

Inducing and inhibitory effects of amniotic membrane on angiogenesis in an animal model

Ghodsieh Paeini Vayghan¹,

Habibollah Peirovi²,

Hassan Niknejad³

¹ Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

² Department of Surgery, Nanomedicine and Tissue Engineering Research Center, Faculty of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

³ Department of Pharmacology, Nanomedicine and Tissue Engineering Research Center, Faculty of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

(Received December 6, 2012 ; Accepted February 23, 2013)

Abstract

Background and purpose: Amniotic membrane (AM), the nearest layer of placenta to the fetus, has two surfaces of epithelial and mesenchymal. The AM contains both angiogenic and anti-angiogenic factors which would result in inducing or inhibition of angiogenesis. Also, there are controversial reports on angiogenesis of the AM. We hypothesized here that angiogenic or anti-angiogenic characteristic of the AM could be depending on the surface. So, the aim of this study was to evaluate surface-dependent angiogenesis of the AM.

Materials and methods: Human placenta was obtained shortly after elective Cesarean. Amniotic membrane was separated from the placenta by peeling. The AM was transplanted by dorsal skinfold chamber. Microinital microscopy was performed one week after transplantation of the AM. Analysis of data was performed using one-way analysis and post-Tukey test in ANOVA.

Results: Mesenchymal surface of the AM increased the number of vessel sprouts and their lengths in comparison to control group. Epithelial surface of the AM notably decreased the angiogenesis. Although the number of branch points did not decrease in comparison to control group, their lengths decreased significantly compared with control and epithelial side up groups.

Conclusion: These results demonstrate that the AM surface-dependently promotes or inhibits angiogenesis, probably owing to possessing angiogenic or anti-angiogenic factors. Inducing or inhibition of angiogenesis by the AM can be a beneficial therapeutic approach in ischemic diseases or cancer, respectively.

Keywords: Amniotic membrane, Epithelial surface, Mesenchymal surface, Angiogenesis.

اثرات القایی و مهاري پرده آميوني بر آنژیوژنز در يك مدل حيواني

قدسيه پاييني وايقان^۱

حيب الله پيروي^۲

حسن نيک‌نژاد^۳

چکیده

سابقه و هدف: پرده آمیون نزدیک‌ترین لایه از بافت‌های خارج رویانی به جنین است که دارای دو سطح اپیتلیال و مزانشیمال می‌باشد. پرده آمیون به خاطر داشتن فاکتورهای آنتی آنژیوژنیک و آنژیوژنیک می‌تواند سبب مهار و یا تحریک آنژیوژنز شود. در این راستا، نتایج ضد و نقیضی در مورد آنژیوژنز پرده آمیون گزارش شده است. هدف از این تحقیق، بررسی آنژیوژنز پرده آمیون و احتمال وابسته به سطح بودن آن می‌باشد.

مواد و روش‌ها: پرده آمیون با روش dorsal skinfold chamber به موش صحرایی پیوند زده شد. تعداد جوانه‌های رگی و رشد طولی مویرگ‌ها پس از ۷ روز با روش میکروسکوپی در موجود زنده (microinital microscopy) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل در بین گروه‌ها با روش ANOVA مقایسه شد (Tukey Post-Test).

یافته‌ها: هنگامی که سطح مزانشیمال در مجاورت بافت قرار داشت، تعداد جوانه‌های رگی و رشد طولی رگ‌ها نسبت به بافت کنترل زیاد شد. مجاورت سطح اپیتلیال اثر مهاري مشخصی در آنژیوژنز نشان داد. تعداد جوانه‌های رگی در مقایسه با بافت کنترل تفاوت زیادی نداشت، اما میزان رشد طولی رگ‌ها در مقایسه با گروه کنترل و گروهی که سطح مزانشیمال در مجاورت بافت حیوانی قرار داشت، کاهش یافته بود.

استنتاج: پرده آمیون در دو سمت اپیتلیال و مزانشیمال، خواص آنژیوژنیک وابسته به سطح از خود نشان می‌دهد که می‌تواند به خاطر داشتن فاکتورها و مارک‌های متفاوت باشد. تحریک و مهار آنژیوژنز توسط پرده آمیون را می‌توان به عنوان دستاوردی در درمان بیماری‌های ایسکمیک یا سرطانی به کار گرفت.

واژه های کلیدی: آمیون، سطح اپی تلیال، سطح مزانشیمال، آنژیوژنز

مقدمه

پری کاردیوم و جلوگیری از چسبندگی جراحی استفاده شده است (۱). آمیون شامل یک لایه از سلول‌های اپیتلیالی است که به طور محکمی به غشای پایه چسبیده‌اند (۲،۳). ضخامت آمیون بین ۰/۲ mm تا ۰/۵ mm گزارش شده است. این پرده رگ‌های خونی ندارد

در سال ۱۹۱۰ برای اولین بار از پرده آمیون برای پیوند پوست استفاده شد. پس از آن گزارشات متعددی از استفاده از پرده آمیون برای نوار زخم بندی بیولوژیکی در سوختگی‌ها ارائه شده است. همچنین، این ساختار چند بعدی برای جراحی بازسازی واژن، بستن

E-mail: niknejad@sbm.ac.ir

مؤلف مسئول: حسن نيک‌نژاد - تهران: ولنجک، بیمارستان طالقانی، مرکز تحقیقات نانو تکنولوژی پزشکی و مهندسی بافت

۱. دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

۲. گروه جراحی عمومی، مرکز تحقیقات نانو تکنولوژی پزشکی و مهندسی بافت، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

۳. گروه فارماکولوژی، مرکز تحقیقات نانو تکنولوژی پزشکی و مهندسی بافت، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۹/۱۶ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۱/۱۱/۲۴ تاریخ تصویب: ۱۳۹۱/۱۲/۵

و منبع خونی مستقیمی هم ندارد. آمینون از سمت جنین به طرف خارج شامل ۵ لایه می‌باشد: ۱. اپیتلیال ۲. غشای پایه ۳. لایه فشرده ۴. لایه فیروبلستی ۵. لایه اسفنجی (۱، ۴). مطالعات پرده آمینون انسانی که در 80°C - برای ۱ ماه نگهداری شده بود؛ حضور فاکتورهای EGF, TGF- β 1, KGF, HGF, bFGF را نشان داد. یافتن سطح بالاتری از فاکتورهای رشد مختلف در پرده آمنیوتیک با اپیتلیوم نسبت به پرده آمنیوتیک بدون اپیتلیوم نشان می‌دهد که اپیتلیوم می‌تواند منشأ این فاکتورهای رشد باشد (۱). سلول‌های آمنیوتیک انسانی HLA-A, B و C یا آنتی ژن‌های DR از β_2 میکروگلوبین را در سطح خود بیان نمی‌کنند (۵، ۶)، به طوری که پاسخ‌های ایمونولوژیک در پیوند قابل چشم پوشی هستند. نشان داده شده که هیچ داوطلبی علایم پس زدن حاد را پس از پیوند پرده آمینون انسانی نشان نداده و هیچ یک از داوطلبان آنتی بادی مخالف آنتی ژن HIL-A را نساخته‌اند (۷). در بررسی فاکتورهای آنژیوژنیک، سطوح بالایی از آنژیوژنین، انکوژن وابسته به رشد (GRO)، اینترلوکین ۶ (IL-6)، اینترلوکین ۸ (IL-8)، مهارکننده متالوپروتئیناز بافتی ۱ و ۲ (TIMP-1 & 2) و پروتئین MCP-1 از پرده آمنیوتیک ترشح شده است (۸، ۹).

آنژیوژنز شکل گیری رگ‌های جدید به وسیله جوانه زدن مویرگ‌ها از رگ‌های قبلی است (۱۰). فولکمن در حدود ۳۰ سال قبل آنژیوژنز را برای رشد تومور و متاستاز ضروری می‌دانست. آنژیوژنز نه تنها در رشد تومور بلکه در فرآیندهای فیزیولوژیک نرمال مانند رشد، باروری و روند بهبودی نقش مهمی ایفا می‌کند (۱۱).

شکل گیری رگ‌های جدید طی چند مرحله سریالی رخ می‌دهد. این مراحل به این ترتیب اتفاق می‌افتد: عروق مویرگی متسع شده و نفوذ پذیری رگ در ناحیه بین اندوتلیالی آسان تر می‌شود (۱۲). سپس سلول‌های اندوتلیوم به وسیله فاکتورهای آنژیوژنیک مانند فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (VEGF) تحریک

می‌شوند (۱۳). تخریب پروتئولیتیک غشای پایه رخ می‌دهد (۱۴) که این تخریب با آزاد شدن ماتریکس متالوپروتئیناز در پاسخ به سیگنال‌های خارجی مانند سیتوکین‌ها و فاکتورهای رشد ایجاد می‌شود. بعد از آن مهاجرت و تکثیر سلول‌های اندوتلیوم در ماتریکس خارج سلولی با تحریک فاکتورهای رشد انجام می‌شود (۱۵). شکل گیری و بلوغ لوله های مویرگی جدید با تمایز سلول‌های عضلات صاف و پریشیت‌ها (۱۶) و در نهایت بستر رگی با فرایند های آپوپتوتیک ایجاد می‌شود (۱۷).

از طرفی نشان داده شده است که پرده آمینون دارای فاکتورهای آنتی آنژیوژنیک می‌باشد. این فاکتورها مانند اینترلوکین ۱۰، اینترلوکین ۶، مهارکننده متالوپروتئیناز بافتی ۳ و ۴ (TIMP 3-4)، کلاژن XVIII و ترومبوسپاندین ۱ (TSP) در پرده آمینون وجود دارند (۹). مطالعات انجام شده به صورت تجربی و کلینیکی نیز، داری نتایج متناقضی در زمینه اثرات آنژیوژنیک و آنتی آنژیوژنیک پرده آمینون می‌باشند (۸، ۹). از آنجایی که بیش تر فاکتورهای آنتی آنژیوژنیک از سلول‌های اپی تلیال پرده آمینون ترشح می‌شوند و از طرفی سلول‌های مزانشیمال در سمت مخالف دارای سطح بالایی از فاکتورهای تحریک کننده آنژیوژنز می‌باشند، بنابراین به نظر می‌رسد تناقض در زمینه آنژیوژنز پرده آمینون مربوط به سطح اپی تلیال یا مزانشیمال آن می‌باشد. در این راستا، هدف از این مطالعه بررسی اثر آنژیوژنیک و یا آنتی آنژیوژنیک پرده آمینون و وابسته به سطح بودن آنژیوژنز می‌باشد.

مواد و روش‌ها

این تحقیق یک مطالعه تجربی آزمایشگاهی می‌باشد که در آزمایشگاه مرکز تحقیقات نانوتکنولوژی پزشکی و مهندسی بافت دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی صورت گرفته است.

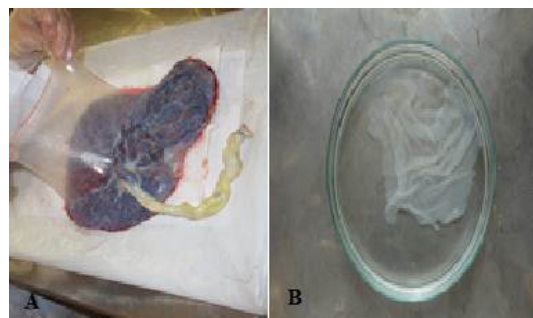
فیکس شدند. پس از آن نمونه‌ها در پارافین جاسازی شدند و به قطعات ۴ میکرومتری برش زده شدند. برای رنگ آمیزی از هماتوکسیلین و ائوزین (H&E) استفاده شد. پس از رنگ آمیزی نمونه‌ها با میکروسکوپ معکوس مجهز به دوربین مورد بررسی قرار گرفتند. برای بررسی آنژیوژنز، روش‌های مختلفی وجود دارد که با توجه به هدف تحقیق انتخاب می‌شود. در این جا مدل dorsal skinfold chamber انتخاب شد (۱۸).

در این تحقیق موش‌های صحرایی نر با وزن ۲۵۰-۲۲۰ گرم در شرایط ایزوله انتخاب شدند (n=6) برای هر گروه). این حیوانات در قفس استاندارد با غذای مخصوص و آب نگهداری می‌شدند. کار با حیوان به تایید کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی رسید. موش‌ها برای بیهوشی استنشاقی تحت تأثیر هالوتان قرار می‌گرفتند. سپس با تزریق داخل صفاقی کتامین (۷۵mg/kg) و زایلازین ۲ درصد (۱۵mg/kg) بیهوش شدند. سطح پستی موش تراشیده شده و با الکل و بتادین استریل شد. از آنجایی که آنژیوژنز یک فرایند فعال و پویا است، مدل dorsal skinfold chamber می‌تواند امکان مشاهده درون تن را با رزولوشن بالا و به صورت سه بعدی در یک دوره زمانی فراهم کند. علاوه بر این، بعد از اتمام آزمایش می‌توان بافت نمونه را به آسانی برداشت. بدین منظور، سطح پستی موش بین دو قطعه تیتانیومی به صورت ساندویچی قرار گرفت. سپس با کمک پیچ‌های ۲×۱۰ mm به یکدیگر بسته شد. dorsal skinfold chamber دارای ابعادی به اندازه ۳۶ mm×۴۲ mm می‌باشد. جنس تیتانیوم آن به آسانی استریل شده و در شرایط درون تن هیچ گونه التهاب و عفونت از خود نشان نمی‌دهد.

یک لایه از پوست سطح پستی با استفاده از اسکالپل برداشته شد (تصویر شماره ۲-A). سپس سطح بافت با آب مقطر شسته شد. پرده آمنیون که در محلول پنی‌سیلین - استرپتومایسین نگه داشته شد بود؛ چند بار با PBS شسته شد. این پرده که در قطعه‌ای به قطر ۵ mm

بافت جفت (Placenta) و ضمام آن از سزارین‌های انتخابی (Elective) تهیه شد. این بافت‌ها از مادرانی که در هفته ۳۸-۳۹ بارداری بودند؛ از بیمارستان عرفان و آیت الله طالقانی تهران تهیه گردید. با وجود آن که بافت جفت دور ریخته می‌شود، رضایت والدین برای استفاده از آن کسب شد. هم چنین آزمایشات سرولوژیکی برای بیماری‌های سفلیس، HIV و هپاتیت B و C انجام شده بود.

بافت جفت در ظرف استریل و در بافر فسفات سالین (PBS) و در دمای ۴°C به آزمایشگاه منتقل می‌شد. پرده آمنیون به روش peeling از کوریون جدا شد. پرده آمنیون برای پاک کردن لکه‌های خونی در محلول PBS سرد شستشو داده شد؛ سپس پرده به قطعات کوچک تر تقسیم شد. کلیه مراحل جداسازی در شرایط استریل و در زیر هود لامینار انجام گرفت. پرده آمنیون پس از جداسازی، روی فیلتر استات سلولز که قبلاً با اشعه uv استریل شده بود؛ قرار گرفت و با دقت به ابعاد ۵ میلی متری بریده شد. در نیمی از نمونه‌ها سطح اپیتلیال پرده آمنیون به سمت بالا قرار داشت و در نیم دیگر سطح مزانشیمال به سمت بالا قرار گرفت. سپس نمونه‌های تهیه شده در محلول پنی‌سیلین - استرپتومایسین قرار داده شد (تصویر شماره ۱).



تصویر شماره ۱: A: جفت و ضمام آن B: پرده آمنیون بعد از مراحل جداسازی و شستشو

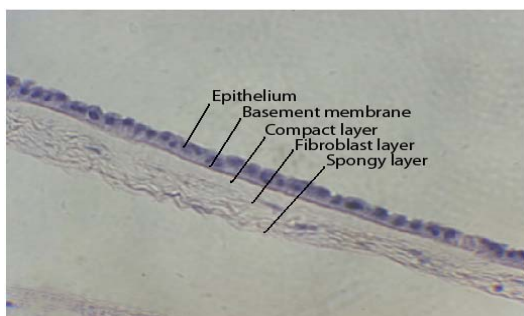
هیستولوژی

برای مطالعات هیستولوژیکی نمونه‌های بافتی در فرمالدئید ۴ درصد در بافر cacodylate برای ۷۲ ساعت

رگ در ناحیه‌ای که بافت پیوند شده بود انتخاب و تعداد شاخه‌های آن که در طول آنژیوژنز ایجاد شده بود، شمارش گردید. پس از آن طول جوانه‌های رگی اندازه‌گیری شد. متغیرهای مورد بررسی شامل میزان جوانه زنی مویرگ‌ها و طول رگ‌ها به صورت $\text{mean} \pm \text{SEM}$ بیان شدند. گروه‌های مورد مطالعه شامل گروه کنترل و گروه اپی تلیال بالا و گروه مزانشیمال بالا بودند. نتایج حاصل در بین گروه‌ها با روش ANOVA به وسیله نرم افزار graphpad prism version 3.02 مقایسه شد (Tukey Post-Test). تفاوت بین نمونه‌ها در دو سطح $p < 0.05$ و $p < 0.01$ بررسی گردید.

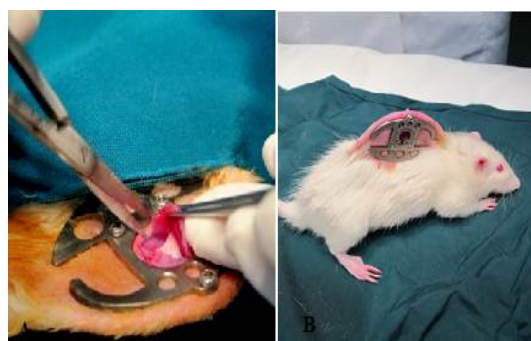
یافته‌ها

رنگ آمیزی هماتوکسیلین-انئوزین در نمونه‌های پرده آمنیون تازه تهیه شده نشان داد که پرده آمنیون در حالت طبیعی از ۵ لایه تشکیل شده است (تصویر شماره ۳). لایه اپی تلیوم که در آن سلول‌های مکعبی شکل اپی تلیال آمنیون با پیوستگی کامل، روی لایه غشاء پایه قرار دارند. در زیر غشاء پایه، لایه متراکم (compact layer) با ساختار شبکه‌ای رتیکولار قرار دارد که لایه زیرین آن لایه فیبروبلاستی (fibroblastic layer) است که در آن سلول‌های فیبروبلاستی در درون شبکه رتیکولار با تراکم کمتر نسبت به لایه متراکم، قرار دارند. لایه اسفنجی (spongy layer) داخلی‌ترین لایه است که در مقاطع بافت شناسی پرده آمنیون دیده می‌شود.



تصویر شماره ۳: ساختار ۵ لایه ای پرده آمنیون که شامل اپیتلیوم، غشای پایه لایه فشرده، لایه فیبروبلاست، لایه اسفنجی می‌باشد.

بریده شده، به دو صورت سمت اپی تلیال بالا (Epithelial side up) و سمت مزانشیمال بالا (mesenchymal side up) در مرکز حلقه chamber قرار گرفت. سپس یک اسلاید شیشه‌ای روی سطح بافت قرار گرفت. حلقه chamber روی آن فیکس شد (تصویر شماره ۲-B). حیوانات یک ساعت بعد از به هوش آمدن، به قفس‌های جداگانه منتقل می‌شدند.



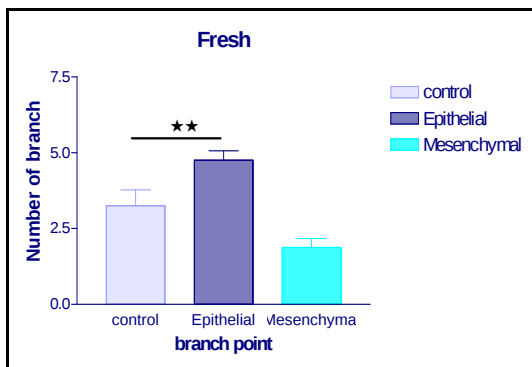
تصویر شماره ۲: A: برداشتن یک لایه از بافت B: پیوند dorsal skinfold chamber و بافت

پس از هفت روز، برای مشاهده میکروسکوپی، حیوان تحت تأثیر هالوتان قرار گرفت. سپس با تزریق داخل صفاقی کتامین (۷۵ mg/kg) و زایلین ۲ درصد (۱۵ mg/kg) بیهوش شد. تمام نمونه‌های دچار عفونت یا هرگونه التهاب در ناحیه پیوند حذف شدند. موش داخل هولدر قرار گرفته و dorsal skinfold chamber فیکس شد. پس از آن هولدر را زیر میکروسکوپ معکوس قرار داده و محل کاشت بافت و نحوه ایجاد رگ‌ها و آنژیوژنز مشاهده گردید. تصاویر با دوربین نیکون که به میکروسکوپ متصل بود، گرفته و برای آنالیز به کامپیوتر منتقل شد.

از نرم افزار (National Institutes of Health, Image J (Bethesda, Maryland برای آنالیز تصاویری که توسط میکروسکوپ گرفته شد، استفاده شد. تصاویر در میکروسکوپ با عدسی چشمی 4X گرفته شد، سپس در نرم افزار اجرا گردید. با توجه به این که هر سانتی‌متر روی تصویر برابر با $12 \mu\text{m}$ در اندازه واقعی است؛ نرم افزار برای اندازه‌گیری تراز شد. برای اندازه‌گیری، یک



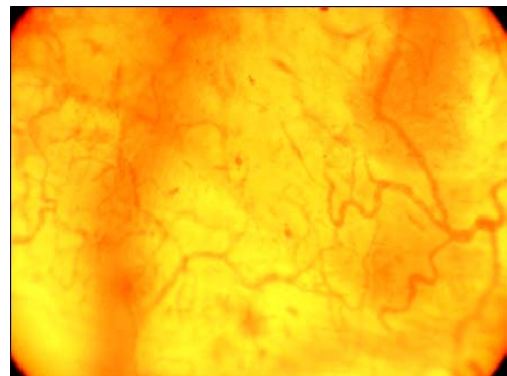
تصویر شماره ۵: مشاهده حدود بافت و جوانه های عروقی با بزرگ نمایی $40\times$. سطح اپی تلیال بالا و سطح مزانشیمال در معرض عروق قرار دارد. ستاره سفید نشانگر آنژیوژنز در زیر بافت پیوند شده و ستاره سیاه آنژیوژنز کمتر در منطقه بیرون از محل پیوند را نشان می دهد. فلش ها محدوده بافت پیوندی را مشخص می کنند.



نمودار شماره ۱: تعداد جوانه های رگی در بافت حیوانی در گروه کنترل و بعد از پیوند پرده آمنیون در دو سطح اپیتلیال بالا و مزانشیمال بالا بررسی شدند. در پیوندی که سطح اپی تلیال پرده آمنیون بالا قرار گرفته بود باعث افزایش تعداد جوانه های رگی شده است (0.31 ± 0.75 عدد) ($p < 0.01$).

هنگامی که سطح اپیتلیال در مجاورت بافت حیوانی بود، اثر مهار برای آنژیوژنز نشان داد و میزان رگ های که در زیر بافت بودند نسبت به بافت اطراف کاهش قابل ملاحظه ای از خود نشان داد (تصویر شماره ۶). در مقایسه با نمونه کنترل نیز در میزان جوانه زنی رگ ها کاهش دیده شد؛ هرچند این اختلاف معنی دار نبود (0.29 ± 1.87 عدد).

برای بررسی آنژیوژنز به صورت درون تن از مدل dorsal skinfold chamber استفاده شد. امروزه این مدل برای مشاهده و آزمایش انواع مختلفی از بافت های پیوندی و ترکیبات مختلف که در فرایند آنژیوژنز نقش دارند، در طول یک دوره زمانی به کار می رود. در این تحقیق پرده آمنیون به عنوان یک ساختار زیستی با خواص متفاوت مورد بررسی قرار گرفت. در نمونه کنترل، هیچ بافتی پیوند نشد تا میزان آنژیوژنز طبیعی بافت اندازه گیری شود. نتایج هیستولوژی، هیچ گونه عفونت، فیروز و اسکار در بافت ها را نشان نداد. برای بررسی تأثیر پرده آمنیون بر میزان آنژیوژنز و تفاوت دو سطح اپیتلیال و مزانشیمال، این سطوح با یکدیگر و با بافت کنترل مورد مقایسه قرار گرفتند ($n=6$). میانگین بافت کنترل در بررسی تعداد جوانه ها 0.52 ± 3.25 بود (تصویر شماره ۴).



تصویر شماره ۴: نمونه ای از بافت کنترل پس از ۷ روز، که در آن هیچ گونه بافتی پیوند نشده است

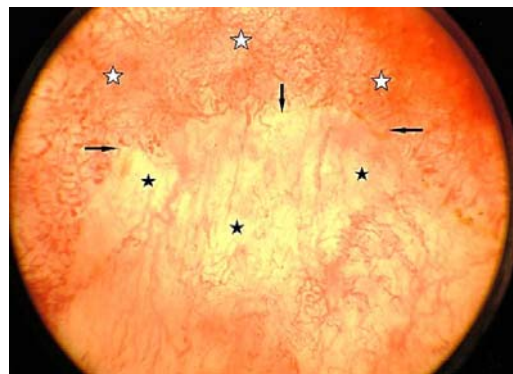
هنگامی که پرده آمنیون با سطح مزانشیمال در مجاورت بافت حیوانی پیوند داده شد، میزان جوانه زنی رگ ها در مقایسه با سطح اپی تلیال و بافت کنترل بیشتر شد (تصویر شماره ۵) (0.31 ± 0.75 عدد). این اختلاف در مقایسه با سطح اپی تلیال معنی دار بود ($p < 0.05$) (نمودار شماره ۱).

طولی کم‌تری داشت ($18/85 \pm 1/98$ میکرومتر). ($p < 0/01$) ** و
($p < 0/05$) *).

بحث

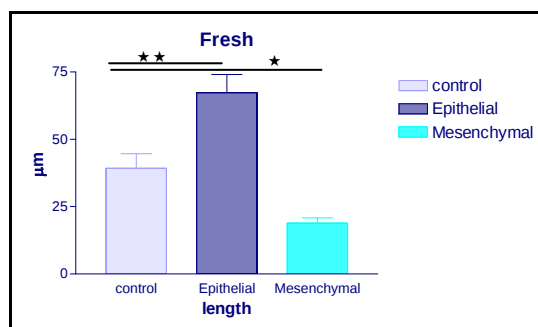
در این پژوهش برای بررسی آنژیوژنز در شرایط درون تن از مدل dorsal skinfold chamber استفاده شد. این مدل امکان مشاهده و بررسی آنژیوژنز را در طی دوره‌های زمانی متفاوت (در این پژوهش دوره زمانی ۷ روزه) را فراهم می‌کند. برای بررسی آنژیوژنز دو فاکتور تعداد جوانه‌های رگی و میزان رشد طولی آن‌ها مورد مطالعه قرار گرفت. پس از پیوند بافت و طی دوره زمانی ۷ روزه هیچ‌گونه التهاب و عفونت در محل پیوند دیده نشد. پرده آمنیون با داشتن فاکتورهایی مانند اینترلوکین ۱۰، اینترلوکین ۶، مهارکننده‌های بافتی متالوپروتئیناز (TIMPs)، کلاژن XVIII و ترومبوسپاندین ۱ (TSP) سبب کاهش التهاب می‌شود (۸). هم‌چنین در این پژوهش علائمی از فیروز و رد پیوند مشاهده نشد. این نتایج می‌تواند همان‌گونه که در سایر تحقیقات بیان شده است به دلیل عدم بیان ژن‌ها و پروتئین‌های HLA-ABC (MHC class I) و عدم بیان پروتئین HLA-DR (MHC class II) در سلول‌های پرده آمنیون باشد. علاوه بر این، تحقیقات دیگری مقاومت نسبی در برابر رد پیوند (حتی در پیوندهای آلورژیک) را به علت وجود فاکتورهای مهارکننده سیستم ایمنی (immunosuppressive) مانند پروتئین CD59 و HLA-G در پرده آمنیون می‌دانند (۲۰). از این رو پرده آمنیون به خاطر مزایای متعددی مانند نداشتن آنتی ژن که مشکل رد پیوند را برطرف می‌کند و خواص دیگری مانند اثرات ضد التهابی و ضد فیبروزی گزینه مناسبی برای پیوند می‌باشد.

همان‌گونه که در بخش نتایج بیان شد، در بافت پرده آمنیون هنگامی که سطح مزانشیمال به سمت بالا بود و سطح اپیتلیال در مجاورت بافت قرار داشت، میزان آنژیوژنز به صورت محسوسی کم‌تر از هنگامی بود که



تصویر شماره ۶: مشاهده حدود بافت و جوانه‌های عروقی با بزرگمایی ۴۰ X. سطح مزانشیمال بالا و سطح اپی تلیال در مجاورت عروق قرار دارد. ستاره سفید نشانگر آنژیوژنز و ستاره سیاه عدم وجود آنژیوژنز را نشان می‌دهد. فلش‌ها محدوده بافت پیوندی را مشخص می‌کنند.

در اندازه‌گیری طول رگ‌ها در مجاورت سطح مزانشیمال بعد از یک دوره ۷ روزه افزایش معنی داری با نمونه کنترل وجود داشت. میانگین رشد در گروه اپیتلیال بالا $6/81 \pm 67/28$ میکرومتر بود. این اختلاف با بافت کنترل که $39/3 \pm 5/46$ میکرومتر بود، معنی‌دار بود ($p < 0/01$). هم‌چنین این اختلاف با گروه مزانشیمال بالا که میانگین $18/85 \pm 1/98$ میکرومتر داشت؛ معنی‌دار بود ($p < 0/05$). اختلاف بالای سطح اپیتلیال و مزانشیمال ($p < 0/01$) در نمودار شماره ۲ نشان داده شده است.



نمودار شماره ۲: میزان رشد طولی رگ‌ها در بافت حیوانی در گروه کنترل و بعد از پیوند پرده آمنیون در دو گروه اپیتلیال بالا و مزانشیمال بالا بررسی شدند. در پیوندی که سطح اپی تلیال بالا قرار گرفته بود میزان رشد طولی رگ‌ها بیشتر از دو گروه دیگر بوده است ($6/81 \pm 67/28$ میکرومتر). در پیوندی که سطح مزانشیمال بالا قرار گرفته بود نیز رگ‌ها از دو گروه کنترل و مزانشیمال رشد

(FGF)، فاکتور رشد TGF- β ، فاکتور رشد اپیدرمی (EGF)، فاکتور رشد کراتینوسیت و فاکتور رشد هپاتوسیت در سطح مزانشیمال مطرح شده است. هم‌چنین وجود مارکرهای سطحی سلول‌های بنیادی Oct 3/4، SSEA-4، Nanog و Sox-2 در سلول‌های مزانشیمال پرده آمنیون به اثبات رسیده است (۲۳، ۲۴). بنابراین با وجود این مارکرها و فاکتورهای آنژیوژنیک، سلول‌های مزانشیمال توانایی تمایز یافتن به سلول‌های اندوتلیالی را دارند. بنابراین، سلول‌های مزانشیمال پرده آمنیون با تمایز به سلول‌های اندوتلیال عروقی می‌توانند باعث افزایش آنژیوژنز شوند (۲۵، ۲۶).

در مجموع می‌توان گفت که بافت پرده آمنیون دارای خاصیت آنتی آنژیوژنزی و آنژیوژنزی می‌باشد. به طوری که سطح اپیتلیال آن اثر آنتی آنژیوژنزی و سطح مزانشیمال آن دارای خواص آنژیوژنیک می‌باشد. با توجه به نتایج این تحقیق و خواص دیگر پرده آمنیون، از این بافت می‌توان در مواردی که نیاز به تحریک آنژیوژنز می‌باشد مانند موارد ایسکمیک (با حذف سلول‌های اپی‌تلیال) و هم می‌توان در مواردی که نیاز به مهار آنژیوژنز است مانند موارد سرطانی استفاده نمود.

سپاسگزاری

بدین وسیله از خانم غزاله علمدارنژاد و آقای مهدی یزدی و قاسم یزدان پناه کلیه عزیزانی که در مرکز تحقیقات نانو تکنولوژی پزشکی و مهندسی بافت دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی در این تحقیق مساعدت کردند؛ تشکر می‌نمایم. این تحقیق با حمایت مالی ستاد توسعه و کاربرد سلول‌های بنیادی انجام گرفت. این مقاله حاصل پایان نامه کارشناسی ارشد بیهوشی خانم قدسیه پائینی وایقان می‌باشد.

References

1. H.S. Dua, Gomes JAP, King AJ, Maharajan VS. The Amniotic Membrane in

سطح مزانشیمال به سمت بالا قرار داشت. کاهش آنژیوژنز در نمونه‌های mesenchymal side up می‌توان علت حضور پروتئین‌های آنتی آنژیوژنز در سلول‌های اپیتلیال پرده آمنیون دانست. پرده آمنیون با ترشح پروتئین‌هایی مانند ترومبوسپاندین و مهارکننده بافتی متالوپروتئیناز (TIMP) می‌تواند آنژیوژنز را مهار کند. در مطالعات که پیش از این انجام شده بود، خاصیت آنتی آنژیوژنزی پرده آمنیون مشاهده شده بود و همین موضوع سبب شده این ساختار زیستی به طور گسترده در پیوند قرنیه مورد استفاده قرار بگیرد؛ بنابراین، اثر مهار آنژیوژنز مشاهده شده احتمالاً به علت سلول‌های اپیتلیالی می‌باشد (۲۱). در بررسی پیوندهای قرنیه، در مواردی که پیوند از سطح اپیتلیال انجام شده موفقیت‌آمیز بوده است. برعکس، پیوند پرده آمنیون از سطح مزانشیمال باعث کدر شدن سطح قرنیه شده است که یکی از علل ایجاد کدورت در قرنیه بعد از پیوند، ایجاد آنژیوژنز می‌باشد (۱). در پرده آمنیون هنگامی که سطح اپیتلیال به سمت بالا بود و سطح مزانشیمال در مجاورت بافت قرار داشت میزان آنژیوژنز به صورت محسوسی بیش‌تر از هنگامی بود که سطح مزانشیمال به سمت بالا قرار داشت. با بررسی تعداد و طول جوانه‌های رگی در بافتی که سطح اپیتلیال به سمت بالا بود و سطح مزانشیمال در مجاورت بافت قرار داشت در مقایسه با بافت کنترل افزایش معنی داری دیده شد. افزایش آنژیوژنز در نمونه‌های Epithelial side up را می‌توان به علت حضور پروتئین‌های آنژیوژنیک در سلول‌های مزانشیمال پرده آمنیون دانست. در تحقیقات جدیدتر وجود فاکتورهای آنژیوژنیک مانند فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (VEGF)، انکوژن وابسته به رشد (GRO)، مهارکننده بافتی متالوپروتئیناز ۱ و ۲ (TIMP-1، 2)، IL-6، IL-8، IL-22، فاکتور رشد فیبروبلاستی

- Ophthalmology. Surv Ophthalmol.
۲۰۰۴؛ ۴۹:۵۱-۷۷

2. Matthews R, Faulk W, Bennett J. A review of the role of amniotic membranes in surgical practice. *Obstet Gynecol. Annu Rev Cell Dev Biol.* ۱۹۸۲, 11; 31-58
3. Niknejad H, Jorjani M, Ahmadiani A, Ghanavi J, Seifalian AM. Properties of the amniotic membrane for potential use in tissue engineering. *Eur cell mater.* ۲۰۰۸; 15: 88-9
4. 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* ۲۰۱۱; ۶۳: ۱۴۵-۵۱
5. Norris MA, Becker SN, Cohen MS, Baur PS, JR. MMW, Seybold HM. Bladder Reconstruction in rabbits with Glutaraldehyde-stabilized Amniotic Membranes. *Urology.* ۱۹۸۲; ۱۹(۶): 631-35.
6. 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. *Journal of Vascular Surgery.* ۲۰۱۲; ۵۶(۴): ۱۰۹۸-104.
7. Akle CA, Adinolfi SW, Leibowitz S, Mccoll I. Immunogenicity of Human Amniotic Epithelial Cells After Transplantation into Volunteers. *the lancet.* ۱۹۸۱; ۳۱۸(۸۲۵۴): ۱۰۰۳-۵
8. Wolbank S, Hildner F, Redl H, Griensven Mv, Gabriel C, Hennerbichler S. Impact of human amniotic membrane preparation on release of angiogenic factors. *J Tissue Eng Regen Med* ۲۰۰۹. ۲۰۰۹; ۳: ۶۵۱-54.
9. Niknejad H, Paeini-Vayghan G, Tehrani FA, Khayat-Khoei M, Peirovi H. Side dependent effects of the human amnion on angiogenesis. *Placenta* 2013; 34(4): 340-5
10. Ferrer FA, Pantschenko AG, Miller LJ, Anderson K, Grunnet M, Mckenna PH, et al. Angiogenesis And Neuroblastoma: Interleukin- α And Interleukin- α Receptor Expression In Human Neuroblastoma. *The Journal Of Urology.* ۲۰۰۰; ۱۶۴: ۱۰۱6-20.
11. Wong MLH, Prawira A, Kaye AH, Hovens CM. Tumour angiogenesis: Its mechanism and therapeutic implications in malignant gliomas. *Journal of Clinical Neuroscience.* ۲۰۰۹; ۱۶: 1119-3.
12. Alessi P, Ebbinghaus C, Neri D. Molecular targeting of angiogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta.* ۲۰۰۴; 30: 1649-54.
13. Bellon G, Martiny L, Robinet A. Matrix metalloproteinases and matrikines in angiogenesis. *Critical Reviews in Oncology/Hematology.* ۲۰۰۴; ۴۹: ۲۰۳-220.
14. Park JH, Jeoung JW, Wee WR, Lee JH, Kim MK, Lee JL. Clinical efficacy of amniotic membrane transplantation in the treatment of various ocular surface diseases. *Contact Lens & Anterior Eye.* ۲۰۰۸; ۳۱: ۷۳-۸۰
15. Boldrini L, Gisfredi S, Ursino S, Lucchi M, Mussi A, Basolo F, et al. Interleukin- α in non-small cell lung carcinoma: Relation with angiogenic pattern and p۵۳, Alterations. *Lung Cancer.* ۲۰۰۵; ۵۰: ۳۰۹-۱۷
16. Yao JS, Zhai W, Young WL, Yang GY. Interleukin- γ triggers human cerebral endothelial cells proliferation and migration: The role for KDR and MMP-۹. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* ۲۰۰۶; ۳۴۲: ۱۳۹۶-۴۰۴
17. MIHU CM, CIUCĂ DR, SORITĂU O, ŞUŞMAN S, MIHU D. Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from the amniotic membrane. *Romanian Journal of Morphology and Embryology.* ۲۰۰۹; ۵۰(۱): ۷۳-7.

18. 21. Ehrmantraut S, Laschke MW, Merkel D, Scheuer C, Willnecker V, Meyer-Lindenberg A, Menger MD, Naumann A. Perioperative steroid administration inhibits angiogenic host tissue response to porous polyethylene (Medpor) implants. *Eur Cell Mater.* 2010;19:107-16.
19. Burgos H. Angiogenic and growth factors in human amnio-chorion and placenta. *European Journal of Clinical Investigation* ۱۹۸۳;13: 89-96.
20. Niknejad H, Peirovi H. The Effects of Cryopreservation on Epithelial Cells before and After Isolation from Human Amniotic Membrane. *J Mazand Univ Med Sci* 2012; 22(94): 15-26 (Persian).
21. Kamiya K, Wang M, Uchida S, Amano S, Oshika T, Sakuragawa N, et al. Topical application of culture supernatant from human amniotic epithelial cells suppresses inflammatory reactions in cornea. *Experimental Eye Research.* ۲۰۰۵;۸۰:۶۷۱-۹
22. Niknejad H, Khayat-Khoei M, Peirovi H. Inhibition of MMPs might increase anticancer properties of amniotic epithelial cells. *Medical Hypotheses.* ۲۰۱۲; ۷۸(۵): 690-91.
23. Miki T MK, Ross MA, Stolz DB, Strom SC. Identification of stem cell marker-positive cells by immunofluorescence in term human amnion. *J Reprod Immunol.* ۲۰۰۷;۷۵(۲): 91-6.
24. 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(1):22-7
25. Wei JP ZT, Kawa S, Aizawa T, Ota M, Akaike T, Kato K, Konishi I, Nikaido T. Human amnion-isolated cells normalize blood glucose in streptozotocin-induced diabetic mice. *Cell Transplant.* ۲۰۰۳;۱۲(۵): 545-52.
26. Takashima S IH, Zhao P, Akaike T, Nikaido T. Human amniotic epithelial cells possess hepatocyte-like characteristics and functions. *Cell Struct Funct.* ۲۰۰۴;۲۹(۳):۷۳-84.