

## تأثیر خشک کردن در خلاء بر میزان عبور نور از پرده‌ی آمنیون: مقایسه با قرنیه‌ی خرگوش

تینا دهیم، قاسم یزدان پناه، حسن نیک نژاد\*

### خلاصه

مقدمه: پرده‌ی آمنیون به مدت طولانی پس از پیوند (به عنوان جایگزین قرنیه) در چشم باقی می ماند که می تواند بر روی میزان عبور نور (شفافیت) مؤثر باشد. هدف از این مطالعه بررسی میزان شفافیت پرده‌ی آمنیون پس از خشک کردن در خلاء (لیوفیلیزاسیون) و مقایسه‌ی نتایج آن با شفافیت قرنیه خرگوش بوده است. روش: شفافیت پرده‌های آمنیون به دست آمده از ناحیه‌ی دیسک و پریفرال (خارج از دیسک) جفت به صورت تازه و لیوفیلیزه و شفافیت قرنیه خرگوش‌ها اندازه گیری شد. برای حذف لایه‌ی اپی تلیال از هضم آنزیمی استفاده شد. ساختار پرده‌های آمنیون با رنگ آمیزی‌های هماتوکسیلین و ائوزین، ماسون تریکروم و پریودیک اسید شیف و فراساختار سطح آنها با میکروسکوپ الکترونی نگاره ارزیابی شد. یافته‌ها: میزان شفافیت پرده‌ی آمنیون لیوفیلیزه تفاوتی با بافت تازه نداشت. میزان عبور نور از ناحیه‌ی دیسک پرده‌ی آمنیون کمتر از ناحیه‌ی پریفرال بود. حذف لایه‌ی اپی تلیال باعث افزایش میزان عبور نور از پرده‌ی آمنیون شد به طوری که شفافیت پرده‌ی آمنیون معادل با شفافیت قرنیه‌ی خرگوش شد. بررسی‌های میکروسکوپ الکترونی نشان داد که باقیمانده‌های سلول‌های اپی تلیال باعث پخش نور پس از لیوفیلیزاسیون می شوند. نتیجه گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که برای افزایش شفافیت پرده‌ی آمنیون برای پیوندهای چشمی بهتر است تا سلول‌های اپی تلیال قبل از نگهداری بافت‌ها به روش لیوفیلیزاسیون حذف شوند. واژه‌های کلیدی: پرده‌ی آمنیون، شفافیت، خشک کردن در خلاء (لیوفیلیزاسیون)، قرنیه

۱- پزشکی عمومی، گروه مهندسی بافت و طب بازساختی، دانشکده فناوری‌های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران ۲- دانشیار فارماکولوژی، گروه مهندسی

بافت طب بازساختی، دانشکده فناوری‌های نوین پزشکی و مرکز تحقیقات نانوتکنولوژی پزشکی و مهندسی بافت، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

\* نویسنده مسؤول، آدرس پست الکترونیک: [niknejad@sbmu.ac.ir](mailto:niknejad@sbmu.ac.ir)

دریافت مقاله: ۱۳۹۴/۳/۱۴ دریافت مقاله اصلاح شده: ۱۳۹۴/۷/۲۸ پذیرش مقاله: ۱۳۹۴/۸/۱۳

## مقدمه

پرده‌ی آمنیون داخلی‌ترین لایه‌ی پرده‌های جنینی است (۱). این بافت خواص مختلفی از جمله تنظیم سیستم ایمنی (۲)، تنظیم رگ زایی (۳)، ضد التهاب (۴)، ضد فیروز (۵)، ضد باکتری (۶) و ضد سرطان (۷-۹) دارد، که باعث شده است از آن برای موارد مختلف بالینی از جمله پوشش زخم‌ها و سوختگی‌های پوستی (۱۰، ۱۱)، بازسازی‌های جراحی (۱۲) و مهندسی بافت (۱۳) استفاده شود. این بافت از ۵ لایه شامل لایه‌ی اپی‌تلیال (حاوی سلول‌های اپی‌تلیال)، غشای پایه، لایه‌ی فشرده، لایه‌ی فیروبلست (حاوی سلول‌های مزانشیمی) و لایه‌ی اسفنجی تشکیل شده است (۱۴، ۱۵).

از سال‌ها قبل از پرده‌ی آمنیون برای جراحی‌های مختلف چشم (۱۶-۱۸) از جمله بازسازی سطوح قرنیه و ملتحمه در زخم‌های قرنیه، سوختگی‌ها، سندروم استیون-جانسون، ناخنک چشم و بولوس کراتوپاتی‌ها استفاده شده است (۱، ۱۹-۲۲). هم‌چنین به‌تازگی از پرده‌ی آمنیون به‌عنوان حامل سلول‌های اپی‌تلیال قرنیه در زمان نبود سلول‌های بنیادی اپی‌تلیال استفاده شده است (۲۳-۲۵). پرده‌ی آمنیون غنی از فاکتورهای رشد گوناگون است که می‌تواند رشد سلول‌های اپی‌تلیال را حمایت کند (۱۴، ۲۶).

شبهت‌های بین پرده‌ی آمنیون و قرنیه، این بافت را برای درمان نقص‌های قرنیه مناسب ساخته است. نبود عروق خونی، ساختار قرنیه-مانند دستجات فیبریلی کلاژن (به‌خصوص انواع I، III و IV) در غشای پایه و یک اپی‌تلیوم نازک، باعث شده است تا پرده‌ی آمنیون به‌عنوان جایگزین قرنیه مناسب باشد (۲۷، ۲۸).

قرنیه به‌عنوان یک بافت شفاف، از ساختارهای داخلی چشم به‌وسیله‌ی جذب یا جلوگیری از ورود بعضی از طول موج‌های نور، محافظت می‌کند (۲۹). کدورت قرنیه‌های

آلوژنیک و پرده‌ی آمنیون جایگزین قرنیه، برای پیوند چشمی اهمیت دارد. نشان داده شده است که پرده‌ی آمنیون می‌تواند در حالت اولیه‌ی خود در استرومای قرنیه برای حداقل ۱۰ ماه پس از پیوند باقی بماند (۳۰). هم‌چنین، هنگامی که پرده‌ی آمنیون به‌عنوان داربست برای مهندسی بافت چشم (۱)، یا حامل سلول‌های بنیادی (۲۵) مورد استفاده قرار می‌گیرد، شفافیت آن از اهمیت خاصی برخوردار است، که می‌تواند کیفیت دید را تحت تأثیر قرار دهد.

پرده‌ی آمنیون پس از جداسازی از جفت توسط فرآیندهای مختلف نگهداری می‌شود تا در جراحی‌های چشم مورد استفاده قرار گیرد. یکی از روش‌های مرسوم برای نگهداری پرده‌ی آمنیون، خشک کردن در خلاء (freeze-drying یا لیوفیلیزاسیون) است. در این روش نگهداری، آب بافت به‌روش تصعید خارج می‌شود. پرده‌ی آمنیون پس از لیوفیلیزاسیون می‌تواند در دمای اتاق برای مدت طولانی نگهداری شود و پس از استریل کردن با اشعه مورد استفاده قرار گیرد (۳۱). نشان داده شده است که خواص مفید پرده‌ی آمنیون پس از لیوفیلیزاسیون حفظ می‌شوند و می‌تواند در کلینیک استفاده شود (۳۲). ولی تاکنون تأثیر این روش بر روی میزان عبور نور پرده‌ی آمنیون (شفافیت) مورد بررسی قرار نگرفته است.

هم‌چنین نشان داده شده است که تفاوت‌هایی در میزان کدورت پرده‌ی آمنیون بر اساس محلی از جفت که از آن جدا شده است وجود دارد که می‌تواند کیفیت بینایی را پس از پیوند چشمی تحت تأثیر قرار دهد (۳۳). با توجه به مطالب ذکر شده در این مطالعه در نظر است تا تأثیر روش لیوفیلیزاسیون به همراه متغیرهایی از جمله محل جداسازی پرده‌ی آمنیون از جفت (ناحیه‌ی دیسک یا پریفرال) و لایه‌ی اپی‌تلیال، در میزان عبور نور از پرده‌ی آمنیون مورد

بررسی قرار گیرد و نتایج با شفافیت قرنی‌های خرگوش به‌عنوان مدل حیوانی مقایسه شوند.

### روش بررسی

پس از تأیید کمیته اخلاق در پژوهش دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، ۳۰ عدد جفت از دهنده‌های با سن بارداری ۳۶ تا ۳۸ هفته و منفی از نظر ویروس نقص ایمنی اکتسابی، هیپاتیت B و C و سیفلیس، پس از سزارین انتخابی به‌دست آمدند. پس از انتقال جفت‌ها در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به آزمایشگاه، پرده‌ی آمینون از کوریون جدا شده و شستشو داده شد (۳۴). سپس پرده‌های آمینون از ناحیه‌ی دیسک و ناحیه‌ی پریفرال به اندازه‌های ۲×۵ سانتی‌متر مربع بریده شدند. ناحیه‌ی دیسک برابر با پرده‌ی آمینون بر روی دیسک جفت و ناحیه‌ی پریفرال معادل با ۲ سانتی‌متر بیرون از لبه‌ی دیسک در نظر گرفته شدند (شکل ۱، الف). پرده‌های آمینون قرار گرفته بر روی سرویکس و قسمت تحتانی رحم در این مطالعه استفاده نشدند.

### خشک کردن در خلاء

خشک کردن در خلاء پرده‌های آمینون به‌صورتی که در قبل توضیح داده شده است (۲۶)، صورت گرفت. به‌طور خلاصه، پرده‌های آمینون جداسازی شده پس از شستشو ابتدا به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد منجمد شدند و سپس در دستگاه لیوفیلیزاتور (ModulyoD, Thermo Electron Corporation, USA) در دمای ۵۵- درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت تحت لیوفیلیزاسیون قرار گرفتند. قبل از هر آزمایش، پرده‌های آمینون لیوفیلیزه شده به مدت ۶۰ دقیقه در بافر فسفات سالین مجدداً در معرض آبگیری قرار گرفتند.

### جداسازی قرنی‌های خرگوش

در این پژوهش از قرنی‌های ۶ خرگوش بالغ سفید نژاد نیوزلندی (با وزن حدود ۲.۵ کیلوگرم و سن حدود ۴ ماه) استفاده شد. خرگوش‌ها با استفاده از تزریق درون صفاقی دوز بالای سدیم پنتوباریتال کشته شدند. پس از جدا کردن دقیق کره‌ی هر دو چشم، قرنی‌ها از بافت اطراف جداسازی شده و در بافر فسفات سالین تا زمان اندازه‌گیری‌ها نگهداری شد.

### اندازه‌گیری میزان عبور نور

برای اندازه‌گیری میزان عبور نور از نمونه‌های پرده‌ی آمینون و قرنی‌های خرگوش از دستگاه اسپکتروفوتومتر (Cecil, UK) استفاده شد. پس از قرار دادن نمونه‌های پرده‌ی آمینون و قرنی‌ها در بین دو لام به‌صورت مرطوب بدون تاخوردگی و حباب هوا، درصد عبور نور مرئی در طول موج‌های ۴۵۰ و ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. دو لام مرطوب شده به‌عنوان بلانک در نظر گرفته شد. میزان عبور نور سه منطقه‌ی متفاوت از هر نمونه، در هر طول موج اندازه‌گیری شد.

عبور نور نمونه‌های پرده‌ی آمینون هم‌چنین به‌صورت کیفی با استفاده از توانایی خوانا بودن یک کلمه از طریق پرده‌ی آمینون بررسی شد. پرده‌های آمینون ۳ سانتی‌متر بالای صفحه‌نگه داشته شدند و عکس‌ها از فاصله‌ی ثابت گرفته شدند.

### حذف لایه‌ی اپی‌تلیال

برای حذف لایه‌ی اپی‌تلیال، نمونه‌ها در محلول آنزیمی تریپسین-EDTA ۰.۳٪ برای ۱۰ دقیقه قرار داده شدند. سپس بافت‌ها با بافر فسفات سالین شسته شدند و سلول‌های

(Sigma-Aldrich) برای ۲ ساعت در دمای اتاق قرار گرفتند. سپس نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در سری غلظت‌های اتانول (۲۵٪، ۵۰٪، ۷۵٪، ۹۵٪ و ۱۰۰٪) برای آبگیری قرار داده شدند. پس از آن نمونه‌های پرده‌ی آمینون در دستگاه critical point dryer خشک شدند و سطوح آنها با استفاده از لایه‌ی ۱۰ نانومتری از طلا پوشانده شد. در نهایت نمونه‌ها با استفاده از میکروسکوپ الکترونی نگاره (Hitachi, Field Emission Scanning Electron Microscope, Japan) مشاهده شدند.

#### آنالیز آماری

نتایج به صورت میانگین  $\pm$  خطای استاندارد از میانگین نشان داده شده اند. آنالیزهای آماری با استفاده از نرم افزار graphpad prism و پیرایش ۵.۰۴ و آزمون ANOVA یک طرفه و پس از آزمون Tukey's صورت گرفت.

#### نتایج

پس از آبگیری پرده‌ی آمینون لیوفیلیزه شده برای یک ساعت، درصد عبور نور از پرده‌ی آمینون جدا شده از ناحیه‌ی پریفرال برابر با  $39/3 \pm 4/43$ ٪ در ۴۵۰ نانومتر بود، که تفاوتی با پرده‌ی آمینون پریفرال تازه نداشت ( $42/63 \pm 3/82$ ٪ در ۴۵۰ نانومتر). هم چنین در ناحیه‌ی دیسک، شفافیت پرده‌های آمینون پس از لیوفیلیزاسیون در مقایسه با نمونه‌های تازه کاهش یافت ولی معنادار نبود (به ترتیب  $15/59 \pm 3/17$ ٪ در مقابل  $23/76 \pm 3/32$ ٪ در ۴۵۰ نانومتر). به علاوه نتایج نشان دادند که پرده‌ی آمینون جدا شده از ناحیه‌ی پریفرال شفاف‌تر از بافت‌های ناحیه‌ی دیسک می‌باشد که این حالت پس از لیوفیلیزاسیون نیز وجود داشت (شکل ۱، ب).

اپی تلیال به آرامی با استفاده از کاردک سلول بدون آسیب به غشای پایه حذف شدند.

#### بافت شناسی

نمونه‌های پرده‌ی آمینون لیوفیلیزه شده پس از فیکس شدن در فرمالین ۱۰٪ در پارافین غوطه‌ور شدند و به وسیله‌ی میکروتوم به ضخامت‌های بافتی ۴ میکرومتری بریده شدند. پس از آن، نمونه‌های آماده شده با استفاده از هماتوکسیلین و اتوزین برای رنگ آمیزی بهتر سلول‌ها، PAS (Periodic acid-Schiff) برای نمایش غشای پایه و ماسون تریکروم برای مشاهده‌ی مناسب سلول‌ها به همراه ساختار کلاژنی و غشای پایه رنگ‌آمیزی شده و با استفاده از میکروسکوپ نوری بررسی شدند (Olympus, Japan).

#### اندازه‌گیری ضخامت

ضخامت نمونه‌های پرده‌ی آمینون لیوفیلیزه شده با استفاده از نرم افزار ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, available at: <http://imagej.nih.gov/ij>) و بررسی عکس‌های بافت شناسی تهیه شده اندازه‌گیری شد. ضخامت ۵ منطقه از هر نمونه اندازه‌گیری شد و میانگین آنها به عنوان ضخامت بافت در نظر گرفته شد.

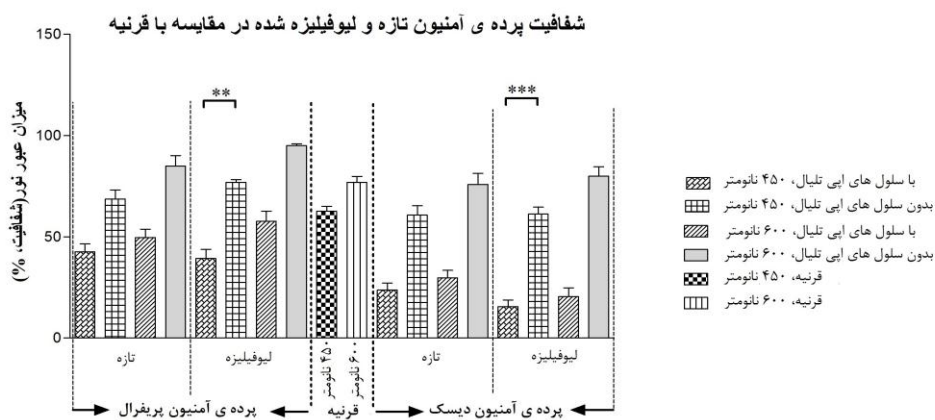
#### میکروسکوپ الکترونی نگاره

سطح پرده‌ی آمینون به صورت تازه، لیوفیلیزه شده و بدون سلول با استفاده از میکروسکوپ الکترونی نگاره همانگونه که قبلاً بیان شده است (۲۶)، مورد ارزیابی قرار گرفت. نمونه‌های پرده‌ی آمینون در گلو تار آلدهید ۲/۵٪ برای ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد فیکس شدند و سپس تحت فیکسیاسون ثانویه در تتراکسید اسمیوم ۱٪

الف



ب

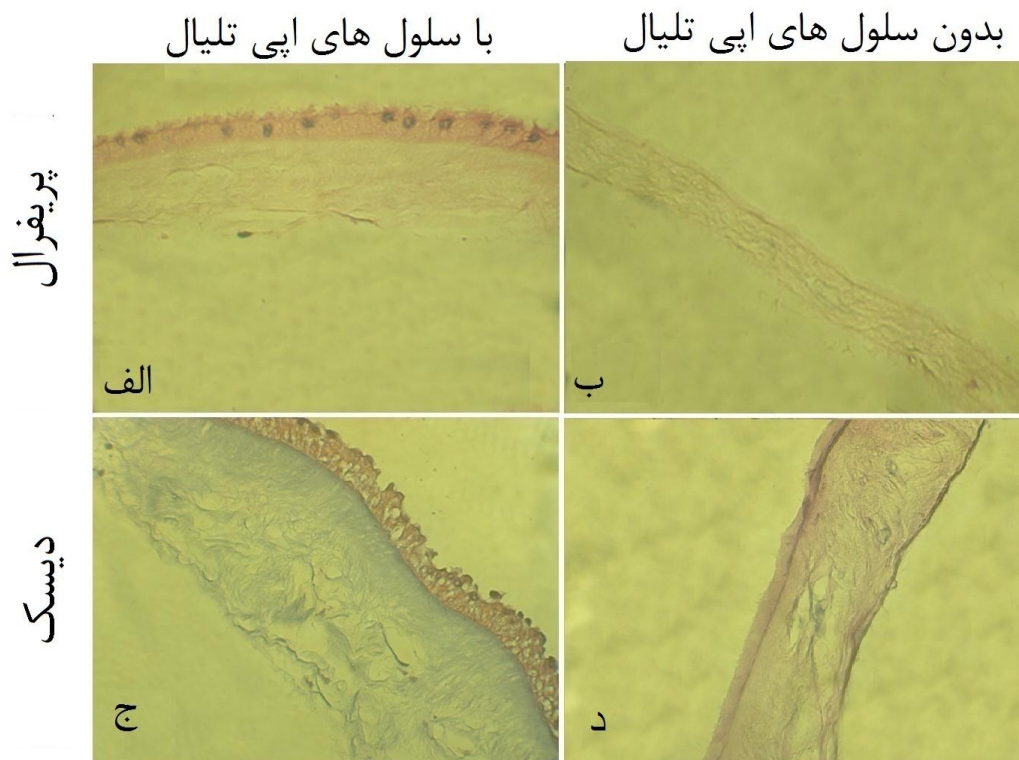


**شکل ۱: الف)** ناحیه‌های جفت که پرده‌ی آمنیون از آنها جداسازی شد. پرده‌ی آمنیون جدانشده از دیسک بافت قرار گرفته بر روی دیسک جفت بوده و پرده‌ی آمنیون پریفرال به بافت با حداقل فاصله‌ی ۲ سانتی‌متر از لبه‌ی دیسک اطلاق شد. **ب)** شفافیت (درصد عبور نور مرئی) ناحیه‌های پریفرال و دیسک پرده‌ی آمنیون تازه و لیوفیلیزه شده، و هم چنین شفافیت قرنیه‌ی خرگوش. شفافیت پس از لیوفیلیزاسیون در هر دو ناحیه‌ی پریفرال و دیسک تغییر نکرد. حذف لایه‌ی اپی‌تلیال قبل از لیوفیلیزاسیون در نمونه‌های هر دو ناحیه به‌صورت معناداری شفافیت آنها را افزایش داد. شفافیت قرنیه‌ی خرگوش قابل مقایسه با نمونه‌های بدون سلول‌های اپی‌تلیال بود. ( $**P < 0.01$ ,  $***P < 0.001$ )

استوانه‌ای هستند و هسته‌های آنها در قله‌ی سلول‌ها وجود دارد. در حالی که سلول‌های اپی‌تلیال در ناحیه‌ی پریفرال به‌صورت مکعبی با هسته‌های مرکزی بودند. هم چنین حذف سلول‌های اپی‌تلیال منجر به آسیب به غشای پایه نشده است (شکل ۲).

بررسی‌های بافتی پرده‌های آمنیون لیوفیلیزه شده، پنج لایه‌ی پرده‌ی آمنیون را که شامل یک لایه‌ی اپی‌تلیال، غشای پایه، لایه‌ی فشرده، لایه‌ی فیبروبلاست و لایه‌ی اسفنجی هستند، را نشان داد. مقایسه‌ی بافت شناسی نمونه‌های ناحیه‌ی پریفرال با دیسک پس از لیوفیلیزاسیون نشان داد که سلول‌های اپی‌تلیال ناحیه‌ی دیسک به‌صورت

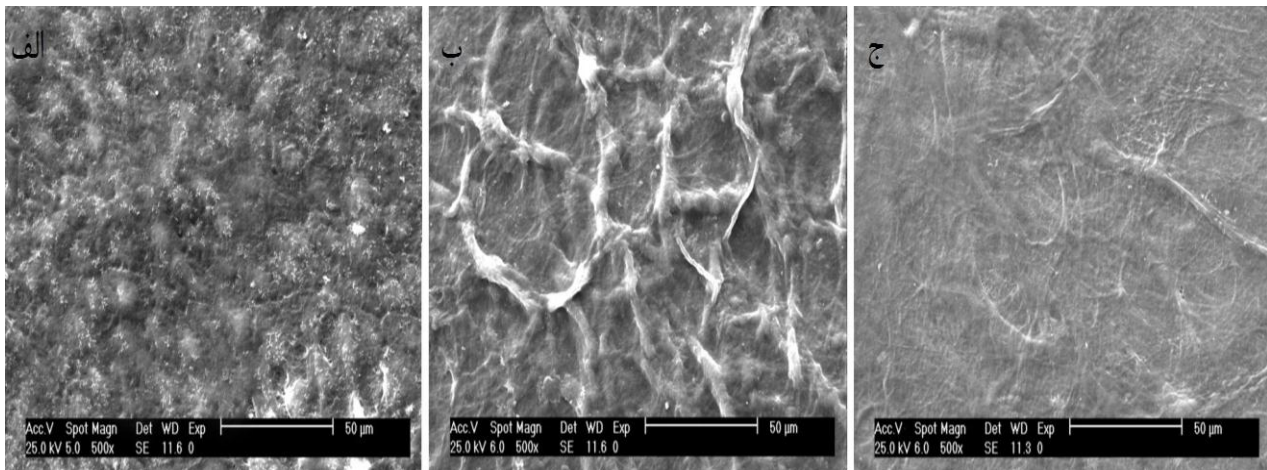
## پرده ی آمیون لیوفیلیزه شده



**شکل ۲:** عکس های بافت شناسی نمونه های پرده های آمیون لیوفیلیزه شده از ناحیه های پریفرال و دیسک. پرده ی آمیون پریفرال با سلول های اپی تلیال لیوفیلیزه شده (الف)، پرده ی آمیون پریفرال بدون سلول های اپی تلیال لیوفیلیزه شده (ب)، پرده ی آمیون دیسک با سلول های اپی تلیال لیوفیلیزه شده (ج) و پرده ی آمیون دیسک بدون سلول های اپی تلیال لیوفیلیزه شده (د). بین سلول های اپی تلیال ناحیه دیسک و پریفرال تفاوت ساختاری وجود دارد. موارد الف و ب رنگ آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین مورد ج رنگ آمیزی ماسون تری کروم و مورد د رنگ آمیزی اسید شیف است که عدم آسیب غشای پایه را پس از حذف لایه ی اپی تلیال نشان می دهد. (بزرگنمایی  $\times 400$ )

اپی تلیال آمیون دارد. پس از لیوفیلیزاسیون مقادیر زیادی از باقی مانده های سلولی بر روی غشای پایه ی پرده ی آمیون دیده شد، ولی حذف سلول های اپی تلیال قبل از لیوفیلیزاسیون باعث ایجاد یک سطح صاف شد.

برای بررسی سطح اپی تلیال پرده ی آمیون پس از تیمارهای مختلف، از میکروسکوپ الکترونی نگاره استفاده شد. همانطور که در شکل ۳ نشان داده شده است، نتایج میکروسکوپ الکترونی نگاره نشان داد که پرده ی آمیون تازه یک لایه ی یکپارچه ی دست نخورده از سلول های



**شکل ۳.** بررسی با میکروسکوپ الکترونی نگاره از سطح اپی تلیال پرده‌ی آمینون، تازه (الف)، پس از لیوفیلیزاسیون (ب) و پس از لیوفیلیزاسیون با حذف قبلی سلول‌های اپی تلیال (ج). پرده‌ی آمینون تازه یک لایه‌ی یکپارچه از سلول‌های اپی تلیال آمینون نشان می‌دهد (الف). جمع شدن دبری‌های سلولی بر روی غشای پایه می‌تواند باعث پخش نور شود (ب)، و حذف سلول‌های اپی تلیال قبل از لیوفیلیزاسیون باعث ایجاد یک سطح صاف می‌شود (ج).

آمینون نشان دادند که عبور نور پس از حذف سلول‌های اپی تلیال آمینون بهبود می‌یابد. پرده‌ی آمینون پریفال که سلول‌های اپی تلیال آن قبل از لیوفیلیزاسیون حذف شده بودند، شفاف‌ترین بافت مورد ارزیابی بود (شکل ۴).

پس از لیوفیلیزاسیون میانگین ضخامت پرده‌های آمینون با سلول‌های اپی تلیال کاهش یافت ولی در مقایسه با نمونه‌های تازه از نظر آماری معنادار نبود. به علاوه همانند نمونه‌های تازه ضخامت پرده‌های آمینون دیسک بیشتر از نمونه‌های پریفال بود (پرده‌ی آمینون پریفال با سلول‌های اپی تلیال لیوفیلیزه شده،  $43/5 \pm 10/1$  میکرومتر در مقابل دیسک با سلول‌های اپی تلیال لیوفیلیزه شده  $105/34 \pm 7/09$  میکرومتر، شکل ۵). هم چنین حذف لایه‌ی اپی تلیال قبل از لیوفیلیزاسیون باعث کاهش معنادار ضخامت پرده‌ی آمینون دیسک شد ولی اختلاف ضخامت بین نمونه‌های پریفال و دیسک هم چنان وجود داشت.

با توجه به تأثیر احتمالی سلول‌های اپی تلیال پرده‌ی آمینون بر روی درصد عبور نور پس از لیوفیلیزاسیون، این سلول‌ها قبل از انجام لیوفیلیزاسیون از نمونه‌های پرده‌ی آمینون حذف شدند. نتایج نشان داد که در هر دو ناحیه‌ی دیسک و پریفال شفافیت پرده‌ی آمینون افزایش می‌یابد به طوری که میزان عبور نور از پرده‌های آمینون ناحیه‌ی پریفال تا ۹۵٪ در ۶۰۰ نانومتر افزایش یافت. هم چنین اختلاف شفافیت بین پرده‌ی آمینون دیسک و پریفال که پس از لیوفیلیزاسیون دیده می‌شد، با حذف سلول‌های اپی تلیال قبل از لیوفیلیزاسیون از بین رفت و درصد عبور نور از هر دو ناحیه‌ی دیسک و پریفال برابر شد.

به علاوه مقایسه‌ی درصد عبور نور از قرنیه‌ی خرگوش با نمونه‌های پرده‌ی آمینون نشان داد که پرده‌ی آمینون پریفال که قبل از لیوفیلیزاسیون سلول‌زدایی شده است نزدیک‌ترین شفافیت را با قرنیه‌ی خرگوش دارد.

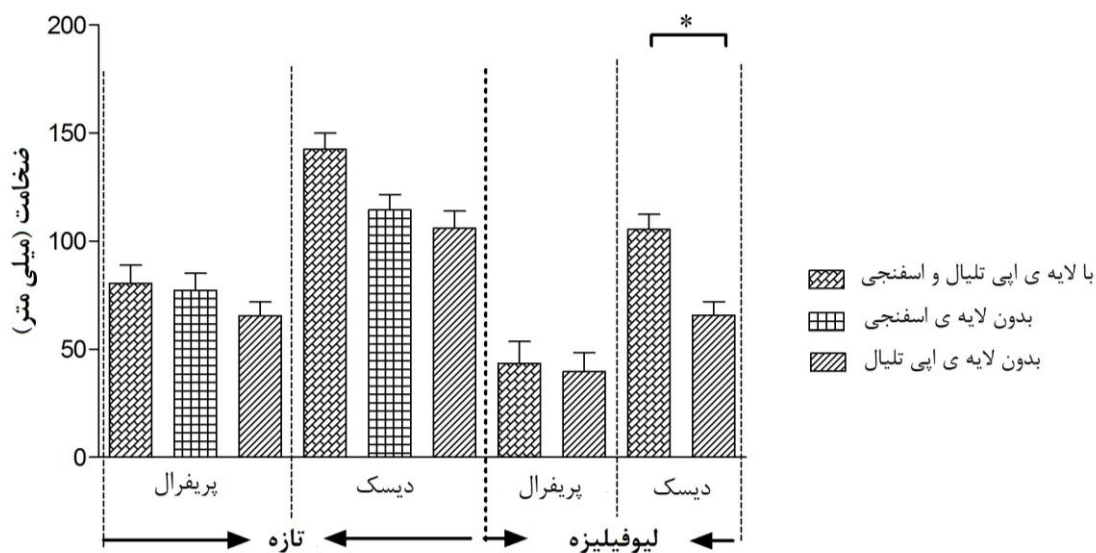
علاوه بر نتایج بیان شده، بررسی‌های کیفی و مقایسه‌ای عکس‌های گرفته شده برای نشان دادن شفافیت پرده‌های





شکل ۴: بررسی کیفی پرده های آمنیون توانایی خواندن کلمه ی "Ophthalmology" را از طریق پرده ی آمنیون به عنوان شاخص شفافیت پرده ی آمنیون نشان داد. پرده ی آمنیون پریفرال که قبل از لیوفیلیزاسیون سلول زدایی شده بود بیشترین شفافیت را داشت.

### ضخامت پرده ی آمنیون



شکل ۵: تأثیرات تیمارهای مختلف بر ضخامت پرده ی آمنیون. ناحیه ی دیسک ضخیم تر از ناحیه ی پریفرال در هر دو بافت تازه و لیوفیلیزه بوده است. حذف لایه ی اپی تلیال باعث کاهش ضخامت پرده ی آمنیون در ناحیه ی دیسک لیوفیلیزه شده، می شود. (\* $p < 0.05$ )



## بحث

به دنبال گزارش خواص بسیار مفید به همراه زیست‌سازگاری پرده‌ی آمینون (۳۵)، این بافت به صورت گسترده‌ای در پزشکی و به ویژه چشم پزشکی استفاده شده است و در اکثر موارد بر روی سطح چشم پیوند زده می‌شود (۱). با توجه به باقی ماندن پرده‌ی آمینون به صورت طولانی مدت در استرومای چشم، شفافیت آن نقش مهمی در کیفیت دید دارد. هم چنین نشان داده شده است که ناحیه‌ای از جفت که پرده‌ی آمینون از آن جدا شده است می‌تواند در توانایی عبور نور از پرده‌ی آمینون تأثیر داشته باشد (۳۰، ۳۳). بنابراین پژوهش حاضر با هدف بررسی تأثیر لیوفیلیزاسیون، به عنوان یک روش استاندارد برای نگهداری پرده‌ی آمینون قبل از جراحی، بر میزان شفافیت پرده‌ی آمینون، به همراه متغیرهای ناحیه‌ی جداسازی بافت و لایه‌ی اپی‌تلیال انجام شد.

هدف اولیه از این مطالعه بررسی تأثیر لیوفیلیزاسیون بر روی شفافیت پرده‌ی آمینون بود. لیوفیلیزاسیون یک روش استاندارد برای نگهداری پرده‌ی آمینون قبل از پیوند می‌باشد، که ماتریکس خارج سلولی و مواد ضروری پرده‌ی آمینون را برای پیوند چشمی حفظ می‌کند (۳۶). با توجه به نتایج، روند لیوفیلیزاسیون، شفافیت پرده‌ی آمینون را افزایش نمی‌دهد و حتی شفافیت پرده‌ی آمینون دیسک پس از لیوفیلیزاسیون کاهش می‌یابد. در مقابل، ما به این نتیجه رسیدیم که حذف سلول‌های اپی‌تلیال قبل از لیوفیلیزاسیون شفافیت پرده‌ی آمینون دیسک و پریفرال را افزایش می‌دهد. همانطور که در نتایج میکروسکوپ الکترونی نگاره نشان داده شده است، به نظر می‌رسد باقی مانده‌های سلولی بر روی پرده‌ی آمینون لیوفیلیزه شده باعث پخش شدن نور و کاهش شفافیت پرده‌ی آمینون می‌شوند. بنابراین برای بهینه

کردن عبور نور از پرده‌ی آمینون، ضروری است تا پرده‌ی آمینون قبل از لیوفیلیزاسیون سلول زدایی شود. توجه اختلاف میزان شفافیت پرده‌های آمینون پریفرال و دیسک را می‌توان در بررسی‌های بافت شناسی به عمل آمده از نمونه‌های لیوفیلیزه شده به دست آورد. همانطور که در بالا بیان شده است سلول‌های اپی‌تلیال آمینون ناحیه‌ی دیسک از نظر ساختاری (استوانه‌ای شکل) با سلول‌های ناحیه‌ی پریفرال (مکعبی شکل) تفاوت دارند. این تفاوت ساختاری که پس از لیوفیلیزاسیون نیز وجود دارد می‌تواند دلیل اختلاف شفافیت بین پرده‌های آمینون دیسک و پریفرال باشد. بنابراین همانطور که نشان داده شده است پس از حذف سلول‌های اپی‌تلیال میزان شفافیت پرده‌های آمینون پریفرال و دیسک بایکدیگر برابر می‌شود. البته اختلاف ضخامت بین پرده‌های آمینون دیسک و پریفرال نیز می‌تواند دلیلی بر اختلاف شفافیت این دو بافت باشد ولی چون پس از حذف سلول‌های اپی‌تلیال همچنان تفاوت ضخامت بین این دو بافت وجود دارد، در نتیجه به نظر می‌رسد ضخامت نقش اساسی در توانایی عبور نور از پرده‌های آمینون لیوفیلیزه شده ندارد. این نتایج بر خلاف مطالعه‌ی سال ۲۰۱۰، کونون و همکاران (۳۳) می‌باشد که بیان کرده بودند که پرده‌ی آمینون خشک شده در خلاء به دلیل کاهش ضخامت از شفافیت بیشتری برخوردار است. بررسی‌های ما در این مطالعه هم چنین بر روی مقایسه‌ی عبور نور نمونه‌های پرده‌ی آمینون با شفافیت قرنی‌ه‌ی خرگوش به عنوان یک مدل حیوانی تمرکز داشته است. نتایج نشان داده‌اند که شفافیت هر دو ناحیه‌ی دیسک و پریفرال پرده‌ی آمینون با سلول‌های اپی‌تلیال (به صورت تازه یا لیوفیلیزه) به صورت معناداری کمتر از قرنی‌ه‌ی بوده ولی حذف لایه‌ی اپی‌تلیال باعث عبور نور مشابه با عبور نور از قرنی‌ه‌ی خرگوش شد. بنابراین با توجه به این نتایج توصیه

شفافیت پرده‌ی آمنیون طی لیوفیلیزاسیون و پس از پیوند مورد نیاز است.

### سپاسگزاری

بدینوسیله از کارکنان اتاق عمل بیمارستان عرفان و آیت‌الله طالقانی تهران که در تهیه بافت همکاری نمودند صمیمانه قدردانی می‌نماییم. این مقاله از نتایج پایان‌نامه پزشکی عمومی استخراج شده است.

می‌شود که سلول‌های اپی‌تلایال پرده‌ی آمنیون قبل از لیوفیلیزاسیون حذف شوند تا شفافیت افزایش یابد.

### نتیجه‌گیری

این مطالعه نشان داد که لیوفیلیزاسیون شفافیت پرده‌های آمنیون را در مقایسه با نمونه‌های تازه تغییر نمی‌دهد، در حالی که حذف سلول‌های اپی‌تلایال قبل از لیوفیلیزاسیون، باعث افزایش عبور نور از پرده‌ی آمنیون می‌شود به طوری که شفافیت پرده‌ی آمنیون شبیه به شفافیت قرنی‌ه‌ی خرگوش می‌شود. مطالعات بیشتری برای بهینه کردن

### References

1. Meller D, Pauklin M, Thomasen H, Westekemper H, Steuhl KP. Amniotic membrane transplantation in the human eye. *Dtsch Arztebl Int* 2011;108(14):243-8.
2. Wolbank S, Peterbauer A, Fahrner M, Hennerbichler S, van Griensven M, Stadler G, et al. Dose-dependent immunomodulatory effect of human stem cells from amniotic membrane: a comparison with human mesenchymal stem cells from adipose tissue. *Tissue Eng* 2007;13(6):1173-83.
3. 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):340-5.
4. 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.
5. 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<sub>4</sub>-treated mice. *Cell Transplant* 2010;19(9):1157-68.
6. Tehrani FA, Ahmadiani A, Niknejad H. The effects of preservation procedures on antibacterial property of amniotic membrane. *Cryobiology* 2013;67(3):293-8.
7. Niknejad H, Khayat-Khoei M, Peirovi H. Inhibition of MMPs might increase anticancer properties of amniotic epithelial cells. *Med Hypotheses* 2012;78(5):690-1.
8. 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.
9. 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):862-5.

10. Jasinkowski NL, Cullum JL. Human amniotic membrane. As a wound dressing. *AORN J* 1984;39(5):894-5, 898-9.
11. Quinby WC, Jr., Hoover HC, Schefflan M, Walters PT, Slavin SA, Bondoc CC. Clinical trials of amniotic membranes in burn wound care. *Plast Reconstr Surg* 1982;70(6):711-17.
12. Kesting MR, Wolff KD, Mucke T, Demtroeder C, Kreutzer K, Schulte M, et al. A bioartificial surgical patch from multilayered human amniotic membrane-In vivo investigations in a rat model. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2009;90(2):930-8.
13. 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):1098-104.
14. 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.
15. Mamede AC, Carvalho MJ, Abrantes AM, Laranjo M, Maia CJ, Botelho MF. Amniotic membrane: from structure and functions to clinical applications. *Cell Tissue Res* 2012; 349(2): 447-58.
16. De Rotth A. Plastic repair of conjunctival defects with fetal membranes. *Arch Ophthalmol* 1940;23(3):522.
17. Sorsby A, Symons HM. Amniotic membrane grafts in caustic burns of the eye (burns of the second degree). *Br J Ophthalmol* 1946; 30(6): 337-45.
18. Dua HS, Gomes JA, King AJ, Maharajan VS. The amniotic membrane in ophthalmology *Surv Ophthalmol* 2004;49(1):51-77.
19. Prabhasawat P, Barton K, Burkett G, Tseng SC. Comparison of conjunctival autografts, amniotic membrane grafts, and primary closure for pterygium excision. *Ophthalmology* 1997;104(6):974-85.
20. Azuara-Blanco A, Pillai CT, Dua HS. Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction. *Br J Ophthalmol* 1999;83(4):399-402.
21. Kim JS, Kim JC, Na BK, Jeong JM, Song CY. Amniotic membrane patching promotes healing and inhibits proteinase activity on wound healing following acute corneal alkali burn. *Exp Eye Res* 2000;70(3):329-37.
22. Honavar SG, Bansal AK, Sangwan VS, Rao GN. Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction in Stevens-Johnson syndrome. *Ophthalmology* 2000;107(5):975-9.
23. Koizumi N, Inatomi T, Quantock AJ, Fullwood NJ, Dota A, Kinoshita S. Amniotic membrane as a substrate for cultivating limbal corneal epithelial cells for autologous transplantation in rabbits. *Cornea* 2000;19(1):65-71.
24. Koizumi N, Inatomi T, Suzuki T, Sotozono C, Kinoshita S. Cultivated corneal epithelial stem cell transplantation in ocular surface disorders. *Ophthalmology* 2001; 108(9): 1569-74.
25. Ti SE, Anderson D, Touhami A, Kim C, Tseng SC. Factors affecting outcome following transplantation of ex vivo

- expanded limbal epithelium on amniotic membrane for total limbal deficiency in rabbits. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;43(8):2584-92.
26. 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):145-51.
  27. Ahn J-I, Jang I-K, Lee D-H, Seo Y-K, Yoon H-H, Shin Y-H, et al. A comparison of lyophilized amniotic membrane with cryopreserved amniotic membrane for the reconstruction of rabbit corneal epithelium. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 2005;10(3):262-9.
  28. Endo K, Nakamura T, Kawasaki S, Kinoshita S. Human amniotic membrane, like corneal epithelial basement membrane, manifests the alpha5 chain of type IV collagen. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45(6):1771-4.
  29. Griffith M, Osborne R, Munger R, Xiong X, Doillon CJ, Laycock NL, et al. Functional human corneal equivalents constructed from cell lines. *Science* 1999;286(5447):2169-72.
  30. Cannon CJ, Nakamura T, Quantock AJ, Kinoshita S. The persistence of transplanted amniotic membrane in corneal stroma. *Am J Ophthalmol* 2006;141(1):190-2.
  31. Rodriguez-Ares MT, Lopez-Valladares MJ, Tourino R, Vieites B, Gude F, Silva MT, et al. Effects of lyophilization on human amniotic membrane. *Acta Ophthalmol* 2009;87(4):396-403.
  32. Libera RD, Melo GB, Lima Ade S, Haapalainen EF, Cristovam P, Gomes JA. Assessment of the use of cryopreserved x freeze-dried amniotic membrane (AM) for reconstruction of ocular surface in rabbit model. *Arq Bras Oftalmol* 2008;71(5):669-73.
  33. Cannon CJ, Douth J, Chen B, Hopkinson A, Mehta JS, Nakamura T, et al. The variation in transparency of amniotic membrane used in ocular surface regeneration. *Br J Ophthalmol* 2010;94(8):1057-61.
  34. 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.
  35. Kakavand M, Yazdanpanah G, Ahmadiani A, Niknejad H. Blood compatibility of human amniotic membrane compared with heparin-coated ePTFE for vascular tissue engineering. *J Tissue Eng Regen Med* 2015; doi:10.1002/term.2064.
  36. Nakamura T, Yoshitani M, Rigby H, Fullwood NJ, Ito W, Inatomi T, et al. Sterilized, freeze-dried amniotic membrane: a useful substrate for ocular surface reconstruction. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45(1):93-9.

## The Effect of Lyophilization on Light Transmission of Amniotic Membrane: A Comparison with Rabbit Cornea

Tina Deihim, M.D.<sup>1</sup>, Ghasem Yazdanpanah, M.D.<sup>1</sup>, Hassan Niknejad, Ph.D.<sup>2\*</sup>

1. General Practitioner, Department of Tissue Engineering and Regenerative Medicine, School of Advanced Technologies in Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

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

\* Corresponding author; e-mail: niknejad@sbm.ac.ir

(Received: 3 June 2015 Accepted: 3 Nov. 2015)

### Abstract

**Background & Aims:** Amniotic membrane persists for a long time after ocular transplantation (as corneal substitute) and can affect light transmission (transparency). The aim of this study was to evaluate the transparency of amniotic membrane after freeze-drying (lyophilization) and to compare the results with transparency of rabbit cornea.

**Methods:** Transparency of rabbits' corneas and fresh and lyophilized AMs from disk and peripheral (out of disk) regions of placenta were measured. The epithelial cells which have stem cell properties were removed with enzymatic digestion. The structure of amniotic membrane was evaluated using H&E, periodic acid-schiff and masson's trichrome staining, and ultrastructural evaluation of surface was carried out using scanning electron microscope.

**Results:** The transparency of lyophilized amniotic membrane was not different with that of fresh one. The light transmission of amniotic membrane from disk region was less than peripheral region. Removing of the epithelial layer improved the light transmission of the amniotic membrane up to the transparency of rabbit cornea. Scanning electron microscopy revealed that the epithelial cell remnants scatter the light after lyophilization.

**Conclusion:** Based on the results of this study, it is recommended to remove the epithelial layer of the amniotic membrane before lyophilization to increase its transparency amniotic membrane for corneal transplantation and ocular tissue engineering.

**Keywords:** Amnion, Transparency, Freeze-drying, Cornea