

Ứng dụng màng collagen từ màng ối người làm giá thể nuôi cấy tế bào bám dính trong kỹ nghệ mô

Nguyễn Thanh Bình^{1,2}, Nguyễn Thị Thu Hiền¹, Ngô Thái Minh Quân², Dương Phương Thanh², Trần Thị Thanh Thủy³, Nhan Ngọc Hiền³, Nguyễn Khánh Hoà³, Hoàng KC Hương³, Nguyễn Tuấn Kiệt⁴, Nguyễn Minh Cẩn⁵, Huỳnh Duy Thảo^{3*}

¹Khoa Y Dược, Trường Đại học Thủ Dầu Một, 6 Trần Văn Ôn, phường Phú Hoà, TP Thủ Dầu Một, tỉnh Bình Dương, Việt Nam

²Trung tâm Nghiên cứu Y sinh, Trường Đại học Y khoa Phạm Ngọc Thạch, 2 Dương Quang Trung, phường 12, quận 10, TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

³Khoa Khoa học Cơ bản - Y học Cơ sở, Trường Đại học Y khoa Phạm Ngọc Thạch, 2 Dương Quang Trung, phường 12, quận 10, TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

⁴Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh, 227 Nguyễn Văn Cừ, phường 4, quận 5, TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

⁵Viện Phát triển Ứng dụng, Trường Đại học Thủ Dầu Một, 6 Trần Văn Ôn, phường Phú Hoà, TP Thủ Dầu Một, tỉnh Bình Dương, Việt Nam

Ngày nhận bài 16/1/2023; ngày chuyển phản biện 18/1/2023; ngày nhận phản biện 13/2/2023; ngày chấp nhận đăng 16/2/2023

Tóm tắt:

Màng ối người đã được sử dụng phổ biến trong lâm sàng để điều trị các loại tổn thương liên quan đến bề mặt biểu mô, tái cấu trúc biểu mô giác mạc, chấn thương chỉnh hình. Hiện tại, một khía cạnh ứng dụng khác của màng ối người được quan tâm rất lớn là sử dụng làm giá thể nuôi cấy tế bào bám dính *in vitro*. Trong nghiên cứu này, màng ối người được thu nhận trong điều kiện vô trùng tại phòng mổ, được xét nghiệm âm tính với HIV, HBV, HCV, VDRL và xử lý để loại bỏ lớp biểu mô, thu nhận màng collagen dùng làm giá thể nuôi cấy tế bào bám dính. Màng collagen được đánh giá cấu trúc bằng phương pháp nhuộm mô học (H&E), SEM, thử nghiệm làm giá thể nuôi cấy các nguyên bào sợi người và đánh giá sự bám dính, tăng trưởng và phát triển của tế bào bằng các hình ảnh mô học theo thời gian nuôi cấy. Các kết quả hình ảnh thu nhận trước và sau khi xử lý cho thấy, màng collagen có cấu trúc vô bào, vẫn duy trì được cấu trúc của lớp màng đáy. Kết quả nuôi cấy tế bào cho thấy, các nguyên bào sợi đã bám dính và phát triển tốt trên màng collagen này.

Từ khoá: giá thể collagen, giá thể nuôi tế bào, màng ối người, nguyên bào sợi.

Chỉ số phân loại: 3.5

1. Mở đầu

Màng ối người đã được sử dụng phổ biến trong lâm sàng để điều trị tổn thương bề mặt biểu mô như bong, tái cấu trúc bề mặt biểu mô giác mạc, hội chứng Stevens - Johnson, trong chuyên ngành nha khoa, chấn thương chỉnh hình [1-6]. Tuy nhiên thời gian gần đây, màng ối người lại được xử lý để làm giá thể nuôi cấy tế bào trong kỹ nghệ mô [7, 8].

Giá thể dùng để nuôi cấy tế bào phải thoả mãn các tiêu chí sau. Giá thể cần phải hỗ trợ tế bào bám dính, cảm ứng tăng sinh và phát triển của tế bào. Ngoài ra, giá thể cũng hỗ trợ cho tế bào ghép tích hợp thuận lợi vào mô chủ [9]. Hiện tại, các loại giá thể được sử dụng phổ biến là các loại polymer tổng hợp như polyglycolic acid (PGA) và polylactic acid (PLLA) hay các loại polymer tự nhiên như collagen, alginate, hydrogel cũng được sử dụng rộng rãi. Tuy nhiên, cả 2 dạng polymer này đòi hỏi một quá trình chế tạo và xử lý phức tạp để dùng làm giá thể nuôi cấy tế bào *in vitro*. Ngoài ra, các loại giá thể này cũng thiếu lớp màng đáy và không thể tái lập được các “niche” của tế bào hay vi môi trường cho sự bám dính và tăng sinh của tế bào [10].

Để tìm một loại giá thể phù hợp cho các đặc tính trên thì màng ối người là một “ứng viên” nổi bật với nhiều đặc tính hấp dẫn như vật liệu vô bào, có tính tương hợp sinh học, phân hủy sinh học và quan trọng hơn màng ối người là một loại vật liệu sinh học tự nhiên được ứng dụng thành công trong cấy ghép mô từ rất sớm [6]. Việc loại bỏ tế bào biểu mô và tế bào của khung nền ngoại bào của lớp đáy làm giảm các đáp ứng miễn dịch nhưng vẫn giữ lại khung nền ngoại bào như collagen, glycosaminoglycan, fibronectin và vitronectin giúp tế bào nuôi cấy bám dính, tăng sinh và phát triển tốt trên màng [7, 11, 12]. Ngoài ra, màng ối người vô bào đã được xác định không gây độc cho tế bào trong điều kiện nuôi cấy *in vitro* [13]. Hiện nay, màng ối người đang được thử nghiệm để làm giá thể nuôi cấy tế bào gốc, tế bào rìa giác mạc và đặc biệt là tế bào sừng trong điều trị bỏng [3, 10, 14, 15]. Do đó, chúng tôi tiến hành nghiên cứu này với mục tiêu thiết lập được quy trình hiệu quả để thu nhận giá thể collagen và thử nghiệm dùng giá thể collagen để nuôi nguyên bào sợi da người.

*Tác giả liên hệ: Email: thaohuynhduy@pnt.edu.vn

Application of collagen membrane from amniotic membrane as a substrate for adherent cell culturing in tissue engineering

Thanh Binh Nguyen^{1,2}, Thi Thu Hien Nguyen¹,
 Thai Minh Quan Ngo², Phuong Thanh Duong²,
 Thi Thanh Thuy Tran³, Ngoc Hien Nhan³,
 Khanh Hoa Nguyen³, KC Huong Hoang³,
 Tuan Kiet Nguyen⁴, Minh Can Nguyen⁵, Duy Thao Huynh^{3*}

¹Faculty of Medicine and Pharmacy, Thu Dau Mot University,
 6 Tran Van Street, Phu Hoa Ward, Thu Dau Mot City, Binh Duong Province, Vietnam

²Biomedical Research Center, Pham Ngoc Thach University of Medicine,
 2 Duong Quang Trung Street, Ward 12, District 10, Ho Chi Minh City, Vietnam

³Faculty of Fundamental Sciences, Pham Ngoc Thach University of Medicine,
 2 Duong Quang Trung Street, Ward 12, District 10, Ho Chi Minh City, Vietnam

⁴University of Science, Vietnam National University - Ho Chi Minh City,
 227 Nguyen Van Cu Street, Ward 4, District 5, Ho Chi Minh City, Vietnam

⁵Faculty of Biology, Thu Dau Mot University,
 6 Tran Van On Street, Phu Hoa Ward, Thu Dau Mot City, Binh Duong Province, Vietnam

Received 16 January 2023; revised 13 February 2023; accepted 16 February 2023

Abstract:

The human amniotic membrane has been widely used in clinical practice to treat all kinds of lesions related to the epithelial surface, corneal epithelial reconstruction, and orthopaedic trauma. Currently, another application aspect of the amniotic membrane of great interest is its use as an *in vitro* adherent cell culture medium. In this study, the human amniotic membranes were collected under sterile conditions in the operating room and tested negative for HIV, HBV, HCV, and VDRL. The amniotic membranes were then processed to remove the epithelial layer, to obtain a collagen membrane that can be used as a substrate for cell culture adhesion. Following that, the collagen membrane was structurally evaluated by Hematoxylin and eosin (H&E) staining, SEM. Next, we tested the use of collagen membranes as a culture medium for human fibroblasts and evaluated cell adhesion, growth, and development by histological images over time of cell culture. The image results obtained before and after processing showed that the collagen membrane has an acellular structure, maintaining the basement membrane's structure. Cell culture results exhibited that fibroblasts adhered and developed well on this collagen membrane.

Keywords: collagen membrane, fibroblasts, human amniotic membrane, scaffold cell culture.

Classification number: 3.5

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng

Màng ối người được thu nhận trong điều kiện vô trùng tại phòng mổ ngay sau khi mổ nhau. Mạng ối được cho vào các chai Duran 500 ml có chứa PBS vô trùng. Sau đó, màng ối được chuyển về phòng thí nghiệm và giữ ở nhiệt độ 4°C để chờ thực hiện các xét nghiệm. Mạng ối chỉ được xử lý thành màng collagen khi có các xét nghiệm âm tính với HIV, HBV, HCV và VDRL. Nguyên bào sợi da người được thu nhận, phân lập và nuôi cấy trong môi trường gồm DMEM/F12, 15% FBS và kháng sinh (Penicilline/Streptomycine).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Thu nhận và xử lý màng ối người thành màng collagen:

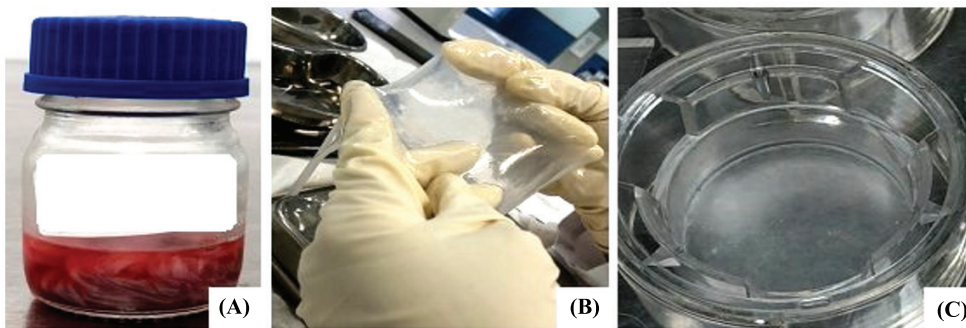
Màng ối được xử lý để thu nhận màng collagen theo quy trình ở bảng 1.

Bảng 1. Quy trình xử lý màng ối người để thu nhận màng collagen dùng làm giá thể nuôi cấy tế bào.

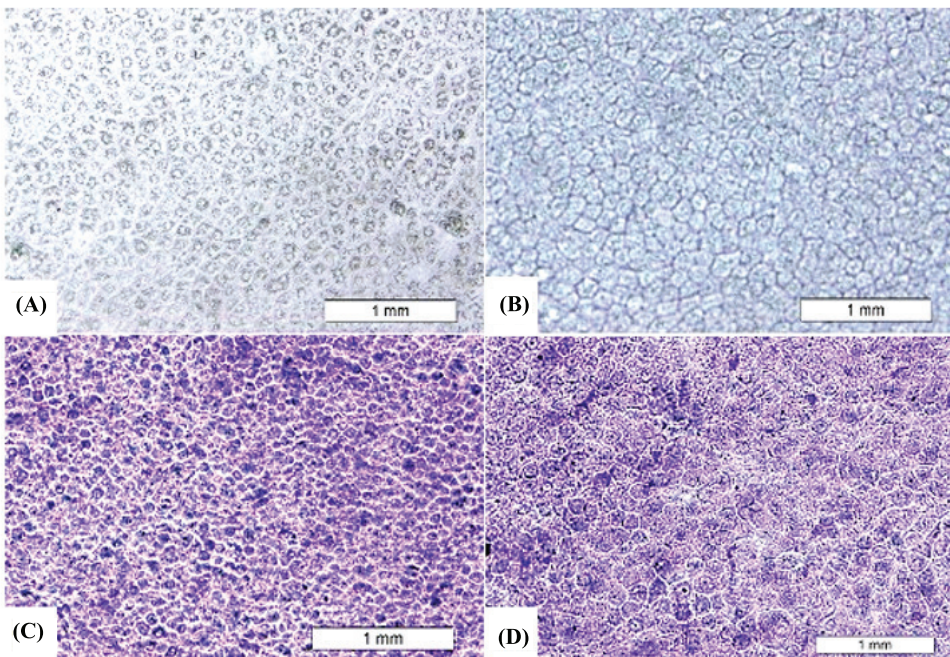
Thứ tự	Các bước thực hiện	Dụng cụ, hoá chất
1	Lắc và rửa sạch màng ối với dung dịch PBS để loại bỏ máu, mô thừa (lặp lại 3 lần)	PBS (Gibco), pH 7,4
2	Ủ với hỗn hợp dung dịch Trypsin-EDTA, 100 ml dung dịch enzyme cho một màng ối	Trypsin 0,25% (Gibco), EDTA 0,05% (Sigma)
3	Rửa sạch màng ối với dung dịch PBS để loại bỏ enzyme (lặp lại 3 lần)	PBS (Gibco), pH 7,4
4	Cạo bỏ lớp biểu mô	Dụng cụ xử lý gồm que, gạc, kéo
5	Rửa sạch lại màng ối với dung dịch PBS	PBS (Gibco), pH 7,4
6	Trái màng trên các đĩa lồng	Cell culture insert (Nunc™)
7	Đề khô qua đêm trong tủ thao tác vô trùng ở nhiệt độ phòng	Tủ thao tác an toàn sinh học (Class II)
8	Đóng gói, khử trùng bằng tia gamma với liều 25 kGy	Trung tâm Nghiên cứu và triển khai công nghệ bức xạ (VINAGAMMA)
9	Bảo quản màng collagen ở nhiệt độ phòng	

Đánh giá giá thể collagen: Giá thể collagen sau khi thu nhận được quan sát tươi và nhuộm Giemsa dưới kính hiển vi để so sánh với màng ối chưa xử lý về hiệu quả loại bỏ lớp biểu mô. Sau đó, giá thể collagen sẽ được làm tiêu bản mô học (nhuộm H&E) và quan sát dưới kính hiển vi điện tử quét (SEM) để đánh giá cấu trúc của giá thể.

Thử nghiệm dùng giá thể collagen nuôi cấy nguyên bào sợi: Nguyên bào sợi được nuôi trong môi trường DMEM/F12, 15% FBS và kháng sinh. Tế bào sau lần cấy chuyển thứ 2 được thu nhận bằng dung dịch Trypsin-EDTA (0,25-0,05%) và chuyển lên giá thể collagen với mật độ 10^4 nguyên bào sợi/cm² bề mặt giá thể collagen. Sau 3 ngày nuôi sẽ tiến hành thay môi trường nuôi mới. Việc nuôi cấy này sẽ tiến hành theo dõi trong thời gian 2 tuần, tế bào được theo dõi và quan sát dưới kính hiển vi đảo ngược. Tại các mốc thời gian nuôi cấy 1 và 2 tuần, tế bào được nuôi trên giá thể collagen được thu nhận lại để làm tiêu bản mô học (nhuộm H&E) nhằm đánh giá khả năng bám dính và phát triển của tế bào trên giá thể collagen.



Hình 1. Quá trình thu nhận màng collagen từ màng ối dùng làm giá thể nuôi cấy tế bào bám dính. (A) Màng ối người sau khi được thu nhận từ phòng mổ; (B) Màng collagen được thu nhận từ màng ối; (C) Màng collagen đã được trải trên đĩa lồng để sẵn sàng nuôi tế bào bám dính.



Hình 2. Màng ối người. (A, B) Màng ối được quan sát tươi dưới kính hiển vi (10X), (20X); (C, D) Màng ối được nhuộm Giemsa quan sát dưới kính hiển vi (10X), (20X).

2.3. Đạo đức nghiên cứu

Nghiên cứu đã được thông qua Hội đồng đạo đức trong nghiên cứu y sinh học theo quyết định số 219/QĐ-HĐTr ngày 7/2/2022 của Chủ tịch Hội đồng Trường Đại học Thủ Dầu Một (Số HĐĐĐ.22.06-001).

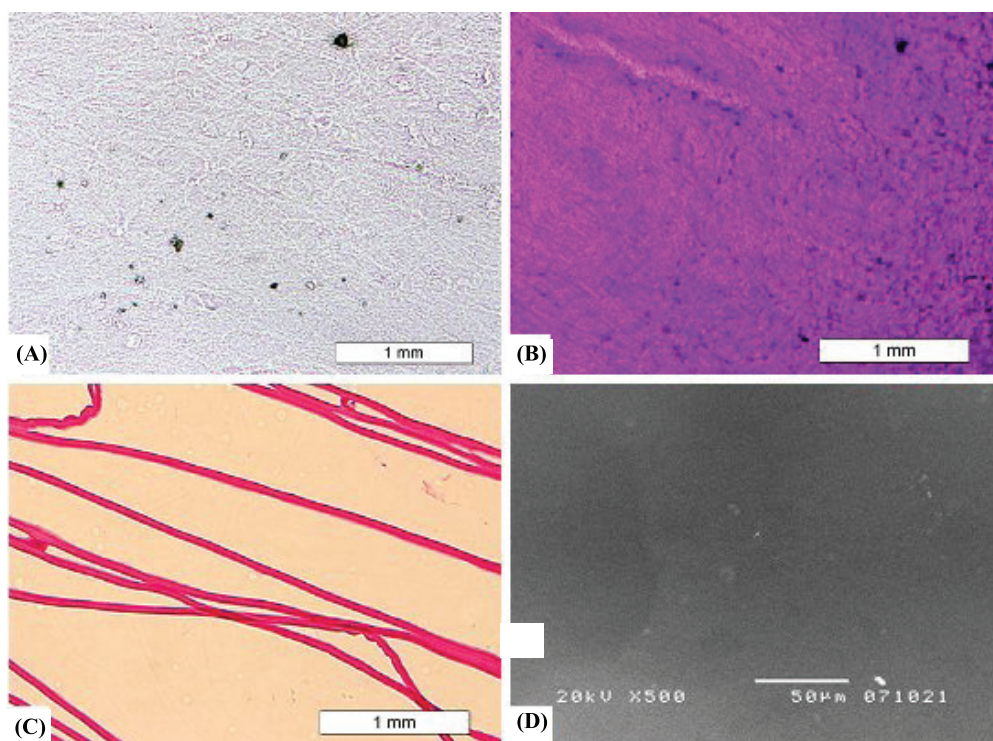
3. Kết quả

3.1. Kết quả thiết lập quy trình xử lý và thu nhận màng collagen

Màng ối sau khi được xử lý theo quy trình do nhóm nghiên cứu thiết lập tại bảng 1 đã loại bỏ được hoàn toàn lớp tế bào biểu mô bề mặt. Cấu trúc màng ối vẫn còn giữ được nguyên vẹn. Màng ối sau xử lý được xem như là màng collagen vì cấu trúc chủ yếu là khung nền collagen (thành phần cấu tạo chính của màng ối). Màng collagen này sẽ được trải lên trên các đĩa lồng để chuẩn bị làm giá thể nuôi tế bào (hình 1).

Màng ối sau khi được thu nhận và loại bỏ mô máu, mô thừa vẫn duy trì cấu trúc toàn vẹn, ổn định, lớp biểu mô bề mặt màng ối vẫn còn nguyên vẹn (hình 2).

Kết quả đánh giá hình thái và cấu trúc của màng collagen sau khi được thu nhận từ màng ối được mô tả ở hình 3. Kết quả cho thấy, màng ối sau khi được xử lý đã loại bỏ hoàn toàn lớp biểu mô, không còn xuất hiện bất kỳ một tế bào biểu mô màng ối khi quan sát tươi (hình 3A) cũng như sau khi nhuộm Giemsa (hình 3B). Điều này cũng được minh chứng thêm bằng kết quả mô học, màng collagen được đem đi làm tiêu bản và quan sát trên kính hiển vi cho thấy tất cả cấu trúc bề mặt lớp biểu mô đã được loại bỏ (hình 3C).



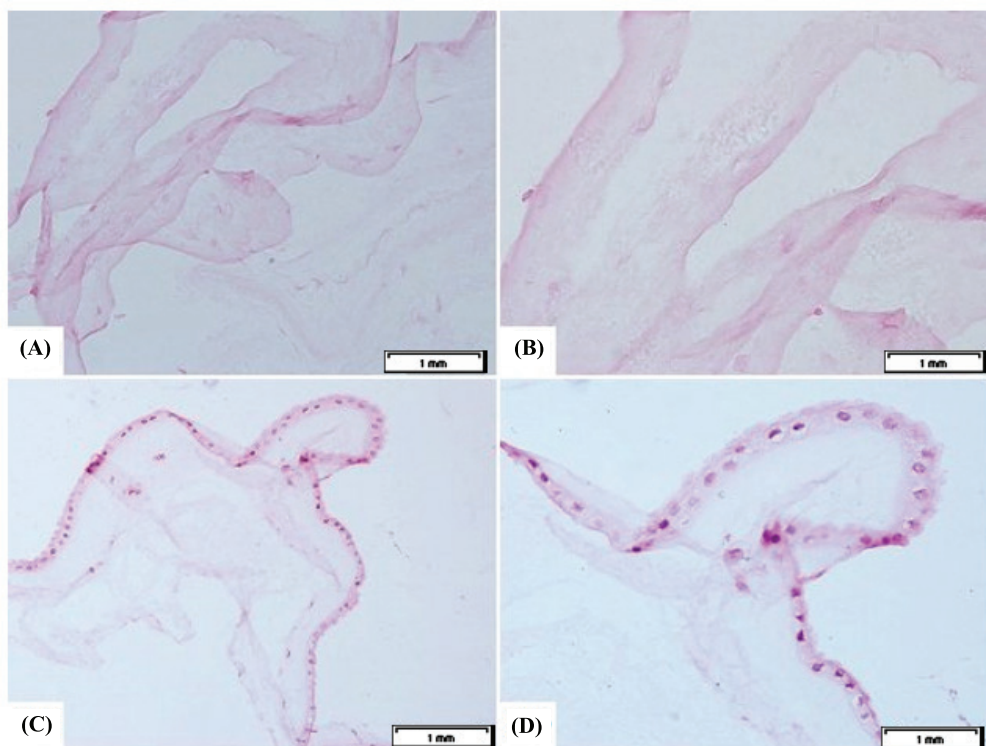
Hình 3. Kết quả đánh giá màng collagen sau khi thu nhận. (A) Màng collagen quan sát tươi dưới kính hiển vi sau khi xử lý (10X); **(B)** Màng collagen được nhuộm Giemsa (10X); **(C)** Màng collagen được nhuộm H&E (20X); **(D)** Màng collagen được chụp dưới SEM 50 μ m.

Kết quả khẳng định lại khi quan sát màng collagen dưới SEM. Kết quả quan sát cho thấy, bề mặt của lớp biểu mô đã hoàn toàn được loại bỏ, cấu trúc màng ối chỉ còn giữ lại lớp đáy với cấu trúc nguyên vẹn và cũng không thấy sự hiện diện của các tế bào của mô liên kết trong khung nền của lớp đáy.

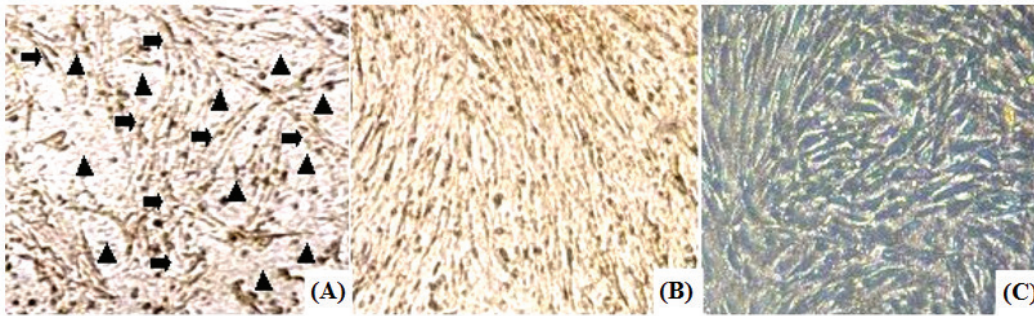
Kết quả thu nhận màng collagen cho thấy, quy trình mà nhóm nghiên cứu đã thiết lập có hiệu quả để loại bỏ lớp biểu mô màng ối nhưng vẫn giữ lại được cấu trúc khung ngoại bào của lớp màng đáy. Cấu trúc của màng collagen cho thấy đã loại bỏ sạch được lớp biểu mô cũng như các tế bào của mô liên kết trong lớp màng đáy.

3.2. Kết quả ứng dụng màng collagen dùng làm giá thể nuôi tế bào

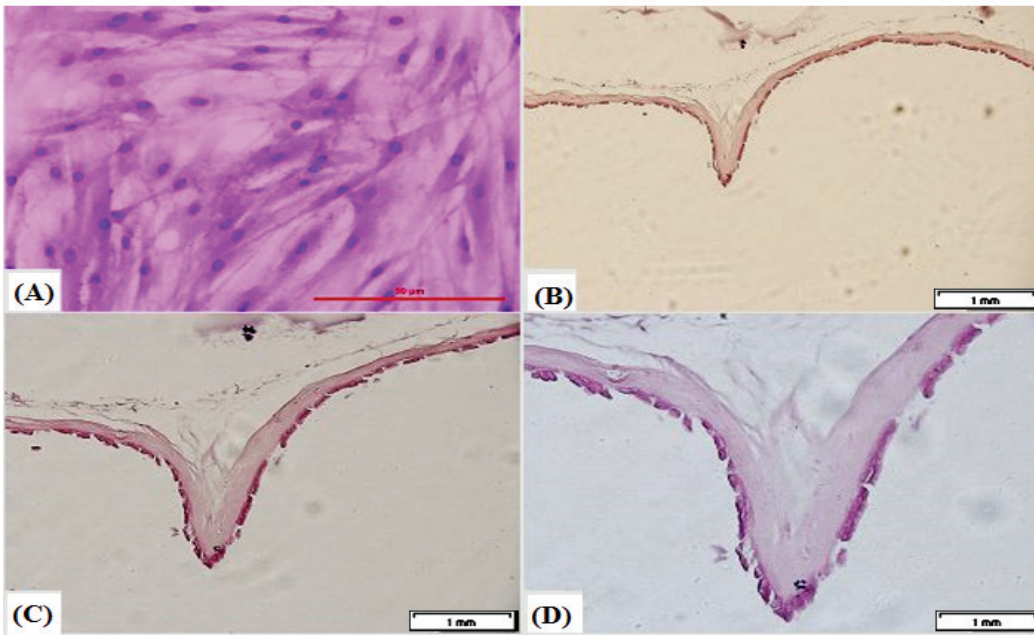
Kết quả nuôi cấy nguyên bào sợi trên màng collagen cho thấy, tế bào bám dính, tăng trưởng và phát triển tốt trên màng (hình 5). Nguyên bào sợi vẫn duy trì được hình thái thon dài đặc trưng của tế bào trung mô khi quan sát dưới kính hiển vi đảo ngược theo thời gian nuôi cấy, điều này minh chứng cho thấy màng collagen là một giá thể không gây độc cho tế bào nuôi cấy. Theo thời gian nuôi cấy, tế bào bám dính và tăng trưởng ngày càng nhiều trên giá thể collagen.



Hình 4. So sánh cấu trúc của màng collagen và màng ối khi được nhuộm H&E. (A, B) Màng collagen được quan sát lần lượt ở vật kính (20X), (40X); **(C, D)** Màng ối người được quan sát lần lượt ở vật kính (20X), (40X).



Hình 5. Kết quả nuôi cấy nguyên bào sợi trên màng collagen. (A) Nguyên bào sợi nuôi trên màng collagen sau 3 ngày nuôi cấy (20X), nguyên bào sợi (mũi tên màu đen) bám dính và phát triển được trên màng collagen (tam giác màu đen); (B) Nguyên bào sợi sau 7 ngày nuôi cấy (20X); (C) Nguyên bào sợi sau 14 ngày nuôi cấy (40X), khi quan sát dưới kính hiển vi đảo ngược pha, hình thái nguyên bào sợi vẫn được duy trì, tế bào bám dính và mật độ tế bào gia tăng theo thời gian nuôi cấy.



Hình 6. Kết quả nuôi nguyên bào sợi trên màng collagen sau 14 ngày nuôi cấy. (A) Nguyên bào sợi được phân lập và nuôi cấy tại lần cấy chuyển thứ hai (10X); (B-D) Nguyên bào sợi bám dính và phát triển trên màng collagen từ màng ối (10X, 20X và 40X).

Sau 14 ngày nuôi cấy, nguyên bào sợi trên giá thể collagen được thu nhận lại làm tiêu bản mô học và nhuộm H&E (hình 6). Kết quả cho thấy, tế bào bám dính và tăng trưởng được trên bề mặt giá thể collagen. Trong khi bám dính, tăng trưởng và di chuyển trên màng collagen thì tế bào vẫn duy trì hình dạng thon dài, bầu dục mang đặc trưng của tế bào trung mô.

4. Bàn luận

Màng ối người đã được sử dụng từ rất sớm trên lâm sàng trong nhiều chuyên ngành như hỗ trợ điều trị các tổn thương do bỏng gây ra cũng như sử dụng làm vật liệu che

phủ vết thương trong các tổn thương mất da, viêm loét. Sau đó, màng ối được sử dụng phổ biến hơn trong các chuyên ngành khác [1-6]. Màng ối người cho thấy là một loại vật liệu sinh học tự nhiên an toàn và hiệu quả để sử dụng trên lâm sàng [1, 2, 6]. Từ đó, màng ối có thể trở thành một vật liệu lý tưởng để phát triển làm giá thể nuôi cấy tế bào bám dính trong kỹ nghệ mô [3, 6, 8, 12, 14, 15]. Hiện tại, đang có nhiều nhóm nghiên cứu trên thế giới đã sử dụng màng ối làm giá thể nuôi cấy tế bào sừng người, tạo ra các mảnh ghép kỹ nghệ để điều trị các tổn thương bỏng [2, 15]; nuôi cấy tế bào rìa giác mạc để điều trị các bệnh lý về mắt; nuôi cấy tế bào gốc để phát triển ra các mảnh ghép hướng đến ứng dụng điều trị trong y học tái tạo [3, 14, 15].

Từ các phân tích trên cho thấy, màng ối có tính hiệu quả, an toàn và phù hợp để tạo ra giá thể collagen dùng để nuôi cấy tế bào. Quy trình mà nhóm nghiên cứu thiết lập cho thấy đã loại bỏ hoàn toàn lớp biểu mô màng ối cũng như đã loại bỏ được các tế bào của mô liên kết trong lớp màng đáy (hình 3). Giá thể collagen là một màng vô bào, cấu trúc chỉ còn lại phần lớp đáy, chủ yếu là khung collagen có chứa các yếu tố tăng trưởng để hỗ trợ tế bào bám dính và tăng trưởng [7, 12] (hình 5).

Để minh chứng điều này, nhóm nghiên cứu đã sử dụng giá thể collagen để nuôi nguyên bào sợi (hình 5 và 6). Kết quả cho thấy, nguyên bào sợi bám dính và phát triển được trên giá thể theo thời gian nuôi cấy. Điều này chứng tỏ giá

thể collagen không những không gây độc mà còn hỗ trợ tế bào bám dính và tăng trưởng [11].

Từ các kết quả nghiên cứu đạt được, giá thể collagen sẽ bổ sung thêm một lựa chọn trong kỹ nghệ mô để phát triển ra nhiều loại mảnh ghép dùng trong y học tái tạo [7], các mảnh ghép này được tạo ra sẽ có tính sẵn sàng sử dụng, đáp ứng nhu cầu của người bệnh trong tương lai không xa.

5. Kết luận

Nhóm nghiên cứu đã thu nhận thành công giá thể collagen từ màng ối. Màng này được xử lý để hướng đến dùng làm giá thể trong nuôi cấy tế bào bám dính. Kết quả nuôi nguyên bào sợi cho thấy, tế bào bám dính, tăng trưởng và phát triển tốt trên giá thể collagen. Như vậy, màng collagen sẽ là một giải pháp thay thế hiệu quả để chọn lựa sử dụng làm giá thể. Đây sẽ là một trong những hướng nghiên cứu đầy tiềm năng và bắt kịp xu hướng ứng dụng của kỹ nghệ mô mà hiện tại thế giới đang triển khai nghiên cứu.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Trường Đại học Thủ Dầu Một trong đề tài mã số DT.22.1-035. Các tác giả xin chân thành cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] A. Abul, M. Karam, S. Rahman (2020), "Human amniotic membrane: A new option for graft donor sites - systematic review and meta-analysis", *Int. Wound J.*, **17(3)**, pp.547-554, DOI: 10.1111/iwj.13313.

[2] M. Eskandarlou, M. Azimi, S. Rabiee, et al. (2016), "The healing effect of amniotic membrane in burn patients", *World J. Plast Surg.*, **5(1)**, pp.39-44.

[3] H.J. Lee, S.M. Nam, S.K. Choi, et al. (2018), "Comparative study of substrate free and amniotic membrane scaffolds for cultivation of limbal epithelial sheet", *Sci. Rep.*, **8**, DOI: 10.1038/s41598-018-32914-0.

[4] K. Tsubota, Y. Satake, M. Ohyama, et al. (1996), "Surgical reconstruction of the ocular surface in advanced ocular cicatricial pemphigoid and Stevens-Johnson syndrome", *Am. J. Ophthalmol.*, **122(1)**, pp.38-52, DOI: 10.1016/S0002-9394(14)71962-2.

[5] R. Mohan, A. Bajaj, M. Gundappa (2017), "Human amnion membrane: Potential applications in oral and periodontal field", *J. Int. Soc. Prev. Community Dent.*, **7(1)**, pp.15-21, DOI: 10.4103/jispcd.JISPCD_359_16.

[6] H.P. Huddleston, M.R. Cohn, E.D. Haunschild, et al. (2020), "Amniotic product treatments: Clinical and basic science evidence", *Curr. Rev. Musculoskelet Med.*, **13(2)**, pp.148-154, DOI: 10.1007/s12178-020-09614-2.

[7] M. Fenelon, S. Catros, C. Meyer, et al. (2021), "Applications of human amniotic membrane for tissue engineering", *Membranes (Basel)*, **11(6)**, DOI: 10.3390/membranes11060387.

[8] D. Shaghayegh, M. Barzegar, E.A. Taghavi, et al. (2022), "Applications of acellular human amniotic membrane in regenerative medicine", *Life Sciences*, **310**, DOI: 10.1016/j.lfs.2022.121032.

[9] A. Marchini, F. Gelain (2022), "Synthetic scaffolds for 3D cell cultures and organoids: Applications in regenerative medicine", *Crit. Rev. Biotechnol.*, **42(3)**, pp.468-486, DOI: 10.1080/07388551.2021.1932716.

[10] M. Gholipourmalekabadi, M. Sameni, D. Radenkovic, et al. (2016), "Decellularized human amniotic membrane: How viable is it as a delivery system for human adipose tissue-derived stromal cells?", *Cell Prolif.*, **49(1)**, pp.115-121, DOI: 10.1111/cpr.12240.

[11] S.P. Wilshaw, J. Kearney, J. Fisher, et al. (2008), "Biocompatibility and potential of acellular human amniotic membrane to support the attachment and proliferation of allogeneic cells", *Tissue Eng. Part A*, **14(4)**, pp.463-472, DOI: 10.1089/tea.2007.0145.

[12] S.P. Wilshaw, J.N. Kearney, J. Fisher, et al. (2006), "Production of an acellular amniotic membrane matrix for use in tissue engineering", *Tissue Eng.*, **12(8)**, pp.2117-2129, DOI: 10.1089/ten.2006.12.2117.

[13] I.S. Rahadian, J. Wahyuhadi, I.K. Sudiana, et al. (2021), "Cytotoxicity test for the use of freeze-dried amniotic membranes against viability, proliferation, and apoptosis on brain cell culture: An in vitro study", *Interdisciplinary Neurosurgery*, **23**, DOI: 10.1016/j.inat.2020.100947.

[14] N. Koizumi, T. Inatomi, A.J. Quantock, et al. (2000), "Amniotic membrane as a substrate for cultivating limbal corneal epithelial cells for autologous transplantation in rabbits", *Cornea*, **19(1)**, pp.65-71.

[15] A.O. Paggiaro, M.B. Mathor, W.R. Teodoro, et al. (2020), "Evaluation of radiosterilized glycerolated amniotic membranes as a substrate for cultured human epithelial cells", *Organogenesis*, **16(1)**, pp.27-41, DOI: 10.1080/15476278.2020.1723366.