

## مطالعه بافت‌شناسی آنژیوژنز درمانی به روش مهندسی بافت در رت: نقش

### ماست سل‌ها و پلاکت‌ها در القاء آنژیوژنز

علی کریمی<sup>۱</sup>، رسول شهروز<sup>۲\*</sup>، رحیم حب نقی<sup>۳</sup>، رحیم محمدی<sup>۴</sup>، اسماعیل مرتاض<sup>۵</sup>، فرهاد سلطانعلی نژاد<sup>۶</sup>، غلامرضا نجفی<sup>۶</sup>

سعیده امانی<sup>۱</sup>

- ۱- دانشجوی دکتری تخصصی بافت‌شناسی مقایسه‌ای، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
- ۲- استاد، علوم تشریح دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
- ۳- دانشیار، پاتولوژی دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
- ۴- استادیار، جراحی دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
- ۵- دانشیار، ایمنی‌شناسی پزشکی، بیمارستان مسیح دانشوری، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
- ۶- استادیار، علوم تشریحی دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۲/۱۴

تاریخ دریافت: ۹۵/۶/۸

#### خلاصه

##### مقدمه

بیماری‌های عروق محیطی در اثر قطع جریان خون در اندام‌ها ایجاد می‌شود. ماست سل‌ها و پلاکت‌ها با القاء آنژیوژنز و افزایش رگ‌زایی ممکن است موجب تسریع در بهبود شرایط ایسکمی موضعی شوند. هدف از مطالعه حاضر کمک به پیدا کردن روش درمانی مؤثر برای بهبود شرایط ایسکمی موضعی، در محل قطع شریان رانی می‌باشد.

##### مواد و روش‌ها

۳۰ قطعه رت نر سفید نژاد Wistar به ۶ گروه آزمایشی که همگی شامل حیوانات دچار ایسکمی بودند بطور تصادفی تقسیم شدند (n=۵): گروه کنترل ایسکمی: برش در محل شریان رانی و برداشت به طول ۵mm، گروه کنترل محلول فسفات بافر (PBS): به منطقه برش PBS اضافه گردید، گروه کنترل کیتوزان (CHIT): به منطقه برش محلول کیتوزان اضافه گردید. گروه تجربی پیوند ماست سل (CHIT/Mast cells): به منطقه برش محلول کیتوزان و ماست سل (۱×۱۰<sup>۶</sup>) اضافه شد. گروه تجربی پیوند پلاکت (CHIT/plat): به منطقه برش محلول کیتوزان و پلاکت (۱۳×۱۰<sup>۶</sup>) اضافه گردید. گروه تجربی پیوند پلاکت و ماست سل (CHIT/plat/Mast cells): به منطقه برش محلول کیتوزان، ۱۳×۱۰<sup>۶</sup> پلاکت و ماست سل (۱×۱۰<sup>۶</sup>) اضافه شد.

##### یافته‌ها

آنالیز داده‌های مربوط به تراکم عروق و هیستومورفومتری روز ۷ بعد از جراحی صورت گرفت. میانگین تعداد عروق خونی در گروه CHIT/Mast افزایش معنی‌داری نسبت به سایر گروه‌های آزمایشی نشان داد (P<۰/۰۵). میانگین مربوط به تعداد عروق متوسط و بزرگ در گروه CHIT/Mast بطور مؤثری بیشتر از گروه‌های کنترل بود (P<۰/۰۵).

##### نتیجه‌گیری

استفاده از ماست سل‌ها در مهندسی بافت می‌تواند پیشنهادی با رویکرد جدید در راستای آنژیوژنز درمانی تلقی شود، که قادر به ارائه بهبود روند رگ‌زایی در موارد ابتلا به بیماری‌های عروق محیطی باشد.

##### کلیدواژه‌ها

آنژیوژنز، ماست سل، مهندسی بافت، پلاکت، بافت‌شناسی

\*نویسنده مسئول: رسول شهروز، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ایران

پست الکترونیک: Rasoulshahrooz1@gmail.com

تلفن: ۰۴۴-۳۲۷۷۰۵۰۸

## مقدمه

علیرغم روش‌های درمانی مدرن میلیون‌ها نفر در جهان از بیماری‌های شریان محیطی که منجر به عدم توانایی تحرک، زخم‌های ایسکمیک مقاوم به درمان، اختلال در بهبود زخم و قطع عضو می‌شود، رنج می‌برند (۱). عدم وجود روش‌های درمانی مناسب در این مورد باعث شده که بسیاری از بیماران امید اندکی برای تسکین دردهای خود داشته باشند (۲). در تأکید بر اهمیت این موضوع باید گفت که تا کنون هیچ روش مطمئنی برای درمان بیماری ایسکمی اندام حرکتی توسط کار گروه اروپایی این بیماری، مورد تأیید قرار نگرفته است (۳). بنابراین روش‌های درمانی جدیدی برای درمان این بیماری مورد نیاز است. در سال‌های اخیر پژوهش‌های بالینی بر پایه القای آنژیوژنز برای درمان بیماری‌های شریان محیطی، درمان زخم‌ها و موارد دیگر در حال انجام بوده است (۴). آنژیوژنز یا تشکیل عروق جدید یک روند چند مرحله‌ای است که بسیار هماهنگ عمل می‌کند و تنها به معنی جوانه‌زدن عروق جدید نیست، بلکه شامل مهاجرت سلول‌های آندوتلیالی، تکثیر آنها و تشکیل لوله و بقای آن می‌باشد (۵). فاکتورها و عوامل متنوعی در این امر دخیل هستند. برای القاء رگ‌زایی از فاکتورها، داروها و یا ترکیبی از این روش‌ها و مهندسی بافت استفاده شده است. استفاده از سلول‌های مغز استخوان برای القای آنژیوژنز در بیماری‌های ایسکمیک قلبی (۶) آنژیوژنز درمانی با القاء ژن فاکتور رشد سلول‌های کبدی انسانی در رت (۷) از جمله این روش‌ها بوده است. در مطالعات قبلی اثر ماست سل‌های طبیعی موجود در بدن در القای آنژیوژنز (۸، ۹) مورد ارزیابی قرار گرفته است. همچنین Xing و همکاران نقش ماست سل‌ها را در محافظت روده

کوچک در مقابل صدمات ایسکمی-پرپیوژن اثبات کرده‌اند (۱۰)، لکن استفاده از پیوند ماست سل‌های مشتق از مغز استخوان به منظور درمان، بسیار جدید و نوپا می‌باشد. در سال ۲۰۱۵ Shao و همکارانش از این سلول‌ها برای بهبود انفارکتوس قلبی استفاده کرده‌اند (۱۱). حضور ماست سل‌ها در نزدیکی محل جوانه زدن مویرگ‌ها یکی از شواهد ارتباط بین آنژیوژنز و ماست سل‌ها می‌باشد (۱۲، ۱۳). ترشحات متنوع ماست سل‌ها قادر به القا و افزایش آنژیوژنز از طریق مسیرهای پیچیده و مرتبط به هم می‌باشند، که این فاکتورها شامل:  $VEGF^1$ ،  $bFGF^2$ ،  $TGF-\beta^3$ ،  $TNF-\alpha^4$ ،  $IL8^5$ ، پروتئینازها، هیپارین، فاکتورهای هیپارینی متصل شونده پیش آنژیوژنیک (heparin-binding pro-angiogenic factors) هیستامین، واسطه‌های مشتق از لیپید، و فاکتورهای دیگر می‌باشند (۹).

پلاکت‌ها نیز حاوی مواد مؤثر متعددی بوده که در روند آنژیوژنز شرکت می‌کنند، مانند  $bFGF$ ،  $VEGF$ ، ترمبواسپاندین،  $PDGF^6$ ، اندواستاتین،  $IGF1^7$ ،  $IGF2$ ،  $EGF^8$  و غیره (۱۴).

رگ‌زایی مناسب و پایدار علاوه بر سلول‌ها و فاکتورهای رشد به عامل سوم دیگری که ماتریکس بین سلولی است، نیاز می‌باشد. ماتریکس بین سلولی ارتباط و هماهنگی بین این عوامل را بر عهده دارد. تنظیم و انجام این فرایند را در اصطلاح، مهندسی بافت گویند و هدف از آن بازگرداندن، حفظ و بهبود اعمال بافت‌هایی است که به علت عوامل پاتولوژیکی مختلف آسیب دیده‌اند (۱۵).

<sup>6</sup> Platelet-derived Growth Factor: PDGF

<sup>7</sup> Insulin-like Growth Factors

<sup>8</sup> Epidermal Growth Factor

<sup>1</sup> Vascular Endothelial Growth Factor: VEGF

<sup>2</sup> basic Fibroblast Growth Factor: bFGF

<sup>3</sup> Transforming Growth Factor- beta: TGF- $\beta$

<sup>4</sup> Tumor necrosis factor alpha: TNF- $\alpha$

<sup>5</sup> Interleukin 8: IL8

دو نقطه به فاصله ۵mm دو گره زده و فاصله بین دو گره برداشته شد.

بعد از جراحی، سلول ها را طبق گروه بندی اعلام شده، در محل قطع شریان، پیوند داده و در روز هفتم پس از جراحی، حیوانات را با دوز بالایی از کتامین و زایلازین (۳ برابر دوز بیهوشی) آسان کشی و از محل مذکور نمونه برداری به عمل آمد (۲).

پس از فیکس کردن نمونه ها در فرمالین ۱۰ درصد بافری و طی مراحل پاساژ بافتی و رنگ آمیزی ماسون تریکروم (۱۶)، میزان آنژیوزنز از طریق شمارش عروق و مورفومتری با استفاده از دوربین دیجیتال (Dino-Eye-AM-7023) و نرم افزار DinoCapture2.0 مورد ارزیابی قرار گرفت (تصویر ۱).

**تولید ماست سل های مشتق شده از مغز استخوان:**  
سلول های غیر چسبنده را از مغز استخوان جدا کرده و با استفاده از میتوزن های حاصله از کشت سلول های طحالی به ماست سل تمایز داده شدند (۱۷).  
روش انجام کار بطور خلاصه بدین قرار است:

در مطالعه حاضر از طریق مهندسی بافت و به همراه ماست سل های بدست آمده از مغز استخوان موش سوری و پلاکت ها استحصال شده از خون محیطی رت، در مدل ایسکیمیک تجربی (قطع شریان رانی) رت، با تقلید از شرایط فیزیولوژیک، آنژیوزنز القا داده شد.

### مواد و روش ها

در مطالعه حاضر از ۳۰ قطعه رت نر بالغ در ۶ گروه مساوی با وزن تقریبی ۲۵۰-۲۰۰ گرم استفاده گردید. رت ها به مدت یک هفته قبل از شروع آزمایش به محل عادت داده شدند و میزان روشنایی، ۱۴ ساعت نور و ۱۰ ساعت تاریکی اعمال گردید.

گروه های کنترل و تجربی عبارتند بودند از:

(۱) گروه کنترل ایسکمی: در این گروه پای عقب با لیگاتور زدن در دو نقطه از شریان رانی به فاصله ۵mm و قطع شریان در بین نواحی گره زده شده، دچار ایسکمی شدند.

(۲) گروه کنترل PBS: علاوه بر ایسکمی در محل قطع شریان از PBS به حجم ۵۰ μl استفاده شد.

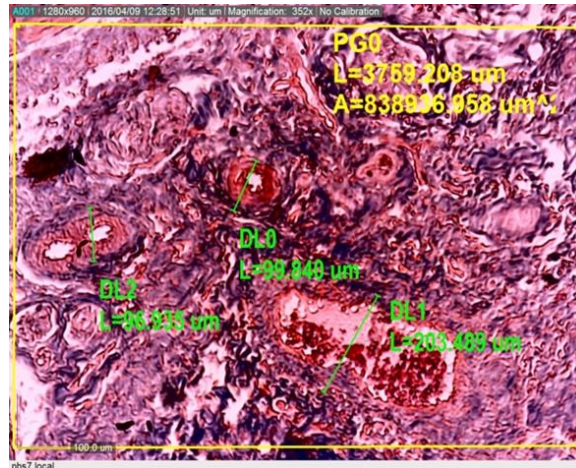
(۳) گروه کنترل کیتوزان یک: علاوه بر ایسکمی در محل قطع شریان رانی فقط اسکافولد کیتوزان به حجم ۵۰ μl قرار داده شد.

(۴) گروه تجربی ماست سل: تعداد یک میلیون ماست سل همراه با کیتوزان به حجم ۵۰ μl در محل قطع شریان قرار داده شد.

(۵) گروه تجربی پلاکت: تعداد سیزده میلیون پلاکت به حجم ۵۰ μl به همراه کیتوزان در محل قطع شریان قرار داده شد.

(۶) گروه تجربی ماست سل و پلاکت: تعداد یک میلیون ماست سل همراه با سیزده میلیون پلاکت به همراه کیتوزان در محل قطع شریان قرار داده شد (۲).

رت ها را بوسیله تزریق داخل صفاقی ترکیبی از کتامین و زایلازین (کتامین ۵ درصد، ۹۰ mg/Kg و زایلازین ۲ درصد، ۵mg/Kg) بیهوش کرده و به شریان رانی، در ریشه شریان، از



تصویر ۱- ارزیابی هیستومورفومتریک عروق خون با نرم افزار DinoCapture2.0 (رنگ آمیزی ماسون تریکروم X ۳۵۲)

### کشت سلول های مغز استخوان

سلول های مغز استخوان از استخوان فمور موش سوری بعد از بیهوشی و آسان کشتی به سرعت جدا گردید. بوسیله سرنگ انسولین و با استفاده از محیط کشت عاری از اندوتکسین فلاشیگ شده و سپس به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۳۲۰g سانتریفیوژ شد. سلول های هسته دار با نسبت  $10^6 \times 0.5$  در هر میلی لیتر RPMI1640 همراه با FBS10%، ۱۰۰ واحد بین المللی بر میلی لیتر پنی سلین،  $100 \mu\text{g/ml}$  استرپتومایسین،  $0.1 \mu\text{mol}$  اسیدهای آمینه غیر ضروری،  $2 \text{mmol}$  ال-گلوتامین و پاکویت میتوزن طحالی (به نسبت ۲۰ درصد) کشت داده شد. بعد از ۳-۴ هفته نمونه ها با رنگ آمیزی اختصاصی تولوئیدین بلو و فلوسایتومتری ارزیابی شدند.

### طرز تهیه پاکویت سلول های طحالی

#### Pokeweed mitogen-stimulated spleen cell conditioned medium

سلول های طحالی را از موش سوری جدا کرده و با تراکم دو میلیون سلول در میلی لیتر به محیط RPMI1640 که حاوی

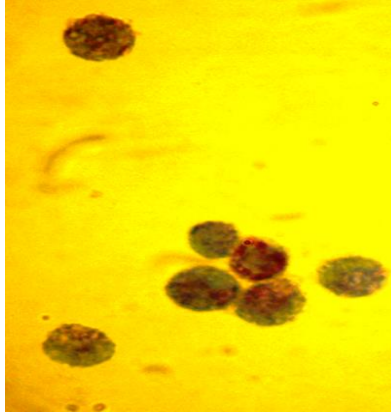
$4 \mu\text{mol}$  ال-گلوتامین،  $5 \times 10^{-5} \text{M}$  -۲ مرکاپتو اتانول،  $1 \text{mmol}$  سدیم پیروات، ۱۰۰ واحد بین المللی بر میلی لیتر پنی سلین،  $100 \mu\text{g/ml}$  استرپتومایسین،  $0.1 \mu\text{mol}$  اسیدهای آمینه غیر ضروری،  $8 \mu\text{g/ml}$  لکتین را در فلاسک های  $75 \text{cm}^2$  کشت داده شدند، بعد از ۷-۵ روز محیط کشت رویی را به مدت ۱۵ دقیقه و با دور ۳۲۰g سانتریفیوژ شده و از فیلتر  $0.22 \mu\text{m}$  گذرانده شدند، مایع بدست آمده به عنوان پاکویت میتوزن طحالی در مراحل بعد استفاده گردید (۱۷).

### رنگ آمیزی تولوئیدین بلو

گرانول های اختصاصی ماست سل ها با تولوئیدین بلو رنگ آمیزی شدند (۱۸) (تصویر ۲).

### تأیید ماست سل ها به روش فلوسایتومتری

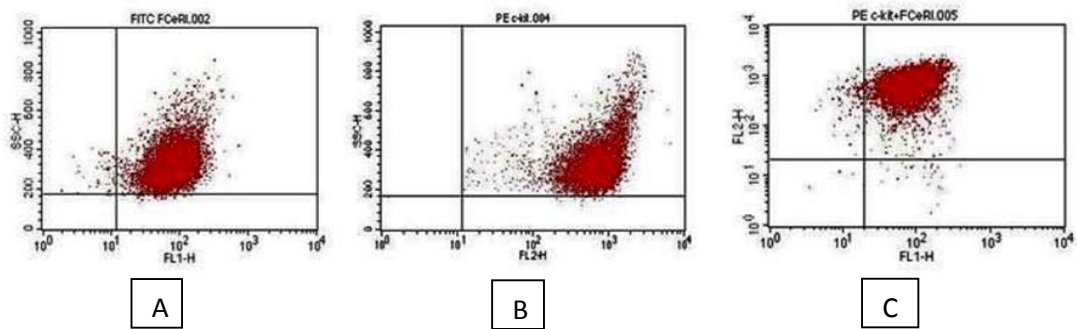
بعد از استحصال ماست سل ها، آنها را با محلول فسفات بافری (PBS) سرد شستشو داده و رسپتور سطحی FC قبل از رنگ-آمیزی به وسیله ۲/۴G2 (PharMingen, San Diego, CA, USA) مسدود شد.



تصویر ۲- ماست سل های تمایز یافته از مغز استخوان (رنگ آمیزی تولئیدین بلو X ۱۰۰۰)

PBS شناور و همراه با آنتی بادی ها در دمای ۴°C به مدت یک ساعت انکوبه و بوسیله دستگاه فلوسایتومتری FACSCantoII (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) ارزیابی شدند. در هنگام آنالیز سلول های مرده جدا گشتند (تصویر ۳).

از آنتی بادی ضد موشی (PE<sup>۹</sup>-conjugated *c-kit*) (PharMingen, USA) برای رنگ آمیزی *c-kit* استفاده شد و FcεRI موشی به وسیله (آنتی بادی ضد موشی - FITC<sup>۱۰</sup> conjugated) (PharMingen, USA) رنگ آمیزی و با آنتی - بادی کنترل هم ایزوتوپ مقایسه گردید. سلول ها در ۵۰ μl



تصویر ۳- ارزیابی ماست سل های مغز استخوان به وسیله دستگاه فلوسایتومتری، (A) سلول های FcεRI مثبت (B) سلول های CD117 (C) سلول های kit مثبت، (C) سلول هایی که هر دو مارکر مثبت آنها مثبت است (۹۳ درصد)

#### روش تهیه محلول کیتوزان :

پودر کیتوزان با وزن مولکولی متوسط و درصد داستیلاسیون ۸۵ درصد در محلول آبی (یک درصد v/v) اسید استیک گلاسیال تا رسیدن به غلظت ۲ درصد (w/v) حل گردید. سپس محلول از کاغذ فیلتر واتمن

#### روش تهیه پلاکت

پلاکت از جریان خون محیطی رت با استفاده از شتاب های مختلف سانتریفیوژ جدا گردید (۱۹).  
اسکافولد: اسکافولد را از نوع کیتوزان انتخاب کرده و برطبق روش ذیل تهیه گردید.

<sup>10</sup> Fluorescein iso thiocyanate

<sup>9</sup> Phycoerythrin

شماره ۳ برای جدا کردن ذرات احتمالی عبور داده شد.

بعد از این مرحله ۰/۲۸۳۵g گلیسرول به ازای هر گرم کیتوزان به عنوان نرم کننده اضافه گردید (۲۰).

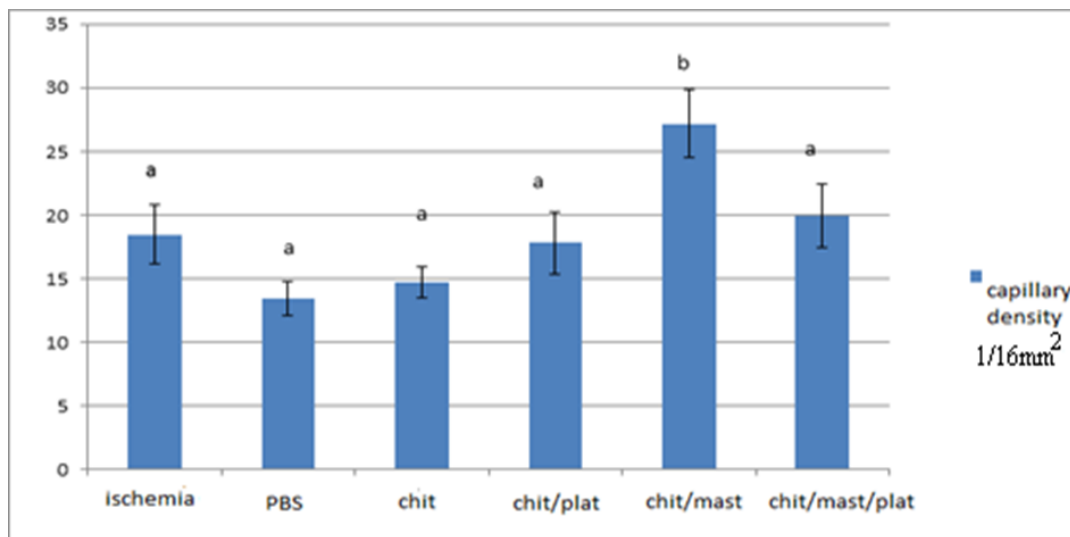
## آنالیز آماری

داده‌ها به وسیله نرم‌افزار SPSS v.22 آنالیز شدند. تمام مقادیر تحت عنوان میانگین  $\pm$  انحراف معیار (mean  $\pm$  SE) بیان گردید. تفاوت داده‌ها بین گروه‌های آزمایشی با روش ANOVA یک-طرفه آنالیز شده و برای ارزیابی معنی‌دار بودن تفاوت بین گروه‌ها از آزمون LSD استفاده گردید. حد معنی‌داری آزمون-ها ( $P < 0.05$ ) در نظر گرفته شد.

## یافته‌ها

شمارش تعداد عروق خونی در محل قطع شریان فمورال نشان داد که تعداد مویرگ‌ها در گروه پیوند ماست سل نسبت به

سایر گروه‌ها افزایش معنی‌داری داشت ( $P = 0.025$ ،  $P = 0.006$ ،  $P = 0.0001$ ،  $P = 0.0001$ ،  $P = 0.005$ ). درحالی‌که در سایر گروه‌ها تغییرات تعداد عروق فاقد تفاوت معنی‌داری بود، تعداد مویرگ‌ها در گروه‌های دریافت کننده پلاکت و مخلوط پلاکت و ماست سل، افزایش نسبی را نشان داد، ولی این افزایش معنی‌دار نبود (نمودار ۱).



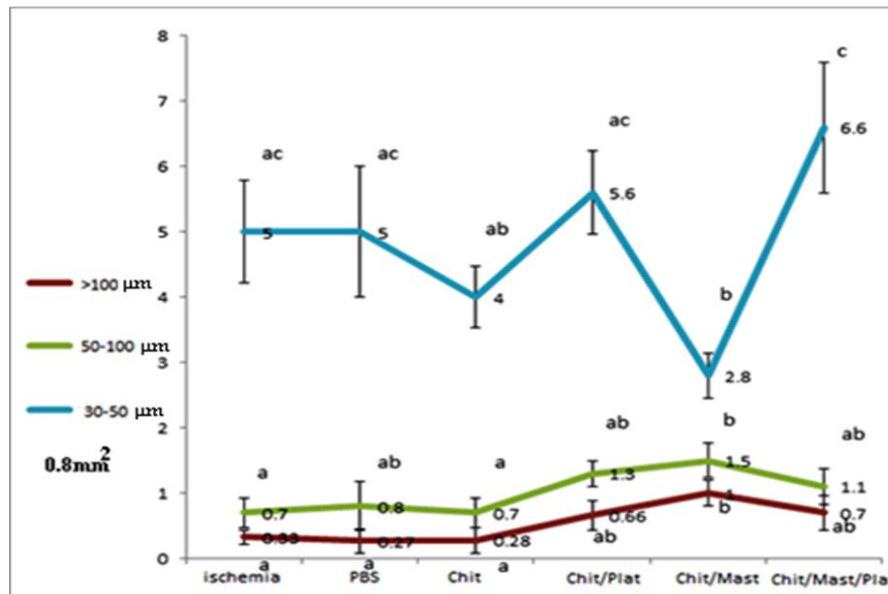
نمودار ۱- میانگین تعداد کلی مویرگ‌ها (حروف انگلیسی نامشابه نشان دهنده وجود تفاوت معنی‌دار در سطح  $P < 0.05$  است)

کننده PBS، پلاکت و مخلوط پلاکت و ماست سل کاهش نشان داد ( $P < 0.0001$ ،  $P < 0.001$ ،  $P = 0.02$ ،  $P = 0.002$ )، در این محدوده ضخامت، تعداد عروق ریز در گروه‌های مخلوط

در هیستومورفومتری بر اساس ضخامت‌های مختلف عروق خونی تعداد عروق ریز با قطر  $30-50 \mu\text{m}$  در گروهی که در محل قطع شریان فمورال فقط ماست سل دریافت کرده بود بطور معنی‌داری نسبت به گروه ایسکمیک و گروه‌های دریافت

تعداد عروق بزرگ با قطر بیش از  $100\mu\text{m}$  در محل قطع شریان فمورال در گروهی که فقط ماست سل همراه با اسکافولد کیتوزان پیوند داده شده بود نسبت به سه گروه ایسکمیک، کیتوزان و PBS، دارای افزایش معنی داری بود ( $P=0/01$  و  $P=0/017$  و  $P=0/009$ ) (در این گروه تعدادی عروق با قطر بالای  $400\mu\text{m}$  مشاهده گردید)، در حالیکه این افزایش نسبت به گروه های پلاکت و مخلوط پلاکت و ماست سل، فاقد تفاوت معنی دار بود (نمودار ۲).

(پلاکت و ماست سل) نسبت به گروه کیتوزان افزایش معنی داری نشان داد ( $P=0/039$ ). در حالیکه گروه های ایسکمیک، PBS، کیتوزان و پلاکت دارای تعداد عروق ریز تقریباً مشابهی بودند. تعداد عروق متوسط با قطر  $50-100\mu\text{m}$  در محل قطع شریان رانی در گروه ماست سل نسبت به گروه های ایسکمیک و کیتوزان افزایش معنی دار نشان داد ( $P=0/027$  و  $P=0/011$ ). علیرغم اینکه تعداد این عروق در گروه های پلاکت و مخلوط (پلاکت و ماست سل) نیز افزایش داشت ولی این ازدیاد نسبت به گروه های ایسکمیک، PBS و کیتوزان معنی دار نبود.



نمودار ۲- مقایسه میانگین تعداد عروق خونی در اندازه های مختلف بر حسب میکرومتر در گروه های آزمایشی. حروف نامشابه نشان دهنده وجود تفاوت معنی دار در سطح  $P < 0/05$  می باشد.

حضور ماست سل ها در نزدیکی محل جوانه زدن مویرگ ها یکی از شواهد ارتباط بین آنژیوزنز و ماست سل ها می باشد (۱۱). در گروه ماست سل همانطور که اشاره گردید تعداد عروق کوچک کمتر از سایر گروه ها بوده و عروق متوسط افزایش معنی دار نسبت به گروه های ایسکمیک و کیتوزان ( $P < 0/05$ ) و افزایش نسبی در مقایسه با گروه های دیگر نشان داد. اما مهم تر از همه باید به این نکته توجه کرد که میانگین

### بحث

در رابطه با میانگین تعداد عروق در محل قطع شریان، مطالعه حاضر نشان داد که گروه ماست سل بیشترین میانگین تعداد عروق را به خود اختصاص داده و در مقایسه با گروه های دیگر دارای اختلاف معنی داری بود ( $P < 0/05$ ). مطالعات زیادی وجود دارد که نشان دهنده ارتباط بین آنژیوزنز و حضور ماست سل ها در بدن است (۱۰).



تعداد عروق بزرگ در گروه ماست سل بطور معنی‌دار نسبت به سایر گروه‌ها بیشتر گزارش شد ( $P < 0.05$ ).

ممکن است عروق خونی بزرگ در نتیجه پیوستن عروق خونی کوچک به سیستم گردش خون عمومی بدن حاصل شده باشند که در آن صورت نیاز به توسعه عروق خونی کوچک کمتر شده و شدت ایسکمی کاهش می‌یابد، که این موضوع نشان دهنده تأثیر واسطه‌های شیمیایی و فاکتورهای مختلف آزاد شده توسط ماست سل‌ها در محل قطع شریان بر سرعت رشد و تعداد عروق خونی می‌باشد (۹). ترشحات ماست سل‌ها توانایی القا و افزایش آنژیوژنز از طریق مسیرهای پیچیده و مرتبط به هم را دارند که آن را بواسطه فاکتورهایی مانند  $TNF-\alpha$ ,  $TGF-\beta$ , bFGF, VEGF و IL8 و واسطه‌های دیگر انجام می‌دهند (۹).

در پاتوفیزیولوژی ایسکمی موضعی در شرایط انسداد یک شریان بزرگ، جریان خون به بافت ایسکمیک وابسته به عروق جانبی می‌باشد، زمانی که گسترش خود به خودی عروق جانبی کافی نباشد تا بصورت نرمال جریان خون را به بافت برساند، ایسکمی رخ می‌دهد (۲۱، ۲۲) و با توجه به اینکه در گروه ایسکمی عروق بزرگ در روند جبران این شرایط ایجاد نشده پس به نظر می‌رسد که عروق‌زایی در حد مویرگ برای جبران ایسکمی کافی نباشد. در گروه‌های پلاکت بر خلاف پیش فرض‌های اولیه بر اساس تحقیقات صورت گرفته قبلی، مانند نقش پلاکت در ترمیم پوست (۲۳)، ترمیم زخم‌های معده (۲۴)، توقف پارگی در سیستم شبکه‌ای-عروقی در بیماری‌های عروقی شبکه‌ای دیابتی (۲۵)، شرکت در روند بهبود زخم‌ها و آسیب‌های نخاعی (۲۶)، استفاده در بهبود زخم دیابتی (۲۷) و همچنین در گروه مخلوط (پلاکت و ماست سل) علیرغم شواهدی از ارتباط کاری ماست سل‌ها و پلاکت‌ها مانند تأثیر فاکتورهای رشد مشتق از پلاکت PDGF که به صورت غیر مستقیم و از طریق گیرنده وابسته به فاکتور سلول‌های بنیادی (SCF) باعث افزایش تمایز در ماست سل‌ها

می‌شوند (۲۸) و فاکتور فعال کننده پلاکت (PAF) مترشحه از ماست سل‌هاست که قادر به تجمع و دگرانوله کردن پلاکت می‌باشد (۹)، با وجود افزایش نسبی در تعداد و ضخامت عروق نسبت به گروه‌های کیتوزان، PBS و ایسکمی، این افزایش‌ها معنی‌دار نبود.

در گروه‌های PBS، کیتوزان و ایسکمی، از آنجاکه جراحی، خود عاملی تهاجمی و مسبب تروما در موضع است، سبب ایجاد التهاب در منطقه قطع شریان شده، و همین امر به عنوان یک عامل تحریک کننده آنژیوژنز عمل می‌کند. اما علیرغم افزایش عروق ریز در موضع، این مویرگ‌ها موفق به ایجاد ارتباط مؤثر با سیستم گردش خون عمومی نمی‌شوند که به علت عدم وجود پارامترها و فاکتورهای رشد موجود در ماست سل‌ها در گروه‌های یاد شده بوده، که در نتیجه آن جبران ایسکمی، بصورت عقیم باقی می‌ماند.

در کنار وظایف ذاتی ماست سل‌ها در ایمنی بدن در سال‌های اخیر مشخص شده که این سلول‌ها ترشح کننده فاکتورهای سرکوب کننده سیستم ایمنی هستند (۳۱-۲۹)، که در نتیجه آن ممکن است موجب جلوگیری از رد پیوند سلولی شوند. همچنین به دلیل عدم ایفاء نقش ساختاری (مانند تبدیل به سایر سلول‌های ساختار بافتی) در محل پیوند سلولی، بنابراین نیازی به زنده ماندن و فعالیت طولانی مدت این سلول‌ها در موضع پیوند وجود ندارد.

### نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر از روش زئوگرافت (پیوند غیرگونه‌ای) برای ارزیابی تأثیر ماست سل‌ها در آنژیوژنز استفاده شد. از آنجاکه پیدا کردن اهدا کننده در انسان یک چالش بزرگ محسوب می‌شود، این روش چشم‌انداز امیدوار کننده‌ای در تعمیم آن به موارد انسانی دارد.



الفا ترشح فاکتور مورد نظر و یا عدم ترشح بعضی از فاکتورهای غیر مطلوب اقدام گردد.

### تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله مراتب تشکر و قدردانی خود را از آقای علیاری کارشناس محترم بخش ایمنی‌شناسی و آقای هادی اسمعیلی رزیدنت بخش ایمونولوژی اعلام می‌دارند. این مقاله مستخرج از پایان‌نامه دکتری تخصصی بافت‌شناسی مقایسه‌ای آقای علی کریمی می‌باشد که در دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه دفاع گردید، که به ترتیب اساتید راهنما اول و دوم و مشاور اول و دوم آقایان دکتر رسول شهروز، دکتر رحیم حب نقی، دکتر رحیم محمدی و دکتر اسماعیل مرتاض می‌باشند.

با توجه به نتایج حاصل از مطالعه حاضر می‌توان بیان نمود که ماست سل‌ها قادر به تحریک رگ‌زایی در محل ایسکمی بوده و استفاده همزمان از ماست سل‌ها و پلاکت‌ها اثر سینرژیستی قابل توجهی را در زمینه رگ‌زایی نشان نداد. به نظر می‌رسد که در گروه‌های فاقد فاکتورهای رشد کافی و مؤثر، این روند بصورت ناقص طی می‌شود. برای جبران این کمبود می‌توان از سلول‌های ترشح‌کننده این فاکتورها که ماست سل‌ها یکی از منابع شناخته شده آنها هستند، استفاده نمود.

برای بررسی بیشتر و دقیق‌تر فاکتورهای مترشحه، سلول‌های شرکت‌کننده در رگ‌سازی و نیز بررسی روند آنژیوژنز، می‌توان ماست سل‌ها را در محیط کشت سه بعدی به همراه سلول‌های مزانشیمی، اندوتلیالی، فیبروبلاست‌ها و پری‌سیت‌ها کشت داد و در پی آن بوسیله روش‌های اپی‌ژنتیک برای

### References

1. Heart and Stroke Statistical Update. Dallas: American Heart Association. 2007. Available from: URL: [https://www.heart.org/HEARTORG/General/Heart-and-Stroke-Association-Statistics\\_UCM\\_319064\\_SubHomePage.jsp](https://www.heart.org/HEARTORG/General/Heart-and-Stroke-Association-Statistics_UCM_319064_SubHomePage.jsp).
2. Hobo K, Shimizu T, Sekine H, Shin'oka T, Okano T, Kurosawa H. Therapeutic angiogenesis using tissue engineered human smooth muscle cell sheets. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; 28(4):637-43.
3. Second European Consensus Document on Chronic Critical Leg Ischemia. *Circulation* 1991; 84(4 Suppl):IV1-26.
4. Wagoner LE, Merrill W, Jacobs J, Conway G, Boehmer J, Thomas K, *et al*. Angiogenesis protein therapy with human fibroblast growth factor (FGF-1): results of a phase I open label, dose escalation study in subjects with CAD not eligible for PCI or CABG. *Circulation* 2007; 116(16 Suppl):II-443.
5. Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 1997; 386(6626):671-4.
6. Hamano K, Nishida M, Hirata K, Mikamo A, Li TS, Harada M, *et al*. Local Implantation of Autologous Bone Marrow Cells for Therapeutic Angiogenesis in Patients With Ischemic Heart Disease. *Clinical Trial and Preliminary Results. Jpn Circ J* 2001; 65(9):845-7.
7. Taniyama Y, Morishita R, Aoki M, Nakagami H, Yamamoto K, Yamazaki K, *et al*. Therapeutic angiogenesis induced by human hepatocyte growth factor gene in rat and rabbit hindlimb ischemia models: preclinical study for treatment of peripheral arterial disease. *Gene Ther* 2001; 8(3):181-9.
8. Levi-Schaffer F, Pe'er J. Mast cells and angiogenesis. *Clin Exp Allergy* 2001; 31(4):521-4.
9. Norrby K. Mast cells and angiogenesis. *APMIS* 2002; 110(5):355-71.
10. Xing D, Zhang R, Li S, Huang P, Luo C, Hei Z, *et al*. Pivotal role of mast cell carboxypeptidase A in mediating protection against small intestinal ischemia-reperfusion injury in rats after ischemic preconditioning. *J Surg Res* 2014; 192(1):177-86.
11. Shao Z, Nazari M, Guo L, Li SH, Sun J, Liu SM, *et al*. The cardiac repair benefits of inflammation do not persist: evidence from mast cell implantation. *J Cell Mol Med* 2015; 19(12):2751-62.



12. Metcalfe DD, Baram D, Mekori YA. Mast cells. *Physiol Rev* 1997; 77(4):1033-79.
13. Furcht LT. Critical factors controlling angiogenesis: cell products, cell matrix, and growth factors. *Lab Invest* 1986; 55(5):505-9.
14. Sabrkhanly S, Griffioen AW, oudeEgbrink MG. The role of blood platelets in tumor angiogenesis. *Biochim Biophys Acta* 2011; 1815(2):189-96.
15. Nerem RM. Tissue engineering in the USA. *Med Biol Eng Comput* 1992; 30(4):CE8-12.
16. Lee-Brown RK, Laidley JW. Some observations on the microscopical anatomy of the kidney. *J Urol* 1929; 21:259-74.
17. Mortaz E, Redegeld FA, Nijkamp FP, Engels F. Dual effects of acetylsalicylic acid on mast cell degranulation, expression of cyclooxygenase-2 and release of pro-inflammatory cytokines. *Biochem Pharmacol* 2005; 69(7):1049-57.
18. Givi ME, Blokhuis BR, Da Silva CA, Adcock I, Garssen J, Folkerts G, *et al.* Cigarette Smoke Suppresses the Surface Expression of c-kit and FcεRI on Mast Cells. *Mediators Inflamm* 2013; 2013.
19. Messori MR, Nagata MJ, Furlaneto FA, Dornelles RC, Bomfim SR, Deliberador TM, *et al.* A standardized research protocol for platelet-rich plasma (PRP) preparation in rats. *RSBO* 2011; 8(3):299-304.
20. Ojagh SM, Rezaei M, Razavi SH, Hosseini SM. Development and evaluation of a novel biodegradable film made from chitosan and cinnamon essential oil with low affinity toward water. *Food Chem* 2010; 122(1):161-6.
21. Isner JM, Walsh K, Symes J, Pieczek A, Takeshita S, Lowry J, *et al.* Arterial Gene Transfer for Therapeutic Angiogenesis in Patients with Peripheral Artery Disease. St. Elizabeth's Medical Center, Tufts University School of Medicine, Boston, Massachusetts. *Human Gene Therapy* 1996; 7(8):959-88.
22. Losordo DW, Vale PR, Symes JF, Dunnington CH, Esakof DD, Maysky M, *et al.* Gene therapy for myocardial angiogenesis initial clinical results with direct myocardial injection of phVEGF165 as sole therapy for myocardial ischemia. *Circulation* 1998; 98(25):2800-4.
23. Knighton DR, Ciresi KF, Fiegel VD, Austin LL, Butler EL. Classification and treatment of chronic nonhealing wounds. Successful treatment with autologous platelet-derived wound healing factors (PDWHF). *Ann Surg* 1986; 204(3):322-30.
24. Ma L, Elliott SN, Cirino G, Buret A, Ignarro LJ, Wallace JL. Platelets modulate gastric ulcer healing: role of endostatin and vascular endothelial growth factor release. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98(11):6470-5.
25. Yamashiro K, Tsujikawa A, Ishida S, Usui T, Kaji Y, Honda Y, *et al.* Platelets accumulate in the diabetic retinal vasculature following endothelial death and suppress blood-retinal barrier breakdown. *Am J Pathol* 2003; 163(1):253-9.
26. Hiraizumi Y, Transfeldt EE, Kawahara N, Sung JH, Knighton D, Fiegel VD. In vivo angiogenesis by platelet-derived wound-healing formula in injured spinal cord. *Brain Res Bull* 1993; 30(3-4):353-7.
27. Steed D, Goslen B, Hambley R, Abell E, Hebda P, Webster M. Clinical trials with purified platelet releasate. *Prog Clin Biol Res* 1990; 365:103-13.
28. Hiragun T, Morita E, Tanaka T, Kameyoshi Y, Yamamoto S. A fibrogenic cytokine, platelet-derived growth factor (PDGF), enhances mast cell growth indirectly via a SCF-and fibroblast-dependent pathway. *J Invest Dermatol* 1998; 111(2):213-7.
29. de Vries VC, Pino-Lagos K, Nowak EC, Bennett KA, Oliva C, Noelle RJ. Mast cells condition dendritic cells to mediate allograft tolerance. *Immunity* 2011; 35(4):550-61.
30. Gan PY, Summers SA, Ooi JD, O'Sullivan KM, Tan DS, Muljadi RC, *et al.* Mast cells contribute to peripheral tolerance and attenuate autoimmune vasculitis. *Clin J Am Soc Nephrol* 2012; 23(12):1955-66.
31. Lu LF, Lind EF, Gondek DC, Bennett KA, Gleeson MW, Pino-Lagos K, *et al.* Mast cells are essential intermediaries in regulatory T-cell tolerance. *Nature* 2006; 442(7106):997-1002.



## Histological Study of Therapeutic Angiogenesis in Rat by Tissue Engineering Method: Role of Bone Marrow Mast Cells and Platelets in Induction of Angiogenesis

Ali Karimi<sup>1</sup>, Rasoul Shahrooz<sup>\*2</sup>, Rahim Hobbenaghi<sup>3</sup>, Rahim Mohammadi<sup>4</sup>, Esmacil Mortaz<sup>5</sup>, Farhad Soltananejad<sup>6</sup>, Gholam Reza Najafi<sup>6</sup>, Saeedeh Amani<sup>1</sup>

1- PhD student, Comparative Histology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran

2- Associate Professor, Anatomy sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran

3- Associate Professor, Veterinary Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran

4- Assistant Professor, Veterinary Surgery, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran

5- Associate Professor, Medical Immunology, Massih Daneshvari Hospital, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

6- Assistant Professor, Anatomy sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran

Received: Aug 29, 2016

Accepted: Mar 4, 2017

### Abstract

#### Introduction

Peripheral arterial disease is the result of obstruction of blood circulation. Mast cells and platelets via induction of angiogenesis may cause the enhancement of amelioration local ischemia. The aim of this study was help to find an appropriate approach to recovery of ischemic condition in the restricted femoral artery localization.

#### Materials and Methods

30 male white Wistar rats were divided into 6 ischemic experimental groups (n=5), randomly: Ischemia control group: the femoral artery was transected, Phosphate buffer control solution (PBS) group: the transected location was immersed with PBS, Chitosan control group (CHIT): the transected location was immersed with chitosan solution, Mast cell transplanted experimental group (CHIT/Mast cells): the transected location was immersed with chitosan and mast cells ( $1 \times 10^6$ ). Platelets transplanted experimental group (CHIT/plat): the transected location was immersed with chitosan and platelets ( $13 \times 10^6$ ). Platelets and mast cells transplanted experimental group (CHIT/plat/Mast cells): the transected location was immersed with chitosan,  $13 \times 10^6$  platelets and mast cells ( $1 \times 10^6$ ).

#### Results

Analyses of capillary density and histomorphometrical analysis were performed on day 7 after surgery. Mean number of blood vessels in CHIT/Mast cells group indicated a significant difference compared to other experimental groups ( $P < 0.05$ ). The mean number of medium and large blood vessels in CHIT/Mast cells group was significantly more than control groups ( $P < 0.05$ ).

#### Conclusion

Mast cells using in tissue engineering could offer a new approach for therapeutic angiogenesis which is able to provide improved neovascularization in cases of peripheral arterial diseases.

#### Keywords

Angiogenesis, Mast Cells, Tissue Engineering, Platelets, Histology

\*Corresponding Author: Rasoul Shahrooz, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran

Email: Rasoulshahrooz1@gmail.com

Tel: 044-32770508

#### Please cite this article as:

Karimi A, Shahrooz R, Hobbenaghi R, Mohammadi R, Mortaz E, Soltananejad F, *et al.* Histological Study of Therapeutic Angiogenesis in Rat by Tissue Engineering Method: Role of Bone Marrow Mast Cells and Platelets in Induction of Angiogenesis. J Neyshabur Univ Med Sci 2016; 4(4):22-32.





