مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و پنجم/شماره‌ی ٤٢٤/هفته‌ی چهارم اردیبهشت ماه ۱۳۹۶

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۸/۴
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱/۲۳

ارزیابی اثرات پرده‌ی آمنیون تازه تهیه شده و نگهداری شده به روش انجماد بر میزان زنده ماندن سلول‌های سرطانی HeLa و MDA-MB-۲۳۱ و آنژیوژنز حلقه‌ی آئورت موش صحرایی

مریم ذوالقدر[۱]، خشایار مدرسی‌فر[۲]، سارا عزیزیان[۲]، حسن نیک‌نژاد[۳]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: تحقیقات نشان داده‌اند که پرده‌ی آمنیون و سلول‌های آن به دلیل دارا بودن خواص ضد سرطانی، می‌توانند گزینه‌ی مناسبی برای درمان سرطان باشند. مطالعه‌ی حاضر با هدف بررسی تأثیر انجماد بر خاصیت آنتی‌آنژیوژنیک و القای آپوپتوز پرده‌ی آمنیون انجام شد.

روش‌ها: در این تحقیق، با قرار دادن محیط کشت رویی پرده‌ی آمنیون تازه و نگهداری شده به روش انجماد بر روی سلول‌های سرطانی (HeLa و MDA-MB-۲۳۱) به مدت ۲۴ ساعت، درصد زیست‌پذیری سلول‌های سرطانی با استفاده از آزمون 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) مشخص گردید. جهت بررسی تغییر آنژیوژنز، از آزمون حلقه‌ی آئورت رت استفاده شد. بدین ترتیب طی ۷ روز، مهار تکثیر سلول‌های شبه فیبروبلاستی و شبه مویرگی از حلقه‌ی آئورت در هر دو سطح سلول‌های اپی‌تلیال و مزانشیمال پرده‌ی آمنیون تازه و نگهداری شده به روش انجماد، در حضور و پس از حذف سلول‌های اپی‌تلیال مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: زیست‌پذیری سلول‌های سرطانی تیمار شده با محیط کشت رویی پرده‌ی آمنیون تازه و نگهداری شده به روش انجماد، به صورت وابسته به دوز کاهش یافت و تفاوت معنی‌داری بین دو بافت مشاهده نشد. در آزمون حلقه‌ی آئورت در پرده‌ی آمنیون تازه و نگهداری شده به روش انجماد، حضور سلول‌های بنیادی اپی‌تلیال پرده‌ی آمنیون، از نفوذ سلول‌های شبه فیبروبلاست و ایجاد آنژیوژنز ممانعت نمود. همچنین، پس از حذف سلول‌های اپی‌تلیال، سلول‌های شبه فیبروبلاستی در هر دو سطح اپی‌تلیال و مزانشیمال پرده‌ی آمنیون تازه و نگهداری شده به روش انجماد نفوذ کرد.

نتیجه‌گیری: محیط کشت رویی پرده‌ی آمنیون نگهداری شده به روش انجماد مانند بافت تازه، باعث کاهش زیست‌پذیری سلول‌های سرطانی می‌شود. همچنین، حفظ لایه‌ی اپی‌تلیال و غشای پایه‌ی پرده‌ی آمنیون، منجر به حفظ خاصیت آنژیومدولاتوری پرده‌ی آمنیون طی انجماد می‌گردد.

واژگان کلیدی: پرده‌ی آمنیون، انجماد، آنژیوژنز، سلول‌های سرطانی

ارجاع: ذوالقدر مریم، مدرسی‌فر خشایار، عزیزیان سارا، نیک‌نژاد حسن. **ارزیابی اثرات پرده‌ی آمنیون تازه تهیه شده و نگهداری شده به روش انجماد بر میزان زنده ماندن سلول‌های سرطانی HeLa و MDA-MB-۲۳۱ و آنژیوژنز حلقه‌ی آئورت موش صحرایی.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۶؛ ۳۵ (۴۲۴): ۳۴۴-۳۴۰

مقدمه

آمنیون به عنوان درونی‌ترین لایه‌ی پرده‌های جنینی، غشای نیمه شفافی است که از یک لایه‌ی داخلی سلول‌های اپی‌تلیال، یک غشای پایه‌ی ضخیم و یک استرومای بدون عروق تشکیل شده است (۱). آمنیون انسان به عنوان یک ساختار زیستی، طی صد سال اخیر در ترمیم جراحی‌ها (۲)، پیوند پوست (۳)، ترمیم سوختگی‌ها و زخم‌های پوستی، درمان بیماری‌های مختلف چشمی (٤)، کنترل عفونت (۵) و همچنین، به جای پوست از دست رفته در سندرم Stevens-Johnson استفاده شده است. به‌تازگی نیز پتانسیل آن برای کاربرد در مهندسی بافت عروق مورد ارزیابی قرار گرفته است (٦).

۱- پزشک عمومی، مرکز تحقیقات نانوتکنولوژی پزشکی و مهندسی بافت، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
۲- گروه بیومتریال، دانشکده‌ی مهندسی پزشکی، دانشگاه صنعتی امیرکبیر، تهران، ایران
۳- دانشیار، مرکز تحقیقات نانوتکنولوژی پزشکی و مهندسی بافت و گروه مهندسی بافت و طب بازساختی، دانشکده‌ی فن‌آوری‌های نوین پزشکی و گروه فارماکولوژی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: حسن نیک‌نژاد
Email: niknejad@sbmu.ac.ir

سلول‌های اپی‌تلیال آمنیون با ترشح فاکتورهای پروآپوپتوتیک و مهار آنژیوژنز (رگ‌زایی) و تعدیل سیستم ایمنی، گزینه‌ی مناسبی جهت مقابله با سرطان می‌باشند (۸-۷). مطالعات گذشته نشان داده‌اند که پرده‌ی آمنیون از طریق القای آپوپتوز، باعث کاهش زیست‌پذیری سلول‌های سرطانی می‌شود (۳). همچنین، تحقیقات دیگر گزارش کرده‌اند که آمنیون توانایی مهار آنژیوژنز به عنوان یکی از عوامل رشد تومور را دارد (۹).

یکی از روش‌های نگهداری طولانی مدت، انجماد (Cryopreservation) است که در آن، پرده‌ی آمنیون در محلول کرایوپروتکتنت (Cryoprotectant) قرار می‌گیرد و به مدت ٦ ماه در دمای ۸۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری می‌شود. انجماد می‌تواند تأثیراتی از جمله کاهش زیست‌پذیری سلول‌ها و کاهش توانایی تمایز بر روی آمنیون را به دنبال داشته باشد (۱۰). هدف از انجام پژوهش حاضر، بررسی اثر نگهداری به روش انجماد بر خواص ضد سرطانی آمنیون از جمله کاهش زیست‌پذیری سلول‌های سرطانی و تأثیر آن بر آنژیوژنز بود.

روش‌ها

برای آماده‌سازی آمنیون، جفت از مادرانی با بارداری طبیعی به دنبال سزارین انتخابی از بیمارستان عرفان تهران تهیه شد و در این راستا از والدین رضایت‌نامه اخذ گردید. بافت آمنیون در شرایط استریل به روش Peeling از کوریون جدا گردید و برای پاک کردن لکه‌های خونی، در محلول Phosphate buffered saline (PBS) سرد شستشو داده شد.

جهت انجام فرایند انجماد، قطعات پرده‌ی آمنیون درون فالکون حاوی ۷۰ درصد PBS، ۱۰ درصد Fetal bovine serum (FBS)، ۱۰ درصد Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM) و ۱۰ درصد Dimethyl sulfoxide (DMSO) قرار داده شد و به مدت ٦ ماه در فریزر با دمای ۸۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری گردید. سپس، قطعات آمنیون چند بار با محلول PBS دمای ٤ درجه‌ی سانتی‌گراد شسته شد تا محلول کرایوپروتکتنت به طور کامل حذف شود (۱۰). سلول‌های سرطانی HeLa و MDA-MB-۲۳۱ (تهیه شده از انستیتوپاستور ایران) در محیط کشت Roswell Park Memorial Institute (RPMI) و حاوی ۱۰ درصد FBS و ۱ درصد پنی‌سیلین- استرپتومایسین کشت داده شد و در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و دی‌اکسید کربن ۵ درصد نگهداری گردید. پرده‌ی آمنیون تازه و نگهداری شده به روش انجماد، به قطعات ۲ × ۲ سانتی‌متری بریده شد و هر قطعه در یک چاهک پلیت ۱۲ خانه‌ای که سطح اپی‌تلیال آن رو به بالا بود، قرار گرفت. به هر چاهک نیز ۱ میلی‌لیتر از محیط کشت DMEM حاوی ۱۰ درصد FBS و ۱ درصد پنی‌سیلین- استرپتومایسین اضافه گردید. سپس پلیت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و دی‌اکسید کربن ۵ درصد نگهداری شد. پس از ٢٤ ساعت، محیط کشت روی هر چاهک جمع‌آوری و بعد از فیلتراسیون با فیلترهای ۰/۲۲ میکرون، به سلول‌های سرطانی به ترتیب ۲۰۰، ٤۰۰، ٦۰۰ و ۸۰۰ میکرولیتر اضافه شد. گروه شاهد شامل سلول‌های سرطانی در محیط کشت RPMI بود. میزان زنده بودن سلول‌های سرطانی که با محیط کشت روی آمنیون تیمار شده بودند، پس از ٢٤ ساعت با استفاده از آزمون 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) و با تقسیم میزان اختلاف جذب نوری بین نمونه‌های تیمار و نمونه‌های بلنک بر جذب نوری گروه شاهد، به صورت درصد بررسی و بیان گردید.

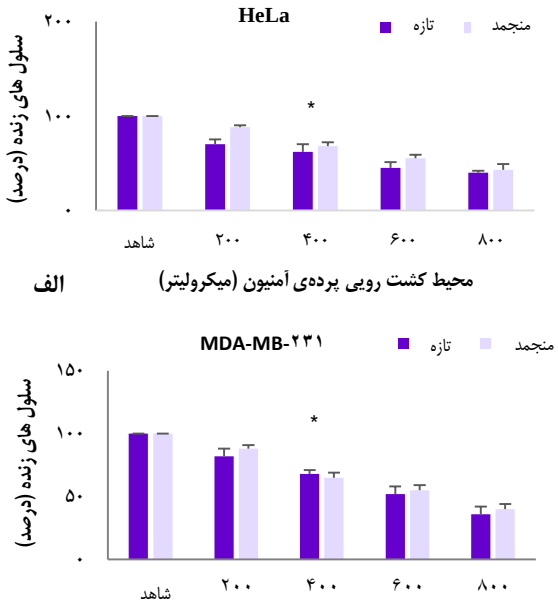
برای بررسی آنژیوژنز، پرده‌ی آمنیون تازه و نگهداری شده به روش انجماد به دو قطعه تقسیم شد. یکی دست نخورده باقی ماند و به قطعات ۲ × ۲ سانتی‌متری تقسیم گردید. برای حذف سلول‌های اپی‌تلیال آمنیونی از روی پرده‌ی آمنیون، از آنزیم ۰/۰۳ درصد تریپسین- Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) و روش مکانیکی (به وسیله‌ی Cell Scraper) استفاده شد. قطعات ۲ × ۲ سانتی‌متری بریده شده از پرده‌ی آمنیون در کف پلیت‌های ۱۲ خانه‌ای به دو صورت بالا بودن سطح اپی‌تلیال و بالا بودن سطح مزانشیمال، پهن شدند. سپس ۲ میلی‌لیتر از محیط DMEM حاوی ۱۵ درصد FBS، ۱۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر Basic fibroblast growth factor (bFGF) و ۱ درصد پنی‌سیلین- استرپتومایسین به هر چاهک اضافه شد و پلیت‌ها در انکوباتور کشت سلولی با دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و ۵ درصد دی‌اکسید کربن قرار گرفتند.

بررسی برون‌تنی آنژیوژنز با استفاده از آزمایش حلقه‌ی آئورت رت صورت گرفت. حلقه‌ها از آئورت نزولی توراسیک رت‌های ۱۲ هفته‌ای با وزن ۱۵۰ تا ۲۰۰ گرم، به دست آمد. سپس آئورت به قطعات حلقوی با ضخامت ۲ میلی‌متر تقسیم شد و این قطعات به سرعت روی آمنیون در پلیت‌های کشت از قبل تهیه شده قرار داده شد و به مدت ۸ روز نگهداری گردید که در این مدت روند آنژیوژنز روی آن‌ها با میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفت. محیط کشت هر ۲ روز تعویض می‌شد. تمامی فرایند تحقیقاتی به تأیید کمیته‌ی اخلاق دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی رسید.

داده‌های به دست آمده از نمونه‌ها به صورت میانگین و انحراف معیار بیان گردید و پس از آن با استفاده از آزمون‌های ANOVA و Tukey مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. $P < ۰/۰۵۰$ به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

حجم‌های ۲۰۰، ۴۰۰، ۶۰۰ و ۸۰۰ میکرولیتر از محیط‌های روی پرده‌ی آمنیون تازه و نگهداری شده به روش انجماد به صورت معنی‌داری میزان زنده بودن سلول‌های سرطانی HeLa و MDA-MB-۲۳۱ را به صورت وابسته به دوز نسبت به گروه شاهد کاهش داد ($P < ۰/۰۵۰$) و بیشترین میزان کاهش در غلظت ۸۰۰ میکرولیتر مشاهده شد (شکل ۱، قسمت‌های الف و ب).

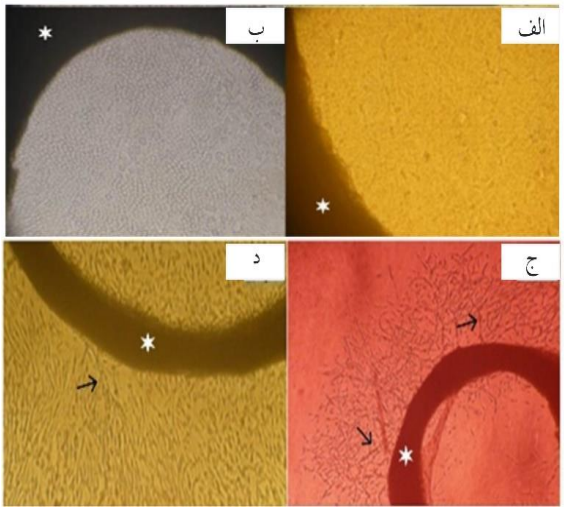


شکل ۱. درصد زیست‌پذیری سلول‌های سرطانی HeLa (الف) و سلول‌های سرطانی MDA-MB-۲۳۱ (ب) نگهداری شده با محیط کشت رویی پرده‌ی آمنیون به روش انجماد و تازه

$P < ۰/۰۵^{*}$

در نمونه‌هایی که بافت آمنیون تازه دارای سلول‌های اپی‌تلیال بود، حلقه‌ی آئورت چسبندگی اندکی به سطح اپی‌تلیال پرده‌ی آمنیون داشت؛ در حالی که وقتی سلول‌های اپی‌تلیال حذف شده بودند، حلقه‌ی آئورت پس از ۲ ساعت به غشای پایه متصل می‌شد. وقتی سطح مزانشیمال به سمت بالا قرار داشت، 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 به دنبال آن، جهت‌گیری خاص و تشکیل مویرگ مشاهده نشد. نتایج مشابهی از پرده‌ی آمنیون نگهداری شده به روش انجماد به دست آمد و تفاوت قابل ملاحظه‌ای وجود نداشت (شکل ۲، قسمت‌های الف و ب).

پس از گذشت ۲ روز از قرار دادن حلقه‌ی آئورت بر روی آمنیون فاقد سلول‌های اپی‌تلیال، نفوذ سلول‌های فیبروبلاستی دوکی شکل به پرده‌ی آمنیون در هر دو سطح اپی‌تلیال و مزانشیمال مشاهده گردید که به تدریج بیشتر شد و جهت‌گیری خاصی پیدا کرد. در روز پنجم، تشکیل مورفولوژی‌های شبه مویرگی مشهود و در روز هفتم نیز شبه مویرگ‌های تشکیل شده به خوبی قابل رؤیت بود که هم در داخل و هم در خارج حلقه‌ی آئورت در هر دو سطح اپی‌تلیالی و مزانشیمالی مشاهده گردید. این حالت هم در سطح اپی‌تلیال و هم در سطح مزانشیمال وجود داشت. نتایج مشابهی از آمنیون نگهداری شده به روش انجماد به دست آمد و تفاوت قابل ملاحظه‌ای مشخص نگردید. شکل ۲ (قسمت‌های ج و د) نتایج حاصل را در هر دو سطح اپی‌تلیال و مزانشیمال پرده‌ی آمنیون نگهداری شده به روش انجماد نشان می‌دهد.



شکل ۲. سطح مزانشیمال پرده‌ی آمنیون نگهداری شده به روش انجماد (الف)، سطح اپی‌تلیال پرده‌ی آمنیون نگهداری شده به روش انجماد (ب) در حضور سلول‌های اپی‌تلیال (بزرگ‌نمایی ۴۰X)، آنژیوژنز حلقه‌ی آئورت رت روی پرده‌ی آمنیون فاقد سلول‌های اپی‌تلیال آمنیونی (ج و د)، سطح اپی‌تلیال پرده‌ی آمنیون نگهداری شده به روش انجماد (بزرگ‌نمایی ۱۰X) (ج) و سطح مزانشیمال پرده‌ی آمنیون نگهداری شده به روش انجماد (بزرگ‌نمایی ۲۰X) (د)

ستاره سفید نشان دهنده‌ی حلقه‌ی آئورت و فلش سیاه بیانگر کاپیلاری‌های تشکیل شده است.

بحث

نتایج تحقیقی نشان داد که زیست‌پذیری سلول‌های سرطانی بعد از تیمار با محیط کشت رویی آمنیون از طریق القای آپوپتوز و افزایش بیان کاسپاز ۳ و ۸ کاهش پیدا می‌کند (۱۱). در پژوهش حاضر نیز زیست‌پذیری سلول‌های سرطانی HeLa و MDA-MB-۲۳۱ تیمار

شده با محیط کشت روی پرده‌ی آمنیون تازه و نگهداری شده به روش انجماد کاهش یافت و این میزان کاهش در بافت نگهداری شده به روش انجماد در مقایسه با بافت تازه، تفاوت محسوسی نداشت که علت آن می‌تواند حفظ شدن لایه‌ی سلول‌های اپی‌تلیال پرده‌ی آمنیون طی فرایند انجماد باشد. یافته‌های مطالعه‌ی Magatti و همکاران نشان داد که منبع اصلی ترشح مواد ضد سرطان، سلول‌های پرده‌ی آمنیون می‌باشد (۱۲).

نتایج حاصل از آزمون حلقه‌ی آئورت حاکی از آن بود که آمنیون دارای خاصیت آنژیوژنزی و ضد آنژیوژنزی است؛ به طوری که در حضور سلول‌های اپی‌تلیال در پرده‌ی آمنیون دست نخورده، شواهدی از آنژیوژنز در هیچ یک از سطوح اپی‌تلیال و مزانشیمال پرده‌ی آمنیون مشاهده نشد و در عدم حضور سلول‌های اپی‌تلیال، ساختارهای شبه فیبروبلاستی در هر دو سطح سلول‌های اپی‌تلیال و مزانشیمال ایجاد گردید که با نتایج تحقیقات قبلی (۱۳، ۱۱) همخوانی داشت. مهار آنژیوژنز با استفاده از پرده‌ی آمنیون، در زمینه‌ی چشم‌پزشکی به طور گسترده‌ای مورد استفاده قرار می‌گیرد. از آن‌جایی که آنژیوژنز در جراحی‌هایی مانند بازسازی قرنیه، می‌تواند باعث کدورت آن و کاهش دید بیمار شود، بنابراین، استفاده از داربست‌هایی مانند پرده‌ی آمنیون حاوی سلول که باعث مهار آنژیوژنز می‌گردد، مورد استقبال قرار گرفته است (۱٤). پرده‌ی آمنیون موادی مانند مهار کننده‌های بافتی متالوپروتئینازهای ۱، ۲، ۳ و ٤ (Metalloproteinases یا TIMPs)، کلاژن ۱۸ (که به اندوستاتین تبدیل می‌شود) و ترومبوسپاندین-۱ را ترشح می‌کند که می‌تواند آنژیوژنز را مهار نماید و مانع رشد تومور شود (۱۵).

در مجموع، روش انجماد تأثیری بر خاصیت آنتی‌پرولیفراتیو و آنتی‌آنژیوژنزی پرده‌ی آمنیون ندارد و به منظور کاربرد آن، انجام مطالعات بیشتر در آینده ضروری می‌باشد.

تشکر و قدردانی

این مطالعه برگرفته از پایان‌نامه‌ی مقطع پزشکی عمومی با شماره‌ی طرح پژوهشی ۲۱۱۵ می‌باشد که با حمایت مالی به شماره‌ی ۱۳۹۲-۱-۱۲۱-۱۲۸۰ مرکز تحقیقات نانوتکنولوژی پزشکی و مهندسی بافت دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی انجام گردید. بدین وسیله از آقای دکتر حبیب‌اله پیروی و کارکنان محترم اتاق عمل بیمارستان عرفان تهران تقدیر و تشکر به عمل می‌آید.

References

1. Dua HS, Gomes JA, King AJ, Maharajan VS. The amniotic membrane in ophthalmology. Surv Ophthalmol 2004; 49(1): 51-77.
2. Riau AK, Beuerman RW, Lim LS, Mehta JS. Preservation, sterilization and de-epithelialization of human amniotic membrane for use in ocular surface reconstruction. Biomaterials 2010; 31(2): 216-25.
3. 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.
4. Tseng SC. Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction. Biosci Rep 2001; 21(4): 481-9.
5. Adly OA, Moghazy AM, Abbas AH, Ellabban AM, Ali OS, Mohamed BA. Assessment of amniotic and polyurethane membrane dressings in the treatment of burns. Burns 2010; 36(5): 703-10.
6. Kakavand M, Yazdanpanah G, Ahmadiani A, Niknejad H. Blood compatibility of human amniotic membrane compared with heparin-coated ePTFE for vascular tissue engineering. J Tissue Eng Regen Med 2015. [Epub ahead of print].
7. Schussler O, Shen M, Shen L, Carpentier SM, Kaveri S, Carpentier A. Effect of human immunoglobulins on the immunogenicity of porcine bioprostheses. Ann Thorac Surg 2001; 71(5 Suppl): S396-S400.
8. Niknejad H, Yazdanpanah G, Ahmadiani A. Induction of apoptosis, stimulation of cell-cycle arrest and inhibition of angiogenesis make human amnion-derived cells promising sources for cell therapy of cancer. Cell Tissue Res 2016; 363(3): 599-608.
9. O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, Chen C, Rosenthal RA, Moses M, et al. Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. Cell 1994; 79(2): 315-28.
10. 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(1): 56-63.
11. Niknejad H, Khayat-Khoei M, Peirovi H, Abolghasemi H. Human amniotic epithelial cells induce apoptosis of cancer cells: a new anti-tumor therapeutic strategy. Cytotherapy 2014; 16(1): 33-40.
12. Magatti M, De MS, Vertua E, Parolini O. Amniotic membrane-derived cells inhibit proliferation of cancer cell lines by inducing cell cycle arrest. J Cell Mol Med 2012; 16(9): 2208-18.
13. Yazdanpanah G, Paeini-Vayghan G, Asadi S, Niknejad H. The effects of cryopreservation on angiogenesis modulation activity of human amniotic membrane. Cryobiology 2015; 71(3): 413-8.
14. Ma KN, Thanos A, Chodosh J, Shah AS, Mantagos IS. A novel technique for amniotic membrane transplantation in patients with acute Stevens-Johnson syndrome. Ocul Surf 2016; 14(1): 31-6.
15. Hao Y, Ma DH, Hwang DG, Kim WS, Zhang F. Identification of antiangiogenic and antiinflammatory proteins in human amniotic membrane. Cornea 2000; 19(3): 348-52.

Journal of Isfahan Medical School
Received: 25.10.2016
Vol. 35, No. 424, 4th Week, May 2017
Accepted: 12.04.2017

Evaluating the Effects of Fresh and Cryopreserved Amniotic Membrane on Viability of HeLa and MDA-MB-231 Cancer Cells and Angiogenesis of Rat Aorta Ring

Maryam Zolghadr[1], Khashayar Modaresifar[2], Sara Azizian[2], Hassan Niknejad[3]

Original Article

Abstract

Background: Previous studies have shown that the amniotic membrane and its cells can be an appropriate choice for cancer treatment due to their anticancer properties. This research was designed to evaluate the impact of cryopreservation method on the anti-angiogenic and apoptosis induction properties of amniotic membrane.

Methods: In this study, the cancer cells were treated with fresh and cryopreserved amniotic membrane condition medium during 24 hours and the percentage of cancer cells viability was determined using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. To evaluate the changes of angiogenesis, the rat aorta ring assay was examined for both fresh and cryopreserved amniotic membrane within 7 days, and penetration and lack of penetration of fibroblasts-like and capillary-like cells of the aorta were evaluated in both amniotic epithelial and mesenchymal sides of fresh and cryopreserved amniotic membrane, in the presence and absence of epithelial cells.

Findings: Viability of cultured cancer cells treated with condition medium of fresh and cryopreserved amniotic membrane decreased dose-dependently and no significant difference was observed between the fresh and cryopreserved amniotic membrane. The aorta ring assay in fresh and cryopreserved amniotic membrane revealed that the amniotic epithelial stem cells inhibited the penetration of fibroblast-like cells and angiogenesis. Moreover, the penetration of fibroblast-like cells was observed in both epithelial and mesenchymal sides of fresh and cryopreserved amniotic membrane, after the removing epithelial cells.

Conclusion: According to the results of this study, cryopreserved amniotic membrane condition medium reduced the viability of cancer cells, as well as the fresh amniotic membrane condition medium. Moreover, it seems that the maintenance of epithelial cells layer and basement membrane of the amniotic membrane preserves the angiomodulatory properties of amniotic membrane in the cryopreservation method.

Keywords: Amnion, Cryopreservation, Neovascularization, Carcinoma

Citation: Zolghadr M, Modaresifar K, Azizian S, Niknejad H. **Evaluating the Effects of Fresh and Cryopreserved Amniotic Membrane on Viability of HeLa and MDA-MB-231 Cancer Cells and Angiogenesis of Rat Aorta Ring.** J Isfahan Med Sch 2017; 35(424): 340-4.

1- General Practitioner, Nanomedicine and Tissue Engineering Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
2- Department of Biomaterials, School of Biomedical Engineering, Amirkabir University of Technology, Tehran, Iran
3- Associate Professor, Nanomedicine and Tissue Engineering Research Center AND Department of Tissue Engineering and Regenerative Medicine, School of Advanced Technologies in Medicine AND Department of Pharmacology, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
Corresponding Author: Hassan Niknejad, Email: niknejad@sbmu.ac.ir