بررسی هیستولوژیک پیوند غشای آمنیون انسانی به مخاط کراتینیزه دهان خرگوش (یک مطالعه اولیه)

دکتر محمد حسن سمندری نجف آبادی*- دکتر شکوفه شهرابی فراهانی[†]- دکتر حسین خیراللهی*****

*استادیار گروه آموزشی جراحی فک و صورت و دهان دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی اصفهان

**استادیار گروه آموزشی آسیب شناسی فک و دهان دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی شهید صدوقی یزد

***عضو هیات علمی بخش اورژانس دانشکده دندانپزشکی یزد

Title: Histological evaluation of human amniotic membrane graft on oral keratinizing mucosa in the rabbit model (A pilot study)

Authors: Samandari Najafabadi MH. Assistant Professor*, Shahrabi Farahani Sh. Assistant Professor**, Kheirollahi H. Faculty member***

Address: *Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Faculty of Dentistry, Isfahan University of Medical Sciences

**Department of Oral and Maxillofacial Pathology, Faculty of Dentistry, Yazd Shahid Sadoughi University of Medical Sciences

***Department of Emergency, Faculty of Dentistry, Yazd Shahid Sadoughi University of Medical Sciences

Background and Aim: One of the complications following major oral surgeries is mucosal defects and delayed healing process. Up to now, various mucocutaneous grafts have been used in this field and recently, amniotic membrane has been proposed as a biological dressing in dermatologic, ophthalmologic and otolaryngologic practices. The purpose of this pilot study was to evaluate the healing process following human amniotic membrane graft on oral keratinized mucosa of rabbit.

Materials and Methods: In this experimental animal study, two surgical mucosal defects with the same size were made in palatal mucosa of 10 rabbits with the same weight, gender and race and a graft of human amniotic membrane was used on one of the defects. On the 7th, 14th and 28th postoperative days, surgical biopsies were randomly obtained from grafted and ungrafted regions of 3, 4 and 3 rabbits, respectively and submitted for microscopic study.

Results: According to the results, grafted regions showed more surface epithelialization and thicker newly formed epithelium. Also inflammatory cells infiltration was less in these areas. In all cases, there was a remarkable cartilage formation in the connective tissue of the recipient sites.

Conclusion: The results of this study suggest that the use of amniotic membrane graft in oral surgery could be effective in healing process. Additional studies should be done using animal and human models with more samples. Furthermore, the formation of cartilage in the grafted sites and its possible potential in reconstruction of bone defects, needs to be studied.

Key Words: Human amniotic membrane; Graft; Histological study; Repair; Rabbit

چکیده

زمینه و هدف: یکی از مشکلات بعد از جراحی‌های حفره دهان به خصوص جراحی‌های وسیع، نقایص مخاطی ناشی از جراحی و ترمیم دیررس می‌باشد. تاکنون انواع پیوندهای پوستی- مخاطی در این زمینه مورد استفاده قرار گرفته‌اند. غشاء آمنیون نیز به عنوان یک biologic dressing در جراحی‌های پوست، چشم و گوش و حلق و بینی مورد توجه قرار گرفته است. مطالعه حاضر با هدف ارزیابی هیستوپاتولوژیک روند ترمیم به دنبال استفاده از پیوند غشای آمنیون انسانی به مخاط شاخی دهان خرگوش انجام شد.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی حیوانی در مخاط کام ۱۰ خرگوش که از نظر وزن، جنس و نژاد وضعیت یکسانی داشتند، دو defect مخاطی هم‌اندازه

[†] مؤلف مسؤول: نشانی: یزد- انتهای خیابان امام- ابتدای بلوار دهه فجر- دانشکده دندانپزشکی شهید صدوقی یزد- گروه آموزشی آسیب شناسی
تلفن: ۰۹۱۲۱۹۹۴۱۵۶ نشانی الکترونیک: shokufeh_shahrabi@yahoo.com

به طریق جراحی ایجاد و در یکی از آنها غشای آمنیون انسانی پیوند زده شد. سپس در زمان‌های۱۴،۷و۲۸، روز متعاقب جراحی از هر دو ناحیه در کام ۳،۴و۳ خرگوش به ترتیب به طور تصادفی نمونه برداری شد و مورد مطالعه میکروسکوپیک قرار گرفت.

یافته‌ها: در نواحی پیوند زده شده در مقایسه با نواحی بدون پیوند، تشکیل اپی‌تلیوم سطحی بیشتر بوده و اپی‌تلیوم تشکیل شده ضخامت بیشتری را دارا بود. همچنین میزان انفیلتراسیون سلول‌های آماسی کمتر بود. در همه نمونه‌ها در ناحیه بافت همبند ناحیه گیرنده پیوند تشکیل بافت غضروفی مشهود بود.

نتیجه‌گیری: یافته‌ها نشان می‌دهد که پیوند غشای آمنیون می‌تواند در روند ترمیم زخم‌های دهانی مؤثر باشد. بنابراین باید مطالعات بیشتری با استفاده از مدل‌های حیوانی و انسانی و با تعداد نمونه بیشتر انجام گیرد. مسئله تشکیل بافت غضروفی در بیشتر این پیوندها و اهمیت آن در بازسازی نقایص استخوانی نیازمند تحقیقات بیشتری است.

کلید واژه‌ها: غشای آمنیون انسانی؛ پیوند؛ مطالعه هیستولوژیکی؛ ترمیم؛ خرگوش

وصول: ۸۵/۰۳/۲۲ اصلاح نهایی: ۸۶/۰۱/۲۷ تأیید چاپ: ۸۶/۰۲/۰۴

مقدمه

یکی از مشکلات متعاقب جراحی‌های حفره دهان به خصوص در انواع وسیع آن، ایجاد نقایص مخاطی است. تاکنون پیوندهای متعددی در این زمینه مورد استفاده قرار گرفته‌اند که شایع‌ترین آنها پیوندهای مخاطی (کام و گونه) و پوستی بوده‌اند. این پیوندها دارای معایبی زیر می‌باشد که عبارتند از: محدودیت دسترسی به آنها، آسیب‌های ثانویه در محل جراحی، عدم چسبندگی دست دندان به آنها، وجود مو، انقباض پیوند و حضور زخم در ناحیه دهنده پیوند در پوست (۱).

غشاهای جنینی به خصوص غشای آمنیون اولین بار در سال ۱۹۱۰ توسط Davis در زخم‌های پوستی مورد استفاده قرار گرفت که به دنبال استفاده از آن روند ترمیم سریع‌تر و با کاهش اسکار همراه بود. غشای آمنیوتیک داخلی‌ترین لایه غشاهای جنینی را تشکیل می‌دهد و دارای یک ماتریکس ضخیم متشکل از کلاژن است که بر روی آن یک لایه سلول‌های اپی‌تلیالی به واسطه غشای پایه اتصال دارد (۲). مطالعات مختلفی استفاده از غشای آمنیون را به عنوان یک biologic dressing یا biodegradable graft در جراحی‌ها و سوختگی‌های پوست، جراحی ناحیه پریتوئن و لگن، نقایص چشمی (قرنیه و ملتحمه)، آسیب‌های طناب نخاعی و گوش و حلق و بینی مطرح نموده‌اند (۳–۸). همچنین استفاده از آن در مطالعه‌ای جهت جانشینی برای مخاط بینی در سندرم Rendu-Osler-Weber، ترمیم پارگی پرده تیمپانیک و در جراحی radical neck dissection گزارش گردیده است (۹). غشای آمنیون ارزان و به راحتی در دسترس است و چه به صورت تازه و یا lyophilized قابل نگهداری می‌باشد. همچنین مطالعات نشان داده‌اند که خاصیت antigenicity آن بسیار اندک بوده و هیچ واکنش ایمنی را برنمی‌انگیزد، ضمن این که دارای خاصیت آنتی باکتریال وآنژیوژنیک می‌باشد (۱).

استفاده از غشای آمنیون در حفره دهان تاکنون بسیار محدود گزارش شده است. از جمله موارد گزارش شده استفاده از آن در بازسازی حفره دهان، درمان فیبروز تحت مخاطی و جراحی‌های وستیبولوپلاستی است (۱،۱۰–۱۲). با توجه به مطالعات اندک در این زمینه و این که تاکنون مطالعه هیستولوژیکی در خصوص استفاده از پیوند غشای آمنیون در حفره دهان گزارش نگردیده است، این مطالعه به صورت یک مطالعه pilot بر روی مخاط کراتینیزه دهان خرگوش که در مقایسه با rat دارای وسعت بیشتری است، انجام شد و هدف از آن ارزیابی هیستوپاتولوژیک روند ترمیم به دنبال پیوند غشای آمنیون انسانی به مخاط شاخی دهان خرگوش بود.

روش بررسی

در این مطالعه تجربی حیوانی، ۱۰ خرگوش بالغ از نوع albino که از نظر جنس، وزن و نژاد وضعیت مشابهی داشتند، از بخش تحقیقات حیوانات آزمایشگاهی دانشکده پزشکی شهید صدوقی یزد انتخاب شدند. متوسط وزن خرگوش‌ها ۳ کیلوگرم بود. غشای آمنیون انسانی یا HAM (Human Amniotic Membrane) به صورت تازه از بخش زنان و زایمان یک بیمارستان از مادرانی که به طور انتخابی تحت عمل سزارین قرار گرفته و دارای شرایط زیر بودند، تهیه شد:

۱– مادران Seronegative بودند و سابقه‌ای از بیماری‌های مقاربتی، عفونی (هپاتیت)، مسری و بیماری آماسی لگن نداشتند.

۲– فاقد Toxemia بودند.

از شرایط دیگر قابل استفاده بودن HAM جهت تحقیق، یکی عدم حضور مایع غیرطبیعی آمنیوتیک و دیگری عدم پارگی غشای آمنیون بود. با در نظر گرفتن شرایط فوق، HAM انتخاب و در شرایط استریل در دمای $4^{o}c$ به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شد ($10\times10\ cm^2$ پلاستنتا در ۴۰۰cc نرمال سالین استریل محتوی ۱ میلیون واحد پنی‌سیلین G).

با استفاده از تزریق عضلانی کتامین $50^{mg}/_{kg}$ و میدازولام $5\ ^{mg}/_{kg}$ در خرگوش‌ها بیهوشی ایجاد و سپس مخاط کام با زایلوکائین ۲٪ و اپی‌نفرین $1/100000$ بی‌حس شد. سپس در ناحیه کام حیوانات، توسط تیغ بیستوری و در شرایط کاملاً استریل دو زخم مخاطی به صورت قرینه هر یک به ابعاد $1/5\ cm \times 1$ ایجاد شد. غشای آمنیون (لایه داخلی) از کوریون غشای نگهداری شده strip و در یکی از نواحی جراحی شده با همان ابعاد از سمت بازال آن با استفاده از پک پریودنتال و بخیه silk پیوند زده شد (گروه آزمایش)، ولی ناحیه زخمی دیگر در مخاط کام تنها با پک پریودنتال و بخیه silk پوشانده شد (گروه کنترل).

پک‌های پریودنتال و بخیه‌ها پس از یک هفته برداشته شدند. سپس در روزهای ۱۴،۷ و ۲۸ متعاقب جراحی به طور تصادفی به ترتیب از ۳و۳،۴ خرگوش پس از ایجاد بیهوشی با همان روش ذکر شده، از هر دو ناحیه در کام تکه برداری شد. بافت‌های بیوپسی شده به طور جداگانه در ظرف حاوی فرمالین ۱۰٪ و دارای برچسب مشخصات قرارگرفته و فیکس شدند. سپس نمونه‌ها به بخش پاتولوژی فک و دهان دانشکده دندانپزشکی شهید صدوقی یزد ارسال شد. بعد از آماده‌سازی بافت‌ها مقاطعی به ضخامت ۶ µm تهیه و با روش H&E رنگ آمیزی شدند.

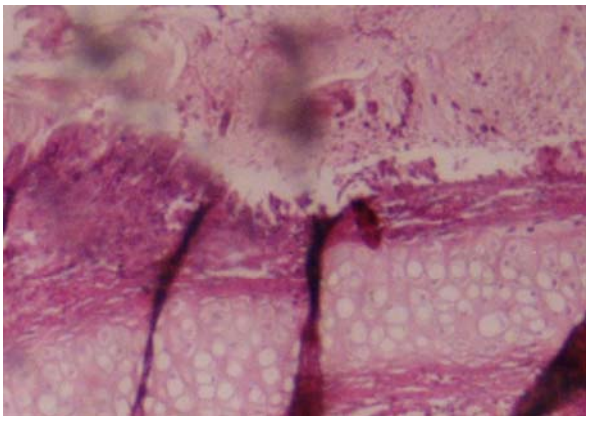
مقاطع میکروسکوپیک از نظر تشکیل اپی‌تلیوم سطحی، ضخامت نسبی اپی‌تلیوم (برحسب شمارش لایه‌های سلولی)، نوع بافت همبندی (جوانه گوشتی یا بافت همبند بالغ یا فیبروز)، شدت انفیلتراسیون سلول‌های آماسی (بدون آماس، ضعیف، متوسط، شدید) و واکنش جسم خارجی (به صورت + یا –) توسط پاتولوژیست مورد ارزیابی و مطالعه هیستولوژیک قرارگرفتند.

یافته‌ها

-یافته‌های هیستوپاتولوژیک در روز هفتم :

در نواحی پیوند زده شده در هر ۳ نمونه، سطح نمونه در قسمتی زخمی و یا دارای بقایای نکروتیک غشای آمنیون بود و در قسمت دیگر شواهدی از تشکیل اپی‌تلیوم مطبق سنگفرشی به چشم می‌خورد. بافت همبند به صورت جوانه گوشتی بود. در بافت همبند زیرین نمونه‌ها انفیلتراسیون سلول‌های آماسی به صورت ضعیف، متوسط و متوسط تا شدید بود.

یافته جالب این که در بافت همبند سطحی همه نمونه‌ها، کانون کوچکی از ماتریکس غضروفی قابل رؤیت بود (شکل ۱). در گروه کنترل (ناحیه بدون پیوند)، وسعت زخم بیشتر، بافت همبند به صورت جوانه گوشتی و انفیلتراسیون سلول‌های آماسی شدیدتر بود. در هیچ کدام از نمونه‌ها واکنش جسم خارجی مشاهده نشد.

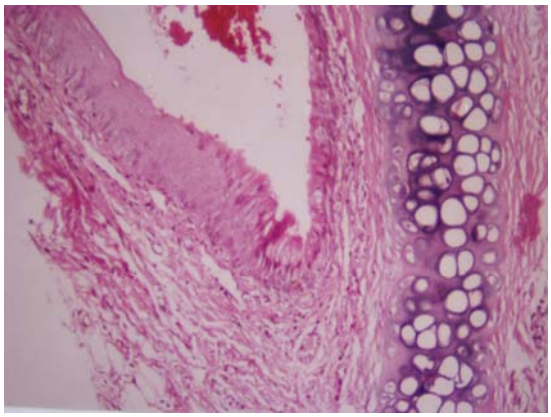


شکل ۱- نمای میکروسکوپیک ناحیه گیرنده پیوند آمنیون: بقایای نکروتیک غشای آمنیون بر روی جوانه گوشتی آماسی و تشکیل ماتریکس غضروفی بعد از یک هفته (H & E ,× 200)

- یافته های هیستوپاتولوژیک در روز چهاردهم:

اپی‌تلیالیزه شدن سطح نواحی گیرنده پیوند به صورت مطبق سنگفرشی پاراکراتوتیک و ضخامت آن در مقایسه با گروه کنترل بیشتر بود. در ۳ مورد بافت همبند زیرین به صورت جوانه گوشتی و در یک مورد به صورت بافت همبندی فیبروز دیده شد. در گروه پیوند زده شده از نظر انفیلتراسیون سلول‌های آماسی یک مورد ضعیف، دو مورد متوسط و یک مورد به صورت شدید گزارش شد. در ۳ نمونه، تشکیل ماتریکس غضروفی جلب نظر می‌کرد (به صورت کانونی کوچک یا کاملاً وسیع). در هیچ‌کدام از نمونه‌ها واکنش جسم خارجی مشاهده نشد و در گروه کنترل در هر ۳ نمونه بافت همبند به صورت جوانه گوشتی بوده و میزان آماس از شدت بیشتری برخوردار بود.

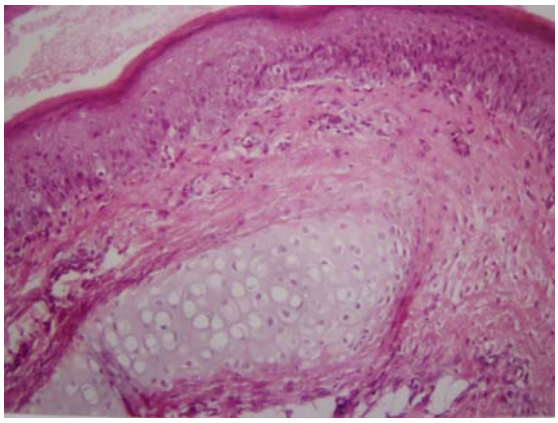
در هیچ‌یک از موارد واکنش جسم خارجی مشاهده نشد (شکل ۲).



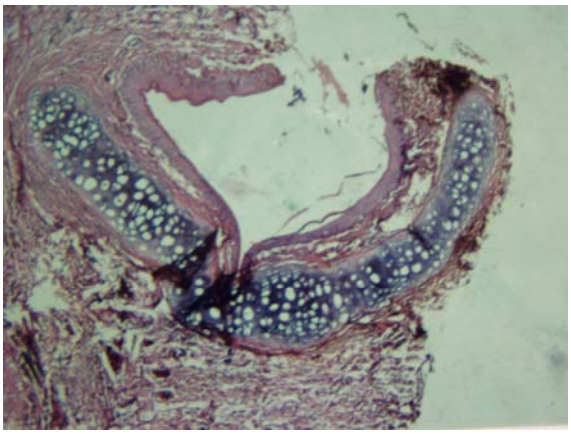
شکل ۲- نمای میکروسکوپیک ناحیه گیرنده پیوند آمنیون بعد از دو هفته: تشکیل اپی‌تلیوم مطبق سنگفرشی در سطح بافت همبندی فیبروز و تشکیل غضروف هیالن درپیوند (H & E,×100)

- یافته های هیستوپاتولوژیک در روز بیست و هشتم:

پوشش اپی‌تلیالی مطبق سنگفرشی پاراکراتوتیک بر روی سطح همه نمونه‌ها با ضخامت قابل توجهی در نمونه‌های به دست آمده از نواحی پیوند زده شده در مقایسه با مخاط بدون پیوند دیده شد. بافت همبند زیرین به جز در یک نمونه که در قسمتی به صورت جوانه گوشتی بود، در بقیه به صورت بافت همبند فیبروز بالغ رؤیت شد. در یک مورد از موارد پیوند زده شده، شدت انفیلتراسیون سلول‌های آماسی به صورت ضعیف و بقیه فاقد آماس بودند. در بافت همبند سطحی هر ۳ نمونه از مخاط دارای پیوند، به طور قابل توجهی بافت غضروفی تشکیل شده بود. واکنش جسم خارجی مشاهده نشد (شکل ۳ و ۴).



شکل ۳- تشکیل اپی‌تلیوم مطبق سنگفرشی کراتینیزه و غضروف در ناحیه گیرنده پیوند بعد از ۴ هفته (H & E ,× 100)



شکل ۴- ترمیم ناحیه جراحی شده با استفاده از پیوند غشای آمنیون و تشکیل غضروف در بستر پیوند بعد از ۴ هفته (H & E ,× 40)

در گروه کنترل در هر ۳ نمونه بافت همبند تقریباً به صورت فیبروز بالغ بود و انفیلتراسیون سلول‌های آماسی مزمن به صورت ضعیف تا متوسط مشهود بود. واکنش جسم خارجی رؤیت نشد.

بحث و نتیجه گیری

در مطالعه حاضر روند ترمیم مخاط دهان به دنبال استفاده از پیوند غشای آمنیون انسانی به صورت هیستولوژیک گزارش شد که این امر تا آنجا که ما می‌دانیم به جز در مطالعه اولیه‌ای که از این پیوند در وستیبولوپلاستی استفاده و در دو بیمار بررسی هیستوپاتولوژیک آن انجام شد (۱۲)، مورد مطالعه و تحقیق قرار نگرفته است. در مطالعه مذکور مطرح گردید که این ماده می‌تواند پیوندی مطلوب جهت جراحی‌های وستیبولوپلاستی ایجاد کند و روند ترمیم آن دارای سیر طبیعی می‌باشد (۱۲). نتایج مطالعه حاضر نشان داد، به دنبال این پیوند بر روی مخاط شاخی دهان خرگوش، روند ترمیم زخم و تشکیل اپی‌تلیوم سطحی به صورت طبیعی انجام شده و در مقایسه با ناحیه بدون پیوند این روند سریع‌تر بوده است. همچنین میزان انفیلتراسیون سلول‌های آماسی کمتر می‌باشد. این یافته با مطالعات قبلی که بر روی سطح قرنیه یا ملتحمه چشم انجام یافته است، مطابقت می‌کند (۵،۶، ۱۳،۱۴). Lawson در مطالعه‌ای از این غشاء به همراه عضله جهت بازسازی حفره دهان استفاده نمود و به این نتیجه رسید که وقتی عضله به تنهایی بدون غشای آمنیون به کار رود، روند ترمیم طولانی‌تر می‌شود (۱۰). مطالعات نشان داده‌اند که غشای آمنیون به علت دارا

بودن غشای پایه ضخیم، مهاجرت سلول‌های اپی‌تلیالی را تسهیل کرده، موجب تقویت چسبندگی سلول‌های اپی‌تلیالی بازال می‌شود و همچنین موجب تمایز سلول‌های اپی‌تلیالی شده و از apoptosis آنها جلوگیری می‌کند (۳) .

در حقیقت غشای آمنیون خود به عنوان یک غشای پایه ضخیم عمل کرده و جایگزین غشای پایه از دست رفته می‌شود (۶)، فرآیند تماس سلول- غشای پایه که جهت پرولیفراسیون و تمایز با اهمیت است، توسط این غشاء فراهم می‌شود (۱۴). Gris و همکاران مطرح می‌کنند که غشای آمنیون به عنوان یک سوبسترا برای تشکیل اپی‌تلیوم عمل کرده و با توجه به دارا بودن فاکتورهای رشد متعدد، موجب نگهداری و حفظ ضخامت استرومای از دست رفته می‌شود (۱۳). غشای آمنیون حتی می‌تواند به عنوان سوبسترایی برای فیبروبلاست‌ها عمل کند. مطالعات تجربی متعددی رشد سلول‌های فیبروبلاست را بر روی این غشاء تأیید نموده‌اند (۱۵).

در مورد سرنوشت غشای آمنیون بعد از پیوند، مطالعات تجربی نشان داده‌اند که ۱۰-۱۵ روز بعد از پیوند، این غشاء تحت دژنرسانس موکوئیدی قرار گرفته و به طور کامل توسط اپی‌تلیوم جایگزین می‌شود (۱) که این یافته در نمونه‌های مطالعه حاضر نیز دیده شد، به طوری که بعد از گذشت دو هفته، در برخی نمونه‌ها بقایای این غشاء مشهود بود. البته Gris و همکاران در مطالعه خود مطرح کردند که جذب آمنیون به دنبال پیوند قرنیه، به وضعیت عروقی و میزان سلول‌های آماسی قرنیه بستگی داشته و پیوند می‌تواند حتی چند ماه باقی بماند (۱۳).

Stoiber و همکاران با مطالعات ایمونوهیستوشیمیایی با استفاده از شاخص‌های غشای پایه بر این نظر بودند که غشای پایه غشای آمنیون از نظر مولکولی با غشای پایه قرنیه متفاوت است و دریافتند که غشای پیوندی می‌تواند باقی مانده و یا توسط سلول‌های ناحیه گیرنده تغییر نماید (۶). تقریباً در تمام نمونه‌های این مطالعه، تشکیل غضروف و یا ماتریکس غضروفی در بافت همبند سطحی در زیر اپی‌تلیوم در هفته اول بعد از پیوند به خوبی نمایان بود. القای استئوژنیک بین سلول‌های اپی‌تلیالی کاشته شده در سلول‌های مزانشیمی در مطالعات گوناگونی تحت بررسی بوده است (۱۶).

Anderson و همکاران به دنبال کاشت سلول‌های اپی‌تلیالی انسانی مانند سلول‌های آمنیوتیک یا Hela به عضله اسکلتال موشی که تحت درمان با کورتون بود، بعد از هفت روز تشکیل غضروف را مشاهده نمودند (۱۸،۱۷) و یا در مطالعه Hall، تشکیل بافت استخوان و غضروف توسط مزانشیم قوس مندیبل تحت تأثیر القای اپی‌تلیوم جنینی گزارش شده است (۱۹).

مکانیسم القای تشکیل غضروف توسط سلول‌های آمنیون بدین صورت مطرح شده است که یا از سلول‌های آمنیون ماده شیمیایی القاء کننده برای فیبروبلاست‌های حساس در جهت تمایز کندروسیتیک و تولید ماتریکس غضروفی تولید می‌شود که چنین ماده قابل انتشاری با توانایی القای تشکیل غضروف در جنین توسط طناب نخاعی شکمی و نوتوکورد نشان داده شده است و یا این مواد محیط شیمیایی فیبروبلاست‌ها را تغییر داده و از طریق تداخل با موادی که از پیش وجود داشته‌اند عمل کرده و منجر به تولید محصولاتی می‌شوند که نتیجه آن تشکیل استخوان یا غضروف است. البته نظریه دیگری نیز مطرح شده دال بر این که سلول‌های رده آمنیون هیچ ماده القا کننده‌ای تولید نمی‌کنند، بلکه در حد سلولی، آسیبی مکانیکی وارد می‌کنند که منجر به تجمع زیاد فیبروبلاست‌هایی می‌شود که برخی از آنها می‌توانند تمایز غضروفی داشته باشند (۱۸). در مطالعات هیستولوژیک گزارش شده قبلی در مورد پیوند غشای آمنیون به سطح قرنیه یا ملتحمه در بستر پیوند تشکیل غضروف یا استخوان مشاهده نشد. ولی در مطالعه Anderson و همکاران در ۱۵ مورد از ۱۱۷ مورد کلسیفیکاسیون دیده شد که در توجیه آن استفاده از قطره‌های چشمی فسفات مطرح گردید (۲۰).

در هر صورت نتایج این مطالعه که می‌توان آن را یک مطالعه Pilot قلمداد کرد، نشان می‌دهد که استفاده از غشای آمنیون می‌تواند در موارد جراحی‌های حفره دهان موجب تسریع روند ترمیم شده و به دلیل ایجاد التهاب کمتر، عوارض پس از جراحی (تورم، درد، التهاب) را کاهش دهد و یا حداقل به عنوان یک پوشش و پانسمان بیولوژیک، آسودگی بیشتر بیماران را فراهم آورد.

البته باید مطالعاتی با تعداد نمونه بیشتر در مورد اثر غشای آمنیون در روند ترمیم انجام یابد و شاخص‌های هیستولوژیک از جمله ضخامت اپی‌تلیوم با روش‌های دقیق‌تر توسط میکرومتر ارزیابی گردند. تشکیل غضروف در زیر این پیوند و امکان کلسیفیکاسیون آن نیز می‌تواند نشان‌دهنده خاصیت القا استخوان‌سازی یا Osteoconduction در این

بافت پیوندی باشد، بنابراین اگر مطالعاتی در راستای القای تشکیل استخوان در زیرپریوست انجام گیرد از این خاصیت می‌توان در امر بازسازی نقایص استخوانی و یا در جهت افزایش ریج آلوئول در بیمارانی که دارای تحلیل استخوان هستند، بهره جست که البته این امر نیازمند مطالعات و تحقیقات بیشتری در آینده است.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از زحمات آقای پارسا در حیوانخانه دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد در امر نگاهداری حیوانات و همچنین آقای محمد مهدی همائی‌فر جهت آماده‌سازی بافت‌ها و تهیه مقاطع میکروسکوپیک تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع:

1- Guler R, Ercan MT, Ulutuncel N, Devrim H, Uran N. Measurement of blood flow by the ^{133} xe clearance technique to grafts of amnion used in vestibuloplasty . Br J Oral Maxillofac Surg 1997; 35:280-3.
2- Davis JW. Skin transplantation with a review of 550 cases at the John Hopkins Hospital .Johns Hopkins Med J 1910;15:307-96.
3- Prabhasawat P, Tseng SC. Impression cytology study of epithelial phenotype of ocular surface reconstructed by preserved human amniotic membrane .Am Med Assoc 1997;115:1360-7.
4- Trelford JD, Trelford- Sauder M. The amnion in surgery, past and present. Am J Obstet Gynecol 1979; 134:833-45.
5- LU R, Lin J, Zhang J, Zheng H, Yuan Z, Lin J. The histological changes after preserved human amniotic membrane transplantation for conjunctival reconstruction of rabbits eyes. Yan Ke Xue Bao 2000;16(4):224-7.
6- Stoiber J, Muss WH, Pohla- Gubo G, Ruckhofer J, Grabner G. Histopathology of human corneas after amniotic membrane and limbal stem cell transplantation for severe chemical burn. Cornea 2002; 21(5):482-9.
7- Sankar V, Muthusamy R. Role of human amniotic epithelial cell transplantation in spinal cord injury repair research. Neuroscience 2003; 118(1):11-17.
8- Gris O, Guell JL, Lopez-Navidad A, Caballero F, Del Campo Z. Application of the amniotic membrane in ocular surface pathology. Ann Transplant 1999;4(3-4):82-4.
9- Zohar Y, Talmi YP, Shvili Y, Finkelstain Y, Sadov R, Laurian N. Use of human amniotic membrane in otolaryngologic practice. Laryngoscope 1987;97(8):978-80.
10- Lawson VG. Oral cavity reconstruction using pectoralis major muscle and amnion. Arch Otolaryngol 1985;111:230-33.
11- Lai DR, Chen HR, Lin LM, Huang YL, Tsai CC. Clinical evaluation of different treatment methods for oral submucous fibrosis .A 10- year experience with 150 cases. J Oral Pathol Med 1995; 24(9):402-6.
12- Samandari MH, Yaghmaei M, Ejlali M, Moshref M, Saffar A. Use of amnion as a graft material in vestibuloplasty: A preliminary report. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2004; 97(5):574-8.
13- Gris O, Wolley-Dod C, Guell JL, Tresserra F, Lerma E, Corcostegui B, Adan A. Histologic findings after amniotic membrane graft in the human cornea. Ophthalmology 2002;109(3):508-12.
14- 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.
15- Kumar TR, Shanmugasundaram N, Babu M. Biocompatible collagen scaffolds from a human amniotic membrane: Physiochemical and in vitro culture characteristics . J Biomater Sci Polym Ed 2003; 14(7):689-706.
16- Anderson HC. Osteogenetic epithelial-mesenchymal cell interactions. Clin Orthop 1976;Sep(119):211-23.
17- Anderson HC, Merker PC, Fogh J. Formation of tumors containing bone after intramuscular injection of transformed human amnion cells into cortisone-treated mice. Am J Pathol 1964;44(3):507-9
18- Anderson HC, Coulter PR. Bone formation induced in mouse thigh by cultured human cells. Journal of Cell Biology 1967;33:165-177
19- Hall BK. The induction of neural crest- derived cartilage and bone by embryonic epithelia: an analysis of the mode of action of an epithelial- mesenchymal interaction. J Embryol Exp Morphol 1981; 64: 305-20.
20- Anderson SB, De Souza RF, Hofmann-Rummelt C, Seitz B. Corneal calcification after amniotic membrane transplantation. Br J Ophthalmol 2003;87(5):587-91.