

# ORIGINAL ARTICLE

## ***Evaluation of Blood Compatibility of Amnion Epithelial Side Compared to Artificial Vessel (Polytetrafluoroethylene)***

Mona Kakavand<sup>1</sup>,  
Ghasem Yazdanpanah<sup>1</sup>,  
Hassan Niknejad<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup> General Practitioner, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

<sup>2</sup> Associate Professor, Department of Tissue Engineering and Regenerative Medicine, School of Advanced Technologies in Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

<sup>3</sup> Nanomedicine and Tissue Engineering Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

(Received November 10, 2015 Accepted July 30, 2015)

### **Abstract**

**Background and purpose:** Amniotic membrane (AM) is a proper candidate for vascular tissue engineering. The aim of this study was to evaluate the hemocompatibility of the epithelial surface of the AM.

**Materials and methods:** In this study, we assessed the effects of the epithelial surface of the AM on blood coagulation system by measuring activated partial thromboplastin time (aPTT), prothrombin time (PT), clotting time (CT), hemolysis and platelet aggregation compared with expanded Polytetrafluoroethylene (ePTFE). The amount of P-selectin was measured to test the platelet activation using ELISA. Adhesion and morphological changes of platelets were analyzed by scanning electron microscopy.

**Results:** The results of aPTT, PT and CT tests showed that the epithelial surface of the AM activated the external coagulation pathway less than ePTFE and had same effects as this synthetic material on the internal coagulation pathway. Furthermore, the epithelial surface of the AM suppressed aggregation, activation and adhesion of the platelets and in turn inhibited initiation of clot formation. In contrast, more number of platelets were adhered and activated on the surface of ePTFE.

**Conclusion:** Based on suitable features of the AM and hemocompatibility results of amniotic epithelial cells which have stem cell characteristics, the AM could be a good candidate for vascular tissue engineering.

**Keywords:** Amniotic membrane, hemocompatibility, tissue engineering, ePTFE

J Mazandaran Univ Med Sci 2015; 25(131): 67-78 (Persian).

## بررسی خون سازگاری سطح اپی تلیال پرده آمنیون در مقایسه با رگ صناعی (پلی ترافلورواتیلن)

مونا کاکاوند<sup>۱</sup>

قاسم یزدان پناه<sup>۱</sup>

حسن نیک نژاد<sup>۲</sup>

### چکیده

**سابقه و هدف:** پرده آمنیون یکی از داربست‌های مناسب جهت استفاده در مهندسی بافت عروق می‌باشد. این مطالعه با هدف ارزیابی خون سازگاری سطح اپی تلیال پرده آمنیون و مقایسه با رگ صناعی انجام شده است.

**مواد و روش‌ها:** در مطالعه تجربی حاضر تاثیر سطح اپی تلیال پرده آمنیون بر روی آزمون‌های انعقاد خون شامل زمان پروترومبین (PT)، زمان پارشیال ترومیوپلاستین (aPTT)، زمان تشکیل لخته (CT)، همولیز و تجمع پلاکتی در مقایسه با پلی ترافلورواتیلن انسپاسی (ePTFE) مورد بررسی قرار گرفت. جهت بررسی میزان فعال شدن پلاکت‌ها مقادیر p-selectin آزاد شده پس از تماس با سطح اپی تلیال پرده آمنیون به روش الیزا اندازه‌گیری شد. هم‌چنین میزان چسبندگی و تغییر مورفوولوژی پلاکت‌ها توسط میکروسکوپ الکترونی مورد ارزیابی قرار گرفت.

**یافته‌ها:** نتایج آزمون‌های PT، aPTT و CT در این مطالعه نشان دادند که سطح اپی تلیال پرده آمنیون مسیر خارجی انعقاد را کم تر از ePTFE فعال می‌کند و هم‌چنین اثر مشابهی با ePTFE در فعال کردن مسیر داخلی انعقاد دارد. هم‌چنین سطح اپی تلیال پرده آمنیون مانع از تجمع، فعال شدن و اتصال پلاکت‌ها به آن می‌شود در حالی که تعداد پلاکت‌های متصل به ePTFE بیشتر بود.

**استنتاج:** با توجه به خواص ویژه پرده آمنیون و یافته‌های امیدوارکننده‌ای که از آزمون‌های خون سازگاری سطح اپی تلیال پرده آمنیون در این مطالعه به دست آمده است، این پرده می‌تواند جایگزین مناسبی جهت استفاده در مهندسی بافت عروق باشد.

**واژه‌های کلیدی:** پرده آمنیون، خون سازگاری، مهندسی بافت، ePTFE

### مقدمه

به میزان شدت این بیماری‌ها دارد که شامل دارو درمانی، آنتیوگرافی عروق کرونر و پیوند عروقی می‌باشد(۱). استاندارد طلایی در روند جایگزینی عروق استفاده از عروق خود فرد می‌باشد ولی متابفانه در بسیاری از

اولین علت مرگ در دنیا بیماری‌های قلبی-عروقی می‌باشد. بیماری‌های قلبی-عروقی شامل بیماری‌های عروق کرونری قلب، بیماری‌های عروق مغزی و بیماری‌های عروق محیطی می‌باشند. درمان انتخابی بستگی

E-mail: niknejad@sbmu.ac.ir

مؤلف مسئول: حسن نیک نژاد - تهران: بیمارستان طالقانی، دانشکده فناوری‌های نوین پزشکی، ساختمان شماره ۲

۱. پژوهش عمومی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

۲. دانشیار، گروه مهندسی بافت و طب باساختی، دانشکده فناوری‌های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

۳. مرکز تحقیقات نانوتکنولوژی پزشکی و مهندسی بافت، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

۴. تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۷/۱۰ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۴۰۰/۸/۲۷ تاریخ تصویب: ۱۴۰۰/۴/۲۷

خون سازگاری عروق صناعی استفاده شده است. از جمله این روش‌ها می‌توان به پوشاندن سطوح داخلی عروق صناعی با کربن، هپارین و سلول‌های اندوتیال اشاره کرد(۱۴،۲). ولی تا کنون روش‌های مورد استفاده نتوانسته‌اند خون سازگاری مناسبی را در عروق صناعی به وجود آورند، به خصوص در مواردی که از آن‌ها به عنوان جایگزین وریدی استفاده می‌شود. پرده آمنیون دارای ویژگی‌های منحصر به فردی می‌باشد که آن را داریست مناسبی چهت استفاده در مهندسی بافت به عنوان جایگزین عروقی کرده است. این بافت خواص ضد باکتری(۱۵)، ضد التهاب(۱۶)، ضد فیروزی(۱۷) و خواص مکانیکی مناسب چهت مهندسی بافت دارد(۱۸). هم‌چنین سلول‌های اپی‌تیال پرده آمنیون به علت عدم HLA-A، HLA-B، HLA-C و DR-، هم‌چنین بیان HLA-G دارای ایمنی زایی پایینی می‌باشند و مطالعات بالینی نشان داده‌اند که پرده آمنیون موجب تحریک سیستم ایمنی نمی‌شود(۱۹). یکی از موانع همیشگی در مهندسی بافت برای ساخت جایگزین عروقی مسئله خون سازگاری می‌باشد(۲۰). در مطالعه حاضر برای اولین بار به بررسی خون سازگاری سطح اپی‌تیال پرده آمنیون در مقایسه با ePTFE پوشیده شده با هپارین به عنوان جایگزین عروق صناعی مورد استفاده در بالین، پرداخته شده است.

## مواد و روش‌ها

در مطالعه تجربی حاضر پس از کسب تایید کمیته اخلاق پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، بافت‌های جفت (۲۰ عدد) حاصل از سزارین‌های انتخابی در هفته‌های ۳۶ تا ۳۸ بارداری از بیمارستان عرفان جمع‌آوری شدند. مادران وارد شده در این مطالعه از نظر نشانگرهای سری HIV، سیفلیس، هپاتیت B و C منفی بودند. پس از انتقال بافت‌های جفت به آزمایشگاه، پرده آمنیون از کوریون جدا شد و در محلول بافر (PBS or Phosphate Buffered Saline) فسفات سالین به آرامی شستشو داده شد تا باقیمانده‌های خون موجود

موارد از جمله وجود بیماری‌های زمینه‌ای، عروق اтолوگ به اندازه کافی در دسترس نیست و نیاز به استفاده از جایگزین‌های صناعی عروقی مانند پلی‌تترافلوروواتیلن expanded polytetrafluoroethylene (ePTFE) یا می‌باشد(۲). پرده آمنیون نزدیک ترین لایه از پرده‌های جنبی به جنین می‌باشد. این بافت از نظر بافت‌شناسی به ترتیب از خارج به داخل از پنج لایه تشکیل شده است. لایه اپی‌تیال اولین لایه است که مستقیماً با مایع آمنیوتیک در ارتباط بوده و از سلول‌های آمنیوتیک اپی‌تیال تشکیل شده است. غشای پایه (دومین لایه) شامل کلائزنهای نوع I، II و IV، لامینین، فیبرونکتین و پرلکان می‌باشد. سومین لایه، لایه فشرده است که مشکل از کلائزنهای نوع I و II است. لایه فیربلاستی در برگیرنده کلائزنهای نوع I، III و IV بوده و حاوی سلول‌های آمنیوتیک مزانشیمی می‌باشد. لایه اسفنجی آخرین لایه پرده آمنیون می‌باشد که متصل به کوریون بوده و حاوی پروتئوگلیکان‌ها است(۴،۳). پرده آمنیون در سال‌های اخیر به صورت گسترش در پزشکی مورد استفاده قرار گرفته است. یکی از بیشترین استفاده‌ها از این بافت در بیماری‌های پوستی و سوختگی‌ها بوده است. هم‌چنین پرده آمنیون در زمینه چشم پزشکی از جمله بیماری‌های ملتحمه، قرنیه و استرایسم مورد استفاده بسیاری قرار گرفته است(۵). از جمله کاربردهای دیگر پرده آمنیون در جراحی‌های گوناگون از جمله تیمپانoplasty، ترمیم حفره دهان، کنترل چسبندگی داخل شکمی ثانویه به جراحی، بازسازی مثانه و به عنوان جایگزین ورید بوده است(۶-۹). هم‌چنین به تازگی نشان داده شده است که پرده آمنیون دارای خواص ضد سرطان است(۱۰-۱۲). با توجه به نیاز روز افزون به جایگزین‌های عروقی در بالین و محدودیت‌های استفاده از عروق صناعی از جمله تنگی، ترومبوز و عفونت، مطالعات به سمت طراحی جایگزین‌های عروقی با حداقل امکان ایجاد عوارض پیش‌رفته است(۱۳). در راستای این هدف از روش‌های مختلفی چهت افزایش

زمان پروتروموبین (Prothrombin Time (PT)) برای بررسی تاثیر سطح اپی تیال پرده آمنیون و ePTFE بر زمان پروتروموبین، ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر پلاسمای سیتراته (در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد) با نمونه‌ها انکوبه شد. سپس ۲۰۰ میکرولیتر ترومبوپلاستین D (Fisher, USA) اضافه و بلافاصله پس از آن زمان تشکیل لخته فیبرینی در لوله آزمایش اندازه گیری شد.

محاسبه زمان لخته شدن خون کامل بدون خصل انعقاد (Clotting Time (CT))

یک میلی لیتر از خون غیر سیتراته به مدت یک دقیقه با سطح اپی تیال پرده آمنیون و ePTFE انکوبه شد و زمان لخته شدن خون با استفاده از روش کاپیلاری (Capillary method) محاسبه گردید.

#### همولیز

برای بررسی تاثیر نمونه‌ها بر همولیز سلول‌های خونی ابتدا خون لخته نشده با افزودن ۲۰۰ میکرولیتر از خون حاوی سیترات به ۱۰ میلی لیتر نرمال سالین ۰/۹ درصد رقیق شد. سپس نمونه‌ها با خون رقیق شده در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲ ساعت انکوبه شدند. پس از آن نمونه‌های خون با سرعت ۱۰۰۰ g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. محلول رویی جدا شد و جذب نوری آن با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر (Cecil, UK) در طول موج ۵۴۵ نانومتر اندازه گیری و درصد همولیز با فرمول زیر محاسبه گردید: (در آزمون همولیز از آب مقطر به عنوان کنترل مثبت و از نرمال سالین به عنوان کنترل منفی استفاده شد).

$$\frac{\text{جذب کنترل مثبت} - \text{جذب نمونه}}{\text{جذب کنترل مثبت}} \times 100 = \text{همولیز} \%$$

بررسی میزان فعال شدن پلاکت‌ها با استفاده از اندازه گیری میزان رهاسازی P-selectin رهاسازی P-selectin مقدار P-selectin رهایش از پلاکت‌ها پس از انکوباسیون ۲۰۰ میکرولیتر خون کامل با سطح اپی تیال

روی بافت کاملاً برطرف شوند. سپس بافت‌های به دست آمده به قطعات کوچک‌تر تقسیم شد تا جهت انجام آزمایشات مورد استفاده قرار گیرند. خون تازه از افراد داوطلب به میزان ۵ میلی لیتر از هر فرد تهیه شد. سپس خون جمع آوری شده در لوله حاوی سدیم سیترات ریخته شد. این افراد در طی یک ماه قبل از مطالعه، هیچ گونه دارویی که توانایی تاثیرگذاری بر سیستم انعقاد را داشته باشد، مصرف نکرده بودند. جهت استخراج پلاسمما، خون تهیه شده به مدت ۱۰ دقیقه با دور 2000g سانتریفیوژ شد. درجهت بررسی خون سازگاری سطح اپی تیال پرده آمنیون آزمون‌های انعقاد خون، بررسی همولیز، و فعالیت و تجمع پلاکتی بر روی پرده آمنیون تازه انجام شد. جهت بررسی هیستولوژی پرده آمنیون از نمونه‌های فیکس شده استفاده گردید.

#### میکروسکوپ نوری

به منظور بررسی بافت شناسی، پرده آمنیون تهیه شده توسط فرمالین ۱۰ درصد به مدت ۲۴ ساعت فیکس شد. سپس در پارافین قرار داده شد و با میکروتوم با ضخامت ۴ میکرومتر از آن برش تهیه شد. برش تهیه شده با استفاده از رنگ هماتوکسیلین و ائوزین رنگ آمیزی و توسط میکروسکوپ نوری ارزیابی شد.

زمان پارشیال ترومبوپلاستین (aPTT) (partial thromboplastin time)

جهت بررسی تاثیر نمونه‌ها بر روی زمان پارشیال ترومبوپلاستین ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر از پلاسمای سیتراته با سطح اپی تیال پرده آمنیون و ePTFE (Jotec, flowline, Biopore, USA) انکوبه شد. سپس بلافاصله ۱۰۰ میکرولیتر از ترومبوپلاستین C (rat brain, Fisher, USA) به آن اضافه شد. پس از ۵ دقیقه انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، ۱۰۰ میکرولیتر کلسیم کلراید ۳۷ درجه سانتی گراد اضافه شد و سپس زمان تشکیل لخته فیبرین محاسبه گردید.

خشک بر روی نمونه‌ها صورت گرفت. نمونه‌ها با یک لایه ۷ نانومتری طلا پوشش داده شد تا جهت بررسی (Hitachi, Field Emission Scanning Electron Microscope, Japan) آماده شوند. تعداد و مورفولوژی پلاکت‌های چسبیده به سطح نمونه‌ها به کمک میکروسکوپ الکترونی مورد ارزیابی قرار گرفت. پلاکت‌ها در ۸ تا ۱۰ زمینه مختلف که به صورت تصادفی انتخاب شده بودند، توسط میکروسکوپ الکترونی مشاهده شدند و تعداد و تغییرات مورفولوژیک آن‌ها در سطح اپی‌تیال، ePTFE و شیشه موردنظر که قبلاً بیان شده است<sup>(۲۰)</sup> به صورت گرد (dendritic or early pseudopodial)، دندرتیک (round)، دندرتیک گسترش یافته (spread-dendritic or intermediate pseudopodial)، در حال گسترش (spreading) و کاملاً گسترش یافته (fully spread) در حالت طور که قبلاً بیان شده است<sup>(۲۰)</sup> طبقه‌بندی شد.

#### محاسبات آماری

آزمون‌ها حداقل بر روی شش بافت مختلف انجام شد. همه نتایج کمی به صورت میانگین  $\pm$  خطای استاندارد میانگین (SEM) بیان شد. تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از آزمون واریانس (ANOVA) و به دنبال آن با استفاده از آزمون Tukey، با استفاده از نرم‌افزار Graphpad Prism نسخه ۵/۰۴ صورت گرفت. مقدار  $p$  کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

#### یافته‌ها

پس از جداسازی پرده آمنیون از جفت، رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین از قطعات بافتی تهیه شده از پرده آمنیون، ۵ لایه تشکیل‌دهنده آن را نشان داد (تصویر شماره ۱). این لایه‌ها به ترتیب از خارج به داخل شامل لایه اپی‌تیال، غشای پایه، لایه فشرده، لایه فیبروبلاست و لایه اسفنجی می‌باشند.

پرده آمنیون و ePTFE به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به روش الایزا اندازه‌گیری شد. پس از اتمام انکوباسیون، نمونه خون به میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل و EDTA تا رسیدن به غلظت نهایی ۱۰ میلی‌مolar به آن اضافه شد. سپس نمونه‌ها جهت تهیه پلاسمای کم پلاکت (Platelet Poor Plasma (PPP)) به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۲۰۰۰g سانتریفیوژ شدند. در نهایت مقدار P-selectin در محلول رویی پس از سانتریفیوژ به روش الایزا با استفاده از کیت تجاری (Human P-selectin Immunoassay، Abnova) و با توجه به دستور العمل شرکت سازنده سنجیده شد.

#### تجمع پلاکتی

خون کامل منعقد نشده به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۶۰g سانتریفیوژ و سپس محلول رویی آن (Platelet Rich Plasma (PRP)) جدا شد. پس از شمارش تعداد پلاکت‌ها، با رقیق‌سازی تعداد نهایی آن‌ها به  $۳ \times ۱۰^5$  پلاکت در هر میکرولیتر رسید. جهت القای تجمع پلاکتی، PRP به دست آمده با سطح اپی‌تیال پرده آمنیون و سطح ePTFE در تماس قرار گرفت. در نهایت میزان عبور نور از نمونه‌ها در مدت ۱۰ دقیقه توسط دستگاه اگریگومتر (Aggregometer، Hart Biologicals, UK) اندازه‌گیری شد.

#### میکروسکوپ الکترونی

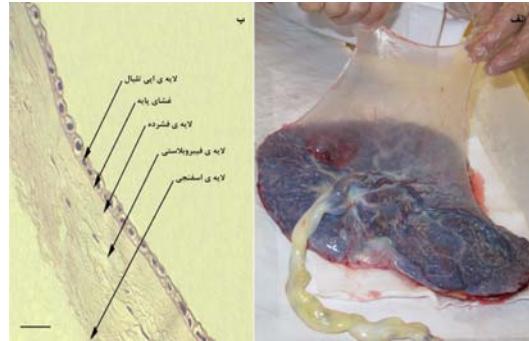
سطح اپی‌تیال پرده آمنیون و ePTFE و هم‌چنین مورفولوژی پلاکت‌ها پس از انکوباسیون با سطح اپی‌تیال پرده آمنیون، ePTFE و شیشه با استفاده از میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM) مورد بررسی قرار گرفت. نمونه‌ها با گلوتار الدهید ۲/۵ درصد محلول در PBS، به مدت ۲ ساعت فیکس شدند. سپس با استفاده از قرار دادن در محلول اتانول با درجات افزایش متوالی (۴۰ درصد، ۶۰ درصد، ۸۰ درصد و ۹۹ درصد) هر کدام به مدت ۱۰ دقیقه آبگیری شدند و پس از آن انجماد

می شود و از گرانولهای پلاکت‌ها P-selectin آزاد می شود. P-selectin آزاد شده از پلاکت فعال به عنوان مارکر مفیدی در مطالعات جهت بررسی میزان فعال شدن پلاکتی استفاده می شود. بر این اساس در این مطالعه جهت اندازه گیری میزان فعال شدن پلاکت از اندازه گیری مقدار P-selectin به روش الیزا استفاده گردید. مقدار P-selectin آزاد شده از پلاسمای غنی از پلاکت (PRP) که با ePTFE و سطح اپی تیال پرده آمنیون در تماس بوده است به ترتیب برابر با  $1636 \pm 70/42$  و  $1208 \pm 74/32$  پیکوگرم بوده است.

مقدار P-selectin آزاد شده از سطح اپی تیال پرده آمنیون انکوبه شده با پلاکت در مقایسه با ePTFE به صورت معنی داری کمتر می باشد ( $p < 0.05$ ).

جهت بررسی تجمع پلاکتی بعد از تهیه پلاسمای غنی از پلاکت از خون و در مجاورت قرار دادن آن با سطح اپی تیال پرده آمنیون و ePTFE، میزان تجمع پلاکتی توسط اندازه گیری میزان عبور نور به مدت ۱۰ دقیقه با فواصل ۳۰ ثانیه سنجیده شد. در این روش به علت تجمع پلاکتی شدت نور عبوری از نمونه‌ها افزایش پیدا می کند بدین معنی که هر چه میزان عبور نور بیشتر شود تجمع پلاکتی افزایش یافته است. نتایج تجمع پلاکتی با نتایج مقدار رهایش P-selectin (فعال شدن پلاکتی) هم خوانی دارد. همان‌طور که در نمودار شماره ۱ نشان داده شده است میزان تجمع پلاکتی در سطح اپی تیال در قیاس با ePTFE کمتر می باشد و هم‌چنین بررسی‌های آماری نیز تفاوت معنی داری را بین گروه‌های ذکر شده نشان می دهد.

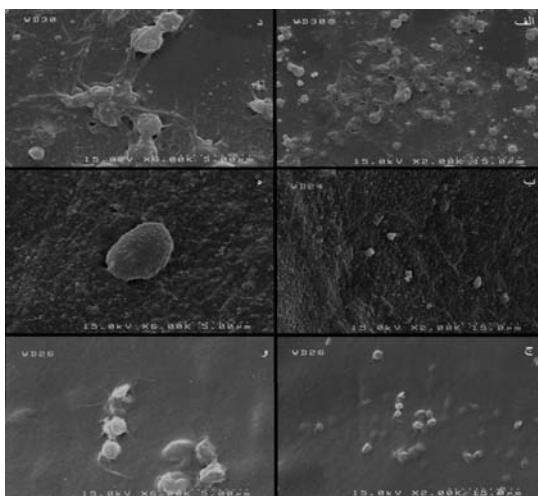
میکروسکوپ الکترونی اطلاعات بسیار مفیدی از سطح اپی تیال پرده آمنیون و ePTFE و هم‌چنین چگونگی رفتار پلاکت‌ها (چسبندگی و تجمع پلاکت‌ها) در زمانی که نمونه‌ها در تماس با پلاکت هستند را فراهم می کند. ساختار سطح پرده آمنیون و ePTFE توسط میکروسکوپ الکترونی مورد ارزیابی قرار گرفت. تصویر شماره ۲ سطح ePTFE را به صورت اسفنجی و



تصویر شماره ۱: جفت به همراه پرده آمنیون (الف)، بافت شناسی پرده آمنیون (ب). پنج لایه اصلی پرده آمنیون: لایه اپی تیال، غشای پایه، لایه فشرده، لایه فیبروبلاست و لایه اسفنجی. مقیاس برابر با ۵۰ میکرومتر است

آبشار انعقادی که شامل مسیر داخلی و خارجی انعقاد می باشد به ترتیب توسط آزمایشات aPTT و PT و برسی شد. زمانی که پلاسمای در تماس با سطح اپی تیال ePTFE پرده آمنیون قرار گرفت، مقدار PT نسبت به افزایش یافت (PT در سطح اپی تیال و ePTFE به ترتیب برابر با  $0/7 \pm 17/4$  و  $11 \pm 0/57$  ثانیه بود،  $p < 0.01$ ). هم‌چنین سطح اپی تیال پرده آمنیون در مقایسه با aPTT زمان ePTFE را کاهش نداد (در سطح ePTFE اپی تیال برابر با  $1/39 \pm 61/28$  ثانیه و در سطح ePTFE برابر با  $2/1 \pm 1/33$  ثانیه بود). از خون کامل جهت بررسی مقدار زمان لخته شدن آن استفاده شد. زمان CT سطح ePTFE اپی تیال پرده آمنیون برابر با  $0/4 \pm 74/37$  ثانیه و برابر با  $0/2 \pm 9/3$  بود که از نظر آماری تفاوت معنی داری با یکدیگر نداشتند. در آزمون همولیز از آب قطر (کنترل مثبت) که موجب همولیز کامل (صد درصد) گلولهای قرمز خون می شود جهت استاندارد کردن نتایج استفاده شد (۲۲). پس از گذشت ۲ ساعت از زمان انکوبه شدن خون با پرده آمنیون و ePTFE همولیز واضحی مشاهده نشد (تمامی مقادیر همولیز کمتر ادرصد بودند). میزان همولیز در پرده آمنیون (سطح اپی تیال) با ePTFE و نرمال سالین (کنترل منفی) تفاوت معنی داری نداشت. بعد از فعال شدن پلاکت‌ها، مورفولوژی پلاکتی دستخوش تغییر می شود که در نتیجه آن چسبندگی ایجاد

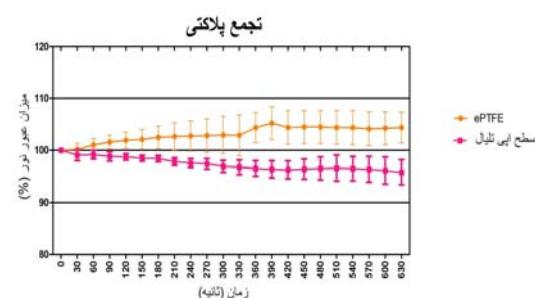
تغییر در مورفولوژی پلاکتی از جمله pseudopodia و spreading از خون نشان نداده‌اند. پلاکت‌ها در سطح ePTFE حالت تجمعی (cluster) داشتند و تغییر مختصّی در مورفولوژی پلاکتی دیده شد که از نظر دسته‌بندی مورفولوژی در گروه دندرتیک و early pseudopodial قرار می‌گیرند (تصویر شماره ۳، ج و و). نتایج حاصل از میکروسکوپ الکترونی نشان می‌دهد که پرده آمنیون القاکننده تجمع پلاکتی نمی‌باشد و دارای مشخصه خون‌سازگاری است.



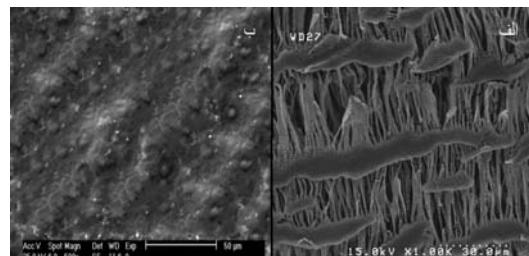
تصویر شماره ۳: تصاویر میکروسکوپ الکترونی نشان دهنده پلاکت‌ها پس از انکوباسیون پلاسمای غنی از پلاکت با شیشه (الف، د)، سطح اپی تیال پرده آمنیون (ب، چ، و)، و ePTFE (ج، و). عکس‌های سمت چپ (د، ھ، و) بزرگ‌شده نمونه‌های عکس‌های ePTFE سمت راست (الف، ب، چ) هستند. پلاکت‌های متصل به شیشه و ePTFE به صورت دندرتیک با پاهای کاذب هستند ولی پلاکت‌های سطح اپی تیال پرده آمنیون کروی هستند.

همان طور که در نمودار شماره ۲ نشان داده شده است کمترین تعداد چسبندگی پلاکتی به طور معنی‌دار در سطح اپی تیال دیده می‌شود که با غالب سلولی گرد (۹۰ درصد) از لحاظ مورفولوژی همراه است در حالی که ۷۰ درصد پلاکت‌ها در سطح ePTFE دندرتیک و ۳۰ درصد گرد هستند. بیشترین تعداد چسبندگی پلاکتی در شیشه مشاهده شد به طوری که اکثریت سلول‌ها دارای مورفولوژی طبیعی گرد خود را حفظ کرده و هیچ گونه fully spread و spread-dendritic نداشته‌اند.

زبر نشان می‌دهد که در اثر تماس با پلاکت‌ها باعث فعال شدن پلاکتی می‌شود در صورتی که سطح اپی تیال پرده آمنیون دارای سطحی صاف با یک لایه سلولی یکپارچه و در یک راستا می‌باشد که باعث کم‌تر فعال شدن پلاکت‌ها می‌شود.



نمودار شماره ۱: میزان عبور نور نشان دهنده تجمع پلاکتی در زمانی که پلاسمای غنی از پلاکت با سطح اپی تیال و یا ePTFE در تماس بوده است. سطح اپی تیال پرده آمنیون در مقایسه با به میزان کم‌تری باعث تجمع پلاکتی می‌شود

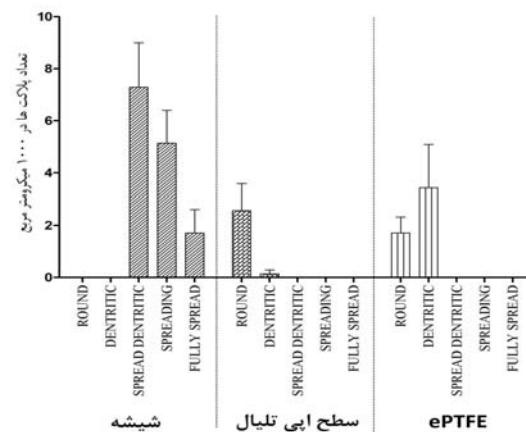


تصویر شماره ۲: تصاویر میکروسکوپ الکترونی از سطح ePTFE (الف) و سطح پرده آمنیون (ب)، ePTFE دارای سطحی اسفنجی می‌باشد در حالی که پرده آمنیون دارای سطحی صاف و یکپارچه از یک لایه سلولی می‌باشد

تصویر شماره ۳ میزان چسبندگی پلاکت‌ها را بر روی سطوح پرده آمنیون و ePTFE در مقایسه با شیشه نشان می‌دهد. تعداد پلاکت‌های چسبیده شده به شیشه در مقایسه با پرده آمنیون و ePTFE بسیار بیشتر است (تصویر شماره ۳، الف و د). تغییر بسیار زیادی در مورفولوژی پلاکتی در زمانی که پلاکت‌ها در تماس با شیشه بودند رخ داد (spread and cluster). پلاکت‌ها در سطح اپی تیال (تصویر شماره ۳، ب و ھ) پرده آمنیون مورفولوژی طبیعی گرد خود را حفظ کرده و هیچ گونه

که به عنوان جایگزین عروق استفاده می‌شود، بهتر بوده و یا حداقل با آن قابل مقایسه می‌باشد. آزمون همولیز روشی معتبر جهت ارزیابی خون سازگاری مواد زیستی است. فراوان‌ترین سلول خونی در کل حجم خون گلبول قرمز است (۴۰ درصد از کل حجم خون، ۴ میلیون در هر میکرولیتر). گلبول‌های قرمز در برخورد با مواد خارجی و تغییر فشار اسمزی در معرض پارگی قرار می‌گیرند و به دنبال آن همولیز ایجاد می‌گردد. به عبارت دیگر سطح همولیز نشان دهنده میزان شکنندگی گلبول‌های قرمز در زمانی که خون در تماس با مواد مختلف قرار می‌گیرد می‌باشد و هرچه قدر مقدار شکنندگی گلبول قرمز بیشتر باشد میزان همولیز نیز بالاتر می‌رود(۲۶). نتایج حاصل از بررسی‌های همولیز هم سو با نتایج آزمون‌های PT و aPTT و نشان داد که سطح اپی‌تیال پرده آمنیون خون سازگار بوده و همولیز گلبول‌های قرمز را القاء نمی‌کند. جهت بررسی تمام فاکتورهای انعقادی موجود در خون در غیاب فاکتور بافتی (Tissue Factor) از آزمون CT استفاده می‌شود(۲۶). نتایج حاصل از این آزمایش نشان داد که سطح اپی‌تیال پرده آمنیون در زمانی که با خون انکوبه می‌شود تاثیر معنی‌داری بر زمان انعقاد خون کامل نمی‌گذارد. در این مطالعه از ePTFE که جایگزین عروقی صناعی بوده و مورد تائید FDA می‌باشد و در بالین به وفور استفاده می‌شود، به عنوان کنترل استفاده گردید(۲۷). ePTFE به دلیل نداشتن خاصیت ضد انعقادی که به طور طبیعی در رگ طبیعی وجود دارد دارای آن مقدار از خون سازگاری نمی‌باشد که بتوان از آن در بسیاری از وسایل پزشکی که در تماس مستقیم با خون هستند، استفاده کرد لذا در این مطالعه به این علت از ePTFE پوشانده شده با هپارین جهت مقایسه با پرده آمنیون استفاده شد(۲). هپارین یک گلیکوزآمنو گلیکان است که دارای خاصیت ضد انعقادی بوده و در دیواره داخلی جایگزین عروقی ePTFE جهت مهار مسیر انعقاد به کار رفته است. خون سازگاری بهتر پرده آمنیون

توزیع مورفو‌لوزیک پلاکت‌های چسبیده



نمودار شماره ۲: توزیع مورفو‌لوزیک پلاکت‌ها بر پایه تعداد پلاکت چسبیده به سطح شیشه، سطح اپی‌تیال پرده آمنیون و ePTFE. تعداد بسیار کمی پلاکت به سطح اپی‌تیال چسبیده است که مورفو‌لوزی غالب آن ها گرد می‌باشد. تعداد مورفو‌لوزی دندتیک در سطح ePTFE بیشتر از سطح اپی‌تیال است

## بحث

همان‌طور که قبلاً یافته شده است پرده آمنیون دارای ویژگی‌های منحصر به فردی است که آن را برای کاربردهای بالینی مناسب می‌کند. یکی از کاربردهای پر اهمیت پرده آمنیون در بالین استفاده از آن در مهندسی بافت عروق می‌باشد(۲۳،۷). به تازگی این گروه تحقیقی پرده آمنیون را به عنوان ورید ژوگولار گوسفند با موفقیت پیوند زده است(۷). پس از ۴۸ هفته هیچ گونه نشانه‌ای از ترومبوز و یا گرفتگی در جایگزین استفاده شده دیده نشد. هم‌چنین پرده آمنیون به عنوان بستری جهت کشت سلول‌های اندوتیال استفاده شده است(۲۴). زمان پارشیال ترومبوپلاستین آزمونی آسان ولی در عین حال قابل اعتماد جهت بررسی میزان منعقد شدن خون از طریق مسیر داخلی می‌باشد. هم‌چنین از آزمون زمان پروترومبین جهت ارزیابی مسیر خارجی انعقاد که در اثر تماس خون با سطوح خارجی فعال می‌شود استفاده شد(۲۵). هر دو آزمون PT و aPTT نشان دادند که سطح اپی‌تیال پرده آمنیون از نظر فعال می‌باشد که سطح اپی‌تیال ePTFE صناعی پوشانده شده با هپارین (heparin coated ePTFE)

کاهش چسبندگی پلاکت‌ها به سطح پرده آمنیون باشد. دومین علت میزان موفقیت پایین جایگزین‌های صناعی به دلیل داشتن سطح ناهموار و عدم وجود یک لایه سلول اندوتیال یکپارچه در لومن داخلی آن‌ها می‌باشد. همان‌طور که اشاره شد هر گونه برخورد پلاکت با سطح ناهموار و یا ماده القاکننده انعقاد باعث شدن پلاکتی و تغییر مورفولوژی پلاکت‌ها می‌شود. نتایج بررسی‌های صورت گرفته با میکروسکوپ الکترونی نشان داد که در سطح ePTFE تعداد بیشتری پلاکت چسبیده است و هم‌چنین مورفولوژی آن‌ها تغییر کرده و چسبندگی پلاکتی (به صورت دندرتیک) رخ داده است. در مقابل در سطح اپی‌تیال پرده آمنیون تعداد کمتری پلاکت چسبیده و نیز مورفولوژی اکثربی آن‌ها گرد می‌باشد. این نتایج را می‌توان به وجود یک لایه سلولی یکپارچه بر سطح اپی‌تیال پرده آمنیون نسبت داد (۳۲). همان‌گونه که در لومن عروق به صورت طبیعی یک لایه سلولی یکپارچه اندوتیال وجود دارد، جهت رفع مشکل القای انعقاد در لومن داخلی گرفته‌های صناعی از کاشتن سلول درون لومن استفاده می‌شود (۱۴، ۲). مزتی که باعث توجه به استفاده از پرده آمنیون در مهندسی بافت عروق می‌شود، خاصیت پرتوانی سلول‌های اپی‌تیال پرده آمنیون است (۳۳). ویژگی پرتوان بودن سلول‌های اپی‌تیال و گزارشاتی که راجع به توانایی تبدیل شدن این سلول‌ها به ۳ لایه جنینی وجود دارد، امکان تمايز این سلول‌ها به سلول‌های اندوتیال را ممکن می‌کند. لذا با توجه به این موضوع که وجود سلول‌های یکپارچه مسئله بسیار مهمی در جلوگیری از ترومبوzu در لومن گرفت عروقی می‌باشد، با تبدیل شدن سلول‌های اپی‌تیال پرده آمنیون به سلول‌های اندوتیال، پرده آمنیون از مزیت ویژه‌ای در استفاده در مهندسی بافت عروق برخوردار است. در پایان براساس نتایج این مطالعه آزمایشگاهی و مطالعات برونز تن گذشتگی توان نتیجه گیری کرد که سطح اپی‌تیال پرده آمنیون خون سازگار است. با توجه به ماتریکس خارج سلولی غنی، خواص بنیادی سلول‌های

می‌تواند به دلیل ویژگی‌های ذاتی این بافت باشد. سلول‌های اپی‌تیال پرده آمنیون حاوی نوعی از پروتئوگلیکان هپارین سولفات می‌باشد که خاصیت ضد انعقادی دارد (۲۸). یکی از اجزای مهم غشای پایه پرده آمنیون پرلکان (perlecan) است که یک پروتئوگلیکان هپارین سولفات بزرگ می‌باشد. پرلکان باعث تکثیر سلول‌های اندوتیال با القای اتصال به فاکتور رشد فیبربلاستیدو می‌شود (۲۹).

اگرچه نتایج aPTT به دست آمده از ePTFE مشابه سطح اپی‌تیال پرده آمنیون می‌باشد ولی میزان موفقیت استفاده از ePTFE پوشانده شده از هپارین و دیگر جایگزین‌های صناعی در وریدهای با قطر پایین کم بوده است (۲۹). همان‌طور که ذکر شد با استفاده از پرده آمنیون جایگزینی وریدی طراحی شد که از آن در ورید ژوگولار خارجی گوسفتند استفاده گردید. ورید ساخته شده از پرده آمنیون به مدت ۴۸ هفته بدون گرفتگی دارای کارکرد بوده و پس از این مدت هیچ گونه نشانه‌ای از التهاب، عفونت و یا تنگی دیده نشد (۷). با دانستن علل عدم موفقیت جایگزین‌های صناعی می‌توان کیفیت آن‌ها را هر چه بیشتر بالا برد. اولین علت پایین‌بودن موفقیت جایگزین‌های صناعی عروقی از میزان کاهش آن‌ها را هر چه بیشتر تراویح می‌باشد. اولین جذب سریع پروتئین‌های پلاسمای سطح داخلی لومن آن‌ها و به دنبال آن ایجاد چسبندگی پلاکتی و فعال شدن مسیر انعقاد و تولید ترومبوzu می‌باشد (۳۰). پرده آمنیون دارای خاصیت ضد چسبندگی بوده که از آن در بالین جهت کاهش میزان چسبندگی پس از عمل‌های جراحی استفاده شده است (۳۱). همان‌گونه که در نتایج این مطالعه نشان داده شده است تعداد پلاکت‌های چسبیده به سطح اپی‌تیال پرده آمنیون به طور قابل توجهی کمتر از ePTFE می‌باشد. هم‌چنین نتایج تجمع پلاکتی و فعال شدن پلاکت‌ها که توسط p-selectin و میکروسکوپ الکترونی ارزیابی شد نیز تایید کننده خون سازگار بودن سطح اپی‌تیال پرده آمنیون می‌باشد که می‌تواند به علت ویژگی ضد چسبندگی پرده آمنیون و

## سپاسگزاری

نویسنده‌گان از جناب آقای دکتر حبیب الله پیروی به جهت راهنمایی‌های ارزشمندانه کمال تشكیر را دارند. نتایج این مقاله از پایان نامه پزشکی عمومی استخراج شده است. این مطالعه با حمایت مرکز تحقیقات نانوفناوری پزشکی و مهندسی بافت دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی انجام شده است.

پرده آمنیون، خصوصیات مناسب مکانیکی، فعالیت ضد باکتری و ایمنی زایی کم، پرده آمنیون یک بیومتریال مناسب برای مهندسی بافت عروق می‌باشد. مطالعات بیشتری در آینده برای بررسی استفاده طولانی مدت از این بافت مورد نیاز است.

## References

1. Vara DS, Salacinski HJ, Kannan RY, Bordenave L, Hamilton G, Seifalian AM. Cardiovascular tissue engineering: state of the art. *Pathol Biol (Paris)* 2005; 53(10): 599-612.
2. Hoshi RA, Van Lith R, Jen MC, Allen JB, Lapidos KA, Ameer G. The blood and vascular cell compatibility of heparin-modified ePTFE vascular grafts. *Biomaterials* 2013; 34(1): 30-41.
3. Niknejad H, Peirovi H. The Effects of Cryopreservation on Epithelial Cells before and After Isolation from Human Amniotic Membrane. *J Mazandaran Univ Med Sci* 2012; 22(94): 15-26.
4. 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): 340-345.
5. 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.
6. Fernandes M, Sridhar MS, Sangwan VS, Rao GN. Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction. *Cornea* 2005; 24(6): 643-653.
7. Peirovi H, Rezvani N, Hajinasrollah M, Mohammadi SS, Niknejad H. Implantation of amniotic membrane as a vascular substitute in the external jugular vein of juvenile sheep. *J Vasc Surg* 2012; 56(4): 1098-1104.
8. Choi JA, Choi JS, Joo CK. Effects of amniotic membrane suspension in the rat alkali burn model. *Mol Vis* 2011; 17: 404-412.
9. Bujang-Safawi E, Halim AS, Khoo TL, Dorai AA. Dried irradiated human amniotic membrane as a biological dressing for facial burns--a 7-year case series. *Burns* 2010; 36(6): 876-882.
10. Niknejad H, Khayat-Khoei M, Peirovi H, Abolghasemi H. Human amniotic epithelial cells induce apoptosis of cancer cells: a new anti-tumor therapeutic strategy. *Cyotherapy* 2014; 16(1): 33-40.
11. Niknejad H, Yazdanpanah G, Mirmasoumi M, Abolghasemi H, Peirovi H, Ahmadiani A. Inhibition of HSP90 could be possible mechanism for anti-cancer property of amniotic membrane. *Med Hypotheses* 2013; 81(5): 862-865.
12. Niknejad H, Khayat-Khoei M, Peirovi H. Inhibition of MMPs might increase anticancer properties of amniotic epithelial cells. *Med Hypotheses* 2012; 78(5): 690-691.

13. Palumbo VD, Bruno A, Tomasello G, Damiano G, Lo Monte AI. Bioengineered vascular scaffolds: the state of the art. *Int J Artif Organs* 2014; 37(7): 503-512.
14. De Visscher G, Mesure L, Meuris B, Ivanova A, Flameng W. Improved endothelialization and reduced thrombosis by coating a synthetic vascular graft with fibronectin and stem cell homing factor SDF-1alpha. *Acta Biomater* 2012; 8(3): 1330-1338.
15. Tehrani FA, Ahmadiani A, Niknejad H. The effects of preservation procedures on antibacterial property of amniotic membrane. *Cryobiology* 2013; 67(3): 293-298.
16. Garfias Y, Zaga-Clavellina V, Vadillo-Ortega F, Osorio M, Jimenez-Martinez MC. Amniotic membrane is an immunosuppressor of peripheral blood mononuclear cells. *Immunol Invest* 2011; 40(2): 183-196.
17. Manuelpillai U, Tchongue J, Lourensz D, Vaghjiani V, Samuel CS, Liu A, et al. Transplantation of human amnion epithelial cells reduces hepatic fibrosis in immunocompetent CCl(4)-treated mice. *Cell Transplant* 2010; 19(9): 1157-1168.
18. Chen B, Jones RR, Mi S, Foster J, Alcock SG, Hamley IW, et al. The mechanical properties of amniotic membrane influence its effect as a biomaterial for ocularsurface repair. *Soft Matter* .2012; 8(32): 8379-8387.
19. Hori J, Wang M, Kamiya K, Takahashi H, Sakuragawa N. Immunological characteristics of amniotic epithelium. *Cornea* 2006; 25(10 Suppl 1): S53-58.
20. Niknejad H, Yazdanpanah G, Kakavand M. Extract of fetal membrane would inhibit thrombosis and hemolysis. *Med Hypotheses* 2015; 85(2): 197-202.
21. Goodman SL. Sheep, pig, and human platelet-material interactions with model cardiovascular biomaterials. *J Biomed Mater Res* 1999; 45(3): 240-250.
22. Motlagh D, Allen J, Hoshi R, Yang J, Lui K, Ameer G. Hemocompatibility evaluation of poly(diol citrate) in vitro for vascular tissue engineering. *J Biomed Mater Res A* 2007; 82(4): 907-916.
23. Lee PH, Tsai SH, Kuo L, Hwang CY, Kuo CY, Yang VC, et al. A prototype tissue engineered blood vessel using amniotic membrane as scaffold. *Acta Biomater* 2012; 8(9): 3342-3348.
24. Niknejad H, Deihim T, Solati-Hashjin M, Peirovi H. The effects of preservation procedures on amniotic membrane's ability to serve as a substrate for cultivation of endothelial cells. *Cryobiology* 2011; 63(3): 145-151.
25. Lin WC, Liu TY, Yang MC. Hemocompatibility of polyacrylonitrile dialysis membrane immobilized with chitosan and heparin conjugate. *Biomaterials* 2004; 25(10): 1947-1957.
26. Tang YZ, Liu ZQ. Quantitative structure-activity relationship of hydroxyl-substituent Schiff bases in radical-induced hemolysis of human erythrocytes. *Cell Biochem Funct* 2008; 26(2): 185-191.
27. Chuang TW, Masters KS. Regulation of polyurethane hemocompatibility and endothelialization by tethered hyaluronic acid oligosaccharides. *Biomaterials* 2009; 30(29): 5341-5351.
28. Hao Y, Ma DH, Hwang DG, Kim WS, Zhang F. Identification of antiangiogenic and antiinflammatory proteins in human amniotic membrane. *Cornea* 2000; 19(3): 348-352.
29. Li WC, Ruan XZ, Zhang HM, Zeng YJ. Biomechanical properties of different segments of human umbilical cord vein and

- 
- its value for clinical application. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2006; 76(1): 93-97.
30. Carnagey J, Hern-Anderson D, Ranieri J, Schmidt CE. Rapid endothelialization of PhotoFix natural biomaterial vascular grafts. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2003; 65(1): 171-179.
31. Kuriu Y, Yamagishi H, Otsuji E, Nakashima S, Miyagawa K, Yoshikawa T, et al. Regeneration of peritoneum using amniotic membrane to prevent postoperative adhesions. *Hepatogastroenterology* 2009; 56(93): 1064-1068.
32. Niknejad H, Yazdanpanah G. Anticancer effects of human amniotic membrane and its epithelial cells. *Med Hypotheses* 2014; 82(4): 488-489.
33. 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): 22-27.