Review Article

Angiogenesis and the Models to Study Angiogenesis

Ali Mostafaie, Ph.D.*, Hamid Reza Mohammadi Motlagh, M.Sc., Kamran Mansouri, M.Sc.

Medical Biology Research Center, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran

** Corresponding Address: P.O.Box: 1568, Medical Biology Research Center, Kermanshah University of Medical Sciences, Sorkheh Lizheh, Kermanshah, Iran*
Email: amostafaie@kums.ac.ir

Received:10/May/2009, Accepted: 5/Sep/2009

Abstract

Angiogenesis, the development of new blood vessels from existing vasculature, is essential in physiological processes such as growth and development, wound healing and reproduction. It is also involved in pathological conditions such as tumor growth, metastases, and certain chronic diseases. Angiogenesis is dependent on a delicate equilibrium between endogenous angiogenic and antiangiogenic factors. However, under pathological conditions, this tight regulation becomes lost which can result in the formation of the different diseases, including corneal neovascularization, endometriosis, obesity, atherosclerosis, diabetic retinopathy, psoriasis and cancer. In general, the process of angiogenesis is a multi-factorial and highly structured sequence of cellular events comprising migration, proliferation and differentiation of endothelial cells and finally vascular formation, maturation and remodelling. Due to the critical role of angiogenesis in physiological and pathological conditions, scientists have designed various experimental models to assay angiogenesis *in vitro*, *ex vivo* and *in vivo*. Currently, these experimental models are used by many researchers for several applications such as discovering angiogenic and antiangiogenic agents, and thereby for future therapeutic applications.

Keywords: Angiogenesis, Antiangiogenic Factor, Angiogenesis Model, Tumor

Yakhteh Medical Journal, Vol 11, No 4, Winter 2010, Pages: 374-381

آنژیوژنز و مدل‌های مطالعه آن

علی مصطفایی .Ph.D*، حمیدرضا محمدی‌مطلق .M.Sc، کامران منصوری .M.Sc

مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران

* آدرس نویسنده مسئول: ایران، کرمانشاه، صندوق پستی: ۱۵۶۸، سرخه لیژه، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی
پست الکترونیک: Email: amostafaie@kums.ac.ir

دریافت مقاله: ۸۸/۲/۲۰، پذیرش مقاله: ۸۸/۶/۱۴

چکیده

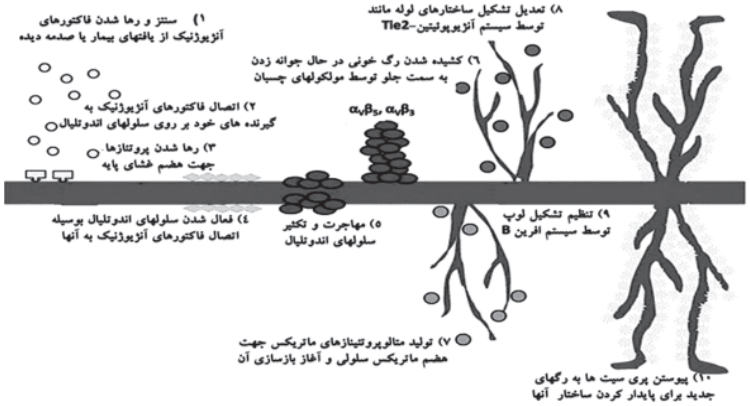
آنژیوژنز (رگ‌زایی)، تشکیل مویرگ‌های جدید از عروق پیشین نامیده می‌شود. این فرایند نقش مهمی در وقایع فیزیولوژیک مانند رشد و نمو، ترمیم زخم و تولیدمثل و همچنین در وقایع پاتولوژیک از قبیل رشد و متاستاز تومور و انواعی از بیماری‌های مزمن دارد. آنژیوژنز وابسته به تعادل دقیق بین تحریک کننده‌ها و مهارکننده‌های طبیعی درون بدن است. در صورتی که این تعادل از حالت طبیعی خارج شود، شرایط برای بروز بیماری‌هایی همچون رگ‌زایی قرنیه اندومتریوز، چاقی، آترواسکلروز، پسوریازیس و رشد و متاستاز تومورها فراهم می‌گردد. به طور کلی این فرایند تحت تاثیر عوامل مختلف بوده و در برگیرنده یک سری رخدادهای سلولی از قبیل مهاجرت، تکثیر و تمایز سلول‌های اندوتلیال و در نهایت تشکیل عروق، بلوغ و بازسازی نهایی آنها می‌باشد. بدین لحاظ در سال‌های اخیر، مهار رگ‌زایی به عنوان ایده‌ای نوین در کنترل و درمان انواعی از اختلالات وابسته به رگ‌زایی به ویژه رشد و متاستاز تومور مطرح شده است. از همین رو، محققان جهت مطالعه آنژیوژنز اقدام به طراحی مدل‌های مختلف *ex vivo*، *in vitro* و *in vivo* نموده‌اند و با استفاده از آنها در زمینه‌های تحقیقاتی مختلف از جمله شناسایی فاکتورهای مهار کننده و القاءکننده آنژیوژنز جهت کاربردهای درمانی بهره برده‌اند.

* **کلیدواژگان:** رگ‌زایی، فاکتور ضد رگ‌زایی، مدل آنژیوژنز، تومور

فصلنامه پزشکی یاخته، سال یازدهم، شماره ٤، زمستان ۸۸، صفحات: ۳۸۱-۳۷٤

مقدمه

آنژیوژنز (Angiogenesis) یا رگ‌زایی، به معنی تشکیل مویرگ‌های جدید از عروق پیشین است. رگ زایی در حالات مختلف پاتولوژیک از قبیل رشد و متاستاز تومور، آرتریت روماتوئید (Rheumatoid Arthritis) و همچنین در فرایندهای فیزیولوژیک مانند رشد و نمو اندام، ترمیم زخم و تولید مثل نقش مهمی دارد (۱). آنژیوژنز، فرایندی کنترل شده است و در افراد بالغ غیر از مواردی مثل ترمیم زخم و سیکل ماهانه (در خانم‌ها) به ندرت رخ می‌دهد. محققان بر این عقیده‌اند که برای القای آنژیوژنز در شرایط فیزیولوژیک یا پاتولوژیک که مشتمل بر مراحل متعددی است (شکل ۱)، کاهش فشار اکسیژن (Hypoxia) در بافت از اهمیت زیادی برخوردار است (۲). در چنین شرایطی بافت دچار هایپوکسی اقدام به سنتز و رهاسازی فاکتورهای آنژیوژنیک همچون فاکتور رشد سلول‌های اندوتلیال (Vein Endothelial Growth Factor; VEGF) می‌کند. این فاکتورها پس از اتصال به گیرنده‌های خود بر روی سلول‌های اندوتلیال منجر به فعال شدن آنها می‌شود. با شروع فعالیت سلول‌های اندوتلیال، انواع خاصی از متالوپروتئازها از سلول‌های فوق ترشح می‌شود و غشای پایه را در منطقه مذکور تجزیه می‌کند. با هضم غشای پایه، سلول‌های اندوتلیال اقدام به مهاجرت و تکثیر می‌نمایند. علاوه بر این، مولکول‌های اتصالی (از قبیل اینتگرین $\alpha_3\beta_v$ و $\alpha_v\beta_5$) نیز به فرایند کشیدن و جلو رفتن جوانه‌های رگ‌های خونی در حال رشد کمک می‌نماید. در مراحل بعدی فرایند آنژیوژنز، متالوپروتئینازهای ماتریکس (Matrix Metalloproteinases; MMP) جهت تجزیه ماتریکس خارج سلولی و آغاز بازسازی مجدد آن تولید می‌شوند. سپس با برهم‌کنش آنژیوپوئیتین-Tie-2 فرایند تشکیل لوله آغاز می‌گردد. در مرحله بعد، سیستم EphB-ephrinB نیز تنظیم فرایند تشکیل لوله‌ها را بر عهده گرفته و در نهایت پری‌سیت‌ها و سلول‌های ماهیچه‌ای صاف برای پایدار کردن رگ خونی تازه تشکیل شده، به این ساختار اضافه می‌شوند (۲).



شکل ۱: مراحل کلیدی سلولی و مولکولی مراحل آنژیوژنز نشان داده شده است (۲) (مشاهده نمونه رنگی تصاویر در انتهای مقالات).

تاریخچه شناخت و اهمیت رگزایی

هر چند واژه آنژیوژنز برای اولین بار توسط محققی به نام هرتیگ مطرح شد، اما اساس بسیاری از تحقیقات بنیادی آن بر طبق نظریات پروفسور جودا فولکمن بنا نهاده شده است. در سال ۱۹۷۱، فولمکن مقاله‌ای در مجله پزشکی نیوانگلند منتشر کرد که تئوری جدید آنژیوژنز را بر اساس چندین سال کار و تحقیق مورد بحث قرار داد. در این تحقیق، فولکمن خاطر نشان کرد که "تومورها هرگز فراتر از اندازه مشخصی رشد نمی‌کنند مگر اینکه عروق آنها افزایش یابد". در این مقاله، او همچنین نظریه‌ای را مطرح کرد که تومورها دارای رگ‌های خونی جدیدی هستند که فاکتوری قابل انتشار، تحت عنوان فاکتور آنژیوژنیک تومور (Tumor Angiogenic Factor; TAF) – فاکتوری که موجب تحریک آنژیوژنز به سمت تومور می‌گردد – را به نحوی به کار می‌گیرند. در نهایت اظهار داشت که "از لحاظ تئوری، اگر بتوان آنژیوژنز را مهار نمود، تومورها در اندازه کوچک باقی می‌مانند و سرانجام آسیب رسان نخواهند شد". نظریه جدید فولکمن همچون سایر نظریات علمی، ابتدا با بدبینی زیادی از سوی جامعه علمی مواجه شد و پذیرش آن نزدیک به یک دهه به طول انجامید. اکنون پس از گذشت نزدیک به چهار دهه از انتشار تئوری فولکمن، آنژیوژنز تومور همچنان به عنوان یک اصل اساسی و بنیادی در تحقیقات مربوط به سرطان و بیماری‌های مزمن وابسته به رگ‌زایی مورد توجه قرار دارد (۵-۳).

نقش آنژیوژنز در ایجاد و گسترش تومور

رشد تومورهای توپر (Solid) به ایجاد رگ‌های جدید و رفع نیازهای تغذیه‌ای سلول‌های توموری بستگی دارد. ترکیبات ویژه (فاکتورهای آنژیوژنیک) به وسیله سلول‌های توموری در محیط رها می‌شوند که موجب تحریک انواع مختلف سلول‌های طبیعی شامل سلول‌های اندوتلیال مویرگ‌های مجاور تومور نیز می‌گردند. این سلول‌ها در پاسخ به فاکتورهای فوق، غشای پایه را تجزیه کرده و با جدا شدن از سلول‌های همسایه و ورود به ماتریکس خارج سلولی، به سمت توده تومورها مهاجرت می‌کنند. علاوه بر این، تقسیم سلولی نیز در جوانه به وجود آمده اتفاق افتاده و با افزایش مهاجرت سلول‌های اندوتلیال، زنجیره‌ای از این سلول‌ها، تشکیل و موجب گسترش غشای پایه به طرف آنها می‌شود. سپس به تدریج حلقه‌های این زنجیره توخالی به هم مرتبط شده و به تشکیل عروق جدید منتهی می‌گردد. بدین‌ترتیب شبکه مویرگی در توده توموری ایجاد شده و می‌تواند به رشدش ادامه دهد. از سوی دیگر، رشد تومور با ایجاد شرایط هایپوکسی و اسیدوز به القای بیشتر آنژیوژنز کمک می‌کند. به هر حال، عروق توموری عملکرد طبیعی دستگاه عروق را ندارند و یک بازخورد مثبت جهت تکثیر مداوم تومور ایجاد می‌کنند که منجر به هایپوکسی مداوم و آنژیوژنز می‌شود (۴).

نقش آنژیوژنز در روند تشکیل جنین

رگ‌های خونی جنین از طریق هر دو فرایند واسکولوژنز و آنژیوژنز به وجود می‌آید. در جنین، سلول‌های اندوتلیال سازنده عروق و بافت‌های خون‌ساز همراه با هم تکامل می‌یابند. در مراحل اولیه تکامل جنینی، آنژیوبلاست‌ها از صفحه جانبی مزودرم و هلال قلبی مشتق گردیده و تعدادی از آنها به داخل مغز مهاجرت می‌کنند. تعدادی از سلول‌ها نیز در داخل اندوکارد لوله قلبی اولیه تجمع می‌یابند. سایر آنژیوبلاست‌ها نیز شبکه‌ای از سلول‌های اندوتلیال را در پایه لوله قلبی می‌سازند که با ویتلین عروق (Vitelline) یکی شده و این امکان را فراهم می‌سازند تا سلول‌های خونی از کیسه زرده به درون بدن جنین جریان یافته و حرکت کنند. علاوه بر این، سلول‌های اندوتلیالی که به طور مستقیم مزانشیم را احاطه کرده‌اند با تهاجم آنژیوژنیک به بافت‌ها، عروق احشایی را به وجود می‌آورند. در نهایت، آنژیوژنز به وسیله هر دو بخش اندودرم و اکتودرم تحریک می‌گردد و سرانجام سبب رشد و نمو اندام‌های مختلف جنینی می‌شود (۲، ۳).

جدول ۱: مهارکننده‌های درون‌زای آنژیوژنز. این مهار کننده‌ها به دو گروه مشتق از ماتریکس و مشتق نشده از ماتریکس تقسیم می‌کردند.

Endogenous Inhibitors of Angiogenesis

Matrix Derived	Non-Matrix Derived
Arresten	Growth factors and cytokines
Canstatin	Interferons
Collagen fragments	Interleukins
EFC-XV	PEDF
Endorepellin	Plastelet factor-4
Endostatin	Other
Fibronectin fragments	Angiostatin
Fibulin	Antithrombin III (cleaved)
Thrombospondin-1 and -2	Chondromodulin
Tumstatin	2-Methoxyestradiol
	PEX
	Plasminogen Kringle 5
	Prolactin fragments
	Prothrombin Kringle 2
	sFlt-1
	TIMPs
	Troponin I
	Vasostatin

مهار آنژیوژنز و فاکتورهای مهار کننده

تا به امروز تعداد زیادی از فاکتورهای درون‌زای (Endogenous) مهارکننده آنژیوژنز شناسایی شده‌اند که منشاء بسیاری از آنها به طور طبیعی از ماتریکس خارج سلولی می‌باشد و برخی هم در واقع پروتیین‌های غشای پایه هستند (۱). بر این اساس، مهار کننده‌های آنژیوژنز به دو کلاس اصلی شامل مهارکننده‌های مشتق از ماتریکس و مهارکننده‌های مشتق نشده از ماتریکس تقسیم می‌شوند. از نمونه‌های معروف کلاس اول می‌توان به ارستین (Arresten)، اندوستاتین، فیبولین و ترومبوسپوندین‌ها اشاره کرد. از کلاس دوم نیز می‌توان از آنژیواستاتین، اینترفرون‌ها و انواعی از اینترلوکین‌ها نام برد (جدول ۱) (۶، ۷).

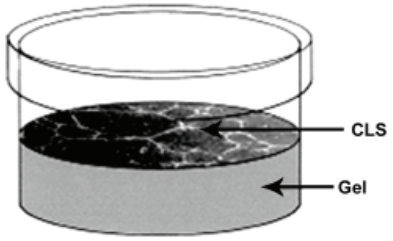
مدل‌های آنژیوژنز

به طور کلی، مدل‌های آزمایشگاهی آنژیوژنز که از سال‌ها پیش تا به امروز جهت تحقیق در شناخت وقایع سلولی فرایند آنژیوژنز ابداع شده و مورد استفاده وسیع محققان قرار گرفته‌اند، شامل مدل‌های *in vitro*، مدل‌های *ex vivo* و مدل‌های *in vivo* هستند.

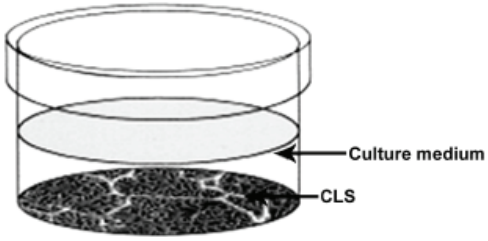
مدل‌های *in vitro* و *ex vivo*

مدل‌های *in vitro* به طور کلی بسته به مسیر سازماندهی مجدد سلول‌ها، به مدل‌های دوبعدی و مدل‌های سه‌بعدی تقسیم می‌شوند (۸). منظور از مدل‌های دوبعدی، مدل‌هایی هستند که در آنها سلول‌های اندوتلیال دارای سازماندهی دووجهی سطحی به موازات سطح پلیت کشت هستند (شکل ۲) (۸، ۹).

مدل‌های کشت دوبعدی به نوبه خود به دو گروه، کشت‌های دوبعدی کوتاه مدت (Short Term Two-Dimensional Cultures) (شکل ۳) (۱۰-۸) و کشت‌های دوبعدی بلند مدت (Long Term Two-Dimensional Cultures) (۱۱، ۱۲) تقسیم می‌شوند. در مدل‌های کوتاه مدت، پس از کشت سلول‌های اندوتلیال، ساختارهای شبه مویرگ (Capillary Like Structure; CLS)، ظرف مدت ۱ تا ۳ روز پدیدار شده و سلول‌ها رفته رفته اقدام به تشکیل شبکه‌هایی (آناستوموز) می‌نمایند. از این رو در چنین سیستم‌هایی، پارامترهای تعیین کننده شامل تراکم سلولی، تکثیر سلولی و غلظت و ترکیب بیوشیمیایی ماتریکس می‌باشند (۱۳).

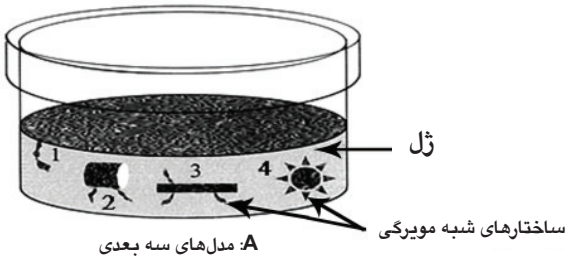


A: کشت دو بعدی کوتاه مدت

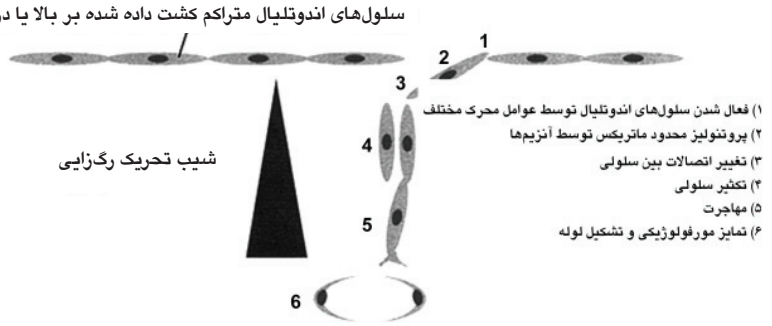


B: کشت دو بعدی بلند مدت

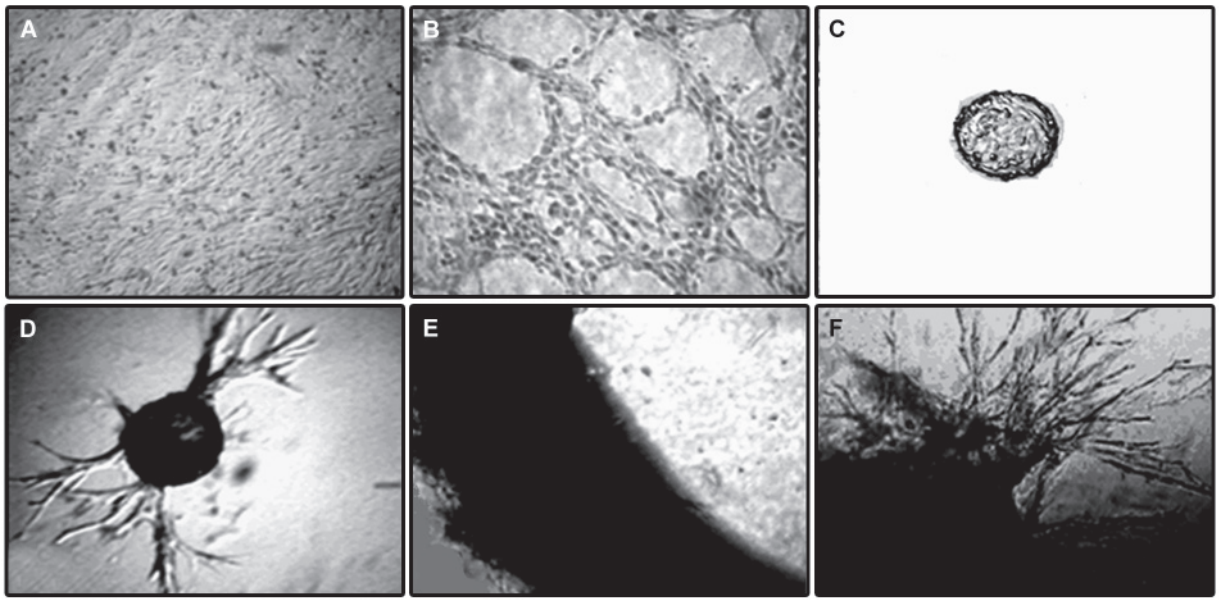
شکل ۲: شمای کلی مدل‌های دوبعدی. A) مدل دوبعدی کوتاه مدت که طبق آن، ساختارهای شبه مویرگ (CLS) بر روی سطح یک ژل گسترش یافته و پیکربندی دو وجهی مسطح را کسب می‌کنند. B) مدل دوبعدی طولانی مدت که در آن، ساختارهای شبه مویرگ پس از چند روز یا یک هفته از زمان کشت، به طور خودبه‌خود در کف ظرف ایجاد می‌گردد (۸).



A: مدل‌های سه بعدی



شکل ۳: نمای شماتیکی مدل‌های سه‌بعدی. A) مدل‌های سه‌بعدی: ۱. تشکیل CLS توسط سلول‌های اندوتلیال فعال کشت شده بر روی یک ماتریکس ژل. ۲. جوانه زدن ساختارهای مویرگی از بافت‌های عروقی در ژل. ۳. سلول‌های ساندویچ شده در بین دو لایه ژل، مهاجرت نموده و تشکیل CLS می‌دهند. ۴. سلول‌های متصل شده به دانه‌های میکروکریر در ژل تولید CLS می‌کنند. B) مکانیسم‌های مولکولی که ممکن است در طی تشکیل این ساختارها در *in vitro* در مدل سه‌بعدی دخیل باشند (۸).



شکل ۴: چند نوع مدل سه بعدی آنژیوژنزی *in vitro* و *ex vivo*. لایه متراکم سلول‌های اندوتلیال بر روی ماتریکس کلاژن (A). تشکیل لوله توسط سلول‌های اندوتلیال پس از گذشت زمان ۲۴ ساعت پس از کشت آنها (B). یک سایتودکس پوشیده از سلول‌های اندوتلیال پس از کاشت اولیه در ژل کلاژن (C). تشکیل جوانه‌های عروقی توسط سلول‌های اندوتلیال در مدل ژل کلاژن- سایتودکس پس از ۷۲ ساعت (D). مدل *ex vivo* حلقه آئورت موش صحرایی در ماتریکس کلاژن پس از گذشت زمان ۱ و ۳ روز از کاشت قطعات آئورت در ماتریکس (E و F). (مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی کرمانشاه، اطلاعات منتشر نشده).

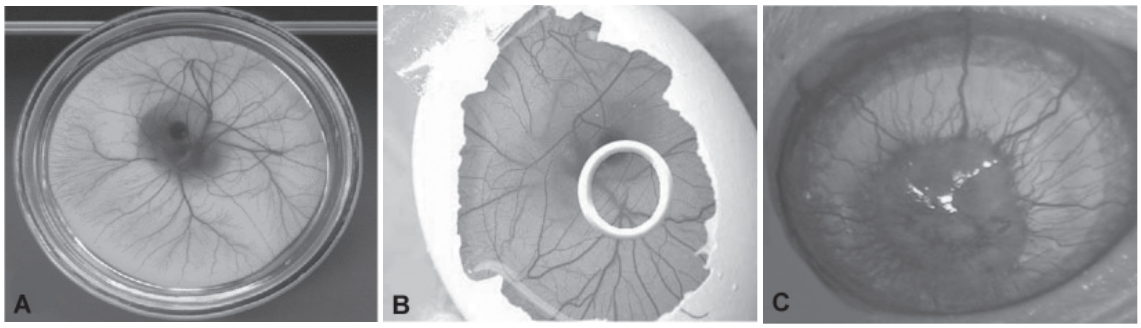
در کشت‌های بلندمدت، گسترش ساختارهای شبه مویرگ حاصل از لایه منفرد و متراکم سلول‌ها، ممکن است به سنتز اجزای ماتریکس خارج سلولی توسط سلول‌ها نیز نیاز داشته باشد (۸، ۱۴). به طور کلی، مدل‌های بلندمدت نسبت به انواع کوتاه مدت برای غربال فعالیت آنژیوژنیک مولکول‌ها از قابلیت کمتری برخوردارند، زیرا ساختارهای شبه مویرگ به طور منظم مشاهده نمی‌شود و فقط اندکی از سلول‌ها متحمل فرایند تمایز و مورفوژنز می‌گردند. بنابراین این مدل‌ها فاقد قابلیت تکرارپذیری بالا هستند (۱۴). مدل‌های دوبعدی به طور کلی ساده بوده و از سلول‌های جدا شده از بافت‌ها طراحی شده‌اند و تا حدودی جهت غربال فعالیت مولکول‌های مهارکننده آنژیوژنز مناسب هستند. یکی از مدل‌های کوتاه مدت، کشت سلول‌ها بر روی ماتریژل است (۱۵). هر چند ترکیب ماتریژل به طور کامل شناسایی نشده است (۱۶)، اما به نظر می‌رسد برای انجام و طراحی مدل آنژیوژنز بسیار مناسب است، زیرا نتایج به دست آمده با آن از تکرارپذیری خوبی برخوردار است. در حقیقت، شناسایی نقش مولکول‌های چسبان عروقی از قبیل سلکتین E (۱۷)، مولکول PECAM-1 (۱۸)، کادهرین ۵ (Cadherin-5)(۱۹) و تعدادی از پروتئازها (۲۰) در فرایند تشکیل لوله نیز از مزایای این روش بوده است. همچنین سنتز پروتیین خارج سلولی، بلوغ رگ (۲۱)، نقش مشتقات قندی در دیابت‌ها (۲۲، ۲۳) و تعدادی از پروتیین‌های ماتریکس سلولی (۲۴) در آنژیوژنز نیز تاحدودی با استفاده از روش ماتریژل مورد مطالعه قرار گرفته‌اند.

اساس مدل‌های سه‌بعدی آنژیوژنز بر پایه ظرفیت سلول‌های اندوتلیال فعال شده و جهت تهاجم به محیط‌های سه‌بعدی (ماتریکس) بنا نهاده شده است (شکل ۳).

این ماتریکس ممکن است ژل کلاژن یا فیبرین (لخته پلاسما)، ماتریژل یا مخلوطی از این پروتئین‌ها به همراه فاکتورهای دیگر باشد. محیط کشت نیز ممکن است درون ژل قبل از پلیمریزه شدن آن یا پس از بستن آن، بر روی ژل اضافه گردد. کشت پیوندهای اکسپلانت عروقی (Vascular Explants) (روش مورد استفاده جهت جداسازی سلول‌ها از یک قطعه بافت موجود زنده و کشت آنها در شرایط محیط کشت آزمایشگاهی) از قبیل حلقه آئورت در ماتریکس‌های ژله‌ای شده و سپس مشاهده سلول‌های اندوتلیال که از درونی‌ترین غشای پوششی عروق یا اینتیما (Intima) انشعاب پیدا می‌کنند، به عنوان یک مدل سه‌بعدی *ex vivo* محسوب می‌گردد (شکل ۴) (۲۷-۲۵). این مدل که توسط نیکوزیا ارائه شده، هنوز به طور وسیعی (البته همراه با تغییراتی چند) مورد استفاده قرار می‌گیرد (۳۰-۲۸). از جمله مدل‌های *in vitro* سه‌بعدی می‌توان به مدل دانه‌های میکروکریر اشاره کرد که جهت کشت سلول‌ها در یک سیستم سه‌بعدی، مدل مناسبی محسوب شده است بنابراین امروزه به عنوان یک مدل سه‌بعدی متداول استفاده می‌گردد (۳۳-۳۱).

به طور کلی مدل‌های سه‌بعدی نسبت به مدل‌های دوبعدی دارای ویژگی‌ها و شرایط نزدیک‌تر به محیط درون بدن هستند، زیرا مراحل گسترده‌تری از آنژیوژنز را در بر می‌گیرند. در حقیقت بسته به ترکیب محیط کشت (درصد سرم، اضافه کردن فاکتورهای رشد و سایتوکاین‌ها)، در این نوع مدل‌ها، سلول‌ها را می‌توان برای جوانه زدن یا ایجاد انشعاب، تکثیر، مهاجرت یا تمایز سه‌بعدی تحریک کرد (۳۴).

مدل‌های سه‌بعدی موجب ایجاد پیشرفت‌های بزرگی در شناخت و درک آنژیوژنز شده‌اند. به نظر می‌رسد مدل‌های سه‌بعدی به خصوص برای مطالعه اثرات سایتوکاین‌ها (۳۵)، نقش متالوپروتئینازها (۳۶) و مسیر فیبرینولیتیک (۳۷، ۳۸) در طی تشکیل لوله عروقی مناسب باشند. به علاوه، این مدل‌ها امکان مطالعه آپوپتوز (۳۹، ۴۰) و اهمیت ترکیب و شکل سوبسترا (۴۱)، نقش مولکول‌های چسبان (۴۲، ۴۳) و اثر شرایط هایپوکسی (۴۴) را فراهم می‌سازد. علاوه بر این، این مدل‌ها در غربال مولکول‌های محرک و بازدارنده آنژیوژنز نیز مفید



شکل ۵: مدل‌های *in vivo*. مدل غشای کوریوآلانتوئیک (CAM) جنین جوجه پس از یک هفته رشد جنین جوجه (A) نوع دیگری از مدل CAM پس از باز کردن و قرار دادن محتویات تخم در درون یک پلیت کشت (B). تحریک آنژیوژنز در قرنیه موش پس از تیمار با مواد آزمایش (مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی کرمانشاه، اطلاعات منتشر نشده) (مشاهده نمونه رنگی تصاویر در انتهای مقالات).

هستند (۴۵، ۴۶).

در این زمینه محققان کشورمان نیز همچون دیگر محققان سراسر دنیا با بهره‌گیری از این مدل‌ها موفق به مطالعه، شناسایی و مطالعه انواعی از ترکیبات مهار کننده آنژیوژنز همچون شناسایی پپتید ضد آنژیوژنزی از غضروف کوسه ماهی (۴۷)، آنتی‌بادی مونوکلونال ضدپلاسمینوژن (۴۸)، مهار کننده تریپسین کونیتز (Kunitz Trypsin Inhibitor)از دانه سویا (۴۹)، مطالعه خواص و مکانیسم‌های ضد رگ‌زایی گیاه موسیر (۳۰، ۵۰)، گیاه مریم گلی (۵۱)، همچنین مطالعه اثر ضدآنژیوژنز چای سبز (۵۲) و عصاره موم عسل (۵۳) شده‌اند.

مدل‌های *in vivo*

علاوه بر مدل‌های *in vitro* ذکر شده در بالا، مدل‌های آزمایشی *in vivo* بسیاری نیز ابداع و توسعه یافته‌اند که انجام آنها به نسبت ساده بوده و علاوه بر این امکان کمیت سنجی بهتری را فراهم می‌سازند. این مدل‌ها شامل مدل غشای کوریوآلانتوئیک جوجه (Chorioallantoic Membrane; CAM)، مدل آنژیوژنز قرنیه موش، مدل Pouch Assay، مدل کیسه هوایی، روش اندازه‌گیری پنجره مزانتریک و مدل آمنیون انسانی است که از میان آنها تنها به توضیح مدل‌های متداول تر پرداخته می‌شود.

مدل جالب توجه غشای کوریوآلانتوئیک جوجه توسط جنین شناسان در حدود ۵۰ سال پیش ابداع و توصیف گردید و تا مدت‌های طولانی جهت مطالعه رشد و نمو اندام جنینی مورد استفاده قرار می‌گرفت.

در این مدل، غشای کوریوآلانتوئیک جنین جوجه‌های ۷ تا ۹ روزه با ایجاد پنجره‌ای در پوسته تخم در معرض قرار می‌گیرد و سپس پیوندهای اندام یا بافت به طور مستقیم بر روی غشای کوریو آلانتوئیک قرار داده می‌شود. سپس پنجره را پوشانده و تخم‌ها مجددا انکوبه می‌شوند. پیوندها پس از طی زمان مناسب انکوباسیون بازیابی شده و مورد بررسی قرار می‌گیرند (شکل ۵، قسمت A) (۵۴، ۵۵). در نوع تغییر یافته این روش، همه محتوای تخم به همراه جنین پس از ۷۲ ساعت از زمان انکوباسیون به یک پلیت کشت پلاستیکی منتقل می‌گردد و آزمایشات مربوطه بر روی آنها انجام می‌گیرد (شکل ۵، قسمت B) (۵۶).

مدل آنژیوژنز قرنیه، یک مدل *in vivo* دیگر است که هنوز به عنوان یکی از مناسب‌ترین این نوع مدل‌ها مطرح می‌باشد. قرنیه به طور طبیعی فاقد عروق قابل مشاهده است به همین دلیل، هر یک از رگ‌ها در قرنیه پس از تحریک توسط بافت‌ها یا فاکتورهای القاکننده آنژیوژنز، جزو رگ‌های جدید محسوب می‌شوند. مدل اولیه این روش بر روی چشم خرگوش انجام گردید (۵۷)، اما اکنون این مدل بر روی چشم موش و رت (۵۸، ۵۹) نیز انجام می‌گردد. به طور خلاصه در این روش یک پاکت در قرنیه ایجاد می‌شود و بافت‌ها یا تومورهای آزمایشی، هنگامی که به این پاکت معرفی می‌گردند، موجب رشد درونی عروق جدید از رگ عضو پیرامونی می‌گردند. علاوه بر این، می‌توان اثر مهارکننده‌های آنژیوژنز را نیز بر روی واکنش مشاهده کرد (شکل ۵، قسمت C) (۶۰).

نتیجه‌گیری

با توجه به اهمیت آنژیوژنز در تحقیقات مربوط به کشف و شناسایی فاکتورهای آنژیوژنیک و عوامل مهارکننده آنژیوژنز جهت درمان بیماری‌های مختلف از جمله انواعی از تومورها که با آنژیوژنز ارتباط تنگاتنگی داشته و به آن وابسته هستند، روش‌های مهار آنژیوژنز که به هدف تداخل با این فرایند مهم جهت‌گیری نموده‌اند، مسیر امیدوارکننده‌ای برای درمان بیماری‌های وابسته به آنژیوژنز محسوب می‌شوند. از جمله مزایای بالقوه ذکر شده این نوع درمان، دسترسی آسان به اهداف داخل عروقی، عدم وجود مشکل مقاومت سلول توموری در مقایسه با شیمی درمانی مرسوم علیه سرطان و همچنین کاربرد گسترده این نوع استراتژی جهت درمان انواع بسیاری از بیماری‌های وابسته به آنژیوژنز می‌باشد. بر این اساس، توسعه و استفاده از مدل‌های مختلف آنژیوژنز برای این منظور بیش از پیش اهمیت پیدا می‌کند، تا جایی که محققان بسیاری در سراسر جهان از مدل‌های مختلف آنژیوژنز جهت مطالعه این پدیده مهم و عوامل تاثیرگذار بر آن سود می‌برند. به طور کلی مدل‌های سه بعدی کشت بافت نقش بسیار ارزشمندی در بیولوژی تومور داشته و موجب فراهم ساختن چندین دیدگاه خیلی مهم در رابطه با بیولوژی تومور شده‌اند. همزمان با افزایش درک ما از همئوستازی، تمایز سلولی و سازمان‌بندی بافتی، مدل‌های *in vitro* نیز محیط تعریف شده و مناسبی را جهت تحقیق بر روی سرطان در مقایسه با محیط پیچیده یک مدل *in vivo* (میزبان) فراهم می‌سازند. با توجه به پتانسیل عظیم کشت‌های سه‌بعدی توموری، امروزه این مدل‌ها توسط بسیاری از شاخه‌های علم بیولوژی و پزشکی و نیز مطالعات با اهداف درمانی، مورد استفاده قرار گرفته و کانون اصلی تحقیق را به خود اختصاص داده‌اند. آنژیوژنز را همچنین می‌توان به صورت *ex vivo* با استفاده از کشت قطعات پیوندی حلقه‌های آئورت در ژل‌های بیولوژیک مورد مطالعه قرار داد. در حقیقت مدل‌های *ex vivo* شکاف بین مدل‌های *in vivo*

و *in vitro* را پر می‌کنند و مزایایی از هر دو سیستم را در بر می‌گیرند به نحوی که اثرات آنژیوژنیک و آنتی آنژیوژنیک فاکتورهای محلول مختلف یا فاکتورهای ماتریکسی به آسانی با استفاده از این مدل قابل ارزیابی و سنجش خواهند بود. در مقایسه، مدل‌های *in vivo* برای شناسایی فعالیت آنتی‌آنژیوژنیک اختصاصیت بیشتری دارند و ارزیابی کامل‌تری از فرایند آنژیوژنز فراهم می‌سازند، اگرچه معمولا مستلزم زمان و صرف هزینه بیشتری هستند. در میان این مدل‌ها، مدل CAM از پراستفادترین مدل‌های *in vivo* جهت مطالعه آنژیوژنز محسوب می‌شود که مزایای زیادی از جمله سهولت انجام کار، هزینه کم و کم بودن ملاحظات اخلاقی در مقایسه با دیگر مدل‌های *in vivo* دارد. علاوه بر این، با توجه به تجهیزات ساده مورد استفاده در آن، از امکان تکرارپذیری بالا برخوردار بوده و نتایج قابل اطمینانی را برای محقق فراهم می‌کند.

References

1. Ruhrberg C. Endogenous inhibitors of angiogenesis. J Cell Sci. 2001; 14: 3215-3216.
2. Martinez A. A new family of angiogenic factors. Cancer Lett. 2006; 236: 157-163.
3. Hertig AT. Angiogenesis in the early human chorion and in the placenta of the macaque monkey, Carnegie Contrib. Embryol. 1935; 25: 37-81.
4. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. New Engl J Med. 1971; 285 (21): 1182-1186
5. Folkman J. Tumor Angiogenesis Factor. Cancer Res. 1974; 34: 2109-2113.
6. Makhni E. Angiogenesis: An Examination of both Tumorigenic and Rehabilitative Properties. MURJ. 2003; 8: 23-26.
7. Nyberg P, Xie L, Kalluri R. Endogenous Inhibitors of Angiogenesis. Cancer Res. 2005; 65: 3967-3979.
8. Vailhé B, Vittet D, Feige JJ. In vitro models of vasculogenesis and angiogenesis. Lab Invest. 2001; 81(4): 439-452.
9. Vernon RB, Sage EH. Between molecules and morphology. Extracellular matrix and creation of vascular form. Am J Pathol. 1995; 147: 873-883.
10. Madri JA, Williams SK. Capillary endothelial cell cultures: Phenotypic modulation by matrix components. J Cell Biol. 1983; 97: 153-165.
11. Ingber DE, Folkman J. Mechanochemical switching between growth and differentiation during fibroblast growth factor-stimulated angiogenesis in vitro: Role of extracellular matrix. J Cell Biol. 1989b; 109: 317-330.
12. Folkman J, Haudenschild C. Angiogenesis in vitro. Nature. 1980; 288: 551-556.
13. Pelletier L, Regnard J, Fellman D, Charbord P. An in vitro model for the study of human bone marrow angiogenesis: Role of hematopoietic cytokines. Lab Invest. 2000; 80: 501-511.
14. Vailhé B, Ronot X, Tracqui P, Usson Y, Tranqui L. In vitro angiogenesis is modulated by the mechanical properties of fibrin and is related to avb3 integrin localization. In Vitro Cell Dev Biol. 1997; 33: 763-773.
15. Iruela-Arispe ML, Sage EH. Endothelial cells exhibiting angiogenesis in vitro proliferate in response to TGF-beta 1. J Cell Biochem. 1993; 52: 414-430.
16. Zimrin AB, Villeponteau B, Maciag T. Models of in vitro angiogenesis: Endothelial cell differentiation on fibrin but not Matrigel is transcriptionally dependent. Biochem Biophys Res Commun. 1995; 213: 630-638.
17. Gerritsen ME, Shen CP, Atkinson WJ, Padgett RC, Gimbrone MAJr, Milstone DS. Microvascular endothelial cells from E-selectin-deficient mice form tubes in vitro. Lab Invest. 1996; 75 (2): 175-184.
18. Sheibani N, Newman PJ, Frazier WA. Thrombospondin-1, a natural inhibitor of angiogenesis, regulates platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 expression and endothelial cell morphogenesis. Mol Biol Cell. 1997; 8: 1329-1341.
19. Matsumura T, Wolff K, Petzelbauer P. Endothelial cell tube formation depends on cadherin 5 and CD31 interactions with filamentous actin. Immunology. 1997; 158: 3408-3416.
20. Schnaper HW, Barnathan ES, Mazar A, Maheshwari S, Ellis S, Cortez SL, et al. Plasminogen activators augment endothelial cell organization in vitro by two distinct pathways. J Cell Physiol. 1995; 165: 107-118.
21. Haralabopoulos GC, Grant DS, Kleinman HK, Lelkes PI, Papaioannou SP, Maragoudakis ME. Inhibitors of basement membrane collagen synthesis prevent endothelial cell alignment in Matrigel in vitro and angiogenesis in vivo. Lab Invest. 1994; 71: 575-582.
22. Yamagishi SI, Yonekura H, Yamamoto Y, Katsuno K, Sato F, Mita I, et al. Advanced glycation end productsdriven angiogenesis in vitro. Biol Chem. 1997; 272: 8723-8730.
23. Yamagishi SI, Kawakami T, Fujimori H, Yonekura H, Tanaka N, Yamamoto Y, et al. Insulin stimulates the growth and tube formation of human microvascular endothelial growth factor. Microvasc Res. 1999; 57: 329-339.
24. DiPietro LA, Nebgen DR, Polverini PJ. Downregulation of endothelial cell thrombospondin 1 enhances in vitro angiogenesis. J Vasc Res. 1994; 31: 178-185.
25. Nicosia RF, Tchao R, Leighton J. Histotypic angiogenesis in vitro: Light microscopic, ultrastructural, and radioautographic studies. In Vitro Cell Dev B. 1982; 18: 538-549.
26. Nicosia RF, Ottinetti A. Growth of microvessels in serum-free matrix culture of rat aorta. Lab Invest. 1990; 63: 115-122.
27. Nicosia RF, Ottinetti A. Modulation of microvascular growth and morphogenesis by reconstituted basement membrane gel in three-dimensional cultures of rat aorta: a comparative study of angiogenesis in Matrigel, collagen, fibrin, and plasma clot. In Vitro Cell Dev B. 1990; 26: 119-128.
28. Arthur WT, Vernon RB, Sage EH, Reed MJ. Growth factors reverse the impaired sprouting of microvessels from aged mice. Microvasc Res. 1998; 55: 260-270.
29. Davis GE, Senger DR. Endothelial extracellular matrix: Biosynthesis, Remodeling and functions during vascular morphogenesis and neovessel stabilization. Circ Res. 2005; 97: 1093-1107.
30. Mohammadi Motlagh HR. The study of anti-angiogenic effects of shallot (Allium hirtifolium) extract and isolation of effective fraction. MS.c Thesis. Tabriz, Iran. Azarbayjan University of Tarbiat Moallem. 2008.
31. Clark JM, Hirtenstein MD. Optimizing culture conditions for the production of animal cells in microcarrier

culture. Annals of the New York Academy of Sciences. 1981; 369: 33-46.
32. Mansouri K, Mirshahi M, Pourfathelah AA, Hasan ZM. Development of an experimental model of angiogenesis in 3-dimensional fibrin matrix for screening of angiogenesis agents. Behbood - the Scientific Journal of Kermanshah. 2005; 9(3): 27-35.
33. Mansouri K, Sheikh Aleslami A, Bahrami GH, Mostafaie A. Isolation of human umbilical vein endothelial cells and development of an angiogenesis model in fibrin matrix. Journal of Zanjan University of Medical Sciences & Health Services. 2006; 14 (55): 17-23.
34. Ferrenq I, Tranqui L, Vailhé B, Gumery PY, Tracqui P. Modelling biological gel contraction by cells: Mechanocellular formulation and cell traction force quantification. Acta Biotheor. 1997; 45: 267-293.
35. Pepper MS, Montesano R, Mandriota SJ, Orci L, Vassali JD. Angiogenesis: A paradigm for balanced extracellular proteolysis during cell€ migration and morphogenesis. Enzyme Protein. 1996; 49: 138-162.
36. Trochon V, Li H, Vasse M, Frankenne F, Thomaidis A, Soria J, et al. Endothelial metalloprotease-disintegrin protein (ADAM) is implicated in angiogenesis in vitro. Angiogenesis. 1998; 2: 277-285.
37. Dubois-Stringfellow N, Jonczyk A, Bautch VL. Perturbations in the fibrinolytic pathway abolish cyst formation but not capillary-like organization of cultured murine endothelial cells. Blood. 1994; 83: 3206-3217.
38. Kroon ME, Koolwijk P, Goor HV, Weidle UH, Collen A, Vander Pluijm G, et al. Role and localization of urokinase receptor in the formation of new microvascular structures in fibrin matrices. Am J Pathol. 1999; 154: 1731-1742.
39. Korff T, Augustin HG. Integration of endothelial cells in multicellular spheroids prevents apoptosis and induces differentiation. J Cell Biol. 1998; 143: 1341-1352
40. Kuzuya M, Satake S, Ramos M, Kanda S, Koike T, Yoshino K, et al. Induction of apoptotic cell death in vascular endothelial cells cultured in three-dimensional collagen lattice. Exp Cell Res. 1999; 248: 498-508.
41. Nehls V, Dreckhahn D. A novel, microcarrier-based in vitro assay for rapid and reliable quantification of three-dimensional cell migration and angiogenesis. Microvasc Res. 1995; 50: 311-322.
42. Guimarães AHC, Laurens N, Weijers EM, Koolwijk P, Hinsbergh VWM, Rijken DC. TAFI and pancreatic carboxypeptidase B (CPB) modulate in vitro capillary tube formation by human microvascular endothelial cells. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2007; 27: 2157-2162.
43. Bayless KJ, Salazar R, Davis GE. RGD-dependent vacuolation and lumen formation observed during endothelial cell morphogenesis in three-dimensional fibrin matrices involves the avb3 and a4b1 integrins. Am J Pathol. 2000; 156: 1673-1683.
44. Phillips PG, Birnby LM, Narendran A. Hypoxia induces capillary network formation in cultured bovine pulmonary microvessel endothelial cells. Am J Physiol. 1995; 268: 789-800.
45. Clapp C, Martial JA, Guzman RC, Rentier-Delure F, Weiner RI. The 16-kilodalton N-terminal fragment of human prolactin is a potent inhibitor of angiogenesis. Endocrinology. 1993; 133: 1292-1299.
46. Bouloumié A, Drexler HCA, Lafontan M, Busse R. Leptin, the product of Ob gene, promotes angiogenesis. Circ Res. 1998; 83: 1059-1066.
47. Hasan ZM, Feyzi R, Sheikhian A, Shahrokh S, Shahabian F, Bargahi A, et al. Low molecular weight fraction of shark cartilage can modulate immune responses and abolish angiogenesis. Int J Immunopharmaco. 2005; 4(3): 961-970
48. Mansouri K, Maleki A, Mirshahi M, Pourfathelah AA, Hasan ZM, Taheripak R. Anti-plasminogen monoclonal antibody (MC2B8) inhibits angiogenesis. Pakistan J Biol Sci. 2007; 10 (19): 3450-3453.
49. Shakiba Y, Mansouri K, Mostafaie A. Anti-angiogenic effect of soybean kunitz trypsin inhibitor on human umbilical vein endothelial cells. Fitoterapia. 2007; 78: 587-589.
50. Mohammadi Motlagh HR, Mansouri K, Shakiba Y, Keshevarz M, Khodarahmi R, Siami A, et al. Anti-angiogenic effect of aqueous extract of shallot (Allium ascalonicum) bulbs in rat aorta ring model. Yakhteh Med J. 2009; 11(2): 184-189.
51. Keshevarz M. The study of anti-angiogenic effect of Salvia officinalis on human umbilical vein endothelial cells. Presented for the MS.c, Kermanshah, Iran, Razi University, 2009.
52. Shakiba Y, Mostafaie A. Inhibition of corneal neovascularization with a nutrient mixture containing Lysine, Proline, ascorbic acid, and green tea extract. Arch Med Res. 2007; 38: 789-791.
53. Keshavarz M, Mostafaie A, Mansouri K, Shakiba Y, Mohammadi Motlagh HR. Inhibition of corneal neovascularization with Propolis Extract. Arch Med Res. 2009; 40: 59-61
54. Hamburger V, Hamilton HL. A series of normal stages in the development of the chick embryo. J Morphol. 1951; 88: 49-92.
55. Brooks PC, Montgomery AM, Cheresh DA. Use of the 10-day-old chick embryo model for studying angiogenesis. Methods Mol Biol. 1999; 129: 257-269.
56. Auerbach R, Kubai L, Knighton D, Folkman J. A simple procedure for the long term cultivation of chicken embryos. Dev Biol. 1974; 41: 391-394.
57. Gimbrone MA, Leapman SB, Cotran RS, Folkman J. Tumor dormancy in vivo by prevention of neovascularization. J Exp Med. 1974; 136: 261-276.
58. Muthukkaruppan VR, Kubai L, Auerbach R. Tumor-induced neovascularization in the mouse eye. J Natl Cancer Inst. 1982; 69: 699-708.
59. Auerbach R, Lewis R, Shinners B, Kubai L, Akhtar N. Angiogenesis assays: a critical overview. Clin Chem. 2003; 49: 32-40.
60. Board RE, Thistlethwaite FC, Hawkins RE. Anti-angiogenic therapy in the treatment of advanced renal cell cancer. Cancer Treat Rev. 2007; 33 (1): 1-8.