

## *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 آمینون در مقایسه با رگ صناعی [پلی تترافلورواتیلن]

مونا کاکاوند<sup>۱</sup>

قاسم یزدان پناه<sup>۱</sup>

حسن نیک نژاد<sup>۲،۳</sup>

### چکیده

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

**مواد و روش‌ها:** در مطالعه تجربی حاضر تاثیر سطح اپی تلیال پرده آمینون بر روی آزمون‌های انعقاد خون شامل زمان پروترومبین (PT)، زمان پارشیال ترومبوپلاستین (aPTT)، زمان تشکیل لخته (CT)، همولیز و تجمع پلاکتی در مقایسه با پلی تترافلورواتیلن انبساطی (ePTFE) مورد بررسی قرار گرفت. جهت بررسی میزان فعال شدن پلاکت‌ها مقادیر p-selectin آزاد شده پس از تماس با سطح اپی تلیال پرده آمینون به روش الیزا اندازه‌گیری شد. هم‌چنین میزان چسبندگی و تغییر مورفولوژی 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 آمینون 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 آمینون مانع از تجمع، فعال شدن و اتصال پلاکت‌ها به آن می‌شود در حالی که تعداد پلاکت‌های متصل به ePTFE بیش تر بود.

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

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

### مقدمه

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

E-mail: niknejad@sbm.ac.ir

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

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

۲. دانشیار، گروه مهندسی بافت و طب بازساختی، 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

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۸/۱۰ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۳/۸/۲۷ تاریخ تصویب: ۱۳۹۴/۴/۸

خون سازگاری عروق صناعی استفاده شده است. از جمله این روش‌ها می‌توان به پوشاندن سطوح داخلی عروق صناعی با کربن، هیپارین و سلول‌های اندوتلیال 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 آمینون دارای ویژگی‌های منحصر به فردی می‌باشد که آن را داربست مناسبی جهت 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 جهت مهندسی بافت دارد (۱۸). هم‌چنین سلول‌های اپی‌تلیال پرده آمینون به علت عدم بیان HLA-A، B، D، DR-، و هم‌چنین بیان HLA-G دارای ایمنی زایی پایینی می‌باشند و مطالعات بالینی نشان داده‌اند که پرده آمینون 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 اپی‌تلیال پرده آمینون در مقایسه با ePTFE پوشیده شده با هیپارین 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 پزشکی 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 سرمی HIV، سیفلیس، هپاتیت B و C منفی بودند. پس از انتقال بافت‌های جفت به آزمایشگاه، پرده آمینون از کوریون جدا شد و در محلول بافر فسفات سالین (PBS or Phosphate Buffered Saline) به آرامی شستشو داده شد تا باقیمانده‌های خون موجود

موارد از جمله وجود بیماری‌های زمینه‌ای، عروق اتولوگ به اندازه کافی در دسترس نیست و نیاز به استفاده از جایگزین‌های صناعی عروقی مانند پلی‌تترافلورواتیلن یا expanded polytetrafluoroethylene (ePTFE) می‌باشد (۲). پرده آمینون نزدیک‌ترین لایه از پرده‌های جنینی به جنین می‌باشد. این بافت از نظر بافت‌شناسی به ترتیب از خارج به داخل از پنج لایه تشکیل شده است. لایه اپی‌تلیال اولین لایه است که مستقیماً با مایع آمنیوتیک در ارتباط بوده و از سلول‌های آمنیوتیک اپی‌تلیال تشکیل شده است. غشای پایه (دومین لایه) شامل کلاژن‌های نوع I، II و IV، لامینین، فیبرونکتین و پرلکان می‌باشد. سومین لایه، لایه فشرده است که متشکل از کلاژن‌های نوع I و II است. لایه فیبروبلاستی در برگیرنده کلاژن‌های نوع I، III و IV بوده و حاوی سلول‌های آمنیوتیک مزانشیمی می‌باشد. لایه اسفنجی آخرین لایه پرده آمینون می‌باشد که متصل به کوریون بوده و حاوی پروتئوگلیکان‌ها است (۴،۳). پرده آمینون در سال‌های اخیر به صورت گسترده در پزشکی مورد استفاده قرار گرفته است. یکی از بیش‌ترین استفاده‌ها از این بافت در بیماری‌های پوستی و سوختگی‌ها بوده است. هم‌چنین پرده آمینون در زمینه چشم پزشکی از جمله بیماری‌های ملتحمه، قرنیه و استرابیسم مورد استفاده بسیاری قرار گرفته است (۵). از جمله کاربردهای دیگر پرده آمینون در جراحی‌های گوناگون از جمله تیمپانوپلاستی، 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 آمینون 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 جهت افزایش

### زمان پروترومبین (Prothrombin Time (PT))

برای بررسی تاثیر سطح اپی تلیال پرده آمینون و ePTFE بر زمان پروترومبین، ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر پلاسمای سیتراته (در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد) با نمونه‌ها انکوبه شد. سپس ۲۰۰ میکرولیتر ترومبوپلاستین (Fisher, USA) D اضافه و بلافاصله پس از آن زمان تا تشکیل لخته فیبرینی در لوله آزمایش اندازه‌گیری شد.

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

یک میلی لیتر از خون غیر سیتراته به مدت یک دقیقه با سطح اپی تلیال پرده آمینون 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 ۱۰۰۰g 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 اندازه‌گیری 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.)

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

بررسی میزان فعال شدن پلاکت‌ها با استفاده از اندازه‌گیری

### میزان رهاسازی P-selectin

مقدار P-selectin رها شده از پلاکت‌ها پس از انکوباسیون ۲۰۰ میکرولیتر خون کامل با سطح اپی تلیال

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 پلاسمای خون تهیه شده به مدت ۱۰ دقیقه با دور 2000g سانتریفیوژ شد. در جهت بررسی خون سازگاری سطح اپی تلیال پرده آمینون آزمون‌های انعقاد خون، بررسی همولیز، و فعالیت و تجمع پلاکتی بر روی پرده آمینون تازه انجام شد. جهت بررسی هیستولوژی پرده آمینون از نمونه‌های فیکس شده استفاده گردید.

### میکروسکوپ نوری

به منظور بررسی بافت شناسی، پرده آمینون 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) (activated partial thromboplastin time)

جهت بررسی تاثیر نمونه‌ها بر روی زمان پارشیال ترومبوپلاستین ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر از پلاسمای سیتراته با سطح اپی تلیال پرده آمینون و ePTFE خریداری شده (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 توسط میکروسکوپ الکترونی نگاره (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 اپی تلیال، ePTFE و شیشه مورد بررسی قرار گرفت. تغییرات مورفولوژیک پلاکتی همان‌طور که قبلاً بیان شده است (۲۰) به صورت گرد (round)، دندرتیک (dendritic or early pseudopodial)، دندرتیک گسترش یافته (spread-dendritic or intermediate pseudopodial)، در حال گسترش (spreading) و کاملاً گسترش یافته (fully spread)، 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 GraphpadPrism نسخه ۵/۰۴ صورت گرفت. مقدار p کم‌تر از ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

#### یافته‌ها

پس از جداسازی پرده آمینون از جفت، رنگ آمیزی هماتوکیسین و اتوزین از قطعات بافتی تهیه شده از پرده آمینون، ۵ لایه تشکیل‌دهنده آن را نشان داد (تصویر شماره ۱). این لایه‌ها به ترتیب از خارج به داخل شامل لایه اپی تلیال، غشای پایه، لایه فشرده، لایه فیبروبلاست و لایه اسفنجی می‌باشند.

پرده آمینون 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 میلی‌مولار 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 مقادیر 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 دستورالعمل شرکت سازنده سنجیده شد.

#### تجمع پلاکتی

خون کامل منعقد نشده به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت 160g سانتریفیوژ و سپس محلول رویی آن (Platelet Rich Plasma (PRP)) جدا شد. پس از شمارش تعداد پلاکت‌ها، با رقیق‌سازی تعداد نهایی آن‌ها به  $3 \times 10^5$  پلاکت در هر میکرولیتر رسید. جهت القای تجمع پلاکتی، PRP به دست آمده با سطح اپی تلیال پرده آمینون 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.

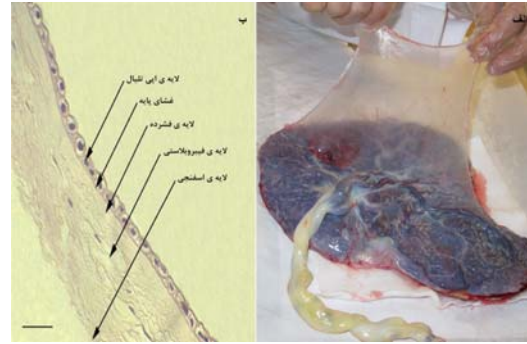
#### میکروسکوپ الکترونی

سطح اپی تلیال پرده آمینون و ePTFE و هم‌چنین مورفولوژی پلاکت‌ها پس از انکوباسیون با سطح اپی تلیال پرده آمینون، ePTFE و شیشه با استفاده از میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM) مورد بررسی قرار گرفت. نمونه‌ها با گلو تارالدهید 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 آبیگری شدند و پس از آن انجماد

می‌شود و از گرانول‌های پلاکت‌ها P-selectin آزاد می‌شود. P-selectin آزاد شده از پلاکت فعال به عنوان مارکر مفیدی در مطالعات جهت بررسی میزان فعال شدن پلاکتی استفاده می‌شود. بر این اساس در این مطالعه جهت اندازه‌گیری میزان فعال شدن پلاکت از اندازه‌گیری مقدار P-selectin به روش الیزا استفاده گردید. مقدار P-selectin آزاد شده از پلاسمای غنی از پلاکت (PRP) که با ePTFE و سطح اپی‌تلیال پرده آمینون در تماس بوده است به ترتیب برابر با  $1208 \pm 74/32$  و  $1636 \pm 70/42$  پیکوگرم بوده است. مقدار P-selectin آزاد شده از سطح اپی‌تلیال پرده آمینون انکوبه شده با پلاکت در مقایسه با ePTFE به صورت معنی‌داری کم‌تر می‌باشد ( $p < 0/05$ ).

جهت بررسی تجمع پلاکتی بعد از تهیه پلاسمای غنی از پلاکت از خون و در مجاورت قرار دادن آن با سطح اپی‌تلیال پرده آمینون و ePTFE، میزان تجمع پلاکتی توسط اندازه‌گیری 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 می‌کند 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) هم‌خوانی دارد. همان‌طور که در نمودار شماره ۱ نشان داده شده است میزان تجمع پلاکتی در سطح اپی‌تلیال در قیاس با ePTFE کم‌تر می‌باشد و هم‌چنین بررسی‌های آماری نیز تفاوت معنی‌داری را بین گروه‌های ذکر شده نشان می‌دهد.

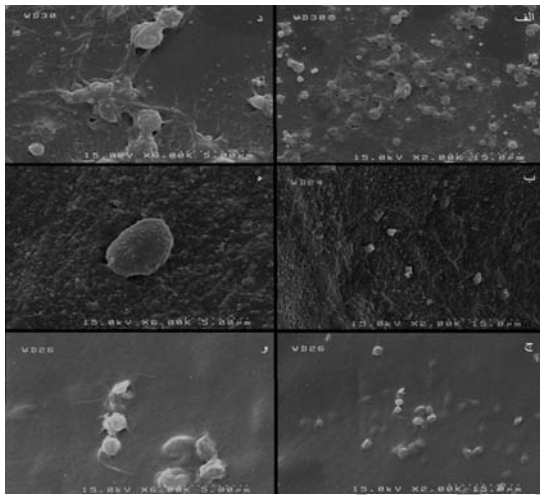
میکروسکوپ الکترونی اطلاعات بسیار مفیدی از سطح اپی‌تلیال پرده آمینون و ePTFE و هم‌چنین چگونگی رفتار پلاکت‌ها (چسبندگی و تجمع پلاکت‌ها) در زمانی که نمونه‌ها در تماس با پلاکت هستند را فراهم می‌کند. ساختار سطح پرده آمینون و ePTFE توسط میکروسکوپ الکترونی مورد ارزیابی قرار گرفت. تصویر شماره ۲ سطح ePTFE را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



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

آبشار انعقادی که شامل مسیر داخلی و خارجی انعقاد می‌باشد به ترتیب توسط آزمایشات PT و aPTT بررسی شد. زمانی که پلاسمای در تماس با سطح اپی‌تلیال پرده آمینون قرار گرفت، مقدار PT نسبت به ePTFE افزایش یافت (PT در سطح اپی‌تلیال و ePTFE به ترتیب برابر با  $17/4 \pm 0/7$  ثانیه و  $11 \pm 0/57$  ثانیه بود، ( $p < 0/01$ )). هم‌چنین سطح اپی‌تلیال پرده آمینون در مقایسه با ePTFE زمان aPTT را کاهش نداد (aPTT در سطح اپی‌تلیال برابر با  $28/61 \pm 1/39$  ثانیه و در سطح ePTFE برابر با  $2/1 \pm 33/1$  ثانیه بود). از خون کامل جهت بررسی مقدار زمان لخته شدن آن استفاده شد. زمان CT سطح اپی‌تلیال پرده آمینون برابر با  $3/74 \pm 0/4$  ثانیه و ePTFE برابر با  $0/2 \pm 3/9$  بود که از نظر آماری تفاوت معنی‌داری با یکدیگر نداشتند. در آزمون همولیز از آب مقطر (کنترل مثبت) که موجب همولیز کامل (صد درصد) گلبول‌های قرمز خون می‌شود جهت استاندارد کردن نتایج استفاده شد (۲۲). پس از گذشت ۲ ساعت از زمان انکوبه شدن خون با پرده آمینون و ePTFE همولیز واضحی مشاهده نشد (تمامی مقادیر همولیز کم‌تر از صد درصد بودند). میزان همولیز در پرده آمینون (سطح اپی‌تلیال) با ePTFE و نرمال سالین (کنترل منفی) تفاوت معنی‌داری نداشت. بعد از فعال شدن پلاکت‌ها، مورفولوژی پلاکتی دستخوش تغییر می‌شود که در نتیجه آن چسبندگی ایجاد

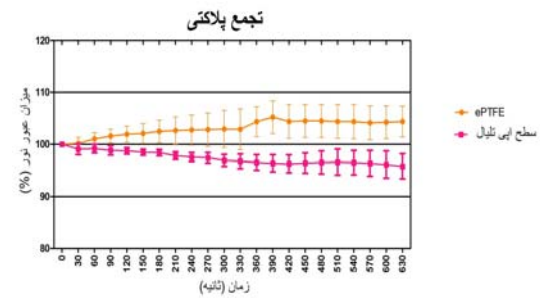
تغییر در مورفولوژی پلاکتی از جمله pseudopodia و spreading از خون نشان نداده‌اند. پلاکت‌ها در سطح ePTFE حالت تجمعی (cluster) داشتند و تغییر مختصری در مورفولوژی پلاکتی دیده شد که از نظر دسته‌بندی مورفولوژی در گروه دندرتیک و early pseudopodial قرار می‌گیرند (تصویر شماره ۳، ج و). نتایج حاصل از میکروسکوپ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



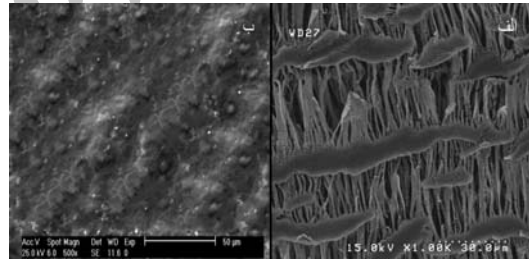
تصویر شماره ۳: تصاویر میکروسکوپ الکترونی نشان دهنده پلاکت‌ها پس از انکوباسیون پلاسمای غنی از پلاکت با شیشه (الف)، سطح اپی تلیال پرده آمینون (ب)، و ePTFE (ج، د). عکس‌های سمت چپ (د، ه، و) بزرگ شده نمونه‌های عکس‌های سمت راست (الف، ب، ج) هستند. پلاکت‌های متصل به شیشه و ePTFE به صورت دندرتیک با پاهای کاذب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

همان‌طور که در نمودار شماره ۲ نشان داده شده است کم‌ترین تعداد چسبندگی پلاکتی به طور معنی‌دار در سطح اپی تلیال 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 spread-dentritic و fully spread هستند.

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



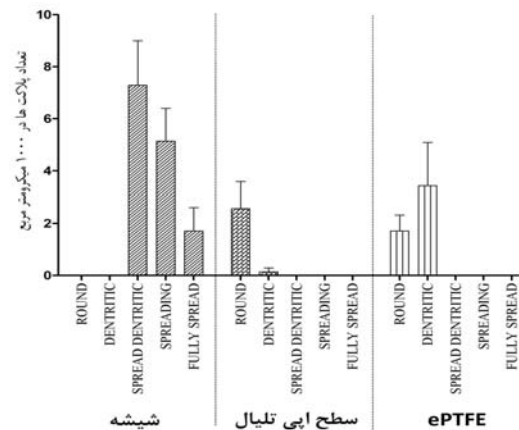
نمودار شماره ۴: میزان عبور نور نشان دهنده تجمع پلاکتی در زمانی که پلاسمای غنی از پلاکت با سطح اپی تلیال و یا ePTFE در تماس بوده است. سطح اپی تلیال پرده آمینون در مقایسه با ePTFE به میزان کم‌تری باعث تجمع پلاکتی می‌شود



تصویر شماره ۵: تصاویر میکروسکوپ الکترونی از سطح ePTFE (الف) و سطح پرده آمینون (ب)، ePTFE دارای سطحی اسفنجی می‌باشد در حالی که پرده آمینون دارای سطحی صاف و یکپارچه از یک لایه سلولی می‌باشد

تصویر شماره ۳ میزان چسبندگی پلاکت‌ها را بر روی سطوح پرده آمینون و ePTFE در مقایسه با شیشه نشان می‌دهد. تعداد پلاکت‌های چسبیده شده به شیشه در مقایسه با پرده آمینون 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 تلیال (تصویر شماره ۳، ب و ه) پرده آمینون مورفولوژی طبیعی گرد خود را حفظ کرده و هیچ‌گونه

توزیع مورفولوژیک پلاکت های چسبیده



نمودار شماره ۲: توزیع مورفولوژیک پلاکت ها بر پایه تعداد پلاکت چسبیده به سطح شیشه، سطح اپی تلیال پرده آمینون و ePTFE. تعداد بسیار کمی پلاکت به سطح اپی تلیال چسبیده است که مورفولوژی غالب آن ها گرد می باشد. تعداد مورفولوژی دندرتیک در سطح ePTFE بیش تر از سطح اپی تلیال است

## بحث

همان طور که قبلاً بیان شده است پرده آمینون دارای ویژگی های منحصر به فردی است که آن را برای کاربردهای بالینی مناسب می کند. یکی از کاربردهای پر اهمیت پرده آمینون در بالین استفاده از آن در مهندسی بافت عروق می باشد (۲۳،۷). به تازگی این گروه تحقیقی پرده آمینون را به عنوان ورید ژوگولار گوسفند با موفقیت پیوند زده است (۷). پس از ۴۸ هفته هیچ گونه نشانه ای از ترومبوز و یا گرفتگی در جایگزین استفاده شده دیده نشد. هم چنین پرده آمینون به عنوان بستری جهت کشت سلول های اندوتلیال 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 می باشد. هم چنین از آزمون زمان پروترومبین جهت ارزیابی مسیر خارجی انعقاد که در اثر تماس خون با سطوح خارجی فعال می شود استفاده شد (۲۵). هر دو آزمون PT و aPTT نشان دادند که سطح اپی تلیال پرده آمینون از نظر فعال کردن سیستم انعقادی از رنگ صناعی پوشانده شده با هپارین (heparin coated ePTFE)

که به عنوان جایگزین عروق استفاده می شود، بهتر بوده و یا حداقل با آن قابل مقایسه می باشد. آزمون همولیز روشی معتبر جهت ارزیابی خون سازگاری مواد زیستی است. فراوان ترین سلول خونی در کل حجم خون گلبول قرمز است (۴۰ درصد از کل حجم خون، ۴ میلیون در هر میکرولیتر). گلبول های قرمز در برخورد با مواد خارجی و تغییر فشار اسمزی در معرض پارگی قرار می گیرند و به دنبال آن همولیز ایجاد می گردد. به عبارت دیگر سطح همولیز نشان دهنده میزان شکنندگی گلبول های قرمز در زمانی که خون در تماس با مواد مختلف قرار می گیرد می باشد و هر چه قدر مقدار شکنندگی گلبول قرمز بیشتر باشد میزان همولیز نیز بالاتر می رود (۲۶). نتایج حاصل از بررسی های همولیز هم سو با نتایج آزمون های PT و aPTT بوده و نشان داد که سطح اپی تلیال پرده آمینون خون سازگار بوده و همولیز گلبول های قرمز را القاء نمی کند. جهت بررسی تمام فاکتورهای انعقادی موجود در خون در غیاب فاکتور بافتی (Tissue Factor) از آزمون CT استفاده می شود (۲۶). نتایج حاصل از این آزمایش نشان داد که سطح اپی تلیال پرده آمینون در زمانی که با خون انکوبه می شود تاثیر معنی داری بر زمان انعقاد خون کامل نمی گذارد. در این مطالعه از ePTFE که جایگزین عروقی صناعی بوده و مورد تأیید FDA می باشد و در بالین به وفور استفاده می شود، 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 نمی باشد 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 آمینون استفاده شد (۲). هپارین یک گلیکوز آمینو 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 آمینون



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

اگرچه نتایج aPTT به دست آمده از ePTFE مشابه سطح اپی‌تلیال پرده آمینون می‌باشد ولی میزان موفقیت استفاده از ePTFE پوشانده شده از هیپارین و دیگر جایگزین‌های صنعتی در وریدهای با قطر پایین کم بوده است (۲۹). همان‌طور که ذکر شد با استفاده از پرده آمینون جایگزینی وریدی طراحی شد که از آن در ورید ژوگولار خارجی گوسفند استفاده گردید. ورید ساخته شده از پرده آمینون 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 صنعتی می‌توان کیفیت آن‌ها را هر چه بیشتر بالا برد. اولین علت پایین بودن موفقیت جایگزین‌های صنعتی عروقی جذب سریع پروتئین‌های پلاسما به سطح داخلی لومن آن‌ها و به دنبال آن ایجاد چسبندگی پلاکتی و فعال شدن مسیر انعقاد و تولید ترومبوز می‌باشد (۳۰). پرده آمینون 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 اپی‌تلیال پرده آمینون 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 تاییدکننده خون سازگار بودن سطح اپی‌تلیال پرده آمینون می‌باشد که می‌تواند به علت ویژگی ضد چسبندگی پرده آمینون و

کاهش چسبندگی پلاکت‌ها به سطح پرده آمینون باشد. دومین علت میزان موفقیت پایین جایگزین‌های صنعتی به دلیل داشتن سطح ناهموار و عدم وجود یک لایه سلول اندوتلیال یکپارچه در لومن داخلی آن‌ها می‌باشد. همان‌طور که اشاره شد هر گونه برخورد پلاکت با سطح ناهموار و یا ماده القاکننده انعقاد باعث فعال 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 اپی‌تلیال پرده آمینون تعداد کم‌تری پلاکت چسبیده و نیز مورفولوژی اکثریت آن‌ها گرد می‌باشد. این نتایج را می‌توان به وجود یک لایه سلولی یکپارچه بر سطح اپی‌تلیال پرده آمینون نسبت داد (۳۲). همان‌گونه که در لومن عروق به‌صورت طبیعی یک لایه سلول یکپارچه اندوتلیال وجود دارد، جهت رفع مشکل القای انعقاد در لومن داخلی گرفت‌های صنعتی از کاشتن سلول درون لومن استفاده می‌شود (۱۴،۲). مزیتی که باعث توجه به استفاده از پرده آمینون در مهندسی بافت عروق می‌شود، خاصیت پرتوانی سلول‌های اپی‌تلیال پرده آمینون است (۳۳). ویژگی پرتوان بودن سلول‌های اپی‌تلیال و گزارشاتی که راجع به توانایی تبدیل شدن این سلول‌ها به ۳ لایه جنینی وجود دارد، امکان تمایز این سلول‌ها به سلول‌های اندوتلیال را ممکن می‌کند. لذا با توجه به این موضوع که وجود سلول‌های یکپارچه مسئله بسیار مهمی در جلوگیری از ترومبوز در لومن گرفت عروقی می‌باشد، با تبدیل شدن سلول‌های اپی‌تلیال پرده آمینون به سلول‌های اندوتلیال، پرده آمینون از مزیت ویژه‌ای در استفاده در مهندسی بافت عروق برخوردار است.

در پایان براساس نتایج این مطالعه آزمایشگاهی و مطالعات برون‌تن گذشتمی توان نتیجه‌گیری کرد که سطح اپی‌تلیال پرده آمینون خون سازگار است. با توجه به ماتریکس خارج سلولی غنی، خواص بنیادی سلول‌های

## سپاسگزاری

نویسندگان از جناب آقای دکتر حبیب اله پیروی به جهت راهنمایی‌های ارزشمندشان کمال تشکر 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 ایمنی‌زایی 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, Lapidus 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. *Cytotherapy* 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 ocular surface 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(diols 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.

Archive of SID