

تهیه داربست سلول‌زدایی شده عصب سیاتیک و ارزیابی ویژگی‌های بافت‌شناسی و خواص مکانیکی آن جهت کاربرد در ترمیم اعصاب محیطی

چکیده

دریافت: ۱۳۹۷/۱۱/۲۳ ویرایش: ۱۳۹۷/۱۲/۰۱ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۲/۲۳ آنلاین: ۱۳۹۸/۰۲/۳۱

زمینه و هدف: مهندسی بافت یک موضوع چندرشته‌ای و بین‌رشته‌ای است که شامل توسعه ایمپلنت‌های زیستی برای بازسازی بافت با هدف بهبود یا افزایش عملکرد بافت یا اندام می‌باشد. هدف از پژوهش حاضر ارزیابی ویژگی‌های مکانیکی و هیستولوژیکی داربست‌های سلول‌زدایی شده عصبی تهیه شده در مقایسه با عصب تازه جهت کاربرد در ترمیم اعصاب محیطی بود.

روش بررسی: این مطالعه از نوع تجربی می‌باشد که در آزمایشگاه تحقیقاتی ترمیم اعصاب دانشگاه فردوسی مشهد از اردیبهشت ۱۳۹۶ تا مهر ۱۳۹۷ انجام شد. به‌منظور تهیه داربست، موش‌های صحرایی با تزریق داخل صفاقی کلرال هیدرات ۱۰٪ بیهوش شدند. قطعات عصب سیاتیک موش‌های صحرایی در بالاتر از محل سه شاخه شدن عصب برداشته شد و پس از پاکسازی بافت‌های زائد به روش ساندر سلول‌زدایی شدند. سپس داربست‌های سلول‌زدایی شده از نظر بافتی و مکانیکی مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: بررسی نتایج حاصل از ارزیابی‌های بافتی نشان داد که سلول‌زدایی داربست‌ها به‌طور کامل انجام شده است. این نتایج توسط رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-انوزین و دپی اثبات شد. ارزیابی‌های تخصصی بافتی با رنگ‌آمیزی میکروفوشین و بررسی میکروسکوپ الکترونی نشان داد که رشته‌های کلاژن و الاستین در ماتریکس خارج سلولی به‌طور نسبی حفظ شده‌اند. همچنین بررسی مکانیکی داربست‌ها در تست کششی نشان‌دهنده حفظ نسبی ماتریکس خارج سلولی داربست‌ها در مقایسه با گروه کنترل بود.

نتیجه‌گیری: در مجموع نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که داربست‌های حاصل از سلول‌زدایی با حفظ ترکیبات اصلی بافت مورد نظر می‌توانند بستر مناسبی برای بررسی رفتارهای سلولی باشند.

کلمات کلیدی: ماتریکس خارج سلولی، اعصاب محیطی، ترمیم، عصب سیاتیک، مهندسی بافت، داربست سلولی.

آرش عبدالملکی^{۱*}، محمد باقر
غیور^۲، صابر زهری^۴، اسداله اسدی^۴
مرتضی بهنام رسولی^۳

۱- گروه علوم مهندسی، دانشکده فناوری‌های نوین، دانشگاه محقق اردبیلی، نمین، اردبیل، ایران.

۲- مرکز پژوهشی علوم زیستی و زیست فناوری، دانشگاه فناوری‌های نوین سیلان، نمین، اردبیل، ایران.

۳- گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

۴- گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران.

* نویسنده مسئول: اردبیل، نمین، خیابان دانشگاه، دانشگاه محقق اردبیلی، دانشکده فناوری‌های نوین، گروه علوم مهندسی.

تلفن: ۰۴۵۳- ۲۳۳۳۶۲۲

E-mail:
Abdolmalekjarash1364@gmail.com

مقدمه

تانسیون ناشی از کشش اتصال مستقیم امکان‌پذیر نیست.^۱ در این موارد روش درمانی مورد استفاده در کلینیک که به استاندارد طلایی معروف است پیوند اتوگرافت‌های عصبی جهت پرکردن فاصله میان دو سر پروگزیمال و دیستال عصب قطع شده است.^۱ با این حال به‌کارگیری اتوگرافت‌های عصبی نیز دارای محدودیت‌هایی همچون نیاز به جراحی ثانویه، از دست رفتن عملکرد حسی اندام دهنده پیوند

در جراحات منجر به قطع اعصاب محیطی، در صورتی که فاصله ایجاد شده میان دو سر عصب کمتر از ۱ تا ۲ cm (در انسان) باشد می‌توان با بخیه زدن انتها به انتها به انتهای دو سر عصب تا حدودی زمینه ترمیم عصب را فراهم آورد. ولیکن در فواصل طولانی‌تر به‌دلیل ایجاد

برتری هستند.^۴ غشاء پایه سلول‌های شوان و غلاف اندونوریوم از اجزای ماتریکس خارج سلولی اعصاب محیطی محسوب می‌گردند که افزون بر ایجاد بستر فیزیکی برای سلول‌ها، از طریق تولید پیام‌های بیولوژیکی و تاثیر بر بیان ژن‌ها نقش مهمی در چسبندگی، تکثیر، مهاجرت و تمایز سلول‌ها بر عهده دارند.^{۱۳،۱۲}

بنابراین داربست‌های سلول‌زدایی شده که ترکیبات آنتی‌ژنیک آن‌ها حذف شده‌اند، گزینه‌های مناسبی جهت جایگزینی بافت‌های از دست رفته از جمله اعصاب آسیب دیده هستند و می‌توانند در آینده جایگزین اتوگرافت‌ها شوند.^{۱۴،۳} هدف از پژوهش حاضر ارزیابی ویژگی‌های مکانیکی و هیستولوژیکی داربست‌های سلول‌زدایی شده عصبی تهیه شده در مقایسه با عصب تازه جهت کاربرد در ترمیم اعصاب محیطی بود.

روش بررسی

این مطالعه از نوع تجربی می‌باشد که در آزمایشگاه تحقیقاتی ترمیم اعصاب دانشگاه فردوسی مشهد از اردیبهشت ۱۳۹۶ تا مهر ۱۳۹۷ انجام شد. آماده‌سازی داربست‌های عصبی سلول‌زدایی شده به منظور تهیه داربست‌های فاقد سلول، قطعاتی به طول ۲۰ mm از عصب سیاتیک موش‌های صحرایی در بالاتر از محل سه شاخه شدن عصب برداشته شد و پس از پاکسازی بافت‌های زائد به روش ساندرل سلول‌زدایی شدند.^۲ به‌طور خلاصه در این روش ابتدا قطعات عصب سیاتیک به مدت ۷ ساعت در آب مقطر دیونیزه غوطه‌ور می‌شوند. سپس به مدت ۱۲ ساعت به محلول تریتون X-100 منتقل شده و به دنبال آن به مدت ۲۴ ساعت به محلول سدیم دزوکسی کولات انتقال یافت. پس از شستشوی نهایی با آب مقطر، قطعات عصب سلول زدایی شده در بافر فسفات (PBS) ۱۰ میلی‌مولار حاوی پنی‌سیلین/ جنتامایسین با $\text{PH}=7/2$ و دمای 4°C ذخیره گردید.

ارزیابی‌های بافتی داربست‌های عصبی سلول‌زدایی شده: پس از فیکس کردن، آب‌گیری و قالب‌گیری با پارافین توسط میکروتوم برش‌هایی با قطر ۵ میکرون تهیه شد. برای رنگ‌آمیزی مقاطع بافتی، ابتدا مقاطع با محلول زایلن، پارافین‌زدایی شدند و سپس توسط اتانول با درجات نزولی آبدهی شدند، در ادامه رنگ‌آمیزی با همتاکسیلین و انوزین برای بررسی مقاطع عصب و داربست صورت گرفت.^{۱۵}

و احتمال شکل‌گیری نوروما و تولید درد می‌باشد. به‌همین دلیل پژوهشگران حوزه ترمیم اعصاب و مهندسی بافت به دنبال روش‌های جایگزینی هستند که ضمن کارایی درمانی بالا محدودیت‌های یادشده را نداشته باشند.^۲

Sondell و همکارانش توانستند با استفاده از دترجنت‌های تریتون X-100 و سدیم داکسی‌کولات به همراه یک سری محلول‌های شستشو داربست‌های عصبی فاقد سلولی تهیه کنند که در عین فقدان خواص ایمنونوزنیسته، به‌طور چشمگیری از رشد آکسون‌ها و مهاجرت سلول‌های شوان نیز جهت ترمیم ضایعات عصبی پشتیبانی می‌کرد.^۲ همچنین در پژوهش دیگری Hudson و همکارانش نیز با استفاده از دترجنت‌های زوتریونی سولفونائین به همراه دترجنت آنیونی تریتون X-200 داربست عصبی فاقد سلولی ایجاد کردند که ساختارهای ماتریکس خارج سلولی و غشای پایه را به شکل مناسبی حفظ کرده بود.^۳

گرافت‌های عصبی سلول‌زدایی شده در قیاس با داربست‌های سنتزی به دلیل دارا بودن ساختار طبیعی و پروتیین‌های ماتریکس خارج سلولی عصب دارای مزیت هستند.^۴ با این حال کماکان ظرفیت ترمیم‌کنندگی گرافت‌های عصبی سلول‌زدایی شده در قیاس با اتوگرافت‌های عصبی به دلیل فقدان سلول‌های شوان در سطح پایین‌تری قرار دارد.^۵ همانگونه که گفته شد این سلول‌ها نقش کلیدی در پیشبرد روند ترمیم اعصاب محیطی برعهده دارند. به‌همین دلیل برخی پژوهشگران تلاش دارند که با استحصال سلول‌های شوان از خود بیمار و پیوند آن‌ها در داربست‌های عصبی سلول زدایی شده موجبات تقویت روند ترمیم را فراهم آورند.^{۶-۸}

داربست‌های زیستی با شبیه‌سازی ماتریکس خارج سلولی اعصاب محیطی بستر مناسبی را برای رشد آکسون‌های در حال ترمیم فراهم می‌آورند. چنین داربست‌هایی باید ویژگی‌هایی همچون استحکام مکانیکی مناسب، عدم ایجاد پاسخ ایمنی، قابلیت سیگنالینگ، تخلخل و قطر منافذ مناسب به منظور تغذیه سلول‌ها و دفع ضایعات سلولی به خارج داربست و قابلیت رنگ‌زایی داشته باشند.^{۹،۱۰} از این‌رو امروزه توجه بسیاری از پژوهشگران بر استفاده از آلوگرافت‌های عصبی سلول‌زدایی شده متمرکز شده است.^{۱۱} چرا که اعصاب سلول‌زدایی شده به دلیل دارا بودن پروتیین‌های طبیعی ماتریکس خارج سلولی در مقایسه با کاندویت‌های عصبی دارای

یافته‌ها

نتایج حاصل از بررسی بافت‌شناسی داربست‌های سلول‌زدایی شده عصب سیاتیک در سطح میکروسکوپ نوری: سلول‌زدایی مناسب، فرآیندی است که نه تنها منجر به حذف کامل سلول‌ها می‌شود، بلکه با حفظ ماتریکس خارج سلولی بستر مناسبی را برای کشت و بررسی رفتار سلولی فراهم می‌کند. مقایسه بافت‌شناسی داربست سلول‌زدایی شده در مقایسه با عصب دست نخورده با استفاده از رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-اِوزین (H&E) نشان داد که در داربست‌های سلول‌زدایی شده هیچگونه هسته سلولی دیده نمی‌شود اما در مقطع عصب دست نخورده هسته سلول‌ها به رنگ بنفش قابل مشاهده است (شکل ۱) که نشان‌دهنده حذف کامل سلول‌ها در فرآیند سلول‌زدایی می‌باشد.

مقایسه بافت‌شناسی داربست سلول‌زدایی شده در مقایسه با عصب دست نخورده با استفاده از رنگ فلورسنت DAPI: رنگ DAPI یک رنگ فلورسنت آبی خاص اسیدهای نوکلئیک است و به DNA دورشته‌ای در محل شیار کوچک به جفت بازهای آدنین و تیمین متصل می‌گردد. این رنگ نشانگر مناسبی جهت نشان دادن هسته سلول‌ها می‌باشد، که در زیر نور UV هسته‌ها به رنگ آبی فلورسانت دیده می‌شوند. نتایج حاصل از این رنگ‌آمیزی نیز نشان داد که در داربست‌های تهیه شده عصب سیاتیک هیچ سلولی دیده نمی‌شود و سلول‌زدایی به‌طور کامل انجام شده است (شکل ۲).

مقایسه محتوای ماتریکس خارج سلولی از جمله ساختار و تراکم رشته‌های کلاژن با رنگ‌آمیزی‌های پیکروفوشین و پیک ایندیگوکارمین: پیکروفوشین یک رنگ اسیدی است که اجزای اسیدوفیل بافت مانند کلاژن را به رنگ قرمز تا صورتی در می‌آورد. همانطور که در (شکل ۳) مشاهده می‌شود. وجود رنگ صورتی نشان دهنده حفظ کلاژن در هر دو نمونه کنترل و داربست سلول‌زدایی شده می‌باشد. رنگ‌آمیزی پیکروفوشین نشان می‌دهد که در طی سلول‌زدایی رشته‌های کلاژن در ماتریکس خارج سلولی به‌طور نسبی حفظ شده‌اند. در رنگ‌آمیزی پیک ایندیگوکارمین رشته‌های کلاژن به رنگ سبز متمایل به آبی در می‌آیند. نتایج حاصل از این رنگ‌آمیزی نشان می‌دهد که فرآیند سلول‌زدایی به روش یاد شده باعث حذف بخشی از کلاژن بافت شده است (شکل ۴).

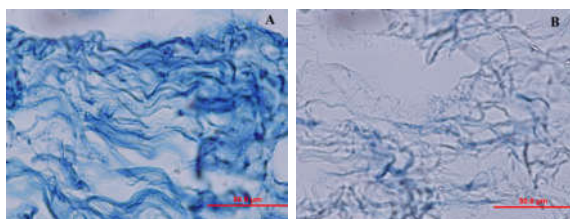
همچنین به‌منظور بررسی کیفیت سلول‌زدایی، داربست‌های سلول‌زدایی شده، با استفاده از رنگ‌آمیزی‌های اختصاصی DAPI، هماتوکسیلین اِوزین و تولوئیدین بلو مورد بررسی‌های بافت‌شناختی قرار گرفتند. در ادامه جهت بررسی محتوای ماتریکس خارج سلولی از جمله ساختار و تراکم رشته‌های کلاژن در داربست‌های سلول‌زدایی شده از رنگ‌آمیزی‌های اختصاصی پیکروفوشین و پیک ایندیگوکارمین استفاده شد.

بررسی فراساختاری داربست سلول‌زدایی شده با عصب دست نخورده در سطح میکروسکوپ الکترونی نگاره: به‌منظور بررسی دقیق‌تر تغییرات ساختاری داربست‌های سلول‌زدایی شده و نمونه‌های بافتی عصب سالم با کمک میکروسکوپ الکترونی نگاره مورد مطالعه قرار گرفتند. به‌طور خلاصه نمونه‌ها توسط گلاتارآلدئید ۲/۵٪ به مدت دو ساعت تثبیت شده و با درجات صعودی اتانول آگیری شدند، پس از خشک کردن، با پوشش طلا-پالادیوم پوشانده شده و آماده بررسی با این میکروسکوپ شدند.

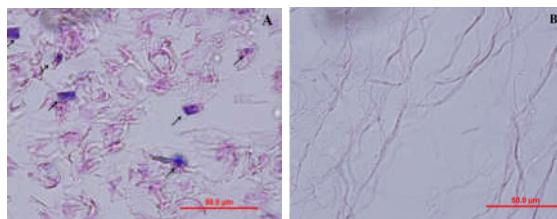
ارزیابی‌های مکانیکی داربست‌های عصبی سلول‌زدایی شده: پس از تهیه داربست‌های سلول‌زدایی شده عصب سیاتیک، جهت بررسی میزان استحکام کششی داربست‌ها و همچنین نمونه‌های کنترل عصب از دستگاه تست کششی (SANTAM SRT-200B, Santam Company, Iran) استفاده شد. به‌طور خلاصه ابتدا قطر نمونه‌ها با استفاده از کولیس دیجیتال اندازه‌گیری شده و سپس قطعات نمونه‌ها به طول ۱ cm به بازوهای دستگاه متصل گردید و برای محکم کردن نمونه‌ها روی بازوهای دستگاه از چسب مایع قوی استفاده شد. پس از آن نمونه‌ها توسط دستگاه با سرعت ثابت ۰/۱ mm/s تحت کشش قرار گرفت. در طی اندازه‌گیری نمونه‌ها با نرمال سالین مرطوب نگه داشته شدند.

هر نمونه به‌طور کامل تا حداکثر نیروی کشش و تا زمانی که قطع گردید، کشیده شد. جهت تحلیل واریانس از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) استفاده شد.

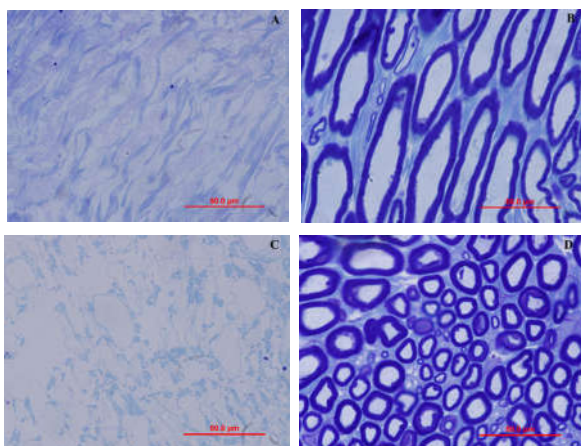
از نظر آماری مقادیر $P < 0/05$ به‌عنوان حداقل سطح معناداری در نظر گرفته شده و تمامی تحلیل‌های آماری توسط SPSS software, version 16 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) و رسم نمودارها توسط نرم‌افزار Microsoft Office 2013 (Microsoft Corp., Redmond, WA, USA) انجام شد.



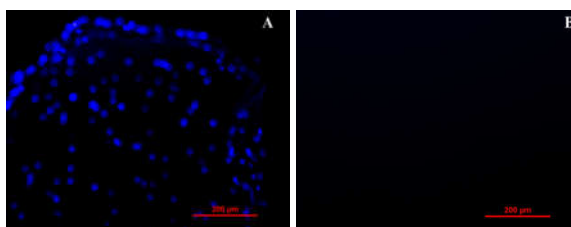
شکل ۴: مقایسه محتوای کلاژن موجود در عصب طبیعی (A) و داربست سلول‌زدایی شده (B) با استفاده از رنگ‌آمیزی پیک ایندیگوکارمین. رنگ سبز مایل به آبی در تصاویر نشان‌دهنده وجود رشته‌های کلاژن می‌باشد.



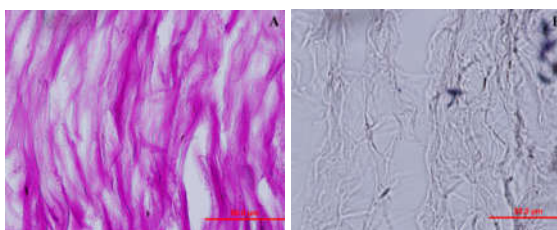
شکل ۱: مقایسه بافت‌شناسی داربست سلول‌زدایی شده با عصب دست نخورده به کمک رنگ‌آمیزی H&E تصویر (A) عصب دست نخورده علامت پیکان هسته سلول‌ها را نشان می‌دهد. تصویر (B) در داربست سلول‌زدایی شده هیچگونه سلولی دیده نمی‌شود.



شکل ۵: مقایسه محتوای ماتریکس خارج سلولی در داربست‌های سلول‌زدایی شده با عصب دست نخورده با استفاده از برش‌های نیمه نازک و رنگ‌آمیزی آبی تولوئیدین. تصاویر (A) و (C) به ترتیب برش‌های طولی و عرضی داربست و تصاویر (B) و (D) برش‌های طولی و عرضی عصب سالم را نشان می‌دهند.



شکل ۲: مقایسه بافت‌شناسی داربست سلول‌زدایی شده با عصب دست نخورده به کمک رنگ‌آمیزی DAPI و میکروسکوپ فلورسنت. (A) مقطع عصب طبیعی که در آن هسته‌ها به صورت نقاط آبی درخشان قابل مشاهده هستند. (B) در داربست سلول‌زدایی شده، هیچگونه نقاط درخشان‌های دیده نمی‌شود.



شکل ۳: مقایسه محتوای کلاژن موجود در عصب طبیعی (A) و داربست سلول‌زدایی شده (B) با استفاده از رنگ‌آمیزی پیکروفوشین. رنگ صورتی موجود در تصاویر نشان‌دهنده وجود رشته‌های کلاژن می‌باشد.

داد که در داربست‌های سلول‌زدایی شده اگرچه ماتریکس خارج سلولی حفظ می‌شود ولی سلول‌ها و رشته‌های آکسون به‌طور کامل حذف شده‌اند (شکل ۵).

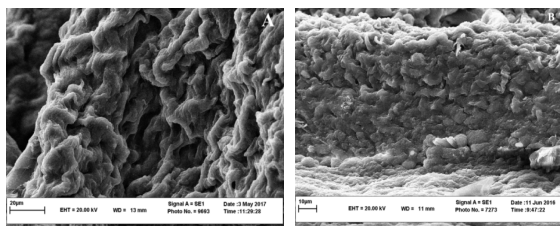
مقایسه فراساختاری داربست سلول‌زدایی شده با عصب دست نخورده در سطح میکروسکوپ الکترونی نگاره: نتایج حاصل از مقایسه دقیق‌تر تغییرات ساختاری داربست‌های سلول‌زدایی شده و نمونه‌های بافتی عصب سالم نشان داد که ساختار کلی ماتریکس

مقایسه محتوای ماتریکس خارج سلولی داربست توسط رنگ‌آمیزی آبی تولوئیدین: نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی آبی تولوئیدین نیز نشان

بررسی محتوای ماتریکس خارج سلولی از جمله ساختار و تراکم رشته‌های کلاژن با استفاده از رنگ‌آمیزی‌های پیکروفوشین و پیک ایندیگوکارمین نیز نشان داد، که رشته‌های کلاژن به‌طور نسبی حفظ گردیده‌اند. بررسی دقیق‌تر داربست‌های سلول‌زدایی شده، با استفاده از میکروسکوپ الکترونی نگاره نشان داد که افزون بر حذف کامل سلول‌ها، ساختار کلی بافت نیز حفظ شده است. نتیجه بررسی بیومکانیکی داربست‌ها توسط تست کششی نشان داد که ساختار و مقاومت مکانیکی داربست‌ها به‌طور نسبی حفظ شده است.

در این رابطه می‌توان بافت دست نخورده را مشابه بتن مسلح، که حاوی سیمان بافتی و الیاف کلاژن و الاستیک است در نظر گرفت. سیمان بافتی، بافت را در مقابل فشار مقاوم می‌سازد و الیاف کلاژن بافت را در مقابل کشش مقاوم می‌سازد. در داربست سلول‌زدایی شده بخشی از سیمان بافتی از بین می‌رود از این‌رو داربست تا حدودی قابلیت پارگی و یا شکنندگی خود را از دست می‌دهد و از آن‌جا که الیاف باقی‌مانده کماکان نسبت به کشش از خود مقاومت نشان می‌دهند، این مقاومت دارای دو پیک است که می‌توان پیک اول را به الیاف کلاژن و پیک دوم را به الیاف الاستیک نسبت داد. از بین رفتن سیمان بافتی موجب می‌شود که داربست حالت متخلخل پیدا کند که هم زمینه را برای نفوذ و چسبندگی سلول‌ها فراهم می‌نماید و هم سبب می‌شود که قابلیت کشسانی داربست تا حدودی افزایش یابد.^{۲۰،۲۱} برای آماده‌سازی داربست‌های سلول‌زدایی شده طبیعی، حذف همه سلول‌ها جهت جلوگیری از اثرات آنتی‌ژنی سلول‌ها و به حداقل رساندن پاسخ ایمنی ضروری می‌باشد، سلول‌زدایی مناسب سبب حفظ ماتریکس خارج سلولی می‌گردد. در این رابطه پژوهش‌ها نشان می‌دهند که درجنت‌ها قادر به متلاشی کردن و حذف بقایای سلولی از بافت‌های عصبی بوده و تاکنون استفاده از آن‌ها جزو موثرترین راه‌های سلول‌زدایی اعصاب محیطی بوده است.^{۲۲،۲۳}

برخی محققین بافت‌های غیرعصبی سلول‌زدایی شده دیگری را نیز برای کمک به روند ترمیم اعصاب آسیب دیده به‌کار گرفته‌اند. برای نمونه ساختار غشای پایه عضلات سلول‌زدایی شده می‌تواند با شبیه‌سازی اندونوریوم اعصاب محیطی بستری را برای رشد آکسون‌های در حال ترمیم فراهم آورد. با این حال احتمال انحراف آکسون‌ها و ایجاد نوروما و همچنین عدم امکان مهاجرت مناسب سلول‌های شوان بسیار زیاد است.^{۲۴،۲۵} گروهی نیز با سلول‌زدایی از



شکل ۶: تصاویر میکروسکوپ الکترونی نگاره از نمای طولی ساختار عصب سیاتیک دست نخورده (A) و داربست سلول‌زدایی شده (B). همانطور که در تصاویر دیده می‌شود، ساختار ماتریکس خارج سلولی در داربست کمابیش حفظ شده است، بزرگ‌نمایی $\times 2500$.

خارج سلولی عصب پس از فرآیند سلول‌زدایی حفظ شده است (شکل ۶). مقایسه مقاومت مکانیکی داربست سلول‌زدایی شده عصب سیاتیک با عصب دست نخورده با استفاده از آزمون کششی: نتایج حاصل از آزمون کششی نشان داد که میانگین بیشینه نیروی مورد نیاز (Fmax) جهت پاره شدن عصب دست نخورده و داربست سلول‌زدایی شده به ترتیب $2/01$ و $1/35$ نیوتن به‌دست آمد. همچنین تفاوت معناداری در میزان ازدیاد طول تا نقطه پارگی بین دو گروه دیده شد.

بحث

تاکنون داربست‌های مختلفی برای ترمیم ضایعات ناشی از قطع اعصاب محیطی مورد استفاده قرار گرفته‌اند. هر کدام از این داربست‌های سنتزی دارای یکسری مزایا و معایب می‌باشند. داربست‌های سنتزی به‌دلیل کاستی‌هایی همچون زیست‌سازگاری محدود، ضعف بیومکانیکی و عملکرد زیستی پایین موفقیت در بازسازی عصب را کاهش می‌دهند.^{۱۷،۱۶} از این‌رو استفاده از داربست‌های سلول‌زدایی شده به‌دلیل داشتن خصوصیتی همچون فراهم کردن محیطی مشابه با ماده زمینه برون‌سلولی برای سلول‌ها، خواص آنتی‌ژنی کم و توانایی بهبود چسبندگی سلولی بسیار مورد توجه می‌باشند.^{۱۸} براساس نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی‌های H&E و DAPI چنین به‌نظر می‌رسد که سلول‌ها به‌طور کامل حذف شدند.

آکسون‌ها و مهاجرت سلول‌های شوآن نیز پشتیبانی می‌کرد.^۲ Hudson و همکارانش نیز در ۲۰۰۴ با استفاده از دترجنت‌های زیوتریونی سولفونائین به همراه دترجنت آنیونی تربتون X-200 داربست عصبی فاقد سلولی ایجاد کردند که ساختارهای ماتریکس خارج سلولی و غشاء پایه را به شکل مناسبی حفظ کرده بود.^۳ در مجموع نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که داربست‌های حاصل از سلول‌زدایی با حفظ ترکیبات اصلی بافت مورد نظر می‌توانند بستر مناسبی برای بررسی رفتارهای سلولی باشند.

سپاسگزاری: این مقاله حاصل بخشی از طرح تحقیقاتی با عنوان "اثرات داروی فنی توئین در برهمکنش سلول بنیادی بندناف انسانی و داربست سلول‌زدایی شده عصب سیاتیک" مصوب دانشگاه محقق اردبیلی در سال ۱۳۹۷ به کد ۲۲۳۶۴۱۰ می‌باشد که با حمایت دانشگاه محقق اردبیلی اردبیل انجام شده است.

سرخرگ بندناف انسان داربستی سه بعدی فراهم آوردند که زمینه‌های را برای اتصال و مهاجرت سلول‌ها فراهم می‌آورد.^۴ در برخی مطالعات دیگر قدرت ترمیم‌کنندگی آلوگرافت‌های عصبی سلول‌زدایی شده با انواع تجاری کانال‌های راهنمای عصب مورد مقایسه قرار گرفته است که اغلب نتایج نشان‌دهنده عملکرد بهتر داربست‌های فاقد سلول در پیشبرد روند ترمیم اعصاب محیطی بوده‌اند.^۵ پژوهش‌ها نشان می‌دهند که دترجنت‌ها قادر به متلاشی کردن و حذف بقایای سلولی از بافت‌های عصبی بوده و تاکنون استفاده از آن‌ها جزو موثرترین راه‌های سلول‌زدایی اعصاب محیطی بوده است.^۶ به‌طور مثال Sondell و همکاران در ۱۹۹۸ توانستند با استفاده از دترجنت‌های تربتون X-100 و سدیم داکسی‌کولات به‌همراه یک سری محلول‌های شستشو داربست‌های عصبی فاقد سلولی تهیه کنند که در عین فقدان خواص ایمونوژنیسیته، به‌طور چشمگیری از رشد

References

1. Deumens R, Bozkurt A, Meek MF, Marcus MA, Joosten EA, Weis J, et al. Repairing injured peripheral nerves: Bridging the gap. *Prog Neurobiol* 2010;92(3):245-76.
2. Sondell M, Lundborg G, Kanje M. Regeneration of the rat sciatic nerve into allografts made acellular through chemical extraction. *Brain Res* 1998;795(1-2):44-54.
3. Hudson TW, Zawko S, Deister C, Lundy S, Hu CY, Lee K, et al. Optimized acellular nerve graft is immunologically tolerated and supports regeneration. *Tissue Eng* 2004;10(11-12):1641-51.
4. Whitlock EL, Tuffaha SH, Luciano JP, Yan Y, Hunter DA, Magill CK, et al. Processed allografts and type I collagen conduits for repair of peripheral nerve gaps. *Muscle Nerve* 2009;39(6):787-99.
5. Fox IK, Schwetye KE, Keune JD, Brenner MJ, Yu JW, Hunter DA, et al. Schwann-cell injection of cold-preserved nerve allografts. *Microsurgery* 2005;25(6):502-7.
6. Jesuraj NJ, Santosa KB, Macewan MR, Moore AM, Kasukurthi R, Ray WZ, et al. Schwann cells seeded in acellular nerve grafts improve functional recovery. *Muscle Nerve* 2014;49(2):267-76.
7. Tohill M, Terenghi G. Stem-cell plasticity and therapy for injuries of the peripheral nervous system. *Biotechnol Appl Biochem* 2004;40(Pt 1):17-24.
8. Oliveira JT, Mostacada K, de Lima S, Martinez AM. Bone marrow mesenchymal stem cell transplantation for improving nerve regeneration. *Int Rev Neurobiol* 2013;108:59-77.
9. Gao S, Zheng Y, Cai Q, Yao W, Wang J, Zhang P, et al. Comparison of morphology and biocompatibility of acellular nerve scaffolds processed by different chemical methods. *J Mater Sci Mater Med* 2014;25(5):1283-91.
10. Fereidoni M, Rassouli B, Moghimi A, Bahrami A, Namini M, Naderi S, et al. Preparation of decellularized three dimensional scaffolds as the model for tissue engineering and their functional assessments in vitro application of blastema tissue. *J Gorgan Univ Med Sci* 2013;15(4):8-17.
11. Isaacs J, Browne T. Overcoming short gaps in peripheral nerve repair: conduits and human acellular nerve allograft. *Hand* 2014;9(2):131-7.
12. Crapo PM, Gilbert TW, Badylak SF. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials* 2011;32(12):3233-43.
13. Raivich G, Makwana M. The making of successful axonal regeneration: genes, molecules and signal transduction pathways. *Brain Res Rev* 2007;53(2):287-311.
14. Marquardt LM, Sakiyama-Elbert SE. Engineering peripheral nerve repair. *Curr Opin Biotechnol* 2013;24(5):887-92.
15. Fischer AH, Jacobson KA, Rose J, Zeller R. Hematoxylin and eosin staining of tissue and cell sections. *CSH Protoc* 2008;2008:pdb.prot4986.
16. Dhandayuthapani B, Yoshida Y, Maekawa T, Kumar DS. Polymeric scaffolds in tissue engineering application: a review. *Int J Polym Sci* 2011;ID:290602.
17. Lin MY, Manzano G, Gupta R. Nerve allografts and conduits in peripheral nerve repair. *Hand Clin* 2013;29(3):331-48.
18. Badylak SF, Freytes DO, Gilbert TW. Extracellular matrix as a biological scaffold material: Structure and function. *Acta Biomater* 2009;5(1):1-13.
19. Abdolmaleki A, Ghayour M B, Feridoni M. The importance of fibronectin in development, regeneration and treatment: review article. *Tehran Univ Med J* 2015;73(5):313-23.
20. Abdolmaleki A, Ghayour MB. Role of extracellular matrix in peripheral nerve regeneration process. *Razi J Med Sci* 2015;22(135):75-88.
21. Johnson P, Wood M, Moore A, Mackinnon S. Tissue engineered constructs for peripheral nerve surgery. *Eur Surg* 2013;45(3).
22. Medrano BG, Pérez CS, Sanz PB, García MG, Rodríguez MJG, et al. (2014) Addition of Insulin-like Growth Factors (IGF-1) for the Regeneration of Critical Defects in Peripheral Nerve Injuries. Biological Findings. *J Cytol Histol* 5:221.
23. Hall S. Axonal regeneration through acellular muscle grafts. *J Anat* 1997;190(Pt 1):57-71.

24. Crouzier T, McClendon T, Tosun Z, McFetridge PS. Inverted human umbilical arteries with tunable wall thicknesses for nerve regeneration. *J Biomed Mater Res A* 2009;89(3):818-28.
25. Moore AM, MacEwan M, Santosa KB, Chenard KE, Ray WZ, Hunter DA, et al. Acellular nerve allografts in peripheral nerve regeneration: a comparative study. *Muscle Nerve* 2011;44(2):221-34.

Preparation of acellular sciatic nerve scaffold and its mechanical and histological properties for use in peripheral nerve regeneration

Arash Abdolmaleki Ph.D.^{1,2*}
Mohammad-Bagher Ghayour Ph.D.³
Saber Zahri Ph.D.⁴
Asadollah Asadi Ph.D.⁴
Morteza Behnam-Rassouli Ph.D.³

1- Department of Engineering Sciences, Faculty of Advanced Technologies, University of Mohaghegh Ardabili, Namin, Ardabil, Iran.

2- Bio Science and Biotechnology Researchcenter (BBRC), Sabalan University of Advanced Technologies (SUAT), Namin, Ardabil, Iran.

3- Department of Biology, Faculty of Sciences, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

4- Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran.

* Corresponding author: Department of Engineering Sciences, Faculty of Advanced Technologies, University of Mohaghegh Ardabili, University St., Namin, Ardabil, Iran.
Tel: +98- 453- 2323622
E-mail: Abdolmalekiarash1364@gmail.com

Abstract

Received: 12 Feb. 2019 Revised: 20 Feb. 2019 Accepted: 13 May 2019 Available online: 21 May 2019

Background: Tissue engineering is a developing multidisciplinary and interdisciplinary field involving the use of bioartificial implants for tissue remodeling with the target for repair and enhancing tissue or organ function. Acellular nerve has been used in experimental models as a peripheral nerve substitute. The purpose of the present study was to evaluate the mechanical and histological characteristics of acellular nerve scaffolds compared to the fresh nerve for application in environmental nerve repair.

Methods: This experimental study was conducted in Ferdowsi University of Mashhad Regeneration Research Laboratory, Mashhad, Iran, from May 2017 to October 2018. In this study for preparing the scaffold. The rats were sacrificed by intraperitoneal anesthesia with 10 % Chloral Hydrate solution. Then sciatic nerve fragments of the rats were removed above the nerve branching site and after cleansing of the tissues were decellularized by Sondell method, briefly nerves were treated with a series of detergent baths consisting of distilled water for 8 h, Triton X-100 for 12 h, and sodium deoxycholate for 24 hours according to the Sondell protocol. All acellularization steps were performed at room temperature. Then decellularized scaffolds were evaluated histologically and mechanically.

Results: The results of tissue evaluations showed that decellularization of scaffolds were done completely, this was demonstrated by hematoxylin and eosin staining and DAPI staining. Also the specialized tissue evaluations by picro-fuchsin staining and evaluation the scaffolds by scanning electron microscopy (SEM) micrographs showed that the collagen and elastin strands are relatively preserved in the extracellular matrix in comparison with control groups. As well as mechanical examination of scaffolds in tensile test showed that extracellular matrix of scaffolds was relatively preserved the main components of tissue compared to control group and scaffolds have good mechanical resistance quality for use in tissue engineering.

Conclusion: The results of the present study showed that decellularized scaffolds that prepared with Sondell decellularization method by preserving the main components of the tissue can be a good platform for investigating cellular behaviors.

Keywords: extracellular matrix, peripheral nerves, regeneration, sciatic nerve, tissue engineering, tissue scaffolds.