سلول‌های اپی‌تلیال آن می‌باشد، لذا پس از نبود هر گونه شواهد آنژیوژنز بر روی هر دو سطح پرده‌ی آمنیون دارای سلول‌های اپی‌تلیال، این سلول‌ها با هضم آنزیمی از پرده‌ی آمنیون جدا شدند و آزمایش حلقه‌ی آئورت بر روی پرده‌ی فاقد سلول‌های اپی‌تلیال آمنیونی صورت گرفت.



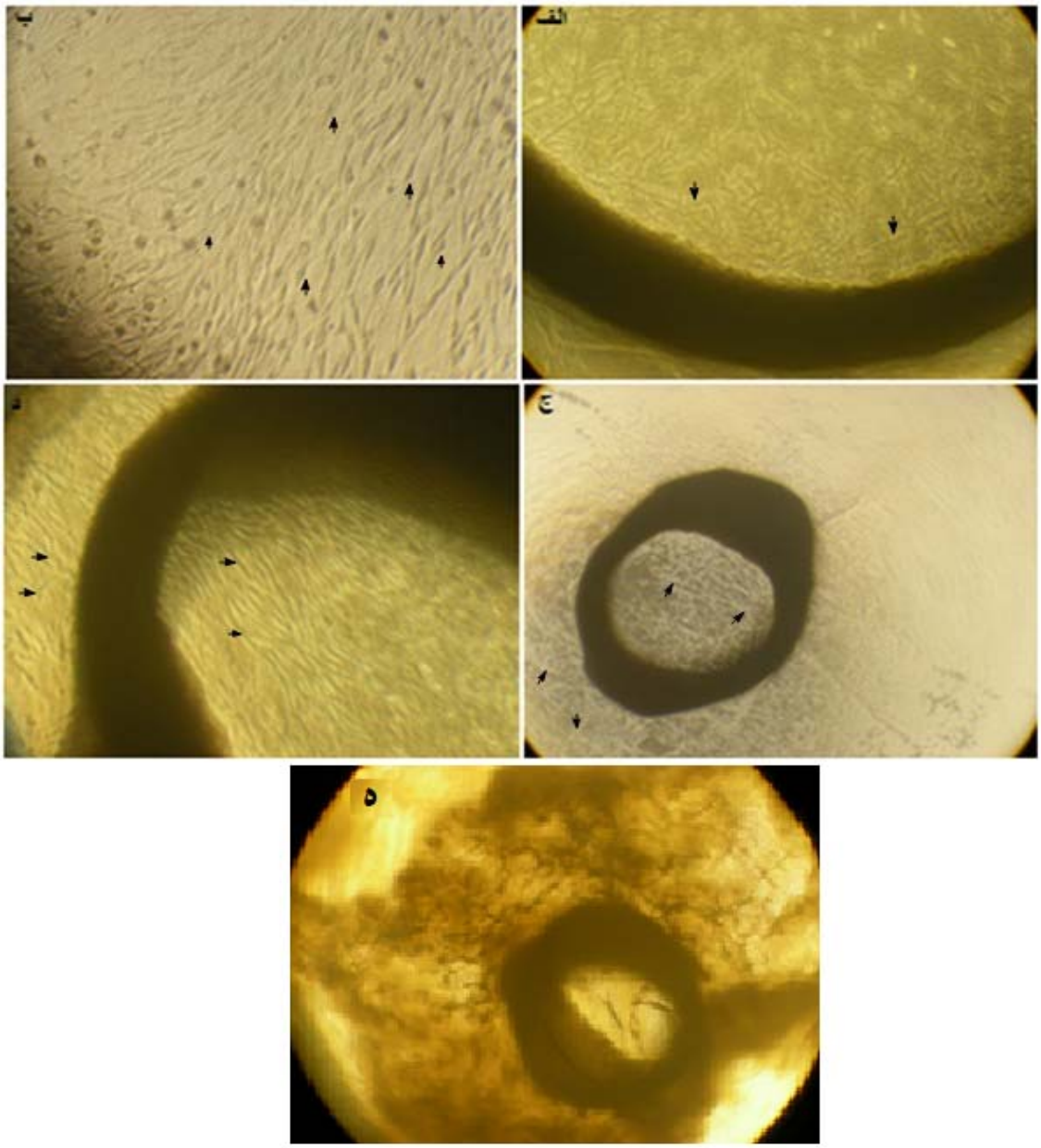
شکل ۱. رنگ آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین پرده ی آمنیون. الف: پرده ی آمنیون شامل لایه ی اپی تلیال (حاوی سلول های اپی تلیال) ، غشای پایه، و لایه ی استروما، شامل لایه های فشرده و فیبروبلاستی (حاوی سلول های آمنیونی مزانشیمال)، و لایه ی اسفنجی است. ب: پرده ی آمنیون پس از جداکردن سلول های اپی تلیال به کمک هضم آنزیمی. (بزرگنمایی ×۴۰۰)



شکل ۲: پرده ی آمنیون دارای سلول های اپی تلیال. در هر دو سطح (الف) اپی تلیال و (ب) مزانشیمال، اثری از نفوذ سلول های فیبروبلاستی و آنژیوژنز دیده نمی شود. سلول های اپی تلیالی و سلول های مزانشیمی آمنیونی در این دوسطح دیده می شوند. (*حلقه ی آئورت، بزرگنمایی ×200)

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-21]

پس از گذشت ۲ روز از قرار دادن حلقه‌ی آئورت بر روی پرده‌ی آمنیون فاقد سلول‌های اپی‌تلیال، در هر دو سطح اپی‌تلیال و مزانشیمال، نفوذ سلول‌های فیبروبلاستی دوکی شکل به پرده‌ی آمنیون دیده می‌شد که به تدریج بیش‌تر شدند و جهت‌گیری خاص پیدا کردند (به ترتیب شکل ۳، الف و ب). در روز پنجم تشکیل مورفولوژی‌های مویرگ مانند مشهود بود و در روز هفتم شبه مویرگ‌های تشکیل شده به خوبی قابل رویت بودند که هم در داخل و هم در خارج حلقه آئورت در هر دو سطح اپی‌تلیالی و مزانشیمالی دیده می‌شدند (به ترتیب شکل ۳، ج و د). از روز هشتم به بعد دیگر وضعیت شبه مویرگ‌های تشکیل شده قابل بررسی نبود زیرا پرده‌ی آمنیون به دور حلقه‌ی آئورت جمع می‌شد (شکل ۳، ه). این حالت هم در سطح اپی‌تلیال و هم در سطح مزانشیمال دیده می‌شد.



شکل ۳: مراحل آنژیوژنز حلقه ی آئورت رت بر روی پرده ی آمنیون فاقد سلول های اپی تلیال آمنیونی. الف: نفوذ سلول های فیبروبلاستی در روز دوم به پرده ی آمنیون در سطح اپی تلیال فاقد سلول های اپی تلیال آمنیونی. ب: نفوذ و جهت گیری همسو و مشخص سلول های فیبروبلاستی بر روی پرده ی آمنیون فاقد سلول های اپی تلیال آمنیونی در سطح مزانشیمی. ج: تشکیل شبه مویرگ های مشخص در روز هفتم در داخل و بیرون حلقه ی آئورت بر روی سطح اپی تلیال. 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.

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-21]

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 تدریجنفوذ سلول‌های فیبروبلاستی 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 [۲۴,۲۳].

تاکنون در هیچ مطالعه‌ای از پرده‌ی آمنیون 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 آمنیون 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 آمنیون 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 آمنیون 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 فیبروبلاستی و شبیه اندوتلیال در پرده‌ی آمنیون 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 تمایزیافته تبدیل شدند (فاز رشد). ولی همان‌طور که در شکل ۴ نشان داده شده است، پس از ۷ روز به دلیل چسبیدن پرده‌ی آمنیون 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 آمنیون دارای سلول‌های اپی‌تلیال در هیچ کدام از سطوح این مراحل دیده نشدند.

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

نبود رگ‌زایی در حضور سلول‌های اپی‌تلیال آمنیونی می‌تواند با ترشح پروتئین‌های ضد رگ‌زایی مانند ترومبوسپوندین 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 آمنیون 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 آمنیون 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 آمنیون دارای سلول‌های اپی‌تلیال مورد استفاده قرار گیرد[۲۵]. گزارش شده است که کدورت حاصل از رگ‌زایی جدید در پیوندهای پرده‌ی

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-21]

آمنیونبه عنوان قرنیه زمانی که سلول‌های اپی‌تلیال حضور داشته باشند، کاهش می‌یابد[۲۶].

القای رگ‌زایی به وسیله‌ی سمت استرومای پرده‌ی آمنیون می‌تواند 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 آمنیونی ترشح می‌شوند، توضیح داده شود [۲۷]. هم‌چنین وجود مارکرهای سطحی سلول‌های بنیادی شامل Oct3/4، SSEA، Nanog و Sox2 در سلول‌های مزانشیمی پرده‌ی آمنیون نشان می‌دهد 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 هپاتوسیتی، که به وسیله‌ی پرده‌ی آمنیون ترشح می‌شوند [۱]، سلول‌های مزانشیمی می‌توانند به سلول‌های اندوتلیال تمایزیابند[۲۸]. بنابراین، علاوه بر ترشح بسیاری از فاکتورهای رگ‌زایی، سمت استرومایی پرده‌ی آمنیون می‌تواند رگ‌زایی را از طریقتمایز سلول‌های مزانشیمی خود به سلول‌های اندوتلیال، افزایش دهد. هم‌چنین در راستای نتایج ما تاثیر رگ‌زایی پرده‌ی آمنیون بعد از کاشت آن در شکم گزارش شده است [۲۹].

رگ‌زایی به معنی تشکیل عروق جدید از سیستم عروقی موجود می‌باشد که می‌تواند هم تاثیرات خوب و هم مضر داشته باشد. این پدیده در تومورها باعث ایجاد متاستاز و تهاجم سرطان به دیگر ارگان‌ها می‌شود، در حالی که رگ‌زایی در پیوند بافت، سوختگی و ایسکمی می‌تواند روند بهبود را تسهیل کند. بنابراین هر دو تاثیر رگ‌زایی و ضد آن در شرایط مختلف سودمند هستند و دانستن این موضوع که پرده‌ی‌آمنیون هر دوتاثیر را دارد می‌تواند آن را مورد مناسبی برای استفاده در طیف وسیعی ار کاربردهای کلینیکی قرار دهد.

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

در این مطالعه نشان داده شد که هنگامی که سلول‌های اپی‌تلیال آمنیونی از پرده‌ی آمنیون جدا می‌شوند این بافت در هر دو سطح اپی‌تلیالی 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 دوسطح پرده‌ی آمنیون می‌شود که بیانگر این موضوع است که سلول‌های اپی‌تلیال آمنیونی تاثیرات ضد رگ‌زایی خود را از طریق ترشح مواد محلول اعمال می‌کنند. از این خاصیت دوگانه‌ی پرده‌ی آمنیون هم می‌توان در مواردی که رگ‌زایی باید مهار گردد (مانند متاستاز سلول‌های سرطانی) و هم در تسهیل روند بهبود زخم و ایسکمی‌ها استفاده کرد. مطالعات بیش‌تری به‌خصوص 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 می‌آید. این مطالعه با حمایت مالی مرکز تحقیقات نانوتکنولوژی پزشکی و مهندسی بافت دانشگاه علوم پزشکی

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-21]

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.

[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. Irn 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.

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-21]

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, ShahidBeheshti 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 transplantationas 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

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-21]

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