

ارزیابی بیومکانیکی داربست سه بعدی زیستی تهیه شده از تاندون شترمرغ به عنوان گرافت

• سعید حسینی (نویسنده مسئول)

گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

• شاپور حسن زاده

گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

• رسول شهروز

گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

تاریخ دریافت: شهریور ۹۴ تاریخ پذیرش: آذر ۹۴

Email: SaeedHosseiniVet@yahoo.com



چکیده

هدف اصلی در مهندسی بافت ایجاد ساختاری مشابه ساختار طبیعی موجود در بدن موجود زنده، جهت ترمیم آسیب‌های بافتی است. همواره مشکلاتی در انجام پیوند بافت وجود داشته است. از جمله کمبود منابع بافتی مناسب و پس‌زدن ایمونولوژیک بافت‌های پیوند زده شده است؛ در مهندسی بافت یکی از جدیدترین روش‌ها به منظور کاهش واکنش ایمنی بدن نسبت به بافت پیوند زده شده، روش سلول‌زدایی بافت است. تعداد ۱۲ نمونه تاندون آشیل شترمرغ در دو گروه سلول‌زدایی شده (گرافت) و نشده (کنترل) از شترمرغ نر ۲ تا ۳ ماهه تهیه گردید. عمل سلول‌زدایی با سدیم دودسیل سولفات انجام شد. پس از ثبوت و طی روند معمول تهیه مقاطع بافتی، به منظور ارزیابی ساختار بافتی از رنگ آمیزی‌های هماتوکسیلین-آنوزین، پیکروسپروس قرمز و جهت بررسی میزان سلول‌زدایی و بقایای هسته از رنگ آمیزی DAPI استفاده گردید و ارزیابی استحکام بافتی به وسیله آزمون بیومکانیکی انجام شد. نتایج حاصل از آن توسط Student-Test و Mann-Whitney با نرم افزار SPSS، در دامنه $(p \leq 0.05)$ مورد ارزیابی قرار گرفتند. در ارزیابی میزان سلول‌زدایی، ۹۹٪ گرافت فاقد هسته و بقایای DNA بود. گروه کنترل در مقایسه با زونوگرافت پس از طی فرآیند سلول‌زدایی، از نظر کیفیت کلاژنی فاقد اختلاف معنی‌دار و از نظر نظم رشته‌ای دارای اختلاف معنی‌داری بود. در آزمون بیومکانیکی میزان تنش تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ولی در کرنش بافتی گرافت کاهش معنی‌داری را نشان داد. با ارزیابی خصوصیات ساختار بافتی و بیومکانیکی داربست سه بعدی تهیه شده در مقایسه با تاندون شترمرغ، مشخص شد این زونوگرافت دارای شرایط مناسب برای پیوند می‌باشد.

کلمات کلیدی: گرافت، تاندون، داربست سه بعدی، سلول‌زدایی، شترمرغ

- Veterinary Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 111 pp: 64-74

Biomechanical evaluation of three-dimensional biological scaffold made from Ostrich tendons as graft

By: Hosseini, S., (Corresponding Author) Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran. Hasanzadeh, Sh., Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran and Shahrooz, A., Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran.

Received: August 2015 Accepted: November 2015

Email: SaeedHosseiniVet@yahoo.com

The main goal of tissue engineering design and create a structure similar to the natural structure of a tissue in vivo for repair tissue damages. Tissue transplantation, there are always problems, including a shortage of suitable tissue and immunological rejection of grafted tissue in tissue engineering is one of the newest methods to reduce the immune response to transplanted tissue, is tissue decellularization methods (Acellular). After fixation and routine tissue process, to evaluate the structure of tissue H&E stained, collagen quality assessment xenograft Picrosirius red stained, review and tracking the decellularization, detected nuclei trace and any DNA remaining 4', 6'diamino-2-phenylindole-2HCl (DAPI) staining was used. Assess tissue strength by biomechanical test was performed. Biomechanical results by Student t-Test and Mann-Whitney ($P \leq 0.05$) was performed with SPSS software. Compared with ostrich tendons and matrix three-dimensional structure after the process of decellularization, the tissue density is somewhat reduced cohesion between collagen fibers were observed in some places a few miles away. Quality collagen stained by Picrosirius red that there is no difference between them. In assessing the amount of de-cells after staining DAPI 99% of the three-dimensional scaffold and remains free of nuclear DNA. Biomechanical testing of Stress, there was no difference in graft tissue but strain showed a significant decrease. Evaluation of properties of three-dimensional tissue structure made of scaffolding and comparison with ostrich tendons found this graft is the appropriate for graft.

Keyword: Graft, tendon, three-dimensional scaffold, Acellular, Ostrich

مقدمه

هدف اصلی در مهندسی بافت طراحی و ایجاد ساختاری مشابه ساختار طبیعی یک بافت در بدن موجود زنده، جهت ترمیم آسیب‌های بافتی است. ممکن است بافت آسیب دیده با سلول‌های بنیادی خود به صورت محدود، توان بازسازی را داشته باشد ولی وقتی شدت آسیب بافتی زیاد باشد و این امر موجب از بین رفتن سلول‌های بنیادی بافت گردد، استفاده از داروهای معمول کمک کننده نیست و کاربردی نخواهد داشت که بدین منظور برای درمان بافت آسیب دیده می‌توان به وسیله روش‌های آزمایشگاهی و بهره‌گیری از مهندسی بافت ساختاری مشابه بافت آسیب دیده تهیه کرد و به آن پیوند زد تا موجب تسریع روند بهبود در آن بافت گردد (Longo et al., 2011a). همواره مشکلاتی در انجام پیوند بافت وجود داشته است از جمله اهم آن: کمبود منابع بافتی مناسب و پس‌زدن ایمونولوژیک بافت‌های پیوند زده شده است. مهندسی بافت یکی از جدیدترین روش‌های مورد استفاده در ترمیم بافت‌های آسیب دیده بدن است (Carpenter and Han-kenson, 2004, Alam et al., 2013, Longo et al., 2010, Wisbeck et al., 2012). در این روش با استفاده از داربست‌های صنعتی زیست تخریب پذیر یا طبیعی با در نظر گرفتن شرایط مناسب متابولسمی و ترمیمی در بافت آسیب دیده، مورد استفاده قرار می‌گیرد (Longo et al., 2011b, Santucci)

اولین تجربه بالینی استفاده از محصولات مهندسی بافت در سال ۱۹۸۰ توسط Burke و همکاران از داربست کلاژنی برای جانشینی پوست به منظور حمایت و تقویت رشد سلول‌های فیبروبلاستی استفاده کردند به دنبال آنها Howard Green یک لایه سلولی کراتینوسیتی را در درمان جراحات‌های پوستی استفاده کرد، پس از آن Bell از کاشت سلول فیبروبلاستی با ژل کلاژنی را انجام داد و این تحقیقات همچنان ادامه دارد (Vacanti, 2006).

در حال حاضر از مهندسی بافت به منظور بازسازی بافت‌ها و اندام‌هایی مانند پوست، استخوان، غضروف، کبد، مثانه، لیگامان، اعصاب، دریچه قلب و غیره استفاده می‌شود و البته در تمامی زمینه‌های یاد شده موفقیت‌هایی نیز بدست آمده ولی هنوز نیازمند بررسی‌های بیشتر در مورد بهبود سازگاری زیستی و همچنین عملکرد زیستی بافت‌های مهندسی شده می‌باشد (Pridgen et al., 2011).

پارگی‌های تاندون از عوامل ضربه زنده اقتصادی-اجتماعی در جوامع محسوب می‌شود. آمار سالانه مربوط به شیوع پارگی‌های تاندونی خود موید این سخن می‌باشد. تاندون‌ناشیلی، بعد از پارگی کلاهیک چرخاننده و بازکننده-زانو، سومین محل شایع پارگی تاندونی در بدن انسان و عمدتاً ورزشکاران است. تاندون از قدرت کشسانی کمی برخوردار می‌باشد و

حرکت می‌کند. در طول عمر ۶۰ ساله‌اش روزانه بیش از ۸ ساعت در حال حرکت است. این خصوصیات همواره مورد توجه قرار گرفته است و سبب شد که فرصت مناسبی را به منظور مطالعه سازگاری انگشتان این پرنده با توانایی حرکت سریع بر روی دو انگشت آن فراهم نماید (Rubenson et al., 2007, Schaller et al., 2011, Smith et al., 2006, Schaller et al., 2009). در مطالعات اولیه کالبدشناسی و بافت‌شناسی بر روی تاندون شترمرغ، خصوصیات اولیه و اصلی این ساختار مشخص گردید و فرضیه احتمال تاثیر این ساختار برای جایگزینی در آسیب‌های تاندونی قوت گرفت. از این رو در پژوهش حاضر جهت ساخت داربست سه بعدی زیستی به عنوان زونوگرافت به روش فرآوری آزمایشگاهی از ساختار تاندون شترمرغ استفاده شد و خصوصیات بافتی و بیومکانیکی آن پس از فرآوری مورد ارزیابی قرار گرفت، تا در صورت مناسب بودن استحکام بیومکانیکی و بافت شناسی از آن در ترمیم آسیب‌های تاندونی استفاده شود.

مواد و روش‌ها

به منظور مقایسه خصوصیات ساختار بافتی پیش و پس از فرآوری از تاندون شترمرغ نر ۲ تا ۳ ماهه استفاده شد. که در دو گروه کنترل و تجربی (گرافت) مورد مطالعه قرار گرفت. نمونه‌ها از کشتارگاه شترمرغ واقع در ورامین تهیه شده و در شرایط دمایی مناسب به آزمایشگاه منتقل شد. در گروه کنترل پس از نمونه‌گیری تاندون آشیل پای شترمرغ، به قطعات (۴۰ میلی‌متر طول، ۱۰ میلی‌متر عرض و ۵ میلی‌متر قطر) در محلول فسفات بافر سالین (PBS) جهت انجام آزمون بیومکانیک قرار داده شد. به منظور ارزیابی ساختار بافتی قطعاتی به قطر ۵ میلی‌متر برش داده شده و در محلول فیکساتیو فرمالین بافری قرار گرفت. در گروه گرافت سلول‌زدایی شده گرافت‌پس از نمونه‌گیری از تاندون آشیل پای شترمرغ، به قطعات ۵×۱۰×۴۰ میلی‌متر به منظور تهیه داربست سه بعدی زیستی بدون سلول، تاندون آشیل پای شترمرغ ابتدا تحت فرآیند سلول‌زدایی قرار گرفت و سپس ۶ نمونه از آنها به منظور ارزیابی در محلول PBS جهت انجام آزمون بیومکانیک قرار داده شد. برای ارزیابی ساختار بافتی زونوگرافت قطعاتی به قطر ۵ میلی‌متر برش داده شده و در محلول فیکساتیو فرمالین بافری قرار گرفت.

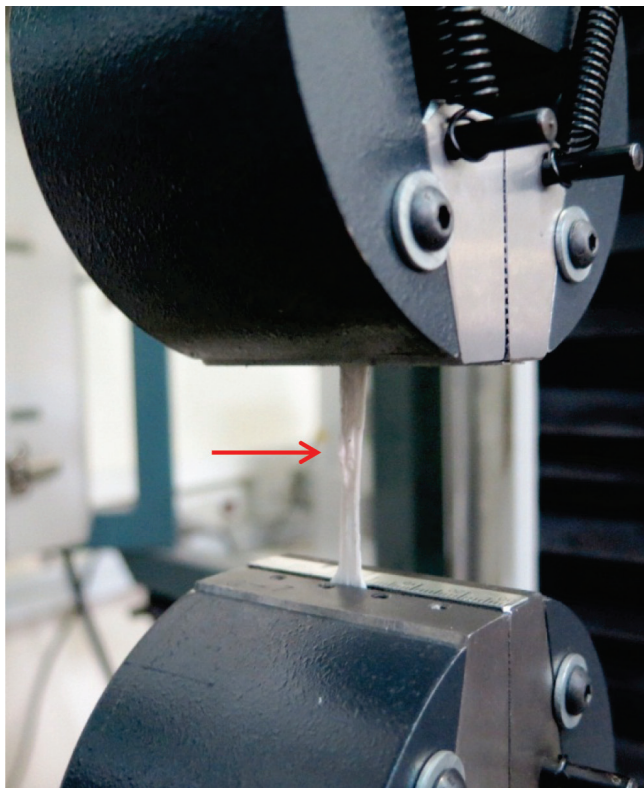
روش سلول‌زدایی زونوگرافت

پای شترمرغ از کشتارگاه شترمرغ واقع در ورامین تهیه شده و داخل جعبه مخصوص حمل نمونه در شرایط دمایی ۴°C تا ۷°C به آزمایشگاه انتقال یافت. پس از آن تاندون‌ها جدا شده و در کوتاه‌ترین زمان ممکن ابتدا در ۲۰°C- قرار داده شد و برای نگهداری بیش از یک هفته در ۸۰°C- قرار داده شد تا روند آماده‌سازی صورت پذیرد تا حداقل آسیب بافتی و ساختاری را متحمل گردد. جهت سلول‌زدایی تاندون شترمرغ، ابتدا تاندون از حالت انجماد خارج شده و به قطعات ۵×۱۰×۴۰ میلی‌متر برش داده شد. سپس به مدت ۲۴ ساعت در آب مقطر قرار داده می‌شود و بعد در محلول سدیم دودسیل سولفات (SDS) ۱٪ قرار داده شده و به مدت ۲۴ ساعت در آب مقطر قرار گرفت و پس از آن به مدت ۲۴ ساعت در الکل اتیلیک ۷۰٪ قرار گرفت. در نهایت در محلول PBS استریل در ۴°C (یخچال) نگهداری شد (Tischer et al., 2007).

این قدرت اندک به مرور زمان کاهش می‌یابد و تاندون را مستعد ضایعه می‌کند که این تغییرات در افراد ورزشکار بیشتر دیده می‌شود (Saltzman and Tearse, 1998, Kvist, 1994). شیوع پارگی تاندون آشیل ۱۱ تا ۱۸ درصد کل پارگی‌های تاندونی می‌باشد و شیوع آن در دهه‌های اخیر افزایش یافته است (Chen et al., 2009). پارگی تاندون آشیل پای چپ از پای راست بیش تر است چرا که پای چپ تاندون ضعیفتری دارد، شروع حرکت‌های فشاری می‌تواند به پارگی تاندون آشیل منجر شود (Theven-dran et al., 2013). پارگی تاندون آشیل با یکی از دو روش جراحی یا غیر جراحی درمان می‌شود (Hockings and Nester, 2000). در مورد استفاده از جراحی به منظور درمان آسیب‌های تاندونی اختلاف نظر وجود دارد و روش‌های جراحی کلاسیک در ترمیم آسیب‌های تاندونی شدید دارای محدودیت معنی‌دار بوده است و روش‌های متفاوتی در بازسازی آسیب‌های تاندونی بکار گرفته شده که اکثر این تلاش‌ها با موفقیت همراه نبوده است. بهترین روش درمانی در اصلاح پارگی کامل تاندون، پیوند است (Moshiri and Oryan, 2012). گرافت‌های طبیعی به سه دسته عمده اتوگرافت، آلوگرافت و زونوگرافت تقسیم می‌شوند. هر کدام از گرافت‌ها دارای محدودیت‌هایی می‌باشد (Zhang et al., 2012, Leigh et al., 2012, Shearn et al., 2011). محدودیت اتوگرافت شامل در دسترس نبودن بافت به همان میزان، شکل و اختلاف ویژگی فیزیولوژی با بافت طبیعی در محل پیوند می‌باشد (Shearn et al., 2011). آلوگرافت نیز به دلیل احتمال انتقال بیماری‌های مشترک، رد پیوند، ناکارآمدی و آسیب مجدد ناشی از کاهش فعالیت مکانیکی آن و ملاحظات اخلاقی دارای محدودیت‌هایی می‌باشد (Zhang et al., 2012, Leigh et al., 2012, Veillette et al., 1998). زونوگرافت نیز دارای محدودیت‌های آلوگرافت می‌باشد با این تفاوت که احتمال رد پیوند شدیدتر و ارزش استفاده از این نوع پیوند در جراحی اصلاحی به دلیل تحقیقات ناکافی و وجود سوالات متعدد از اهمیت بالایی برخوردار می‌باشد (Leigh et al., 2012, Bigham et al., 2010, Badylak, 2004, Wisbeck et al., 2012). چنانچه از پیوندهای آلوگرافت و زونوگرافت استفاده گردد علاوه بر استفاده از داروهای تضعیف کننده دستگاه ایمنی، فرآوری و تغییرات بافتی در حذف عامل تحریک ایمنی موثر می‌باشد (Longo et al., 2011a). باید اشاره داشت که امروزه به منظور کاهش واکنش ایمنی بدن نسبت به بافت پیوند زده شده، از روش‌های مهندسی بافت استفاده می‌شود که یکی از آنها روش سلول-زدایی نمودن بافت است. در این روش داربست زیستی به عنوان حاملی برای عوامل رشد مختلف عمل می‌نماید و توانایی بدن را در مسیر ترمیم افزایش می‌دهد. داربست سلول‌زدایی شده شامل رشته‌های کلژن (I و II)، رشته‌های الاستیک، گلیکوز آمینوگلیکان‌ها، پروتئوگلیکان‌ها، گلیکوپروتئین‌ها مثل فیبرونکتین، عوامل رشد، سایتوکین‌ها و پروتئازها می‌باشد (Azhim et al., 2013, Carpenter and Hankenson, 2004, Longo et al., 2011a, Longo et al., 2011b). یکی از راه‌های تهیه بافت‌های سلول‌زدایی شده، استفاده از ساختارهای اندام یا بدن سایر حیوانات پس از معدوم شدن یا ذبح آن‌ها است. شترمرغ از آن دسته پرنده‌گانی است که در ایران به منظور و استفاده خوراکی پرورش می‌یابد. نباید از ذهن دور داشت که شترمرغ حیوان بسیار تخصص یافته در حرکت روی زمین است و تنها بر روی دو انگشت راه می‌رود. این پرنده با وزن متوسط ۱۵۰ کیلوگرم با سرعت بالای ۶۰-۱ kmh

آنالیز آماری داده ها

پس از ارزیابی بافتی و استخراج نتایج، با توجه به رتبه‌ای بودن داده‌ها از آزمون Mann-Whitney و برای مقایسه نتایج بیومکانیکی گروه کنترل و گرفت از آزمون student t-Test توسط برنامه SPSS Ver.19 استفاده شد و از نظر آماری با هم مقایسه شدند و اختلاف میانگین‌ها در سطح ($P \geq 0.05$)



شکل ۱- نحوه قرار گیری گرفت در دستگاه کشش بافتی را هنگام آزمون کشش نشان می‌دهد. پیکان محل شروع پارگی گرفت در اثر کشش بیش از حد تحمل را نمایش می‌دهد.

معنی‌داری در نظر گرفته شد (Tischer et al., 2007).

ملاحظات اخلاقی

با توجه به اینکه نمونه‌های مورد استفاده در این پژوهش از کشتارگاه تهیه شده است نیاز به مجوز از کمیته اخلاقی ناظر بر تحقیقات حیوانات آزمایشگاهی نداشت.

یافته‌ها

در بررسی ساختار بافتی تاندون شترمرغ با رنگ آمیزی هماتوکسیلین-اُوزین این ساختار از جنس بافت همبندی مترکم منظم که ۹۵٪ سلول‌های تاندون از فیبروسیت (تنوسیت) و فیبروبلاست تشکیل شده بود.

ارزیابی خصوصیات زئوگرافت

به منظور ارزیابی ساختار بافتی، سپس ثبوت و طی روند معمول پاساژ بافتی، مقاطع پارافینی تهیه شد و پس از تهیه لام رنگ آمیزی هماتوکسیلین-اُوزین، برای ارزیابی کیفیت کلاژن زئوگرافت پس از فرآیند سلول‌زدایی از رنگ آمیزی پیکروسیروس قرمز استفاده شد (Rich and Whittaker, 2005, Azhim et al., 2013). جهت بررسی میزان سلول‌زدایی گرفت و بقایای هسته و ردیابی DNA از روش رنگ آمیزی 4،6-diamino-2-phenylindole-2HCl (DAPI) استفاده گردید (Ning et al., 2012).

رنگ آمیزی هماتوکسیلین-اُوزین

به منظور ارزیابی ساختار کلی گرفت از رنگ آمیزی هماتوکسیلین و اُوزین (Haematoxylin and Eosin (H&E) استفاده شد (Tischer et al., 2007).

رنگ آمیزی پیکروسیروس قرمز

به منظور ارزیابی کیفیت رشته‌های کلاژنی گرفت از رنگ آمیزی پیکروسیروس قرمز استفاده شد. بدین منظور ابتدا پس از رنگ آمیزی با پیکروسیروس قرمز، لام‌ها توسط میکروسکوپ پلاریزان Olympus-BX51 با طول موج nm540 مورد بررسی قرار گرفت (رشته کلاژن با کیفیت مناسب به رنگ قرمز و رشته‌های با کیفیت کم به رنگ سبز مشاهده خواهد شد) (Azhim et al., 2013, Rich and Whittaker, 2005).

رنگ آمیزی DAPI

ابتدا مقاطع پارافین‌زدایی و آبدهی شد و با محلول McIlvaine's buffer به مدت ۵ دقیقه شستشو داده شد. سپس با دستمال خشک گردیده و به آن رنگ DAPI اضافه شد و توسط فویل آلومینیومی پوشانیده شده و پس از ۱۵ دقیقه توسط میکروسکوپ پلاریزان Olympus-BX51 با طول موج nm ۳۳۰ مورد بررسی قرار گرفت (هسته به رنگ آبی مشاهده خواهد شد) (Ning et al., 2012).

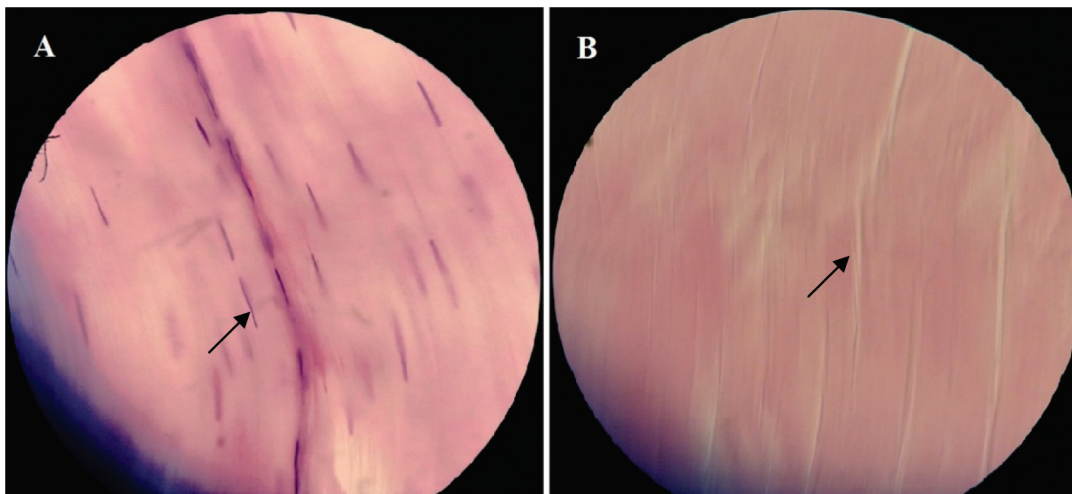
آزمون بیومکانیک

به منظور بررسی و مقایسه استحکام بیومکانیکی گرفت با استحکام بیومکانیکی تاندون دست نخورده این ارزیابی رو ۱۲ قطعه تاندون در دو گروه کنترل و زئوگرافت صورت گرفت. ابتدا تاندون که به قطعات $5 \times 10 \times 4$ میلی‌متر برش داده شده و داخل PBS قرار گرفته بود، و داربست سه بعدی زیستی آماده شده، کشش بافتی با پیش بارگذاری یک نیوتن آغاز و کشش به میزان 1mm/min به طور مداوم افزایش داده شد و تا پاره شدن نمونه ادامه پیدا کرد (شکل ۱)، (Tischer et al., 2007). این آزمون توسط دستگاه Santam مدل STM-۱۵۰ در دانشکده مکانیک دانشگاه علم و صنعت انجام شد و اطلاعات آن توسط کامپیوتر ثبت گردید. میزان حداکثر تنش (Stress) و کرنش (Strain) محاسبه و با هم مقایسه شد. میزان تنش برابر است با واحد نیرو تقسیم بر واحد سطح که نیوتن بر میلی‌متر مربع یا مگاپاسکال (MPa) بیان می‌شود. میزان کرنش برابر است با میزان کشیدگی یا فشردگی بخش بر طول (کرنش هیچ واحدی نداشته و یک مقدار بدون بعد است. زیرا برابر است با نسبت دو طول با واحد یکسان).

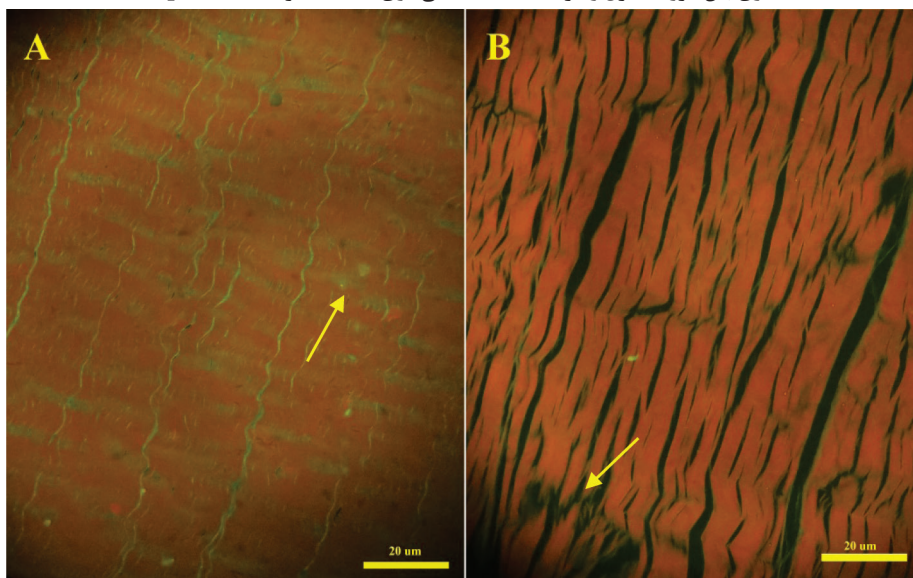
از انسجام و تراکم بافتی تا حدودی کاسته شده و بین رشته‌های کلاژنی در برخی نقاط اندکی فاصله مشاهده گردید که در مقایسه آماری اختلاف میانگین‌ها در سطح $(p \leq 0/05)$ دارای اختلاف معنی‌داری بود $(p= 0/002)$ (شکل ۲، B).

در ارزیابی کیفیت کلاژنی به وسیله رنگ آمیزی پیکروسپیروس قرمز

این بافت همبندی از دستجات فیبرهای متراکم با آرایش منظم تشکیل شده و به صورت موازی با محور طولی تاندون قرار گرفته بود. این دستجات بوسیله غلاف تاندونی احاطه شده بود و غلاف تاندونی داخلی و خارجی نیز از ترکیبات داربست خارج سلولی تشکیل شده بود (شکل ۲، A). در مقایسه گروه کنترل با گرفت آماده شده پس از طی فرآیند سلول زدایی،



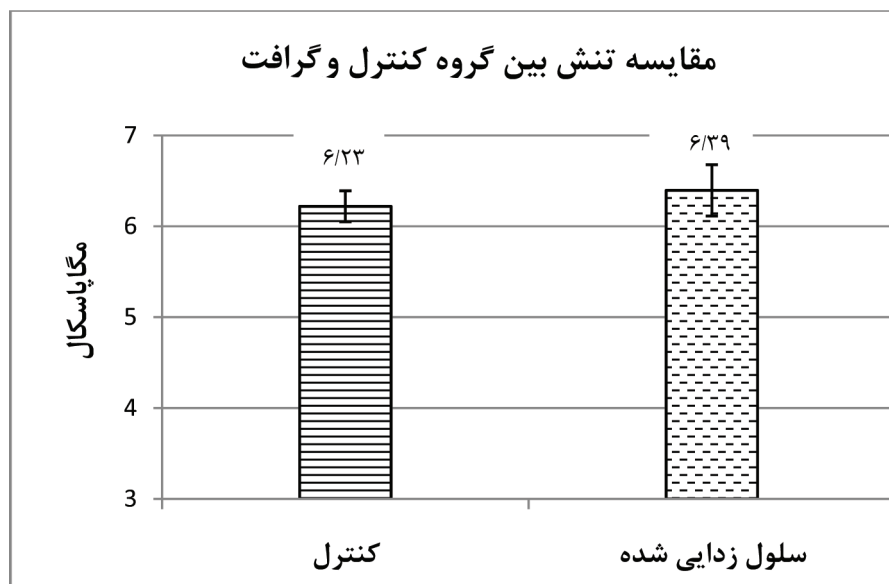
شکل ۲- A) ساختار بافتی تاندون آشیل گروه کنترل در رنگ آمیزی E&H، که به تراکم قرارگیری و نظم رشته‌های کلاژن اشاره دارد. پیکان نشان دهنده تنوسیت است (B). ساختار بافتی داربست سه بعدی زیستی (گرافت) در رنگ E&H، که نشان دهنده کاهش تراکم رشته‌ای و ایجاد فاصله و تخلخل در بین رشته‌های کلاژنی اشاره دارد. پیکان نشان دهنده فاصله ایجاد شده است که در مقایسه آماری بین گروه کنترل و گرفت اختلاف معنی‌داری مشاهده گردید $(p= 0/002)$ (400X).



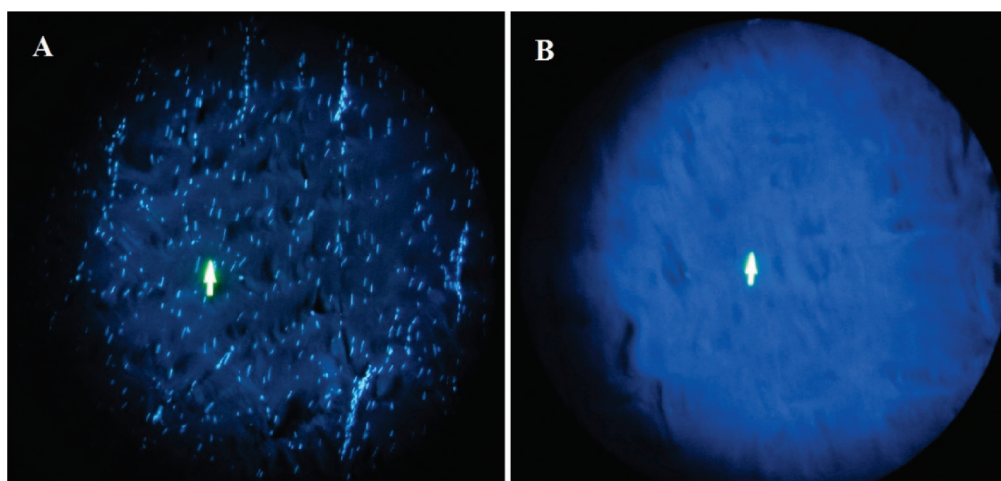
شکل ۳- A) کیفیت ساختار بافتی شترمرغ را در رنگ آمیزی پیکروسپیروس قرمز را نشان می‌دهد، کلاژن با کیفیت مناسب به رنگ قرمز و کلاژن با کیفیت کمتر به رنگ سبز مشخص می‌شود، پیکان به کلاژن با کیفیت کم در گروه کنترل اشاره دارد (400X). B) کیفیت ساختار بافتی داربست سه بعدی زیستی (گرافت) را در رنگ آمیزی پیکروسپیروس قرمز را نشان می‌دهد، کلاژن با کیفیت مناسب به رنگ قرمز و کلاژن با کیفیت کمتر به رنگ سبز مشخص می‌شود، پیکان به کلاژن با کیفیت کم (سبز رنگ) اشاره دارد در مقایسه آماری بین گروه کنترل و گرفت اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید $(p= 0/575)$ (400X).

معنی‌داری نشان نداد ($p = 0/575$) (شکل B،۳).
در ارزیابی میزان سلول‌زدایی که جهت کاهش احتمال پس زدن بافت پیوندی گرافت انجام شده است؛ پس از رنگ آمیزی DAPI، هسته به رنگ آبی مشخص خواهد شد. ابتدا تاندون طبیعی به عنوان کنترل مثبت رنگ آمیزی شد که هسته‌های تنوسیت به خوبی رنگ آمیزی شد (شکل A،۴).

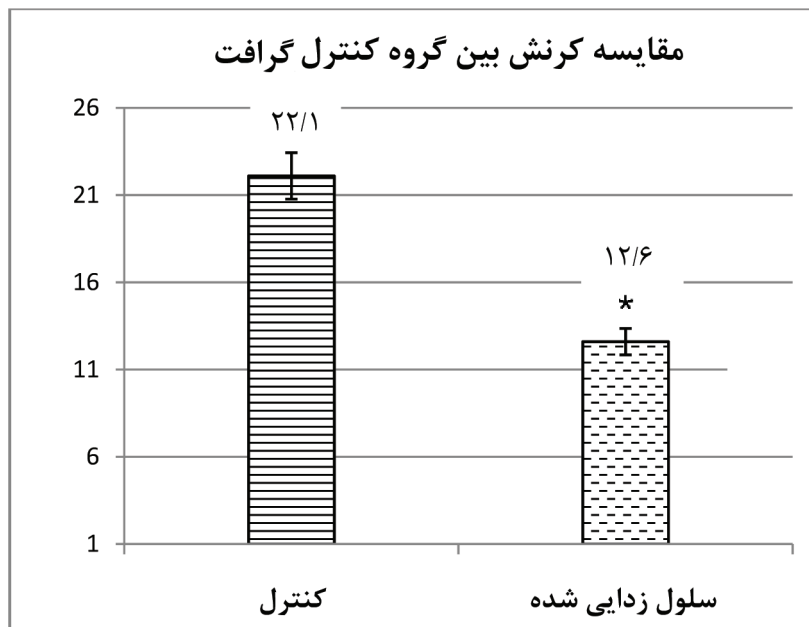
با توجه به اینکه عمدتاً داربست تاندونی از کلاژن نوع I تشکیل شده است بیش از ۹۵٪ ساختار طبیعی با نور پلاریزان به رنگ قرمز مشاهده گردید و فقط مقدار کمی در حدود ۵٪ سبز رنگ مشاهده شد (شکل A،۳). پس از رنگ آمیزی گرافت توسط پیکروسیروس قرمز در مقایسه آماری با گروه کنترل، گرافت اختلاف میانگین‌ها در سطح ($p \leq 0/05$) اختلاف



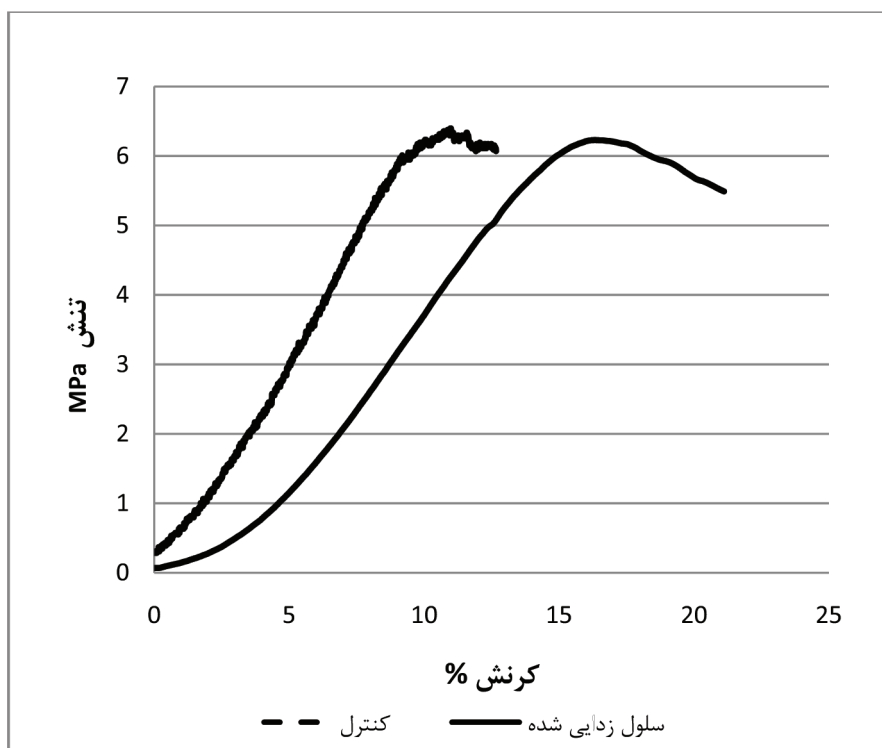
نمودار ۱- مقایسه تنش بین گروه کنترل و زئوگرافت در زئوگرافت $6/93 \pm 0/71$ نیوتن بدست آمد که نسبت به گروه کنترل $6/32 \pm 0/82$ نیوتن کمی افزایش مشاهده شد اما اختلاف میانگین‌ها ($Mean \pm SEM$) در سطح ($p \leq 0/05$) اختلاف معنی‌داری نشان نداد ($p = 0/546$).



شکل ۴- A) ساختار بافتی تاندون گروه کنترل را در رنگ آمیزی IPAD نشان می‌دهد که جهت ردیابی AND صورت گرفته است، نقاط آبی رنگ نشان دهنده هسته‌های کشیده به صورت موازی طولی قرار دارند. نوک پیکان به هسته تنوسیت در گروه کنترل اشاره دارد (B، 250X). ساختار بافتی داربست سه بعدی زیستی (گرافت) را در رنگ آمیزی IPAD نشان می‌دهد که جهت ردیابی AND صورت گرفته است، همان طور که مشاهده می‌شود هیچ نقطه آبی رنگی که نشان دهنده بقایای هسته‌ای باشد مشاهده نمی‌شود. نوک پیکان به سطح داربست اشاره دارد (250X).



نمودار ۲- میزان کرنش در گروه کنترل (22/1±1/3) و در مقایسه با گرافت (12/6±0/7)، که اختلاف میانگین‌ها در سطح (p ≤ 0/05) کاهش معنی‌داری در کرنش گرافت نسبت به گروه کنترل نشان داد (Mean±SEM) که به وسیله (*) نشان داده شده است. (p= 0/04)



نمودار ۳- مقایسه نسبت تنش به کرنش در گروه کنترل و گرافت

کنترل ندارد و حتی به صورت معنی‌داری موجب افزایش تحمل در مقابل کرنش نسبت به تاندون گروه کنترل گردیده است (Tischer, Vogt et al., 2007). گایدون و همکاران در سال ۲۰۰۰ با بررسی جایگزینی فیبرهای پلیمر با لیگامنت صلیبی، به این نتیجه رسیدند که توانایی رشد سلول میزبان در هنگام استفاده از داربست‌های زیستی افزایش می‌یابد (Gui-doin, Marois et al. 2000). رکورد و همکاران در سال ۲۰۰۱ به بررسی استفاده از زیر مخاط روده به عنوان گرافت جهت ترمیم مثانه پرداختند و عنوان کردند که استفاده از ماتریکس خارج سلولی جهت ترمیم ضایعات تاندون از بهترین گزینه‌ها در درمان ضایعات تاندونی می‌باشد (Record, Hillegonds et al. 2001). ولنتین و همکاران در سال ۲۰۰۶ و بادپلاک و همکاران در سال ۲۰۱۰ در مطالعه بافت‌شناسی مقایسه‌ای روی کاربرد ماتریکس خارج سلولی در ارتوپدی نشان دادند که مزیت استفاده از پیوند داربست خارج سلولی در کاهش نیروهای وارده به تاندون، بعد از جراحی و کمک به ترمیم بهتر آن با نفوذ سلول‌های میزبان به داربست انجام می‌شود (Valentin, Badylak et al. 2006, Badylak and Valentin 2010). زانگو همکاران در سال ۲۰۰۵ در مطالعه‌ای با استفاده از یک گرافت تجاری تهیه شده از زیر مخاط روده باریک خوک، التهاب وسیع همراه با نفوذ لنفوسیت‌ها در محل پیوند مشاهده کردند. آن‌ها نشان دادند که این بافت پیوندی از ماتریکس کلاژنی بدون سلول تهیه نشده و حاوی DNA می‌باشد. همچنین نشان دادند که معروف‌ترین داربست‌های کلاژنی که دارای سلول هستند و به منظور ترمیم تاندون بر روی بیماران تجربی و کلینیکی استفاده شده‌اند، اثراتی همراه با نقص تاندونی به جا می‌گذارند. واکنش‌های التهابی در پی سلول‌زدایی کردن این اثرات نامطلوب را به حداقل می‌رساند (Zheng, Chen et al. 2005). وایتلاک و همکاران نیز در سال ۲۰۰۷ به منظور ارزیابی میزان نفوذ سلول و پاسخ التهابی کوتاه مدت حاصل از آن، داربست کلاژن تاندون خم‌کننده عمیق انگشتی را از پای جوجه نژاد لگهورن جدا و آن را آسولولار و اکسیده کردند. نتیجه حاصل از آسولولار بافت مذکور در این مطالعه نشان‌دهنده کاهش پتانسیل ایجاد التهاب و انتقال بیماری بود (Whitlock, Smith et al. 2007). در مطالعه چن و همکاران در سال ۲۰۰۹، نگرانی اصلی در مورد استفاده از هر دو نوع داربست‌های سنتتیک و زیستی، پاسخ ایمنی و التهابی ناشی از رد بافت به عنوان جسم خارجی است (Chen, Xu et al. 2009). به همین سبب در این پژوهش از روش مهندسی بافت جهت سلول‌زدایی بافت همبندی جهت ساخت گرافت استفاده شد. استحکام بافتی یکی از خصوصیات است که باید در حفظ و تقویت آن کوشش کرد. رشته‌های کلاژنی مقاومت زیادی در برابر کشش دارند و نسبت به کرنش مقاومت زیادی نشان می‌دهد. نتایج بدست آمده نشان‌دهنده کاهش معنی‌دار نسبت تنش به کرنش گردید. عواملی که باعث تقویت مقاومت بیومکانیکی می‌گردند مربوط به گلیکوزآمینوگلیکان‌ها (GAGs) و الگوی قرارگیری کلاژن نوع I و کلاژن نوع III موجود در داربست می‌باشد. مهمترین عواملی که در ساخت داربست‌های مصنوعی باید مد نظر قرار گیرد تخلخل، استحکام و تخریب‌پذیری در این داربست‌ها است (Shea, McCarthy et al. 2010). پس از فرآیند سلول‌زدایی داربست گرافت نسبت به گروه کنترل رشته‌ها از هم فاصله گرفته و باعث کاهش تراکم بین رشته‌ای شد. این فاصله و تخلخل موجب افزایش تبادل مواد مغذی و مواد زائد پس از پیوند می‌گردد. تخریب‌پذیری برای خودی شدن

در گرافت پس از رنگ آمیزی مشخص شد بیش از ۹۹٪ این داربست سه بعدی فاقد هسته و بقایای DNA است (شکل ۴B).

در ارزیابی بیومکانیکی کشش بافتی با پیش بارگذاری یک نیوتن آغاز و کشش به میزان ۱ mm/min به طور مداوم افزایش داده شد و تا پاره شدن نمونه ادامه پیدا کرد و حداکثر توان مقامت در برابر تنش Ultimate tensile strength (UTS) محاسبه شد. میزان تنش و کرنش بافتی در گرافت تهیه شده با گروه کنترل مقایسه گردید. میزان UTS در گرافت $6/39 \pm 0/17$ نیوتن بدست آمد که نسبت به گروه کنترل $6/23 \pm 0/28$ نیوتن کمی افزایش مشاهده شد اما اختلاف میانگین‌ها (Mean±SEM) در سطح $(p \leq 0/05)$ اختلاف معنی‌داری نشان نداد ($p=0/645$)، (نمودار ۱). میزان کرنش در گروه کنترل $(0/221 \pm 0/013)$ و در مقایسه با گرافت $(0/126 \pm 0/007)$ اختلاف میانگین‌ها (Mean±SEM) در سطح $(p \leq 0/05)$ کاهش معنی‌داری در کرنش گرافت نسبت به گروه کنترل نشان داد ($p=0/004$).

بحث

برخلاف روش‌های سنتی درمان ضایعات تاندون همچون استفاده از وسایل ارتوپدی پلیمریک و فلزی، امروزه روش‌های مهندسی بافت موجب بهبود روند التیام آسیب‌های تاندونی به وسیله استفاده از داربست‌های زیستی، سلول‌درمانی و فاکتورهای رشد شده است. گرافت به عنوان داربست زیستی جهت ترمیم بافت تاندون مورد استفاده قرار گرفته است، به طوری که عملکرد مکانیکی تاندون به شکل اولیه در بیمار بروز کند. استفاده از سلول‌درمانی نیز روش دیگری در درمان آسیب‌های تاندونی است، با توجه به برخی گزارش‌ها مبنی بر احتمال ایجاد بافت‌های استخوانی نابجا و حتی تومور به دنبال استفاده از سلول‌های بنیادی در شرایط *in vivo*، پیشنهاد شده از سلول مزانشیمی تمایز یافته در شرایط *in vitro* استفاده شود (Awad et al., 2003, Lui et al., 2011). بافت‌های سلول‌زدایی شده مزایای بیشتری نسبت به بافت‌های اتولوگ و گرافت‌های مصنوعی دارند. مهمترین خصوصیات این نوع گرافت‌ها کاهش ایمونوژنیسیته و آنتی‌ژنیسیته این نوع ساختارها می‌باشد که این امر با از بین بردن هسته سلول‌ها که عامل اصلی آنتی‌ژنیک هستند میسر می‌شود (Adams, Zobitz et al. 2006). از طرفی این داربست‌ها پس از فرآیند سلول‌زدایی، علاوه بر حفظ ماکرومولکول‌ها و داربست کلاژنی، بستر مناسبی برای اتصال و رشد سلول‌ها برای سرعت بخشی به ترمیم آسیب‌ها می‌باشند (Tischer, Vogt et al. 2007). چند خصوصیت در این گرافت‌ها حائز اهمیت است؛ کیفیت داربست کلاژنی؛ با توجه به استفاده از مواد و روش‌های متفاوت در بکارگیری از دیترجنت‌هایی مانند SDS و Triton X-100 و آنزیم‌هایی مانند DNase و تریپسین و یا روش‌های فیزیکی ممکن است طی فرآیند سلول‌زدایی به این داربست آسیب رسانیده و باعث کاهش کیفیت و نازک شدن رشته کلاژنی گردد، رشته‌های آسیب دیده و نازک به رنگ سبز دیده خواهند شد (Rich and Whittaker 2005). با توجه به نتایج کسب شده (رنگ آمیزی پیکروسپیروس قرمز) کیفیت کلاژنی در داربست پس از فرآیند سلول‌زدایی حفظ شده و مطابق با نتایج محققین دیگر بود (Ruzzini, Longo et al. 2013). کلاژن و کیفیت کلاژنی داربست در مقاومت بیومکانیکی آن موثر است. نتایج بیومکانیک مشخص کرد این فرآیند در تحمل تنش و لود مکانیکی تفاوت معنی‌داری با تاندون گروه

سال ۲۰۱۲ یافتند سلول‌های مزانشیمی کاشته شده روی ورقه‌هایی از تاندون آشیل گاوی تغییرات مورفومتریک داشته و کشیدگی در هسته‌ها مشاهده کردند. این خصوصیات ظاهری از ویژگی‌های سلول‌های فیبرو بلاستی، فیبروسیتی و تنوسیت‌ها که موافق با یافته‌های پژوهش اخیر می‌باشد (Tong, Shen et al. 2012).

پاورقی‌ها

- 1- Biocompatibility
- 2- Biofunctionality
- 3- Rotator cuff
- 4- Knee Extensor
- 5- graft
- 6- Acellular
- 7- phosphate buffered saline
- 8- Sodium Dodecyl Sulfate
- 9- Endotenonium
- 10 - Epitenonium
- 11- Niche

نتیجه گیری

در این پژوهش با بررسی و ارزیابی خصوصیات بیومکانیکی و ساختار بافتی داربست سه بعدی ساخته شده و مقایسه با تاندون طبیعی گروه کنترل، مشخص گردید این داربست سه بعدی می‌تواند به عنوان گرافت در پژوهش‌های آتی برای پیوند با روش مهندسی بافت پیشنهاد شود.

تشکر و قدردانی

این مقاله مستخرج از رساله دکتری بافت‌شناسی مقایسه‌ای می‌باشد که با حمایت بخش بافت‌شناسی و معاونت پژوهشی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه صورت پذیرفته است، نویسندگان این مقاله به دلیل حمایت‌های مالی و معنوی از این طرح مراتب تشکر و قدردانی خود را اعلام می‌دارند.

منابع مورد استفاده

1. Adams, J. E., M. E. Zobitz, J. S. Reach Jr, K.-N. An and S. P. Steinmann (2006). "Rotator cuff repair using an acellular dermal matrix graft: an in vivo study in a canine model." *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery*, 22(7): 700-709.
2. Alam, M., W. Gordon, S. Heo, K. Lee, N. Kim, M. Kim and H. Lee (2013). "Augmentation of ruptured tendon using fresh frozen Achilles tendon allograft in two dogs: a case report." *Veterinarni Medicina*, 58(1): 50-55.
3. Azhim, A., T. Ono, Y. Fukui, Y. Morimoto, K. Furukawa and T. Ushida (2013). Preparation of decellularized meniscal scaffolds using sonication treatment for tissue engineering. Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC), 2013 35th Annual Inter-

(autologous) یا یکسان شدن با بافت‌های بدن بسیار مهم است. با توجه به این که داربست‌های زیستی از کلاژن و مواد زیستی طبیعی می‌باشد احتمال خودی شدن آن نیز افزایش می‌یابد (Adams, Zobitz et al. 2006). Bigham و همکاران در سال ۲۰۱۰ با جایگزینی تاندون شترمرغ سلول زدایی نشده به عنوان زونوگرافت استفاده کردند که به دلیل برانگیختگی سیستم ایمنی موجب رد پیوند و در نتیجه عدم کارایی آن گردید (Bigham, Moghaddam et al. 2010). در نتایج رنگ آمیزی DAPI مشخص کرد که سلول‌زدایی در گرافت ۹۹٪ صورت پذیرفته و این امر ممکن است موجب کاهش ایمونوژنیسیته و آنتی‌ژنیسیته گرافت گردد و در نتیجه احتمال گرفتن و قبول پیوند در استفاده از این گرافت بیشتر خواهد شد. سرعت تخریب پذیری داربست باید با میزان نوژنز بافتی در موضع آسیب سازگاری داشته باشد؛ به این معنی که پس از درمان، داربست به بافت خودی تبدیل شده و اثری از آن باقی نماند. این مهم از دیگر عوامل موثر در استفاده‌ی داربست‌ها با منشا زیستی است، که به دلیل نزدیکی ماهیت طبیعی این دست از ساختارها و سازگاری بیشتر در تخریب پذیری موجب گردیده است، استفاده‌ی از آنها نسبت به داربست‌های صنایع بیشتر از پیش ارجحیت داده شود (Hampson, Forsyth et al. 2008). یکی از محدودیت‌های بافت‌های سلول زدایی شده، نداشتن و کاهش سلولی است که می‌توان با کاشت سلول به روند درمان سرعت بخشید (Docheva, Muller et al. 2015). در درمان آسیب‌های تاندونی بجز خودی شدن بافتی، یکی از نکاتی که باید مورد توجه قرار گیرد قابلیت بازبازی فعالیت مکانیکی و تحمل نیروهای وارده به بافت ترمیمی است. بازبازی قابلیت بیومکانیکی بافت ترمیمی در کارایی آن و در نتیجه توانایی از سرگیری فعالیت‌های طبیعی در فرد آسیب را محیا می‌نماید، یکی از روش‌هایی که محققین جهت بهبود کارایی بیومکانیکی پیشنهاد می‌کنند استفاده از داربست‌های زیستی و کاشت سلول یا سلول درمانی است (Shapiro, Grande et al. 2015). سلول‌های مزانشیمی قدرت تکوینی بسیار زیادی دارند و سلول‌های مزانشیمی بالغ موجود در مغز استخوان قادرند به بافت‌های دیگر از جمله تاندون، عضله و استخوان و غضروف تمایز پیدا کنند، گرافت‌های زیستی دارای کنام یا ریز محیط و مواد موثر در چسبندگی سلولی هستند، از جمله این موارد می‌توان به وجود پروتئین‌های اتصالاتی مانند اینتگرین و پروتئوگلیکان‌هایی مانند فیرونکتین و تناسین اشاره کرد. این عوامل موجب چسبندگی بهتر سلول‌های مزانشیمی کاشته شده در گرافت را مهیا می‌کند (Hampson, Forsyth et al. 2008). چن و همکاران در سال ۲۰۰۹ در مطالعه‌ای به بررسی داربست‌های قابل استفاده در ترمیم تاندون پرداختند. آنها دریافتند، تداخل بین سطح داربست و سلول میزبان دلیلی برای استفاده از داربست‌ها بوده است. همچنین افزودن که تداخل پروتئین‌های بین غشایی و پروتئین‌های سطح داربست، بعد تجمع گیرنده‌ها و بعد چسبندگی موضعی بین اکتین سائتواسکلتون سطح سلول، در فاز اول رشد سلولی مشاهده می‌شود. چن و همکاران نیز با تایید تحقیق هاتمکر، اضافه کردند که سطح داربست‌های زیستی با کلاژن نوع یک طبیعی پوشانده شده که به دلیل نزدیکی ترکیبات آن با سلول میزبان موجب بهبود روند اتصال، تکثیر و مهاجرت سلولی می‌شود، (شکل ۴-۷)، (Chen, Xu et al. 2009). فنوتیپ و مورفولوژی سلول تا حدود بسیار زیادی به جنس داربست خارج سلول (ECM) بستگی دارد. تانگ و همکاران در

- national Conference of the IEEE.
4. Badylak, S. F. (2004). "Xenogeneic extracellular matrix as a scaffold for tissue reconstruction." *Transplant Immunology*, 12 (3-4): 367-377.
 5. Badylak, S. F. and J. E. Valentin (2010). "Extracellular Matrix Bioscaffolds for Orthopaedic Applications." *The Journal of Bone & Joint Surgery*, 92(5): 1317-1318.
 6. Bigham, A., A. Z. Moghaddam, H. Nourani, M. C. Bashi and A. Raeisi (2010). "Ostrich tendon (new xenogenic) transplantation in rabbit model." *Comparative Clinical Pathology*, 19(2): 185-188.
 7. Carpenter, J. E. and K. D. Hankenson (2004). "Animal models of tendon and ligament injuries for tissue engineering applications." *Biomaterials*, 25(9): 1715-1722.
 8. Chen, J., J. Xu, A. Wang and M. Zheng (2009). "Scaffolds for tendon and ligament repair: review of the efficacy of commercial products."
 9. Chen, T. M., W. M. Rozen, W. r. Pan, M. W. Ashton, M. D. Richardson and G. I. Taylor (2009). "The arterial anatomy of the Achilles tendon: anatomical study and clinical implications." *Clinical Anatomy*, 22(3): 377-385.
 10. Docheva, D., S. A. Muller, M. Majewski and C. H. Evans (2015). "Biologics for tendon repair." *Adv Drug Deliv Rev*. 84: 222-239.
 11. Guidoin, M.-F., Y. Marois, J. Bejui, N. Poddevin, M. W. King and R. Guidoin (2000). "Analysis of retrieved polymer fiber based replacements for the ACL." *Biomaterials*, 21(23): 2461-2474.
 12. Hampson, K., N. Forsyth, A. El Haj and N. Maffulli (2008). "Tendon tissue engineering." *Topics in tissue engineering* 4.
 13. Hockings, M. and C. Nester (2000). "Use of dorsal ankle orthoses in the management of Achilles tendon rupture." *The Foot*, 10(1): 51-54.
 14. Kvist, M. (1994). "Achilles tendon injuries in athletes." *Sports Medicine*, 18(3): 173-201.
 15. Leigh, D. R., M. Mesiha, A. R. Baker, E. Walker and K. A. Derwin (2012). "Host response to xenograft ECM implantation is not different between the shoulder and body wall sites in the rat model." *Journal of Orthopaedic Research*, 30(11): 1725-1731.
 16. Longo, U. G., A. Lamberti, N. Maffulli and V. Denaro (2010). "Tendon augmentation grafts: a systematic review." *British medical bulletin*, 94(1): 165-188.
 17. Longo, U. G., A. Lamberti, N. Maffulli and V. Denaro (2011). "Tissue engineered biological augmentation for tendon healing: a systematic review." *British Medical Bulletin*, 98(1): 31-59.
 18. Longo, U. G., A. Lamberti, S. Petrillo, N. Maffulli and V. Denaro (2011). "Scaffolds in tendon tissue engineering." *Stem cells international*, 2012.
 19. Moshiri, A. and A. Oryan (2012). "Role of tissue engineering in tendon reconstructive surgery and regenerative medicine: current concepts, approaches and concerns." *Hard Tissue*, 1(2): 11.
 20. Ning, L. J., Y. Zhang, X. H. Chen, J. C. Luo, X. Q. Li, Z. M. Yang and T. W. Qin (2012). "Preparation and characterization of decellularized tendon slices for tendon tissue engineering." *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 100(6): 1448-1456.
 21. Pridgen, B. C., C. Y. Woon, M. Kim, J. Thorfinn, D. Lindsey, H. Pham and J. Chang (2011). "Flexor tendon tissue engineering: acellularization of human flexor tendons with preservation of biomechanical properties and biocompatibility." *Tissue Engineering Part C: Methods* 17(8): 819-828.
 22. Record, R. D., D. Hillemonds, C. Simmons, R. Tullius, F. A. Rickey, D. Elmore and S. F. Badylak (2001). "In vivo degradation of 14 C-labeled small intestinal submucosa (SIS) when used for urinary bladder repair." *Biomaterials*, 22(19): 2653-2659.
 23. Rich, L. and P. Whittaker (2005). "Collagen and picrosirius red staining: a polarized light assessment of fibrillar hue and spatial distribution." *Braz J Morphol Sci*. 22(2): 97-104.
 24. Rubenson, J., D. G. Lloyd, T. F. Besier, D. B. Heliams and P. A. Fournier (2007). "Running in ostriches (*Struthio camelus*): three-dimensional joint axes alignment and joint kinematics." *J Exp Biol*. 210(Pt 14): 2548-2562.
 25. Ruzzini, L., U. G. Longo, S. Campi, N. Maffulli, A. O. Muda and V. Denaro (2013). "Adhesion and collagen production of human tenocytes seeded on degradable poly (urethane urea)." *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*, 21(8): 1834-1840.
 26. Saltzman, C. L. and D. S. Tearse (1998). "Achilles tendon injuries." *Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*, 6(5): 316-325.
 27. Santucci, R. A. and T. D. Barber (2005). "Resorbable extracellular matrix grafts in urologic reconstruction." *International braz j urol*. 31(3): 192-203.
 28. Schaller, N. U., K. D'Aout, R. Villa, B. Herkner and P. Aerts (2011). "Toe function and dynamic pressure distribution in ostrich locomotion." *J Exp Biol*. 214(Pt 7): 1123-1130.
 29. Schaller, N. U., B. Herkner, R. Villa and P. Aerts (2009). "The intertarsal joint of the ostrich (*Struthio camelus*): Anatomical examination and function of passive structures in locomotion." *J Anat*. 214(6): 830-847.
 30. Shapiro, E., D. Grande and M. Drakos (2015). "Biologics in Achilles tendon healing and repair: a review." *Curr Rev Musculoskelet Med*. 8(1): 9-17.
 31. Shea, K. P., M. B. McCarthy, F. Ledgard, C. Arciero, D. Chow-

