

بررسی خون سازگاری سطح مزانشیمی پرده‌ی آمینون انسانی در مقایسه با رگ مصنوعی پوششی داده شده با هپارین

دکتر قاسم یزدان پناه^۱، دکتر مونا کاکاوند^۱، دکتر حسن نیک نژاد^۲

نویسنده‌ی مسوول: تهران، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده‌ی فناوری‌های نوین پزشکی، گروه مهندسی بافت

niknejad@sbmu.ac.ir

دریافت: ۹۳/۷/۲۳ پذیرش: ۹۴/۲/۱۶

چکیده

زمینه و هدف: پرده‌ی آمینون به‌عنوان یک بافت طبیعی دارای ویژگی‌های منحصر به فردی است که آن را به‌عنوان جایگزین مناسبی در مهندسی بافت عروق قرار می‌دهد. هدف از انجام این مطالعه بررسی خون سازگاری سمت مزانشیمی پرده‌ی آمینون جدا شده از پلاستای انسانی می‌باشد. **روش بررسی:** در این مطالعه تاثیر سمت مزانشیمی پرده‌ی آمینون بر آزمون‌های انعقادی شامل مسیرهای داخلی و خارجی انعقاد، همولیز و فعالیت پلاکتی بررسی شد، و نتایج آن با جایگزین عروقی صناعی *ePTFE* (Expanded Polytetrafluoroethylene) پوشانده شده با هپارین مقایسه شد. هم چنین میزان اتصال و تغییرات مورفولوژیک پلاکت‌ها پس از تماس قرار گرفتن با نمونه‌ها توسط میکروسکوپ الکترونی مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: آزمون‌های زمان پروترومبین (*PT*)، زمان پارشیال ترومبوپلاستین (*aPTT*)، زمان انعقاد خون کامل (*CT*) و همولیز، تایید کننده‌ی خون سازگاری سمت مزانشیمی پرده‌ی آمینون بودند. هم چنین سمت مزانشیمی پرده‌ی آمینون کمتر از *ePTFE* موجب تجمع پلاکتی شده ولی القاء آزاد شدن *P-selectin* در هردو برابر بود. تعداد پلاکت‌های چسبیده به سمت مزانشیمی پرده‌ی آمینون کمتر از *ePTFE* بود. هم‌چنین مورفولوژی بیشتر سلول‌ها در سطح سمت مزانشیمی کروی بوده، در حالی که در سطح *ePTFE* بیشتر پلاکت‌ها مورفولوژی دندرتیک داشتند. **نتیجه گیری:** نتایج به دست آمده از این مطالعه نشان داد که سمت مزانشیمی پرده‌ی آمینون خون سازگار بوده و می‌تواند کاندید مناسبی جهت استفاده در مهندسی بافت به‌عنوان جایگزین عروق باشد.

واژگان کلیدی: پرده‌ی آمینون، خون سازگاری، مهندسی بافت عروق، سلول‌های بنیادی، *ePTFE*

مقدمه

عروق اتولوگ که از خود فرد گرفته می‌شوند انتخاب اول در بیماری‌های عروقی جهت جایگزینی عروق آسیب دیده می‌باشند. متأسفانه همیشه رگ اتولوگ مناسب جهت جراحی‌های عروقی به دلایلی همچون فلیت قبلی، واریس، برداشتن عروق جهت اعمال جراحی دیگر و یا آناتومی نامناسب وجود ندارد. در چنین شرایطی جراح به ناچار، ملزم به استفاده از جایگزین‌های عروقی صناعی مهندسی شده می‌باشد (۱ و ۲). جایگزین‌های عروقی صناعی در معرض	
---	--

۱- پزشک عمومی، گروه مهندسی بافت، دانشکده‌ی فناوری‌های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تهران

۲- دکترای فارماکولوژی، دانشیار دانشکده‌ی فناوری‌های نوین پزشکی و مرکز تحقیقات نانو تکنولوژی و مهندسی بافت، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تهران

عوارض بعدی همچون استنوز، ترومبوز، کلسیفیکاسیون و عفونت می‌باشند (۳). از طرفی جایگزین‌های صناعی به‌صورت عمده در شریان‌ها استفاده می‌شوند و در وریدها با محدودیت قابل استفاده می‌باشند، زیرا فشار پایین وریدها خطر تشکیل لخته و ترومبوز را افزایش می‌دهد. هنگامی که جایگزین عروقی در بدن موجود زنده به کار می‌رود، خون اولین مایعی است که با آن در تماس قرار می‌گیرد. معمولاً جذب سریع پروتئین‌های پلاسما به سطح داخلی مجرای رگ باعث چسبندگی پلاکتی می‌شود که این روند نیز شروع کننده‌ی فرایند انعقاد و تشکیل ترومبوز می‌شود. احتمال این وقایع در مورد جایگزین‌های صناعی بیشتر می‌باشد (۴ و ۵). با توجه به دلایل بیان شده مطالعات بسیاری برای بهبود جایگزین‌های عروقی (با تاکید بر زیست سازگاری بیشتر) در حال انجام می‌باشد (۶). پرده‌ی آمینون لایه‌ی داخلی پرده‌های جنینی است که غشایی بدون رگ و سرشار از کلاژن می‌باشد. این بافت از ۵ لایه‌ی اصلی تشکیل شده است. نزدیکترین لایه به مایع آمنیوتیک لایه اپی‌تلیال می‌باشد که از سلول‌های آمنیوتیک اپی‌تلیال تشکیل شده است. ماتریکس خارج سلولی پرده‌ی آمینون (غشای پایه) حاوی کلاژن‌های نوع I، II، IV، لامینین، فیبرونکتین و پرلکان می‌باشد که باعث چسبندگی و تکثیر بسیاری از سلول‌ها از جمله سلول‌های اندوتلیال می‌شود. سومین لایه، لایه‌ی فشرده (Compact Layer) نام دارد که شامل رشته‌های موازی از کلاژن نوع I و II بوده و فراهم کننده‌ی خواص مکانیکی پرده‌ی آمینون است. چهارمین لایه، لایه‌ی فیبروبلاست است که از کلاژن‌های نوع I، III، IV و فیبرونکتین تشکیل شده و حاوی سلول‌های آمنیوتیک مزانشیمال می‌باشد. سلول‌های آمنیوتیک اپی‌تلیال و مزانشیمال ویژگی سلول‌های بنیادی و توانایی تمایز به سلول‌های دیگر را دارند (۷). خارجی‌ترین لایه، لایه‌ی اسفنجی بوده که سرشار از پروتئوگلیکان می‌باشد (۸). مطالعات گذشته نشان داده است که پرده‌ی آمینون مزایای بسیاری جهت استفاده در بالین

از جمله خواص آنتی‌باکتریال، ضد چسبندگی، ضد اسکار، ضد التهاب، ضد سرطانی، ایمنی‌زایی کم و قدرت مکانیکی مناسب دارد (۹-۱۱). پرده‌ی آمینون حاوی فاکتورهای رشدی مانند فاکتور رشد فیبروبلاستی (bFGF)، فاکتور رشد اپیدرمی (EGF)، فاکتور رشد کراتینوسیتی (KGF) و فاکتور رشد هپاتوسیتی (HGF) است که می‌توانند در ترمیم بافت‌ها مفید باشند (۱۲ و ۱۳). به همین جهت، پرده‌ی آمینون در ترمیم سوختگی‌ها، جراحی‌هایی مانند بازسازی حفره دهان، مثانه و واژن و در ترمیم پرده‌ی صماخ و مفصل بسیار کارآمد بوده است (۱۴). همچنین پرده‌ی آمینون شرایطی مناسب برای کشت سلول‌های اندوتلیال و اپی‌تلیال ایجاد می‌کند که آن را بستری مناسب در کشت سلول قرار داده است (۱۵). اخیراً در مطالعه‌ای که توسط این گروه تحقیقی انجام شد نشان داده شد که پرده‌ی آمینون می‌تواند جایگزین مناسبی برای ورید گردنی در گوسفند باشد (۱۶). با توجه به مطالب ذکر شده، پرده‌ی آمینون می‌تواند به‌عنوان یک بیومتریال طبیعی جایگزین مناسبی جهت استفاده در مهندسی بافت عروق باشد. از جمله خصوصیات یک بیومتریال مناسب خون سازگاری می‌باشد. لذا در این مطالعه خون سازگاری سمت مزانشیمی پرده‌ی آمینون در مقایسه با ePTFE (Polytetrafluoroethylene Expanded) پوشانده شده با هپارین بررسی شد.

روش بررسی

جمع‌آوری بافت و خون: پس از کسب تایید کمیته اخلاق پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی و پس از کسب رضایت آگاهانه از مادران، بافت جفت (۸ عدد) به دنبال سزارین‌های انتخابی از مادران در هفته‌های ۳۶ تا ۳۸ بارداری از بیمارستان عرفان تهیه شد. مادران همگی از نظر شاخص‌های سرولوژیک عفونت‌های HIV، HBV، HCV و سیفلیس منفی بودند. بافت‌های جفت به آزمایشگاه منتقل شدند و پرده‌ی آمینون از آن‌ها جداسازی شد. جهت پاکسازی

(Fisher, USA) به نمونه‌ها اضافه شد و بلافاصله پس از آن زمان تا تشکیل لخته فیبرین محاسبه شد.

محاسبه‌ی زمان لخته شدن خون کامل بدون ضد انعقاد (Clotting Time (CT): یک میلی لیتر از خون غیر سیترا ته به مدت یک دقیقه با سمت مزانشیمی پرده‌ی آمینون و یا ePTFE انکوبه شد و زمان لخته شدن خون با استفاده از روش کیلاری (Capillary Method) محاسبه گردید.

اندازه گیری همولیز: در این روش ابتدا، جهت رقیق کردن خون، مقدار ۲۰۰ میکرولیتر خون سیترا ته به ۱۰ میلی لیتر نرمال سالین ۰/۹ درصد اضافه شد و سپس سمت مزانشیمی پرده‌ی آمینون و ePTFE با خون رقیق شده به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی گراد انکوبه شدند. پس از آن نمونه خون سانتریفیوژ شد و جذب نوری محلول رویی آن در طول موج ۵۴۵ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر (Cecil, UK) اندازه‌گیری شد و همولیز از فرمول زیر محاسبه گردید:

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

در این آزمون از آب مقطر به عنوان کنترل مثبت و از نرمال سالین به عنوان کنترل منفی استفاده شد.

بررسی میزان فعال شدن پلاکت‌ها با استفاده از **اندازه‌گیری میزان رها سازی P-Selectin:** مقدار P-Selectin رها شده از پلاکت‌ها پس از انکوباسیون ۲۰۰ میکرولیتر خون کامل با سمت مزانشیمی پرده‌ی آمینون و یا ePTFE به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی گراد، به روش الیزا اندازه‌گیری شد. پس از اتمام انکوباسیون، نمونه‌ی خون به میکروتیوب ۱/۵ میلی لیتری منتقل شد. سپس EDTA تا رسیدن به غلظت نهایی ۱۰ میلی مولار به آن اضافه شد. نمونه‌ها جهت تهیه‌ی پلاسمای کم پلاکتی (Platelet Poor Plasma) PPP به مدت ۱۰ دقیقه با دور 2000g سانتریفیوژ شدند. در نهایت مقدار P-Selectin محلول رویی به روش الیزا با استفاده از کیت تجاری

باقیمانده‌های خون از پرده‌های آمینون، به آرامی در محلول بافر فسفات سالین (PBS, Phosphate Buffered Saline) شستشو داده شدند تا جهت آزمون‌ها مورد استفاده قرار گیرند (۱۷). برای تشخیص سطح پرده‌ی آمینون (افتراق سطح اپی تلیال از مزانشیمال)، بافت‌های جداسازی شده توسط میکروسکوپ نوری بررسی شدند، سطح اپی تلیال حاوی لایه‌ای یکنواخت از سلول‌های اپی تلیال است که آن را قابل افتراق از سطح مزانشیمی می‌کند. خون تازه‌ی انسان از افراد سالم و داوطلبی که سابقه‌ی مصرف هیچ گونه داروی ضد انعقاد را نداشتند تهیه شد و در لوله‌ی حاوی سدیم سیترا ت نگهداری شد. جهت استخراج پلاسمای، خون جمع‌آوری شده به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۲۰۰۰g سانتریفیوژ شد.

میکروسکوپ نوری: پرده‌ی آمینون تهیه شده توسط فرمالین ۱۰ درصد به مدت ۲۴ ساعت فیکس شد. پس از قرار دادن در پارافین با استفاده از میکروتوم از آن برش تهیه شد. برش‌های تهیه شده با هماتوکسیلین و ائوزین (H&E) رنگ‌آمیزی شده و توسط میکروسکوپ نوری (NIKON, Japan) مورد ارزیابی قرار گرفتند.

اندازه‌گیری زمان پارشیال ترومبوپلاستین (activated Partial Thromboplastin Time (aPTT): ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر از پلاسمای سیترا ته با سمت مزانشیمی پرده‌ی آمینون و یا ePTFE (Jotec, Flowline, Biopore, USA) انکوبه شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از ترومبوپلاستین (Rat brain, Fisher, USA) C به آن اضافه شد. پس از ۵ دقیقه انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی گراد، ۱۰۰ میکرولیتر کلسیم کلراید ۳۷ درجه‌ی سانتی گراد به آن اضافه شده و زمان تشکیل لخته فیبرین محاسبه گردید. **اندازه‌گیری زمان پروترومبین (Prothrombin Time (PT):** جهت محاسبه‌ی PT، ۱۰۰ میکرولیتر پلاسمای سیترا ته‌ی ۳۷ درجه‌ی سانتی گراد با سمت مزانشیمی پرده‌ی آمینون و یا ePTFE انکوبه شده و سپس ۲۰۰ میکرولیتر ترومبوپلاستین D

اسپردینگ (Spreading) و فولی اسپرد (Fully Spread) طبقه بندی شد.

محاسبات آماری: آزمون‌ها حداقل بر روی شش بافت مختلف انجام شدند. نتایج کمی به صورت آنالیز میانگین $\pm$ خطای استاندارد میانگین (SEM) بیان شده‌اند. تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از آزمون واریانس (ANOVA) و به دنبال آن با استفاده از آزمون Tukey، با استفاده از نرم افزار GraphpadPrism نسخه ۵/۰۴ صورت گرفت. مقدار P کمتر از ۰/۰۵ معنی دار در نظر گرفته شد.

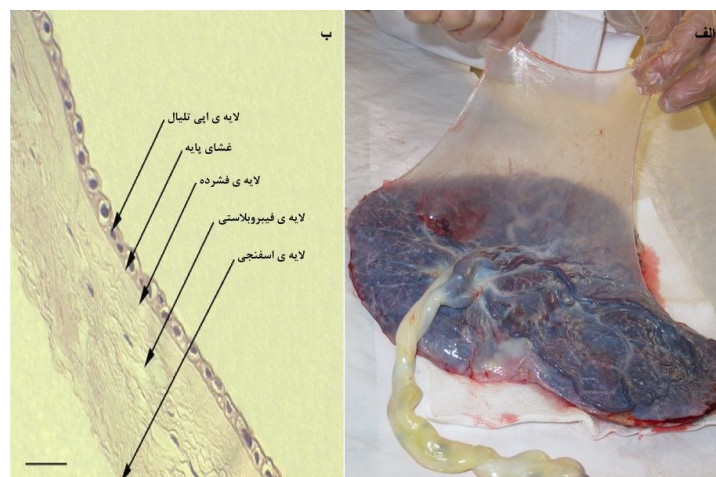
یافته‌ها

جهت بررسی بافت‌شناسی پرده‌ی آمینون، بافت رنگ آمیزی شده با هماتوکسیلین و ائوزین (H&E) مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۱). پنج لایه‌ی اصلی تشکیل دهنده‌ی پرده‌ی آمینون که شامل لایه‌ی اپی‌تلیال، غشای پایه، لایه فشرده، لایه فیروبلست و لایه اسفنجی می‌باشد، توسط میکروسکوپ نوری مورد ارزیابی قرار گرفت. مسیر داخلی آبشار انعقادی توسط آزمون زمان پروترومبین (PT) مورد ارزیابی قرار گرفت. هنگامی که پلاسما در تماس با سمت مزانشیمی پرده‌ی آمینون قرار داشت مقدار PT نسبت به ePTFE بیشتر بود. (زمان پروترومبین در سمت مزانشیمی پرده‌ی آمینون و ePTFE به ترتیب $15/8 \pm 0/7$ ثانیه و $11 \pm 0/57$ ثانیه محاسبه شد ($P < 0/05$ ، شکل ۲، الف). هم چنین آزمون aPTT که نشان دهنده‌ی فعالیت مسیر خارجی آبشار انعقاد می‌باشد، نشان داد که سمت مزانشیمی پرده‌ی آمینون و ePTFE تاثیر یکسانی در فعال کردن مسیر خارجی داشتند (شکل ۲، ب). جهت بررسی مسیر داخلی و خارجی آبشار انعقاد به صورت هم زمان از آزمون Clotting Time (CT) استفاده شد. نتایج این آزمون نشان داد که سمت مزانشیمی پرده‌ی آمینون و ePTFE از نظر زمان CT، تفاوت معناداری با یکدیگر ندارند (شکل ۲، ج).

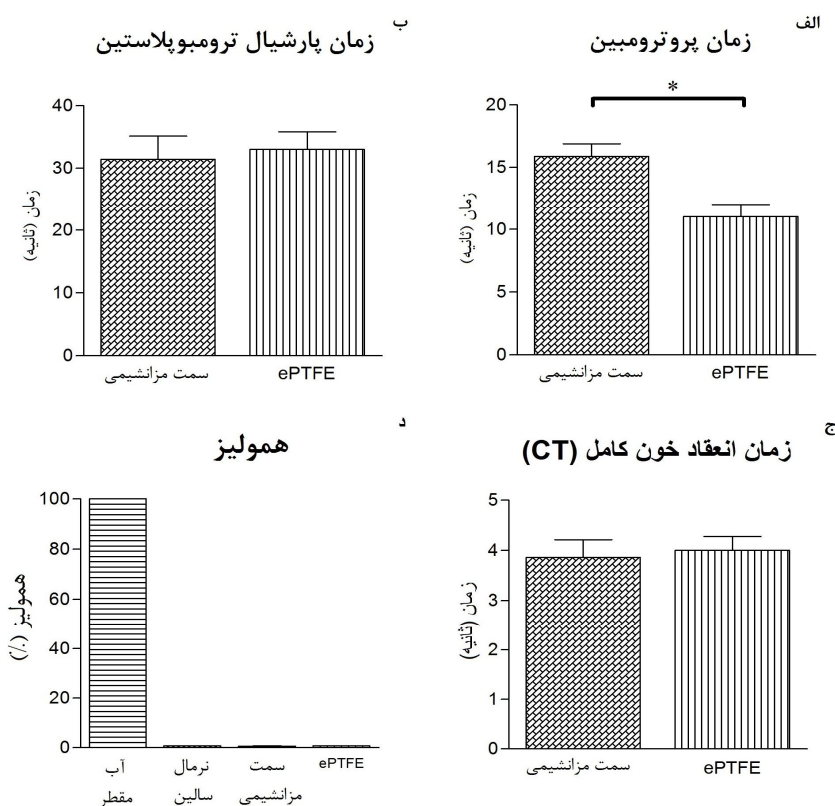
(Human P-selectin Immunoassay, Abnova) و با توجه به دستورالعمل شرکت سازنده سنجیده شد.

تجمع پلاکتی: جهت تهیه‌ی پلاسما غنی از پلاکت، خون کامل منعقد نشده به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۶۰g سانتریفیوژ شده و محلول رویی آن Platelet Rich Plasma (PRP) جمع‌آوری شد. پس از محاسبه‌ی غلظت پلاکت به دست آمده، غلظت آن توسط PBS به غلظت نهایی 3×10^5 پلاکت در هر میکرولیتر رسید. سپس پلاسما غنی از پلاکت با سمت مزانشیمی پرده‌ی آمینون و سطح ePTFE به جهت القای تجمع پلاکتی در تماس قرار گرفت. در نهایت میزان عبور نور از نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه توسط دستگاه اگریگومتر (Hart Bioicals, UK) اندازه‌گیری شد.

میکروسکوپ الکترونی: مورفولوژی پلاکت‌های چسبیده پس از انکوباسیون آن‌ها با سمت مزانشیمی پرده‌ی آمینون، ePTFE و شیشه توسط میکروسکوپ الکترونی مورد بررسی قرار گرفت. نمونه‌ها با گلو تار ال‌هید ۲/۵ درصد در PBS به مدت ۲ ساعت فیکس شدند. سپس با قرار دادن هر کدام از نمونه‌ها در سری افزایشی اتانول (۴۰، ۶۰، ۸۰ و ۹۹ درصد) به مدت ۱۰ دقیقه آگیری صورت گرفت و سپس انجماد خشک بر روی آن‌ها انجام شد. در نهایت یک لایه‌ی ۷ نانومتری از طلا بر روی نمونه‌ها کشیده شد تا جهت بررسی توسط میکروسکوپ الکترونی (Hitachi, Field Emission Scanning Electron Microscope, Japan) آماده شوند. جهت بررسی تعداد و مورفولوژی پلاکت‌های چسبیده به سطح نمونه‌ها، سطح آن‌ها در ۸ تا ۱۰ زمینه‌ی مختلف که به صورت تصادفی انتخاب شده بودند مشاهده شدند و تعداد و تغییرات مورفولوژیک آن‌ها در سمت مزانشیمی، ePTFE و شیشه مورد بررسی قرار گرفت. تغییرات مورفولوژیک پلاکتی همان طور که قبلاً بیان شده است (۱۹ و ۱۸) به صورت گرد (Round)، دندرتیک (Dendritic or Early Pseudopodial)، اسپرد-دندرتیک (Spread-Dendritic or Intermediate Pseudopodial).



شکل ۱: جفت به همراه پرده ی آمنیون (الف)، بافت شناسی پرده ی آمنیون (ب). پنج لایه ی تشکیل دهنده ی پرده ی آمنیون؛ لایه ی اپی تلیال، غشای پایه، لایه ی فشرده، لایه ی فیبرویلاست و لایه ی اسفنجی. مقیاس برابر با ۵۰ میکرومتر است.

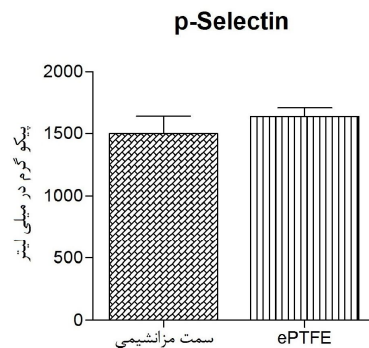


شکل ۲: (الف) زمان پروترومبین و (ب) زمان پارشیال ترومبوپلاستین، سمت مزانشیمی پرده ی آمنیون زمان پروترومبین را به صورت معنی داری افزایش می دهد. (ج) زمان لخته شدن خون بعد از انکوباسیون خون کامل با سمت مزانشیمی پرده ی آمنیون و ePTFE هر دو نمونه اثر مشابهی بر CT داشتند. (د) میزان همولیز ایجاد شده در نمونه های خون انکوبه شده با سمت مزانشیمی پرده ی آمنیون، ePTFE و نرمال سالین در مقایسه با آب مقطر. پس از گذشت ۲ ساعت از انکوباسیون با نمونه ها هیچ گونه شواهدی از همولیز مشاهده نشد ($P < 0.05$).

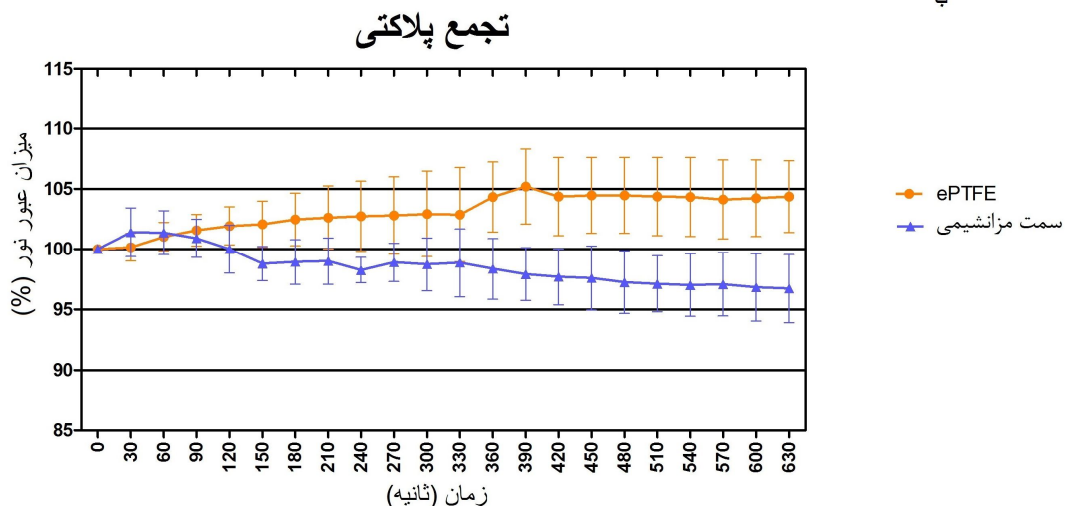
می‌شود که در نتیجه‌ی آن چسبندگی پلاکتی رخ داده و از گرانول‌های پلاکت‌ها P-Selectin آزاد می‌شود. لذا جهت بررسی میزان فعال شدن پلاکت‌ها در این مطالعه مقدار P-Selectin رها شده به روش الیزا اندازه‌گیری شد. مقدار P-Selectin آزاد شده هنگامی که پلاکت‌ها در تماس با سمت مزانشیمی پرده‌ی آمینون و یا ePTFE بودند، به یک اندازه محاسبه گردید (شکل ۳، الف). این نتایج بیان می‌کند که سمت مزانشیمی پرده‌ی آمینون القا کننده‌ی فعالیت پلاکت‌ها نمی‌باشد و خون سازگاری مناسبی دارد.

در آزمون همولیز، از آب مقطر که موجب همولیز کامل گلبول‌های قرمز خون می‌شود به عنوان کنترل مثبت و از نرمال سالین که هیچ گونه لیزی در گلبول‌های قرمز ایجاد نمی‌کند به عنوان کنترل منفی استفاده شد (۲۰). پس از گذشت ۲ ساعت از زمان انکوبه شدن خون با سمت مزانشیمی پرده‌ی آمینون و ePTFE، همولیزی در نمونه‌های انکوبه شده با سمت مزانشیمی پرده‌ی آمینون، ePTFE و نرمال سالین (کنترل منفی) در مقایسه با آب مقطر مشاهده نشد (شکل ۲، د). در اثر فعال شدن پلاکت‌ها تغییر مورفولوژی پلاکتی ایجاد

الف



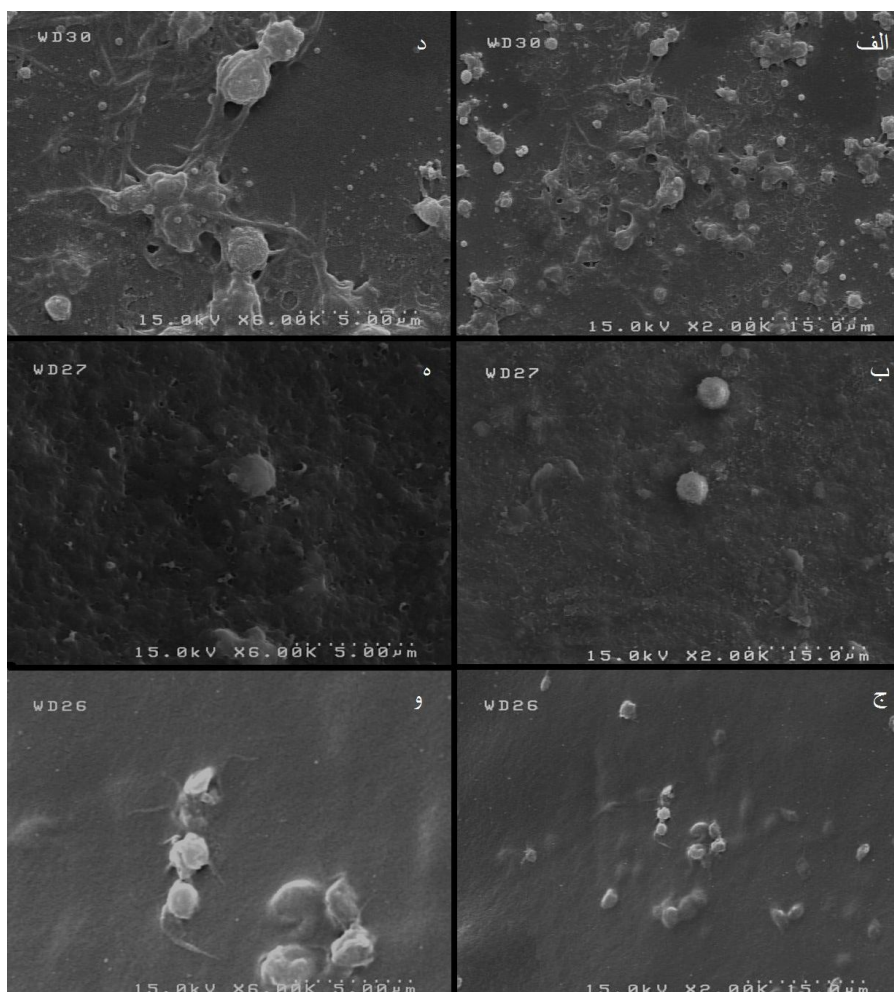
ب



شکل ۳، الف) مقدار P-selectin محلول آزاد شده در پلاسما به دنبال انکوباسیون با سمت مزانشیمی پرده‌ی آمینون و ePTFE اندازه‌گیری شده با روش الیزا. ب) میزان تجمع پلاکتی در زمانی که پلاسمای غنی از پلاکت (PRP) با سمت مزانشیمی پرده‌ی آمینون و ePTFE انکوبه شده است. سمت مزانشیمی پرده‌ی آمینون در مقایسه با ePTFE به میزان کمتری باعث تجمع پلاکت‌ها می‌شود.

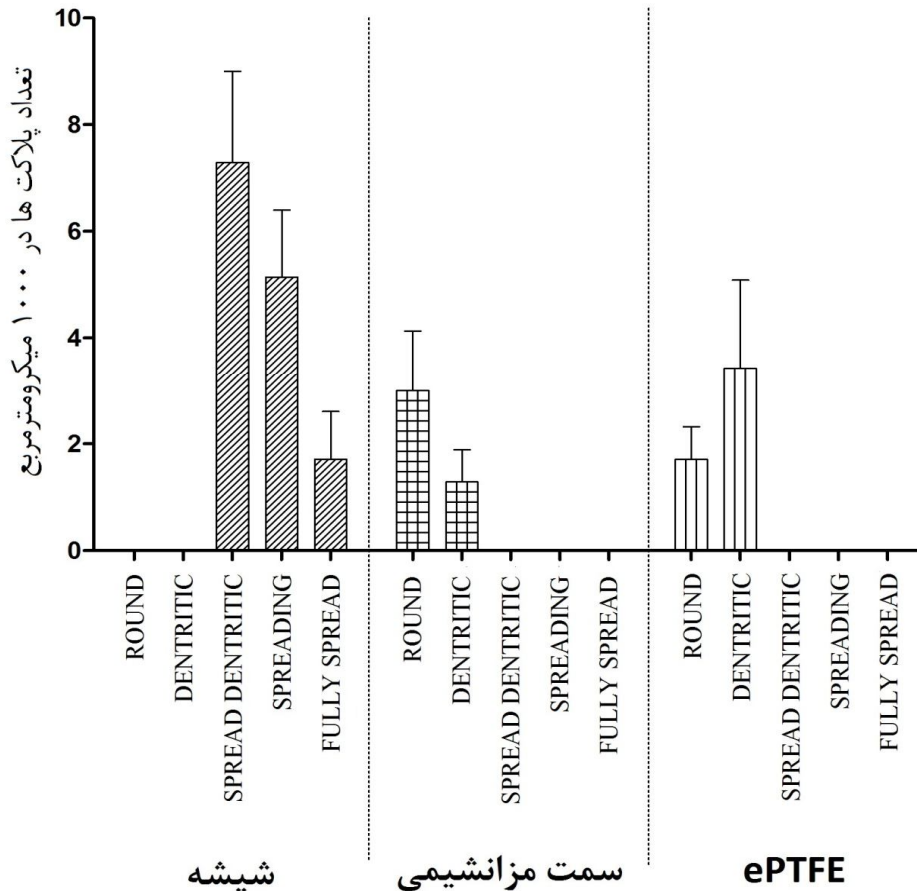
تجمع پلاکتی پس از تماس با سمت مزانشیمی پرده‌ی آمینون نسبت به ePTFE به صورت معناداری کمتر می‌باشد. چگونگی رفتار پلاکت‌ها (میزان چسبندگی و تغییرات مورفولوژی آن‌ها) پس از تماس با سمت مزانشیمی پرده‌ی آمینون و ePTFE با استفاده از میکروسکوپ الکترونی مورد ارزیابی قرار گرفت. شکل ۴ چگونگی اتصال پلاکت‌ها را روی سمت مزانشیمی پرده‌ی آمینون و ePTFE در مقایسه با شیشه نشان می‌دهد.

جهت بررسی تجمع پلاکتی، پلاسمای غنی از پلاکت (PRP) در مجاورت سمت مزانشیمی پرده‌ی آمینون و یا ePTFE قرار گرفت. سپس میزان تجمع پلاکتی با اندازه‌گیری شدت نور عبوری از نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه با فواصل ۳۰ ثانیه سنجیده شد. در این آزمون به دنبال تجمع پلاکتی شدت نور عبوری از نمونه‌ها افزایش پیدا می‌کند، بدین معنی که هرچه میزان عبور نور بیشتر شود تجمع پلاکتی افزایش یافته است. همان‌طور که در شکل ۳، ب، نشان داده شده است، میزان



شکل ۴: تصاویر گرفته شده از شیشه (الف و د)، سمت مزانشیمی پرده‌ی آمینون (ب و ه) و ePTFE (ج و و) توسط میکروسکوپ الکترونی پس از انکوباسیون با پلاسمای غنی از پلاکت (PRP). تصاویر سمت چپ (د، ه و و) بزرگ نمایی بیشتر از تصاویر سمت راست (الف، ب و ج) می‌باشند. تعداد پلاکت‌های چسبیده به سطح شیشه و ePTFE نسبت به تعداد پلاکت چسبیده به سطح سمت مزانشیمی پرده‌ی آمینون بیشتر می‌باشد. پلاکت‌ها در سطح شیشه و ePTFE دارای مورفولوژی spread و pseudopodial هستند، در حالی که در سمت مزانشیمال پرده‌ی آمینون مورفولوژی طبیعی (گرد) پلاکت‌ها حفظ شده است.

توزیع مورفولوژیک پلاکت های چسبیده



شکل ۵: توزیع مورفولوژیک پلاکتی بر پایه‌ی تعداد پلاکت چسبیده به سطح شیشه، سمت مزانشیمی پرده‌ی آمینون و ePTFE. تعداد مورفولوژی دندرتیک در سطح ePTFE بیشتر از سمت مزانشیمی پرده‌ی آمینون می‌باشد.

(Cluster) داشته و تغییرات مختصری در مورفولوژی آن‌ها دیده می‌شود که از نظر دسته‌بندی مورفولوژیک در گروه دندرتیک و Early Pseudopodial قرار می‌گیرند (شکل ۴، ج و و). شکل ۵ توزیع مورفولوژی پلاکتی بر پایه‌ی تعداد پلاکت متصل به سمت مزانشیمی پرده‌ی آمینون، ePTFE و شیشه را نشان می‌دهد. براساس مورفولوژی پلاکتی حدود ۷۰ درصد پلاکت‌ها در سمت مزانشیمی پرده‌ی آمینون دارای مورفولوژی کروی (Round) و ۳۰ درصد مورفولوژی

تعداد پلاکت‌های چسبیده شده به شیشه در مقایسه با پرده‌ی آمینون و ePTFE بسیار بیشتر است (شکل ۴، الف و د). تغییرات زیادی در مورفولوژی پلاکت‌ها در زمانی که در تماس با شیشه بوده‌اند رخ داده است (spread and cluster). پلاکت‌ها در سمت مزانشیمی پرده‌ی آمینون (شکل ۴، ب و ه) مورفولوژی طبیعی گرد (Round) خود را حفظ کرده و تغییراتی از جمله Pseudopodia و Spreading از خود نشان نداده‌اند. پلاکت‌ها در سطح ePTFE حالت تجمع‌ی

سازگاری جایگزین‌های صناعی، لومن آن‌ها با هپارین پوشیده می‌شود (۱). هپارین یک گلیکوزآمینوگلیکان است که باعث مهار انعقاد می‌شود. یکی از ویژگی‌های پرده آمینون بیان یک نوع از هپارین سولفات گلیکوزآمینوگلیکان توسط سلول‌های مزانشیمی و پرلکان توسط غشای پایه می‌باشد (۲۶). پرلکان همچنین از طریق تاثیر بر فاکتور رشدی فیروبلاست-۲ (FGF-2) موجب تکثیر سلول‌های اندوتلیال می‌شود (۸). یکی از علل ایجاد ترومبوز، چسبیدن پروتئین‌های پلازما به سطح داخلی لومن جایگزین صناعی و فعال کردن پلاکت‌ها و مسیر انعقاد می‌باشد (۲۷). از ویژگی‌های ذاتی پردهی آمینون خاصیت ضد چسبندگی آن می‌باشد که این ویژگی باعث افزایش خون سازگاری و کاهش احتمال تشکیل ترومبوز می‌شود. از این خاصیت پردهی آمینون در انواع جراحی‌ها استفاده می‌شود (۲۸). همان‌طور که تصاویر گرفته شده توسط میکروسکوپ الکترونی و نمودار تجمع پلاکتی نشان می‌دهد، تعداد پلاکت‌های چسبیده به سمت مزانشیمی پرهی آمینون و نیز میزان تجمع پلاکتی در آن نسبت به ePTFE کمتر می‌باشد که می‌تواند به دلیل ویژگی ضد چسبندگی پردهی آمینون باشد. در بررسی مورفولوژیک پلاکتی، بیشتر پلاکت‌ها روی سمت مزانشیمی حالت طبیعی (کروی) خود را حفظ کرده و نیز تعداد پلاکت چسبیده به سطح آن کمتر از ePTFE بود که یکی از دلایل آن می‌تواند ترشح مدیاتورهای ضد التهابی از جمله IL-4، IL-10 و IL-13 توسط سلول‌های مزانشیمال پردهی آمینون باشد (۲۹). نشان داده شده است که بین التهاب و انعقاد ارتباط وجود دارد به این گونه که هر چه میزان التهاب بیشتر باشد ریسک فعال شدن مسیر انعقاد و تشکیل ترومبوز نیز بیشتر می‌شود (۳۰). همچنین ترشح موادی هم چون ماتریکس متالوپروتئیناز-۹ و PEDF از سلول‌های پردهی آمینون باعث مهار تجمع و فعالیت پلاکتی می‌شوند (۳۱ و ۳۲). همان‌طور که پیش‌تر بیان شد سلول‌های مزانشیمال پردهی آمینون خاصیت سلول‌های بنیادی را دارند

دندرتیک داشتند، در حالی که ۷۰ درصد پلاکت‌ها در سطح ePTFE دارای مورفولوژی دندرتیک و ۳۰ درصد مورفولوژی کروی (Round) داشتند. بیشترین تعداد چسبندگی پلاکتی بر روی نمونه شیشه مشاهده شد، به‌طوری که اکثریت سلول‌ها دارای مورفولوژی Spread-Dentritic و Fully Spread بودند.

بحث

پردهی آمینون به‌عنوان یک بیومتریال طبیعی خواص کاربردی بسیاری از جمله خواص ضد رشد سلول‌های سرطانی دارد (۲۳-۲۱) و همچنین به‌عنوان یک داربست منحصر به فرد برای مهندسی بافت مطرح می‌باشد. لذا خون سازگاری پردهی آمینون برای استفاده از آن در کلینیک از اهمیت بسیاری برخوردار است. جهت بررسی چگونگی تاثیر سمت مزانشیمی پردهی آمینون بر روی آبشار انعقادی و ایجاد ترومبوز، از آزمون‌های PT، PTT و CT به‌ترتیب جهت بررسی مسیر داخلی انعقاد، مسیر خارجی انعقاد و کل مسیر انعقاد خون بدون حضور فاکتور بافتی، استفاده شد (۲۴). نتایج به‌دست آمده نشان می‌دهد که سمت مزانشیمی پردهی آمینون در مقایسه با ePTFE پوشانده شده با هپارین از خون سازگاری مناسبی برخوردار است. حدود ۴۰ درصد از کل سلول‌های در گردش خون را گلبول‌های قرمز تشکیل می‌دهند. این سلول‌ها به دنبال تغییر فشار اسمزی و یا برخورد با اجسام خارجی دچار پارگی و لیز می‌شوند. به عبارت دیگر هر چه میزان همولیز کمتر باشد نشان دهندهی خون سازگاری بیشتر مادهی زیستی مورد نظر می‌باشد (۲۵). با توجه به این مطلب، جهت بررسی چگونگی تاثیر سمت مزانشیمی پردهی آمینون و ePTFE بر روی گلبول‌های قرمز از آزمون همولیز استفاده شد. یافته‌های آزمون همولیز با نتایج آزمون‌های PT، PTT و CT هم‌خوانی داشته و نشان دهندهی خون سازگاری سمت مزانشیمی پردهی آمینون می‌باشد. جهت افزایش خون

خواص مکانیکی مناسب، این بافت می‌تواند کاندید مناسبی جهت استفاده در مهندسی بافت باشد.

تقدیر و تشکر

نویسندگان از جناب آقای دکتر حبیب اله پیروی به جهت راهنمایی‌های ارزشمندشان کمال تشکر را دارند. نتایج این مقاله از پایان نامه‌ی پزشکی عمومی استخراج شده است. این مطالعه با حمایت مرکز تحقیقات نانو فناوری پزشکی و مهندسی بافت دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی انجام شده است.

References

- 1- 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: 30-41.
- 2- Zhang WJ, Liu W, Cui L, Cao Y. Tissue engineering of blood vessel. *J Cell Mol Med*. 2007; 11: 945-57.
- 3- 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: 503-12.
- 4- Suma H. Arterial grafts in coronary bypass surgery. *Ann Thorac Cardiovasc Surg*. 1999; 5: 141-5.
- 5- Carnagey J, Hern-Anderson D, Ranieri J, Schmidt CE. Rapid endothelialization of photo fix natural biomaterial vascular grafts. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2003; 65: 171-9.

(۳۳). نشان داده شده است که این سلول‌ها توانایی تمایز به سلول‌های اندوتلیال را دارند (۳۵ و ۳۴). سلول‌های اندوتلیال یکی از مهم‌ترین عوامل ایجاد کننده‌ی محیطی برای جلوگیری از ایجاد لخته‌ی خون در لومن رگ می‌باشد. این سلول‌ها با واکنش با فاکتورهای انعقادی و هم‌چنین لیز لخته‌های ایجاد شده مانع از ایجاد ترومبوز می‌شوند (۳۶).

نتیجه‌گیری

با توجه به یافته‌های امیدوارکننده این مطالعه و همچنین ویژگی‌های پرده‌ی آمینون از جمله خواص ضد باکتری، ایمنی‌زایی پایین، خواص بنیادی سلول‌های پرده‌ی آمینون و

- 6- Seifu DG, Purnama A, Mequanint K, Mantovani D. Small-diameter vascular tissue engineering. *Nat Rev Cardiol*. 2013; 10: 410-21.
- 7- 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: 22-7.
- 8- 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.
- 9- Tehrani FA, Ahmadiani A, Niknejad H. The effects of preservation procedures on antibacterial property of amniotic membrane. *Cryobiology*. 2013; 67: 293-8.
- 10- Niknejad H, Khayat-Khoei M, Peirovi H. Inhibition of MMPs might increase anticancer properties of amniotic epithelial cells. *Med Hypotheses*. 2012; 78: 690-1.

- 11- Niknejad H, Yazdanpanah G. Anticancer effects of human amniotic membrane and its epithelial cells. *Med Hypotheses*. 2014; 82: 488-9.
- 12- Lee SB, Li DQ, Tan DT, Meller DC, Tseng SC. Suppression of TGF-beta signaling in both normal conjunctival fibroblasts and pterygial body fibroblasts by amniotic membrane. *Curr Eye Res*. 2000; 20: 325-34.
- 13- Solomon A, Rosenblatt M, Monroy D, Ji Z, Pflugfelder SC, Tseng SC. Suppression of interleukin 1alpha and interleukin 1beta in human limbal epithelial cells cultured on the amniotic membrane stromal matrix. *Br J Ophthalmol*. 2001; 85: 444-9.
- 14- Fernandes M, Sridhar MS, Sangwan VS, Rao GN. Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction. *Cornea*. 2005; 24: 643-53.
- 15- 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: 145-51.
- 16- 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: 1098-104.
- 17- 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: 56-63.
- 18- Ko TM, Lin JC, Cooper SL. Surface characterization and platelet adhesion studies of plasma-sulphonated polyethylene. *Biomaterials*. 1993; 14: 657-64.
- 19- Goodman SL. Sheep, pig, and human platelet-material interactions with model cardiovascular biomaterials. *J Biomed Mater Res*. 1999; 45: 240-50.
- 20- 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: 907-16.
- 21- 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: 33-40.
- 22- 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: 862-5.
- 23- Niknejad H, Yazdanpanah G, Khayat-khoei M. In vitro evaluation of the effects of amniotic membrane on viability and proliferation of cancer cells. *J Zanzan Unive Med Sci*. 2013; 21: 13-21.
- 24- Lin WC, Liu TY, Yang MC. Hemocompatibility of polyacrylonitrile dialysis membrane immobilized with chitosan and heparin conjugate. *Biomaterials*. 2004; 25: 1947-57.
- 25- Wennberg A, Hensten-Pettersen A. Sensitivity of erythrocytes from various species to in vitro

- hemolysis. *J Biomed Mater Res.* 1981; 15: 433-5.
- 26- Hao Y, Ma DH, Hwang DG, Kim WS, Zhang F. Identification of antiangiogenic and antiinflammatory proteins in human amniotic membrane. *Cornea.* 2000; 19: 348-52.
- 27- Murdoch AD, Dodge GR, Cohen I, Tuan RS, Iozzo RV. Primary structure of the human heparan sulfate proteoglycan from basement membrane (HSPG2/perlecan). A chimeric molecule with multiple domains homologous to the low density lipoprotein receptor, laminin, neural cell adhesion molecules, and epidermal growth factor. *J Biol Chem.* 1992; 267: 8544-57.
- 28- Kuriu Y, Yamagishi H, Otsuji E, et al. Regeneration of peritoneum using amniotic membrane to prevent postoperative adhesions. *Hepatogastroenterology.* 2009; 56: 1064-8.
- 29- Zaga-Clavellina V, Flores-Espinosa P, Pineda-Torres M, et al. Tissue-specific IL-10 secretion profile from term human fetal membranes stimulated with pathogenic microorganisms associated with preterm labor in a two-compartment tissue culture system. *J Mater Fet Neo Med.* 2014; 27: 1320-7.
- 30- Choi G, Schultz MJ, Levi M, van der Poll T. The relationship between inflammation and the coagulation system. *Swiss Med Wkly.* 2006; 136: 139-44.
- 31- Shao C, Sima J, Zhang SX, et al. Suppression of corneal neovascularization by PEDF release from human amniotic membranes. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2004; 45: 1758-62.
- 32- Lee Y-M, Lee J-J, Shen M-Y, Hsiao G, Sheu J-R. Inhibitory mechanisms of activated matrix metalloproteinase-9 on platelet activation. *Eur J Pharmacol.* 2006; 537: 52-8.
- 33- Ilancheran S, Michalska A, Peh G, Wallace EM, Pera M, Manuelpillai U. Stem cells derived from human fetal membranes display multilineage differentiation potential. *Biol Reprod.* 2007; 77: 577-88.
- 34- Oswald J, Boxberger S, Jorgensen B, et al. Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro. *Stem Cells.* 2004; 22: 377-84.
- 35- Niknejad H, Paeini-Vayghan G, Tehrani FA, Khayat-Khoei M, Peirovi H. Side dependent effects of the human amnion on angiogenesis. *Placenta.* 2013; 34: 340-5.
- 36- Mitchell SL, Niklason LE. Requirements for growing tissue-engineered vascular grafts. *Cardiovasc Pathol.* 2003; 12: 59-64.

Hemocompatibility Evaluation of Mesenchymal Surface of Human Amniotic Membrane Compared to Heparin Coated Expanded Polytetrafluoroethylene (EPTFE)

Yazdanpanah G¹, Kakavand M¹, Niknejad H²

¹Dept. of Tissue Engineering, Faculty of Advanced Technologies in Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

²Dept. of Tissue Engineering and Nanomedicine Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Corresponding Author: Niknejad H, Dept. of Tissue Engineering and Nanomedicine Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

E-mail: niknejad@sbm.ac.ir

Received: 15 Oct 2014 **Accepted:** 6 May 2015

Background and Objective: Amniotic membrane (AM) as a natural tissue has lots of unique features which make it a suitable candidate for vascular tissue engineering. The aim of this study was to evaluate blood compatibility of mesenchymal surface of the AM.

Materials and Methods: In this study, the effect of mesenchymal surface of the AM on internal and external coagulation pathways, hemolysis and platelet activity was measured and the results were compared with heparin-coated ePTFE as a synthetic vessel substitute. In addition, platelet adhesion and their morphologic changes after being in contact with samples were analyzed by electron microscopy.

Results: Prothrombin time (PT), activated partial thromboplastin time (aPTT), clotting time and hemolysis tests showed that the AM is hemocompatible. Additionally, mesenchymal surface of the AM induced platelet aggregation less than ePTFE while both similarly provoked secretion of P-selectin. Number of adhered platelets to mesenchymal surface of the AM was less than ePTFE. The platelets on the mesenchymal surface had round morphology whereas ePTFE exhibited dendritic shape platelets.

Conclusion: Results of this study showed that the mesenchymal surface of the AM is hemocompatible which could be a proper candidate for vascular tissue engineering.

Keywords: Amniotic membrane, Hemocompatibility, Vascular tissue engineering, Stem cells, ePTFE