

تأثیر کرایوپرزرویشن و انجماد خشک بر ساختار بافتی و استحکام مکانیکی پرده آمینون

حسن نیک‌نژاد^۱، قاسم یزدان پناه^۲، فاطمه عاصی طهرانی^۳، قدسیه پایینی وایقان^۴

^۱ استادیار فارماکولوژی، مرکز تحقیقات نانوتکنولوژی پزشکی و مهندسی بافت، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

^۲ دانشجوی پزشکی، مرکز تحقیقات نانوتکنولوژی پزشکی و مهندسی بافت، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

^۳ کارشناسی ارشد میکروبی شناسی، مرکز تحقیقات نانوتکنولوژی پزشکی و مهندسی بافت، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

^۴ کارشناسی ارشد میکروبی شناسی، مرکز تحقیقات نانوتکنولوژی پزشکی و مهندسی بافت، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

نشانی نویسنده مسؤول: تهران، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، مرکز تحقیقات نانوتکنولوژی پزشکی و مهندسی بافت، تهران، ایران

E-mail: niknejad@sbmu.ac.ir

وصول: ۹۱/۶/۱۰، اصلاح: ۹۱/۸/۱۹، پذیرش: ۹۱/۱۱/۲۴

چکیده

زمینه و هدف: پرده آمینون با داشتن خصوصیات منحصر به فرد و پتانسیل‌های بالقوه و بالفعل، بیومتریال مناسبی جهت استفاده در مهندسی بافت می‌باشد. روش‌های مختلفی برای نگهداری پرده آمینون وجود دارد. در این مطالعه، پرده آمینون با روش‌های مختلف نگهداری شد و اثرات روش‌های نگهداری بر روی ساختار بافتی و خواص فیزیکی و مکانیکی آن با نمونه‌های تازه تهیه شده مقایسه گردید.

مواد و روش‌ها: پرده آمینون انسانی پس از جداسازی از جفت با روش‌های کرایوپرزرویشن (در دمای -80°C به مدت ۶ ماه) یا انجماد خشک (لیوفلیزاسیون) نگهداری شد و مورد ارزیابی بافت‌شناسی توسط میکروسکوپ نوری و میکروسکوپ الکترونی قرار گرفت. استحکام مکانیکی پرده نیز با استفاده از آزمون‌های مقاومت کششی یک جهته، آزمون تحمل بخیه و اندازه‌گیری ضخامت بررسی گردید.

یافته‌ها: نتایج نشان داد میزان نیروی اعمال شده و ازدیاد طول در نقطه پاره شدن در پرده آمینون کرایوپرزرو شده و لیوفلیزه، از بافت‌های تازه تهیه شده، کمتر می‌باشد. با اینکه نمونه‌های لیوفلیزه شده، ضخامت کمتری نسبت به سایر نمونه‌ها داشتند، اما مقاومت نمونه‌های مختلف در آزمون تحمل بخیه یکسان بود. ساختار بافتی از نظر سلول‌های اپی‌تلیوم و لایه‌های بافتی در نمونه‌های مختلف یکسان نبود.

نتیجه‌گیری: کرایوپرزرویشن و انجماد خشک به عنوان روش‌های نگهداری پرده آمینون، می‌توانند ساختار بافتی، خواص فیزیکی و خواص مکانیکی آن را تغییر دهند. بنابراین می‌توان با توجه به کاربرد نهایی پرده آمینون به عنوان یک بیومتریال، نوع روش نگهداری آن را انتخاب کرد.

واژه‌های کلیدی: پرده آمینون، نگهداری، ساختار بافتی، خواص مکانیکی.

مقدمه

مهار و جلوگیری از ایجاد واکنش‌های التهابی سیستم ایمنی (۲)، جلوگیری از ایجاد زخم (۳) و کمک به ترمیم آن و تسریع اپیتلیالیزاسیون (۴) استفاده وسیعی در پزشکی

پرده آمینون داخلی‌ترین لایه جفت است که با داشتن خواصی مانند جلوگیری از رشد باکتری‌ها (۱)،

دارد و یک بافت ایده آل برای مهندسی بافت شناخته می شود (۵). همه این خواص بدلیل ساختار بافتی و خصوصیات مکانیکی پرده آمینون می باشد (۶,۷).

از پرده آمینون به اشکال تازه تهیه شده و نگهداری شده برای مصارف درمانی و تحقیقاتی استفاده می شود. از روش های رایج نگهداری پرده آمینون که مورد توجه بیشتری می باشد، می توان به روش کرایوپرزرویشن و روش انجماد خشک یا لیوفلیزاسیون اشاره کرد (۸,۹). استفاده از هر یک از این روش های نگهداری، مزایا و معایبی به همراه دارد. پرده آمینون تازه تهیه شده (fresh) نوعی بیومتریال آماده برای مصرف است و نیاز به تجهیزات و امکانات خاص برای آماده سازی ندارد. به همین دلیل، مراکز درمانی و تحقیقاتی مانند بیمارستانها، می توانند در صورت نیاز، به راحتی بافت را تهیه و استفاده نمایند؛ اما می بایست اطلاعات جامعی در باره تهیه و استفاده از آن داشته باشند (۵). قبل از تهیه بافت آزمون های سرولوژیکی بر روی مادران اهدا کننده بافت انجام می شود و شرایط استریل برای تهیه، انتقال و نگهداری بافت، از جمله استفاده از محلول های بافری حاوی آنتی بیوتیک، رعایت می شود. علیرغم تمام این پیش بینی ها، خطر انتقال آن دسته از عوامل عفونی که در دوره نهفته (window period) - زمان ابتلا به میکروب تا زمان ظهور علائم سرولوژیکی - هستند، وجود دارد. بنابراین ایجاد شرایط مناسب برای نگهداری آمینون بدون آسیب قابل توجه، قبل از مصارف درمانی و تحقیقاتی، به منظور کنترل مجدد عوامل عفونی در اهدا کنندگان، پس از گذشت زمان مناسب ضرورت پیدا می کند (۷,۱۰).

کرایوپرزرویشن پرده آمینون، یک روش نگهداری طولانی مدت است که در این روش، پرده آمینون در دمای ۸۰- درجه سانتی گراد یا پایین تر، در محیط کشت حاوی مواد محافظ انجماد مانند گلیسرول یا DMSO و سایر افزودنی ها نگهداری می شود (۸,۱۱). لیوفلیزاسیون یا انجماد خشک، روش نگهداری دیگری است که در این

روش آب موجود در بافت با مکانیسم تصعید از آن خارج می شود. از مزیت های پرده آمینون لیوفلیزه شده، می توان به توانایی نگهداری آن در دمای اتاق به مدت طولانی، و در نتیجه امکان نقل و انتقال آسان اشاره کرد (۹).

ممکن است روش های نگهداری در ساختمان بافتی و خواص مکانیکی پرده آمینون تأثیرگذار باشد. خواص مکانیکی یک بافت به عوامل مختلفی وابسته است، یکی از این عوامل، ماتریکس خارج سلولی (ECM) و ترکیب و ساختمان فیزیکی آن می باشد (۶). همچنین نشان داده شده است که نگهداری بافت ها بر روی خواص مکانیکی آنها نیز مؤثر است (۱۱). با توجه به موارد فوق و اهمیت استفاده از پرده آمینون در مصارف بالینی، هدف اصلی ما در این مطالعه، بررسی جامع اثرات روش های نگهداری مختلف بر روی مشخصات بافتی و خواص بیومکانیکی پرده آمینون است.

مواد و روش ها

تهیه و نگهداری پرده آمینون

نمونه های جفت و اجزای آن (به تعداد ۱۰ عدد) از سزارین های انتخابی (Elective) مادرانی که در هفته ۳۷ و ۳۸ بارداری قرار داشتند، از بیمارستانهای عرفان و آیت الله طالقانی تهران تهیه گردید. علیرغم این که جفت، یک عضو دور انداختنی پس از زایمان است، اطلاعات لازم در مورد استفاده از جفت در این مطالعه به والدین ارائه شد و فرم رضایت کتبی نیز از آنها اخذ گردید. نتایج آزمون های سرولوژیکی برای تشخیص HIV I، HIV II، HCV، HBV و سیفلیس در همه مادران اهدا کننده بافت منفی بود. بافت ها در شرایط استریل و در ظروف مخصوص در بافر فسفات سالین (PBS) که حاوی ۵۰ μg/ml پنی سیلین و ۵۰ μg/ml استرپتومایسین بود، قرار گرفته و در دمای ۴°C به سرعت به آزمایشگاه منتقل گردید. کلیه مراحل در محیط آزمایشگاه در زیر هود

نمونه ها پس از رنگ آمیزی هماتوکسیلین-اٹوزین (H&E) مطالعه شدند.

میکروسکوپ الکترونی

برای مطالعه سطوح نمونه ها از میکروسکوپ الکترونی SEM استفاده شد. نمونه ها با استفاده از گلو تار آلدئید ۲/۵ درصد به مدت یک شبانه روز در یخچال، در دمای ۴ درجه سانتی گراد فیکس شدند. سپس در دمای اتاق و به مدت ۲ ساعت در مجاورت با محلول ۱ درصد از Osmium tetraoxide (Sigma-Aldrich) قرار گرفتند. آبیگری نمونه ها توسط سری الکل های صعودی به ترتیب ۲۵ درصد، ۵۰ درصد، ۷۵ درصد، ۹۵ درصد و ۱۰۰ درصد، هر کدام به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. پس از خشک کردن با دستگاه critical point dryer و قرارگیری نمونه ها در محفظه مربوطه، سطح نمونه ها با یک لایه نازک طلا پوشانده شد و در نهایت نمونه ها با استفاده از میکروسکوپ SEM (JSM-5600; JEOL, Tokyo, Japan) بررسی شدند.

اندازه گیری ضخامت

اندازه گیری ضخامت پرده آمیون با روش بافت-شناسی صورت گرفت. نمونه ها مانند آزمون های میکروسکوپ نوری تهیه شدند. پس از تهیه بلوک پارافینی و برش با میکروتوم و رنگ آمیزی هماتوکسیلین-اٹوزین، ضخامت پرده آمیون بررسی گردید. ضخامت بافت در مقطع عرضی با استفاده از میکروسکوپ کالیبره شده با دوربین دیجیتال (Zeiss, Jena, Germany; Axioskop 2) مشخص گردید. برای به دست آوردن داده های قابل تکرار از ضخامت بافت، از ۵ مقطع مختلف در یک نمونه اندازه گیری ضخامت صورت گرفت و میانگین آنها به عنوان ضخامت بافت در نظر گرفته شد.

آزمون های مکانیکی

برای آزمون های مکانیکی، نمونه هایی با ابعاد ۲۰ × ۵۰ میلی متر تهیه شد و از هر دو انتها به گیره های دستگاه کشش یک جهته (uniaxial test machine)،

کشت سلولی و به صورت استریل انجام شد. سپس پرده آمیون با روش مکانیکی (Peeling) از کوریون جفت جداسازی شده و چندین بار توسط بافر فسفات سالین سرد (۴°C) شستشو داده شد تا لکه های خون کاملا از روی آن شسته شود. در مرحله بعد بافت به قطعات کوچکتر تقسیم شد و روی غشاء نیتروسلولزی طوری قرار گرفت که سطح اپی تلیال به سمت بالا قرار بگیرد. در این مطالعه بافت هایی که با این روش تهیه شدند به عنوان آمیون تازه تهیه شده (Fresh Amniotic Membrane = FAM) مورد استفاده قرار گرفتند.

به منظور تهیه نمونه های کرایوپرزرو شده (Cryopreserved Amniotic Membrane = CAM)، نمونه های آمیون تازه تهیه شده (FAM) در محیط حاوی ۴۰ درصد بافر فسفات سالین و ۵۰ درصد گلیسرول در دمای ۸۰- درجه سانتی گراد به مدت ۶ ماه نگهداری شدند. برای استفاده مجدد، پرده آمیون کرایوپرزرو شده در دمای اتاق ذوب شد و چندین بار با بافر فسفات سالین شستشو گردید.

برای لیوفلیزاسیون آمیون و تهیه نمونه های لیوفلیزه (Lyophilized Amniotic Membrane = LAM)، پرده آمیون تازه تهیه شده به مدت ۳۰ دقیقه در فریزر با دمای ۲۰- درجه سانتی گراد پیش فریز (pre-freeze) شد و سپس توسط دستگاه فریز درایر (ModulyoD, Thermo Electron Corporation, USA) لیوفلیزه گردید. قبل از مصرف مجدد، پرده آمیون لیوفلیزه به مدت ۳۰ دقیقه در بافر فسفات سالین قرار گرفت.

هیستولوژی

به منظور بررسی بافت شناسی نمونه ها، قطعات کوچکی از پرده آمیون از همه گروه ها به مدت ۲۴ ساعت در فرمالین ۱۰ درصد فیکس شد. پس از انجام مراحل رایج و تهیه بلوک پارافین، برش هایی با ضخامت ۴ میکرومتر از نمونه ها به وسیله میکروتوم تهیه شد.

آمد و آنالیز آماری با روش ANOVA یک طرفه با graphpad Tukey post-test انجام گرفت. از نرم افزار prism version 3.02 برای تحلیل های آماری استفاده شد. نتایج در دو سطح $P < 0/05$ و $P < 0/01$ بررسی گردید.

یافته‌ها

مشاهدات ماکروسکوپی

در بررسی های ماکروسکوپی تفاوت مشخصی بین نمونه‌های کرایوپرزرو شده پرده آمینون (CAM) با نمونه‌های تازه تهیه شده (FAM) دیده نشد (شکل ۱ الف). نمونه‌های CAM و FAM را می توان به راحتی و بدون آسیب بافتی بخیه زد. پرده آمینون لیوفلیزه (LAM)، ساختاری بسیار شکننده و ظریف داشت و با اینکه حمل و نقل این نوع راحت است اما در برابر بخیه‌زدن به شدت آسیب پذیر بود (شکل ۱ ب). نتایج همچنین نشان داد که پرده آمینون لیوفلیزه، می تواند بیش از ده برابر وزن خود آب جذب کند و پس از جذب آب (هیدراتاسیون)،

متصل شده و آزمون های مکانیکی انجام گردید. برای آزمون تحمل بخیه (suture retention)، در یک انتهای نمونه، بخیه‌ای با نخ Nylon با شماره (۰-۵) و سوزن غیربرشی (non-cutting) با فاصله ۲ میلی متر از لبه بافت، زده شد. یکی از گیره های دستگاه آزمون مکانیکی به انتهای نخ بخیه و گیره دیگر دستگاه مستقیماً به انتهای سالم بافت متصل شد. در طول انجام همه تست های مکانیکی پرده آمینون توسط بافر فسفات سالین مرطوب نگه داشته می شد. نمونه ها تحت کشش عمودی با سرعت ۱۰ میلی متر در دقیقه قرار گرفتند و نیروی کشش توسط 50 N load cell اندازه گیری شد. نمونه ها تا لحظه پاره شدن تحت کشش قرار می گرفتند. برای به- دست آوردن داده‌های ارزشمند آماری، ۵ نمونه مستقل از همه گروه ها تهیه شد و آزمون های مکانیکی انجام گردید.

آنالیز آماری

همه داده‌های کمی به شکل $Mean \pm SEM$ به دست



شکل- ۱) الف: پرده آمینون تازه تهیه شده (FAM) به همراه جفت و ضمائم آن؛ ب: پرده آمینون لیوفلیزه شده (LAM) و ج: پرده آمینون کرایوپرزرو شده (CAM) پس از شستشو در PBS.



شکل- ۲) تصاویر میکروسکوپ نوری از انواع مختلف پرده آمینون پس از رنگ آمیزی با هماتوکسیلین-ائوزین؛ الف) در پرده آمینون تازه تهیه شده (FAM) ۵ لایه شامل لایه اپی تلیوم، غشاء پایه، لایه متراکم، لایه فیبروبلاستی و لایه اسفنجی قابل رؤیت می باشد؛ ب) در پرده آمینون کرایوپرزرو شده (CAM) نیز سلول‌های اپی تلیال مکعبی شکل به همراه ۴ لایه دیگر مشابه نمونه‌های FAM دیده می شوند؛ ج) در پرده آمینون لیوفلیزه شده (LAM) سلول‌های اپی تلیالی در برخی از مناطق دیده نمی‌شوند، غشاء پایه ساختار خود را حفظ کرده است اما در سایر لایه‌ها حفرات واکوئلی دیده می شود (خط مقیاس: الف و ب: ۱۰۰ میکرومتر؛ ج: ۵۰ میکرومتر).

بافت در طول کرایوپرزرویشن وجود داشت.

میکروسکوپ الکترونی

توسط میکروسکوپ الکترونی می‌توان به ارزیابی فراساختاری پرده آمینون پرداخت و اثرات روش‌های نگهداری مختلف را بر روی کیفیت مورفولوژیکی این پرده بررسی نمود. در تصاویر SEM از FAM سلول‌های اپیتلیال به شکل یک ساختار موزائیکی شش ضلعی نامنظم دیده می‌شدند (شکل ۳ الف) و شیارها و مرزهای بین این سلول‌ها به وضوح قابل مشاهده بود. چنین ساختار یکنواختی در همه نقاط دیده می‌شد و آسیب‌های احتمالی ناشی از پروسه تهیه پرده آمینون به شکل FAM در هیچ یک از نمونه‌های مزبور دیده نشد. بررسی‌های میکروسکوپ الکترونی نمونه‌های کرایوپرزرو شده نشان داد ساختمان موزائیکی شش ضلعی مانند در نمونه‌های CAM نیز به وضوح دیده می‌شود، اما کرایوپرزرویشن پرده آمینون آسیب‌هایی را در پیوندگاه‌های سلول به سلول (cell-cell junction) برخی از نقاط بافت به همراه دارد (شکل ۳ ب و ج). در نمونه‌های LAM سلول‌های اپیتلیال دیده نمی‌شدند، اما محتویات حاصل از تخریب این سلول‌ها مشاهده می‌شد (شکل ۳ د). همچنین بزرگنمایی‌های بالاتر نشان داد که، در محل‌هایی که سلول‌ها از بستر کنده شده بودند، فیبرهای ماتریکس خارج سلولی آرایش طبیعی خود را حفظ کرده بودند (شکل ۳ ه).

ضخامت و استحکام مکانیکی

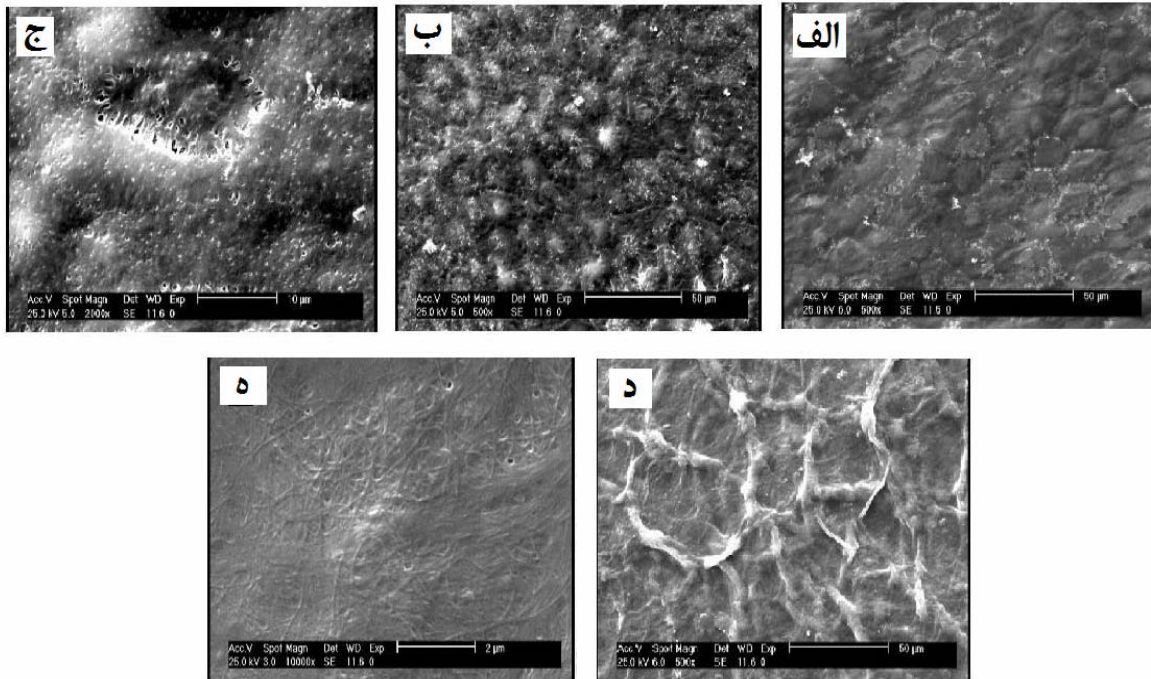
اندازه‌گیری ضخامت و مقاومت کششی بر روی نمونه‌هایی که با روش‌های مختلف نگهداری شده بودند، انجام شد. ضخامت پرده آمینون در نمونه‌های FAM و CAM به شکل معنی‌داری بیشتر از نمونه‌های LAM بود، درحالی‌که تفاوت معنی‌داری در ضخامت نمونه‌های FAM با CAM دیده نمی‌شد (شکل ۴ الف). در آزمون کشش تک جهته (uniaxial)، یک قطعه مستطیل شکل از پرده آمینون تا زمان پاره شدن تحت کشش یکنواخت قرار

انعطاف‌پذیری خود را دوباره به دست آورد و در این شرایط در برابر بخیه‌زدن رفتاری همانند FAM و CAM را از خود نشان دهد (شکل ۱ ج).

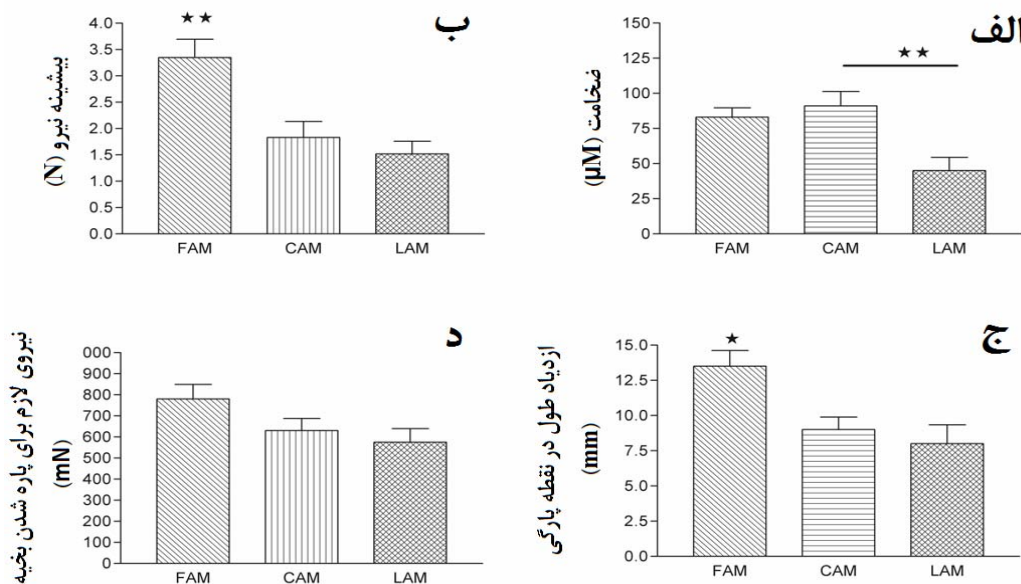
میکروسکوپ نوری

رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین در نمونه‌های پرده آمینون تازه تهیه شده (FAM) نشان داد که، پرده آمینون در حالت طبیعی از ۵ لایه تشکیل شده است (شکل ۲ الف). لایه اپی‌تلیوم که در آن سلول‌های مکعبی شکل اپی‌تلیال آمینون با پیوستگی کامل، روی لایه غشاء پایه قرار دارند. در زیر غشاء پایه، لایه متراکم (compact layer) با ساختار شبکه‌ای رتیکولار قرار دارد و لایه زیرین آن لایه فیبروبلاستی (fibroblastic layer) است که در آن سلول‌های فیبروبلاستی در درون شبکه رتیکولار با تراکم کمتر نسبت به لایه متراکم، قرار دارند. لایه اسفنجی (spongy layer) داخلی‌ترین لایه است که در مقاطع بافت شناسی FAM دیده می‌شود. بررسی‌های میکروسکوپی بر روی CAM نشان داد که، ساختمان ۵ لایه‌ای فوق دقیقاً در بافت‌هایی که کرایوپرزرو شده‌اند نیز حفظ شده است (شکل ۲ ب). نتایج همچنین نشان داد که در نمونه‌های LAM ساختار غشاء پایه کاملاً حفظ شده است، اما سلول‌های اپی‌تلیوم با تعداد بسیار کم در برخی از مناطق دیده می‌شوند. لایه متراکم و لایه فیبروبلاستی نمایی حفره حفره پیدا کرده و نظم شبکه‌ای این لایه‌ها نیز از بین رفته است. (شکل ۲ ج).

رنگ‌آمیزی تریپان بلو، بر روی نمونه‌های CAM نشان داد که، درصد سلول‌های اپی‌تلیال زنده پس از کرایوپرزرویشن کمتر از ۵۰ درصد است در حالی که در نمونه‌های FAM بیش از ۹۰ درصد سلول‌های اپی‌تلیال قدرت حیات داشتند. با اینکه گلیسرول به عنوان ماده محافظ انجماد در کرایوپرزرویشن استفاده شده بود اما در دو مورد از نمونه‌های کرایوپرزرو شده، آسیب‌های سلولی ناشی از چروکیدگی و تاخوردگی قسمت‌هایی از



شکل- ۳) تصاویر میکروسکوپ الکترونی SEM از سطوح انواع مختلف پرده آمینون؛ الف) در پرده آمینون تازه تهیه شده (FAM) سلول‌های اپی‌تلیالی آمینون به شکل منظمی در کنار هم قرار گرفته‌اند و نمای موزائیکی شش وجهی این سلول‌ها قابل رؤیت می‌باشد؛ ب) در نمونه‌های کرایوپرزرو شده (CAM) تقریباً ساختمان موزائیکی سلول‌ها حفظ شده است؛ ج) در بزرگنمایی‌های بیشتر از نمونه‌های CAM، در برخی از نقاط اپی‌تلیوم، آسیب‌هایی در ساختارهای بین سلول‌ها (cell-cell junctions) دیده می‌شود؛ د) در نمونه‌های لیوفلیزه (LAM) سلول‌های اپی‌تلیالی از بین رفته‌اند و محتویات تخریب آن‌ها در سطح دیده می‌شود؛ ه) بزرگنمایی بالاتر از نمونه‌های لیوفلیزه نشان می‌دهد که فیبرهایی با آرایش نامنظم که تشکیل دهنده غشاء پایه هستند در برخی از نقاطی که سلول‌ها از بین رفته‌اند در سطح نمونه قابل رؤیت می‌باشد.



شکل- ۴) مقایسه نتایج حاصل از آزمون‌های مکانیکی پرده آمینون تازه تهیه شده (FAM) با نمونه‌های کرایوپرزرو شده (CAM) و لیوفلیزه (LAM)؛ الف) ضخامت پرده آمینون؛ ب) بیشینه نیروی اعمال شده (Fmax) مورد نیاز برای پاره شدن پرده آمینون؛ ج) میزان ازدیاد طول در نقطه پارگی پرده آمینون؛ د) مقدار نیروی لازم برای پاره شدن بجهت، داده‌ها به صورت mean ± SEM نشان داده شده‌اند. (*P<0.05, **P<0.01).

(F) بود. نتایج نشان داد که، پرده آمینون در طول انجام آزمون تنش-کرنش، رفتاری غیرخطی نشان می‌دهد که

گرفت. متغیرهای این آزمون شامل افزایش طول نمونه‌های تحت کشش (کرنش) و میزان نیروی وارد شده (تنش)

ساختار بافتی و خواص فیزیکی و مکانیکی پرده آمنیون به دست آمده از جفت، که با روش های کرایوپرزرویشن و انجماد خشک (لیوفلیزاسیون) نگهداری شده بود با نمونه های تازه تهیه شده آن مقایسه شد.

مشاهدات ماکروسکوپی نشان داد که نمونه های لیوفلیزه ساختار نازکتر و شکننده تری نسبت به نمونه های تازه تهیه شده و کرایوپرزرو شده دارد. یکی از مهمترین مشخصه هایی که از بیومتریال های استفاده شده در مهندسی بافت انتظار می رود، مقاومت آنها در برابر بخیه زدن می باشد (۱۷). نمونه های LAM پس از آگیری مجدد خواص انعطاف پذیری و تحمل بخیه زدن خود را باز یافتند. این مسئله با نتایج تست تحمل بخیه تأیید شد، به طوری که اختلاف معنی داری بین نمونه های CAM و LAM در این تست مشاهده نشد. با این حال هر دو روش نگهداری کرایوپرزرویشن و لیوفلیزاسیون مقاومت پرده آمنیون در برابر بخیه زدن را در مقایسه با FAM کاهش می دادند. به هر حال، همان طوری که در مطالعه هاپکینسون نشان داده شده است، محل بخیه (از نظر فاصله بخیه از انتهای بافت)، ضخامت بخیه و یا شماره و نوع سوزن آن می تواند مقاومت بافت در برابر بخیه زدن را تغییر دهد (۱۸). بنابراین ضروری است که تست های اختصاصی بیشتری در این زمینه با توجه به عوامل تأثیرگذاری که اشاره شد، انجام گیرد.

به طور کلی استفاده از پرده آمنیون در دو شکل، شامل پرده آمنیون حاوی اپی تلیوم (پرده آمنیون بدون جداسازی سلول های اپی تلیال) و پرده آمنیون فاقد اپی تلیوم رایج است. هاپکینسون و همکاران در سال ۲۰۰۸ و ویلشاو و همکاران در سال ۲۰۰۶، روش های مختلفی برای جداسازی سلول های اپی تلیال به کار گرفته اند (۱۸ و ۱۹). تصمیم گیری برای این که کدام شکل از پرده آمنیون (حاوی اپی تلیوم یا فاقد اپی تلیوم) برای مصارف کلینیکی و مهندسی بافت مناسب است، بستگی به کاربرد آن دارد. رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین در مطالعه

در نتیجه محاسبه مدول یانگ امکان پذیر نبود، بنابراین رفتار مکانیکی پرده آمنیون در منطقه غیرخطی آنالیز شد. همان طور که در شکل ۴ نشان داده شده است (شکل - ۴ ب)، مقدار F_{max} ، که بیانگر مقدار بیشینه نیروی اعمال شده بر بافت در طول آزمون می باشد، در نمونه های FAM به طور معنی داری بیشتر از نمونه های CAM و LAM می باشد ($P < 0/01$). اگرچه میزان F_{max} در نمونه های LAM کمتر از CAM است، ولی اختلاف معنی داری در مقدار نیروی بیشینه بین این دو گروه دیده نمی شود. میزان ازدیاد طول در نقطه پارگی (elongation at break)، نیز در نمونه های FAM بیشتر از نمونه های CAM و LAM است ($P < 0/05$)، ولی اختلافی بین نمونه های نگهداری شده وجود ندارد (شکل - ۴ ج). همچنین نتایج حاصل از آزمون تحمل بخیه نیز نشان داد که تفاوت معناداری بین پرده آمنیون تازه تهیه شده و نمونه های نگهداری شده آن وجود ندارد (شکل - ۴ د).

بحث

پرده آمنیون انسانی به عنوان یک بیومتریال استفاده وسیعی در مهندسی بافت دارد (۵). از کاربردهای آمنیون در پزشکی می توان به استفاده از آن در سوختگی های پوستی (۱۲)، ترمیم زخم ها (۱۳) و بیماریهای چشمی (۱۴) اشاره کرد که روزه روز این کاربردها در حال پیشرفت و توسعه می باشد (۱۵، ۱۶). علیرغم امکان استفاده از پرده آمنیون تازه به عنوان جایگزین بافت های مختلف، لازم است این پرده همواره خصوصیات مکانیکی و بافتی مناسب و کافی برای این کاربردها را از خود نشان دهد. از طرفی، با توجه به پتانسیل های بالقوه و بالفعل پرده آمنیون در مصارف کلینیکی و غیره، ضروری است که بتوان پرده آمنیون را تا موقع مصرف آن در شرایط مناسبی نگهداری کرد. هدف اصلی در این مطالعه ارزیابی ساختمان بافتی و خواص مکانیکی پرده آمنیون پس از نگهداری آن با روش های مختلف بود. در این مطالعه

نمونه‌های FAM در مقایسه با نمونه‌هایی که نگهداری شده بودند به شکل معنی‌داری متفاوت است. بطور کلی در نمونه‌های نگهداری شده با هر دو روش کرایوپرزرویشن و لیوفلیزاسیون مقاومت مکانیکی پرده آمینون کاهش می‌یابد. کاهش خواص مکانیکی در نمونه‌های نگهداری شده را می‌توان به واکنش شدن و آسیب‌های ماتریکس خارج سلولی بافت که با اعمال روش‌های نگهداری ایجاد می‌شود، نسبت داد. البته توجه به این نکته ضروری است که، تغییراتی که در ضخامت بافت ایجاد می‌شود، از بین رفتن سلول‌های اپی‌تلیال در نمونه‌های LAM و حتی میزان سلول‌های زنده در بافت‌هایی که کرایوپرزرو شده‌اند نیز می‌تواند در کاهش خواص مکانیکی تأثیرگذار باشد.

کرایوپرزرویشن و لیوفلیزاسیون دو روش رایج برای نگهداری پرده آمینون هستند که هر کدام به شیوه‌ای می‌توانند ساختمان بافتی و خواص فیزیکی و مکانیکی پرده آمینون را تغییر دهند؛ به طوری که به غیر از کمتر بودن ضخامت نمونه‌های لیوفلیزه از نمونه‌های کرایوپرزرو شده، تفاوت دیگری از نظر خواص فیزیکی و مکانیکی بین دو نوع نگهداری دیده نشد، درحالی‌که نمونه‌های لیوفلیزه از نظر بافت‌شناسی (شامل از بین رفتن لایه اپی‌تلیال و حفره حفره شدن لایه متراکم و لایه فیبروبلاستی و از بین رفتن نظم شبکه‌ای این لایه‌ها) با پرده‌های کرایوپرزرو شده تفاوت داشتند. با توجه به این مسئله، می‌توان روش نگهداری مناسب را برای استفاده از پرده آمینون بر حسب کاربری خاص مورد نیاز انتخاب کرد. با این حال هنوز برای استفاده از پرده آمینون در مهندسی بافت، مطالعات بیشتری لازم به نظر می‌رسد.

تقدیر و تشکر

بدین‌وسیله از پرسنل محترم اتاق عمل بیمارستان‌های عرفان و آیت‌الله طالقانی به‌خصوص سرکار خانم دکتر نیرومنش و سرکار خانم یوسفی کمال قدردانی

حاضر از ساختار طبیعی FAM نشان داد که، پرده آمینون شامل اپی‌تلیوم آمینون، غشاء پایه، لایه متراکم، لایه فیبروبلاستی و لایه اسفنجی است که در برخی از نقاط پرده آمینون، لایه اسفنجی وجود ندارد. در نمونه‌های LAM سلول‌های اپی‌تلیال، پرده آمینون از بین رفته بود و در برخی از نقاط غشاء پایه عاری از سلول بود. با توجه به نتایج به‌دست آمده، هر یک از روش‌های نگهداری استفاده شده در این مطالعه، تغییرات مورفولوژیکی و فراساختاری در پرده آمینون ایجاد می‌کند. بنابراین با توجه به نوع کاربری می‌توان نحوه نگهداری آمینون را انتخاب کرد. به عنوان مثال در مطالعات لی و همکاران در سال ۲۰۰۹ نشان داده شده بود که غشاء پایه پرده آمینون حاوی اجزای ماتریکس خارج سلولی، مانند کلاژن‌های تیپ I، III و IV، لامینین، فیبرونکتین و پرلکان می‌باشد که می‌تواند چسبندگی و پرولیفراسیون سلول‌های مختلف را القاء کند (۲۰). بنابراین شاید استفاده از نمونه‌های LAM برای کشت سلول‌های دیگر بر روی پرده آمینون ارجحیت داشته باشد، زیرا نتایج حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد که، در پرده آمینون لیوفلیز شده، غشاء پایه در سطح تماس آمینون با سلول‌های کشت داده شده قرار خواهد گرفت.

علاوه‌برآن، نتایج بررسی‌ها نشان داد که ضخامت پرده آمینون در گروه‌های مختلف با اختلاف معنی‌داری با هم متفاوت است. نمونه‌های CAM، ضخیم‌ترین و نمونه‌های LAM، نازک‌ترین ضخامت را داشتند. برای توضیح این نتایج می‌توان گفت که، نمونه‌های LAM به دلیل حذف آب در روند لیوفلیزاسیون نازک می‌شوند و ضخامت بالای نمونه‌های CAM، به دلیل جذب ماده گلیسرول در روند کرایوپرزرویشن است که متعاقب آن به دلیل پدیده اسمز، آب بیشتری به داخل بافت وارد می‌شود (۷).

آنالیز نتایج حاصل از تست‌های بیومکانیکی نشان داد که F_{max} و میزان ازدیاد طول تا لحظه پاره شدن، در

و تشکر به عمل می آید. این مطالعه با حمایت مالی مرکز تحقیقات نانو تکنولوژی پزشکی و مهندسی بافت دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی انجام گردید. این مقاله برگرفته از پایان نامه کارشناسی ارشد می باشد.

References

- Ganatra MA. Amniotic membrane in surgery. *J Pak Med Assoc.* 2003; 53(1):29-32.
- Gomes JA, Romano A, Santos MS, Dua HS. Amniotic membrane use in ophthalmology. *Curr Opin Ophthalmol.* 2005; 16(4):233-40.
- Dua HS, Gomes JA, King AJ, Maharajan VS. The Amniotic membrane use in ophthalmology. *Surv Ophthalmol.* 2004; 49(1):51-77.
- Hao Y, Ma DH, Hwang DG, Kim WS, Zhang F. Identification of antiangiogenic and antiinflammatory proteins in human amniotic membrane. *Cornea.* 2000; 19(3):348-52.
- 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.
- Nakamura T, Sekiyama E, Takaoka M, Bentley AJ, Yokoi N, Fullwood NJ, Kinoshita S. The use of trehalose-treated freeze-dried amniotic membrane for ocular surface reconstruction. *Biomaterials.* 2008; 29(27):3729-37.
- von Versen-Hoeyneck F, Steinfeld AP, Becker J, Hermel M, Rath W, Hesselbarth U. Sterilization and preservation influence the biophysical properties of human amnion grafts. *Biologicals.* 2008; 36(4):248-55.
- Ahn JI, Jang IK, Lee DH, Seo YK, Yoon HH, Shin YH, Kim JC, Song KY, Lee HG, Yang EK, et al. A comparison of lyophilized amniotic membrane with cryopreserved amniotic membrane for the reconstruction of rabbit corneal epithelium. *Biotechnol Bioproc E.* 2005; 10(3):262-9.
- Rodríguez-Ares MT, López-Valladares MJ, Touriño R, Vieites B, Gude F, Silva MT, Couceiro J. Effects of lyophilization on human amniotic membrane. *Acta Ophthalmol.* 2009; 87(4):396-403.
- Simonds RJ, Holmberg SD, Hurwitz RL, Coleman TR, Bottenfield S, Conley LJ, Kohlenberg SH, Castro KJ, Dahan BA, Schable CA. Transmission of human immunodeficiency virus type 1 from a seronegative organ and tissue donor. *N Engl J Med.* 1992; 326:726-32.
- Nakamura T, Yoshitani M, Rigby H, Fullwood NJ, Ito W, Inatomi T, Sotozono CH, Nakamura T, Shimizu Y, Kinoshita SH. Sterilized, freeze-dried amniotic membrane: a useful substrate for ocular surface reconstruction. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2004; 45(1):93-9.
- Rao TV, Chandrasekharam V. Use of dry human and bovine amnion as a biological dressing. *Arch Surg.* 1981; 116(7):891-6.
- Tosi GM, Massaro-Giordano M, Caporossi A, Toti P. Amniotic membrane transplantation in ocular surface disorders. *J Cell Physiol.* 2005; 202(3):849-51.
- Uludag M, Citgez B, Ozkaya O, Yetkin G, Ozcan O, Polat N, Isgor A. Effects of the amniotic membrane on healing of normal and high-risk colonic anastomoses in rats. *Int J Colorectal Dis.* 2009; 24(7):809-17.
- Koziak A, Salagierski M, Marcheluk A, Szcześniewski R, Sosnowski M. Early experience in reconstruction of long ureteral strictures with allogenic amniotic membrane. *Int J Urol.* 2007; 14(7):607-10.
- Iijima K, Igawa Y, Imamura T, Moriizumi T, Nikaido T, Konishi I, Nishizawa O. Transplantation of preserved human amniotic membrane for bladder augmentation in rats. *Tissue Eng.* 2007; 13(3):513-24.
- Konig G, McAllister TN, Dusserre N, Garrido SA, Iyican C, Marini A, Fiorillo A, Avila H, Wystrychowski W, Zagalski K, Maruszewski M, Jones AL, Cierpka L, de la Fuente LM, L'Heureux N. Mechanical properties of completely autologous human tissue engineered blood vessels compared to human saphenous vein and mammary artery. *Biomaterials.* 2009; 30(8):1542-50.
- Hopkinson A, Shanmuganathan VA, Gray T, Yeung AM, Lowe J, James DK, Dua HS. Optimization of amniotic membrane (AM) denuding for tissue engineering. *Tissue Eng Part C Methods.* 2008; 14(4):371-81.
- Wilshaw SP, Kearney JN, Fisher J, Ingham E. Production of an acellular amniotic membrane matrix for use in tissue engineering. *Tissue Eng.* 2006; 12(8):2117-29.
- Lee EJ, Vunjak-Novakovic G, Wang Y, Niklason LE. A biocompatible endothelial cell delivery system for in vitro tissue engineering. *Cell Transplant.* 2009; 18(7):731-43.

The effect of cryopreservation and lyophilization on histological and mechanical properties of human amniotic membrane

Hassan Niknejad., PhD

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

Ghasem Yazdanpanah., MD

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

Fatemeh A. Tehrani., MSc

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

Ghodsieh Paeini-Vayghan., MSc

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

Received:01/09/2011, Revised:10/11/2011, Accepted:13/02/2012

Corresponding author:

Hassan Niknejad
Mailing address: Nanomedicine
and Tissue Engineering Research
Center, Shahid Beheshti
University of Medical Sciences,
Velenjak, Tehran, Iran.
E-mail: niknejad@sbmu.ac.ir

Abstract

Introduction & Objective: The amniotic membrane (AM) has distinctive characteristics and potentials that make it a proper biomaterial for tissue engineering. There are varieties of methods for preserving the AM. In this study, the AM was preserved using different methods. The effect of preservation on tissue composition and physical and mechanical properties was compared between preserved and fresh samples of the AM.

Materials & Methods: The human AM was preserved after being detached from the placenta. It was preserved using either cryopreservation methods (in temperature of -80 °C, for 6 months) or lyophilization. The preserved AM was histologically assessed using light and electronic microscopy. Mechanical tolerance of the preserved AM was also measured using uniaxial tension test, suture retention test and thickness calculation.

Results: This study showed that the value of Fmax and elongation at break in the cryopreserved and lyophilaized AM was smaller than the same value in the fresh AM samples. All of the samples had same tolerance in suture retention test, although lyophilaized samples of the AM were thinner than other types of the samples. Tissue composition (histological properties) regarding epithelial cells and tissue layers of the AM were not the same in different samples.

Conclusion: Cryopreservation and lyophilization as two preservation methods of the AM, can affect the tissue composition and physical and mechanical features of the AM. Thus the preservation method for the AM can be chosen regarding the final usage of the AM as a biomaterial.

Keywords: *amnion, preservation, histological structure, mechanical properties.*