

## سلول زدایی بافت لیگامان کف پای شترمرغ بعنوان زئوگرافت

روزبه مریدپورا<sup>۱</sup>، حمیدرضا فتاحیان<sup>۲\*</sup>، پژمان مرتضوی<sup>۳</sup>

### چکیده

علی‌الخصوص و دامپزشکی نقش بسزایی دارد، محققان از سال‌های گذشته با توجه به نیاز این ساختار در ترمیم و بازسازی اندام‌ها توجه خاص به تحقیقات در این زمینه داشته‌اند. استفاده از بافت‌های خودی و با ذخیره ژنتیکی یکسان، بافت‌های تهیه شده با خاصیت و پتانسیل ایمنی زایی از افراد هم‌گونه و همچنین تهیه و تولید بافت از ذخیره ژنتیکی سایر گونه‌ها بخصوص حیواناتی نظیر خوک، بز، گاو، گوسفند و... به طور قابل توجهی با توجه به نیاز در این حوزه گسترش چشمگیری یافته است به طور مثال نیاز امروزی مردم چین به پیوند قرنیه الوگرافت و زئوگرافت (پس از پروسه‌های مهندسی بافت و...) نظیر سایر بافت‌ها از ضروریات امروزی جوامع بشری در این کشور می‌باشد (۱).

امروزه احساس نیاز به تهیه بافت‌های مهندسی شده با حداقل ایمنی زایی در طب انسانی و حیوانی بیش از پیش احساس می‌شود اما باید توجه داشت که چالش‌های خاص خود را به همراه دارد. از سویی تهیه بافت‌هایی با چنین ویژگی تنها مسئله پیش روی محققان و کلینیسین‌ها نمی‌باشد، امکان استفاده از بافت‌های فراوری شده با روش‌های مهندسی بافت با منبع خوک هرچند که در کشور‌های غیرمسلمان و دریافت‌کننده‌ی آن بسیار مورد توجه قرار گرفته است (۲). همانطور که مشخص است روش‌های متعددی در تهیه بافت‌های جایگزین الو و زئو تاکنون معرفی شده است که از این میان تهیه ماتریکس یا بافت همبند فاقد سلول با حداقل خواص انتی ژنیسیته و

استفاده از بافت‌ها در طب در برگرداندن عملکرد ارگان به در درمان عمومیت یافته است. مهندسی بافت روش‌های جدید تهیه و فراوری بافت از این دسته از فناوری‌های امروزی در روند درمان جوامع می‌باشد. در تحقیق حاضر با استفاده از روش‌های شیمیایی و فیزیکی تلاش در تهیه بافت همبند از پای شترمرغ و ارائه آن جهت استفاده در درمان بیماران و دارد. پنج جفت پای شترمرغ ۱۱ ماهه از مفصل مچ پای-قلمی (مفصل هاک) جدا شده و به آزمایشگاه ارسال گردید، پس از جداسازی لیگامان کف پای مطالعه میکروسکوپی و ارزیابی بیومکانیکی انجام پذیرفت و فرایند سلول زدایی با ترکیب سدیم دودسیل سولفات و خلأ بر روی بافت انجام پذیرفت. مطالعه میکروسکوپی نوری و الکترونی و ارزیابی بیومکانیکی بر روی بافت فراوری شده انجام پذیرفت. لیگامان کف پای شترمرغ متشکل از ساختار فیبری-غضروفی (فیبروکارترلاژی) بوده که تا ۹۵ درصد فاقد سلول گردید. نتایج حاصل مطالعه بیومکانیکی تحمل کشش و فشار بافت دسلولاریزه شده اختلاف معنی داری بین بافت غیرفراوری شده و فراوری شده نشان نداد. محلول SDS به همراه خلأ قابلیت برداشت سلول و محتویات ذخیره ژنتیکی را تا ۹۵ درصد با حفظ ساختار همبندی دارا می‌باشد که با کاهش سلول و DNA انتی ژنیسیته بافت زئوگرافت کاسته شد که با حفظ ساختار همبندی آن امکان استفاده در بیمار پس از استریلیزاسیون فراهم می‌نماید.

واژگان کلیدی: سلول زدایی، لیگامان کف پای، شترمرغ

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۷/۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۱/۲۲

### مقدمه

امروزه استفاده از بافت‌های طبیعی، بافت‌های طبیعی مهندسی شده، مواد سنتتیک، عوامل دارویی و کشت سلولی و... در درمان ضایعات گوناگون و آسیب‌های اندام‌ها در طب انسانی

۱- آدانی آموخته گروه آموزشی علوم درمانگاهی، دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران  
۲- گروه آموزشی علوم درمانگاهی، دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران hrfattahian@srbiau.ac.ir  
۳- گروه پاتوبیولوژی، دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

منظور تخریب ساده تر سلولی و حذف سلول ها مورد محک آزمون قرار گرفت.

تحقیق حاضر تحت نظارت معاونت پژوهشی دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی و معاونت پژوهشی واحد متبوع انجام پذیرفت.

## مواد و روش کار

### استخراج بافت

تعداد پنج جفت پای شترمرغ ۱۱ ماهه جدا شده از مفصل مچی پای- قلمی از کشتارگاهی واقع در ورامین، تهیه گردید. سپس نمونه‌ها به آزمایشگاه های وابسته دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی انتقال یافت. پوست از مفصل قلمی- انگشتی پای در سطح کف پای مفصل، با تیغ بیستوری برش داده شد (تصویر ۱-الف). سپس با برش غلاف حاوی تاندون های خم کننده انگشتان، تاندون‌ها کنار زده شدند. بطوریکه بافت لیگامان کف پای که در زیر تاندون‌ها قرار دارد، در معرض دید قرار گرفت. ساختار این بافت شبیه انگشتی است که حلقه‌ای آن، تاندون‌ها را در بر می‌گیرد و بخش نگین انگشتی بافت مورد نظر (لیگامان کف پای) می باشد (تصویر ۲-ب).



تصویر ۱- برش پوست در محل مفصل قلمی- انگشتی سطح کف پای شترمرغ. کادر کوچک: بخشی از لیگامان کف پای همین نمونه.

ایمنی زایی به دلیل وجود منابع بسیار تهیه این بافت ها از سایر گونه ها (زنوگرافت) مورد توجه خاص قرار گرفته است. عمده مشکل و معایب استفاده از زنو گرافت، قدرت و پتانسیل بالا در رد پیوند و ایجاد واکنش های ایمنی از سوی میزبان می باشد که مزیت دسترسی آسان و راحت به این بافت (زنوگرافت) را، تحت الشعاع قرار می دهد. روش های بسیاری به منظور دسلولار کردن و تهیه ماتریکس با چارچوب همبندی تاکنون شناخته شده است که استفاده از روش های فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیکی و یا ترکیبی از روش های فوق به این منظور استفاده می گردد که هر یک با مزایا و معایبی همراه می باشد (۳). هدف اصلی از فراوری بافت ها با این روش، تهیه ماتریکس یا چارچوب همبندی به منظور پیوند در بیماران می باشد. از عمده روش های فیزیکی سلول زدایی می توان به سیکل های انجماد و ذوب، غوطه وری (امرسیون) وهم زدن (اجیتاسیون)، استفاده از فشار، استفاده از مایعات با ویسکوزیته پایین (روش سوپر کریتیکال) اشاره نمود (۴). از عمده روش های سلول زدایی شیمیایی می توان به عوامل اسیدی (اسید استیک)، بازی، شوینده های یونی، شوینده های غیر یونی (زویتریونیک)، الکل ها (اتانول)، ترکیب تری-ان-بوتیل فسفات، عوامل آنزیمی مختلف (الاستاز، کلاژناز، تریپسین، کیموتریپسین، پروتاز، DNase) استفاده از سموم و ترکیبات شلات کننده نظیر EDTA (اتیلن دی امین تترا استیک اسید) و EGTA (اتیلن گلایکول تترا استیک اسید) و... اشاره نمود (۵). در تحقیق حاضر با توجه به مزایای استفاده از زنوگرافت و عمومی شدن آن، محققان این تحقیق تلاش در تهیه بافت های دسلولار از لیگامان کف پای شترمرغ (از بافت های زاید کشتارگاهی)، با استفاده از شوینده یونی سدیم دودسیل سولفات (SDS) تحت شرایط خلأ استفاده نمودند. به زبان دیگر استفاده از مواد شیمیایی در کنار بهره جستن از قواعد فیزیکی نظیر ایجاد خلأ به

### مطالعه میکروسکوپی و بافت شناسی

پس از جداسازی لیگامان کف پای، این ساختار به آزمایشگاه بافت شناسی ارسال گردید. در این مرحله به منظور تهیه لام بافت شناسی، پروسه آماده سازی بافتی به روش معمول انجام گرفت. سپس نمونه‌ها در پارافین غوطه‌ور گردیدند و پس از تهیه نمونه‌های بافتی با برش ۵ میکرونی با رنگ همتوکسیلین-ئوزین و تری کروم به منظور بررسی میکروسکوپی رنگ آمیزی شدند.

### فرآوری بافت آسلولار

تعداد دیگری از لیگامان کف پای جدا شده از پای شترمرغ به این منظور مورد استفاده قرار گرفت به منظور کاهش میزان آلودگی بافتهای مورد نظر، قبل از فرآوری از محلول سدیم کلرید استریل و همچنین پویدون-آیودین اسکراب یک درصد استفاده شد. فرآیند آسلولار کردن بافت مورد نظر شامل مراحل شستشو با آب دیونیزه استریل، استفاده از محلول شوینده محلول سدیم دودسیل سولفات ۲ درصد، شستشوی مجدد با آب دیونیزه استریل، چربی زدایی با الکل ۷۰ درصد و در نهایت استفاده از محلول فسفات بافر سالین استریل تحت شرایط خلأ بود.

پس از قرارگیری بافت ها در شرایط فوق در مراحل فراوری، سپس به منظور بررسی اثر شوینده فوق بر برداشت و حذف سلول های بافتی و بررسی تغییرات ساختاری و عمل کشش به ترتیب بافت فراوری شده به آزمایشگاه آسیب شناسی دانشکده دامپزشکی و پژوهشگاه پلیمر و پتروشیمی ایران و دانشکده مهندسی پزشکی دانشگاه صنعتی امیرکبیر ارسال شد به منظور تایید میزان برداشت و حذف سلول و حفظ ساختار اولیه بافت، این بافت ها تحت مطالعه هیستوپاتولوژی قرار گرفت.

سنجش میزان کلاژن و گلیکوزآمینوگلیکان بافتی (GAG) و خصوصیات بیومکانیکی

به منظور اندازه گیری میزان کلاژن و گلیکوزآمینوگلیکان بافت فراوری شده، و تعیین میزان تاثیرگذاری روند آسلولار، نمونه‌ای از بافت فراوری شده و غیرفراوری شده درون محلول PBS به پژوهشگاه پلیمر و پتروشیمی ایران و دانشکده مهندسی پزشکی دانشگاه صنعتی امیرکبیر ارسال شد، بافت های مورد نظر از نظر میزان تحمل کشش (tensile strength) و فشار (compression) مورد بررسی بیومکانیکی قرار گرفتند (تصویر ۲-الف و ب) سپس نمونه‌هایی از بافت لیگامان کف پای سلول زدایی شده با سطح مقطع ۲۱ و ۴۷/۲۵ میلی‌متر مربع و طول اولیه ۱۸ و ۲۱ سانتی متر تهیه شد، آورده شد، سپس نمونه‌ها از بافت لیگامان کف پای غیرفراوری شده دارای سطح مقطع ۱۷/۶ و ۳۲ میلی‌متر مربع و طول اولیه ۱۲/۷ و ۱۴ تهیه شده بود، آورده شد.

تست آماری با نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ انجام شد. مقایسه بین دو گروه با تجزیه و تحلیل یک طرفه واریانس (آنوا) و آزمون دانکن صورت پذیرفت. سطح معناداری ( $P < 0.05$ ) در نظر گرفته شد.

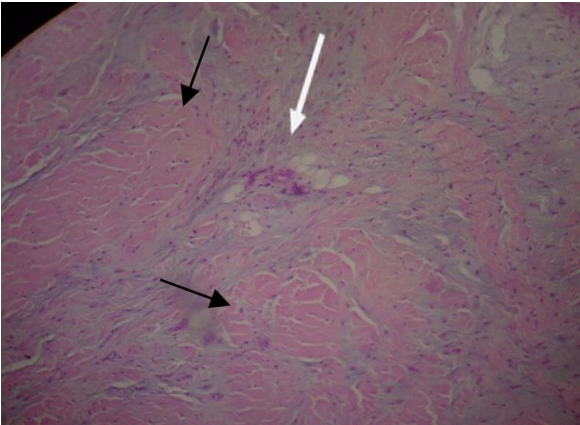


تصویر ۲- الف: آزمایش تحمل فشار؛ تصویر ۲- ب: آزمایش تحمل کشش بر روی بافت لیگامان کف پای

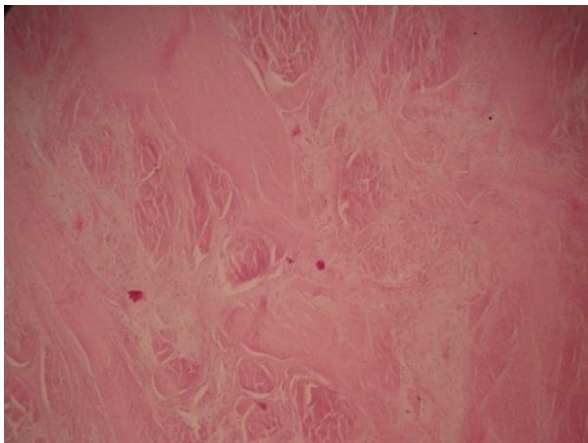
### ارزیابی بافت با میکروسکوپ الکترونی

جهت بررسی ساختار بافتی و مطالعه میزان تاثیرگذاری پروتکل بکار برده در روند سلول زدایی، نمونه‌هایی از بافت فراوری شده و غیرفراوری شده به منظور مطالعه با بررسی

همچنین ساختار اولیه و ماتریکس خارج سلولی بافت بدون آسیب حفظ شد (تصویر ۴).



تصویر ۳-ب: بافت لیگامان کف پای رنگ آمیزی هماتوکسیلین-اوتوزین بزرگنمایی ۱۰۰ مقاطع طولی و عرضی رشته‌های کلاژن (پیکان سیاه) و همچنین غضروف فیبری (پیکان سفید) مشاهده می‌گردد.



تصویر ۴: بافت لیگامان کف پای آسلولار رنگ آمیزی هماتوکسیلین-اوتوزین بزرگنمایی ۱۰۰. در نمونه آسلولار اثری از هسته فیبروسیتها و یا کندروسیتها و دیگر اجزا سلولی مشاهده نمی‌شود و ساختار بافتی حفظ شده است. رنگ آمیزی هماتوکسیلین-اوتوزین.

### نتایج اندازه‌گیری میزان کلاژن و گلیکوزآمینوگلیکان بافت فرآوری شده و بافت غیرفرآوری

فرآیند بدون سلول نمودن منجر به افزایش معنی دار ( $p < 0.05$ ) در میزان کلاژن  $1/66 \pm 25/4$  میکروگرم/میلی‌گرم، و محتوای گلیکوزآمینوگلیکان  $0/05 \pm 1/14$

میکروسکوپ الکترونی به مجتمع آزمایشگاهی واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی ارسال شد. نمونه‌های تهیه شده جهت تصویربرداری، به دانشکده مهندسی مواد واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی ارسال شد.

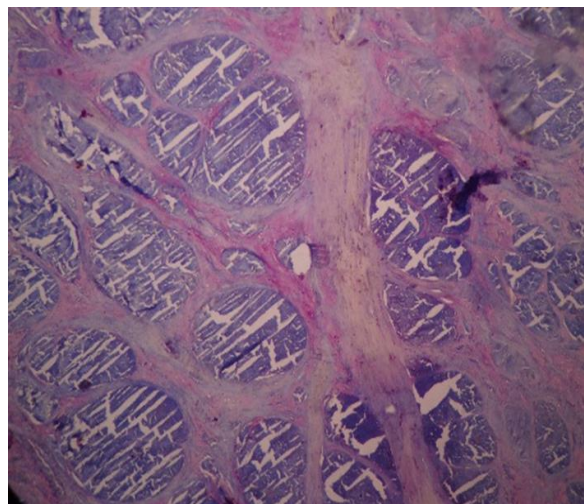
### رنگ آمیزی دپی

نمونه های بافتی فراوری شده و غیرفراوری شده جهت رنگ آمیزی دپی در ظروف حاوی فرمالین بافر ۱۰ درصد به منظور تایید نهایی روند حذف سلول به آزمایشگاه مرکز طبی کودکان بیمارستان امام خمینی (ره) ارسال شد.

### نتایج

#### نتایج بررسی بافت شناسی لیگامان کف پای

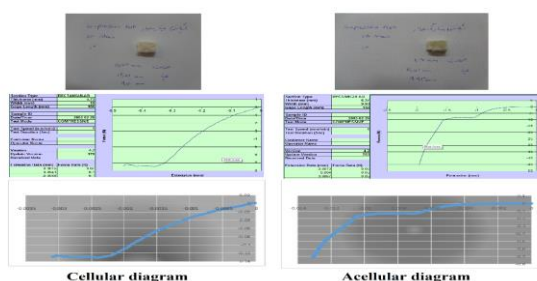
در مطالعه ی بافت شناسی، رشته‌های کلاژن و همچنین غضروف فیبری در سرتاسر ساختار این بافت مشاهده شد که حاکی از ساختار فیبروکارتیلاژی آن می باشد (تصویر ۳-الف و ب).



تصویر ۳-الف: بافت لیگامان کف پای رنگ آمیزی تری کروم بزرگنمایی ۴۰ مقاطع طولی و عرضی رشته‌های کلاژن مشاهده می‌گردد.

مطالعه بافت شناسی بافت فراوری شده نشان داد که بافت مورد نظر به میزان ۹۵ درصد فاقد سلول شده بود این در حالی است که

نتایج حاصل از محاسبات انجام گرفته، حداکثر مدول الاستیسیتة این نمونه‌ها در بازه ۶/۲۵ تا ۱۸/۳۵ مگا پاسکال گزارش شد. قدرت کششی بیان شده نیز در بازه ۲۰/۴۰ تا ۶۶/۹۶ نیوتن قرار داشت (تصویر ۶).



تصویر ۶: آزمایش تحمل نیروی فشار روی بافت لیگامان کف پای اسلولار فراوری شده و غیرفراوری شده

### آزمایش تحمل نیروی فشار

طبق نتایج بدست آمده، بافت لیگامان کف پای با سطح مقطع ۵۷/۳ میلی‌متر مربع تا فشاری معادل ۷/۴۶ نیوتن را تحمل نمود. تغییرات نیروی فشاری وارده بر بافت لیگامان کف پای اسلولار، دارای شیب نمودار یا مدول فشاری ۲۴/۴۰ به دست آمد. متأسفانه با توجه به امکانات موجود، نمودار مربوط به نیروی فشاری بافت فیبروکارتیلاژی کف پای اسلولار نتایج نامطمئنی را ارائه داده است. لذا به محاسبه سایر فاکتورها پرداخته نشد.

### نتایج بررسی میکروسکوپ الکترونی

یکپارچگی ساختار بافتی و نظم رشته ای کلاژنی به همراه دیواره عروق خونی و گلبول های قرمز در بافت لیگامان کف پای غیر فراوری مشاهده شد، شواهد میکروسکوپ الکترونی مقاطع بافتی در گروه دسلولاریزه شده یکسان بودن و انسجام داشتن ساختار همبندی فاقد سلول و هسته را نشان داد (تصویر ۷-الف و ب).

میکروگرم/میلی‌گرم)، در مقایسه با بافت‌های تازه ( $\pm 1/2$  میلی‌گرم/میکروگرم/میلی‌گرم)، ( $0/32 \pm 0/01$  میلی‌گرم/میکروگرم) شده است (جدول ۱).

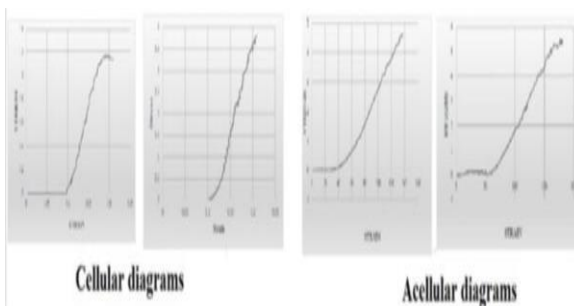
جدول ۱: نتایج اندازه‌گیری میزان کلاژن و گلیکوزآمینوگلیکان بافت فراوری شده و غیرفراوری شده

محتوای توتال SGAG ( $\mu\text{g}/\text{ng wet tissue}$ )	کلاژن توتال ( $\mu\text{g}/\text{ng wet tissue}$ )
$0/32 \pm 0/01$	$19/04 \pm 1/2$
$1/14 \pm 0/05$	$25/4 \pm 1/66$

### نتایج آزمایش خصوصیات بیومکانیکی

#### آزمایش تحمل نیروی کششی

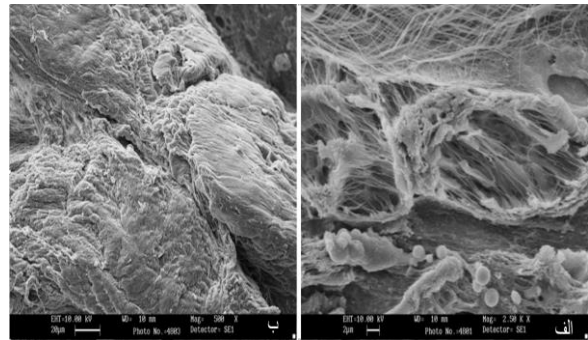
نتایج حاصل از بررسی خصوصیات کششی بافت لیگامان کف پای در تصویر ۴ مشخص شده است. با توجه به وجود امکانات محدود و ناتوانی فک دستگاه در نگه داشتن کامل بافت مورد نظر، نتایج زیر بدست آمد. نتایج حاصل از محاسبات انجام گرفته، حداکثر مدول الاستیسیتة این نمونه‌ها در بازه ۱۵/۱۹ تا ۱۶/۸۲ مگاپاسکال گزارش شد. قدرت کششی بیان شده نیز در بازه ۲۶/۲۲ تا ۴۰/۴۹ نیوتن قرار داشت (تصویر ۵).



تصویر ۵: آزمایش تحمل نیروی کششی بافت لیگامان کف پای اسلولار فراوری شده و غیرفراوری شده



کامل و نزدیک به صددرصد بافت یا نیل به این مهم به منظور تهیه داربست بدون سلول همبندی بسیار حائز اهمیت می باشد (۱، ۴). نقص در سلول زدایی بافت ها باعث باقی ماندن بقایای سلولی می گردد که مشابه به روند و نقش تروما در آسیب و تخریب سلول است که این مولکول های آسیب دیده بافتی و عوامل رها شده از آن باعث پاسخ شدید آماسی می گردد که مانع از بازسازی و ترمیم در محل گیرنده و اثر منفی قابل ملاحظه بر روی نتایج حاصل از استفاده از ماتریکس همبندی دارد (۴). بقایای DNA با سایر بقایای سلولی همانند المان های میتوکندری، چربی های غشایی و بقایای سیتوپلاسمی در تحریک دستگاه ایمنی نقش ایفا می نماید جالب اینکه باقی مانده محتویات DNA به تنهایی نمی تواند نقش تخریبی دفاع میزبان را تحریک نماید. ولی کاهش میزان DNA در بافت دسلولاریزه شده، پاسخ میزبان و تورم بافت های اطراف محل دریافت کننده پیوند را کاهش می دهد و در نهایت باعث کاهش ایجاد تشکیلات سرومایی می گردد از این رو است که سلول زدایی کامل بافت های مورد استفاده نقش تعیین کننده و بسزایی در نتایج حاصل از پیوند زئوگرافت و الو گرافت و کاهش واکنش های رد پیوند دارند (۵، ۶). تحقیقات نشان داده است که روند سلول زدایی به طور کامل امری غیر ممکن است و در طی آن ساختار ماتریکس همبندی با تغییر و آسیب همراه می باشد و این تغییرات ملموس ساختاری در آرشیکت ماتریکس همبندی و جهت قرار گیری الیاف و لیگاند های سطحی متعاقب روش های مختلف دسلولار نمودن مشاهده شده است، تحقیقات اخیر نشان داده است که کلاژن موجود در ماتریکس دسلولاریزه شده با داشتن خواص زیست سازگاری بافتی و سایر مزایا، می تواند به عنوان منبع بافت زئو پس از فراوری و استریلیزاسیون استفاده گردد (۴-۶). در مطالعه حاضر با استفاده از ماده شیمیایی شوینده یونی



تصویر ۷- الف : میکروسکوپ الکترونی بافت لیگامان کف پای. بزرگنمایی ۲۵۰۰۰۰ برابر. عروق خونی و گلبولهای قرمز و رشته های کلاژن بافت غیرفراوری شده دیده می شود. ب : میکروسکوپ الکترونی بافت لیگامان کف پای دسلولاریزه شده، بزرگنمایی ۵۰۰ برابر، یکسان بودن ساختار بافتی مشاهده می شود.

### بافت لیگامان کف پای اسلولار

در بررسی این بافت، حفظ ساختار بافتی و نبود هسته مشاهده شده است.

### بحث

داربست های بیولوژیکی از ماتریکس خارج سلولی تشکیل شده و معمولاً منبع عمده ی آن ها بافت های پستانداران می باشد که طی فرایند های متفاوت فیزیکی و یا شیمیایی یا ترکیبی از این دو، سلول زدایی می گردند. این داربست ها در ترمیم و بازسازی ساختارهای عضلانی-اسکلتی، قلبی-عروقی، دستگاه ادراری، دستگاه گوارشی و دستگاه عصبی و... کاربرد بسیار وسیع بالینی دارند همچنین این داربست های تهیه شده و فراوری شده به روش های مختلف فیزیکی و شیمیایی با توجه به روند سلول زدایی و حذف حداکثری عوامل آنتی ژن و تحریک کننده دستگاه ایمنی باعث ارتقا و تسهیل بازسازی بافتی یا تسریع روند عروق زایی، شکل گیری و نفوذ بافت عصبی (رشته ای عصبی) و افزایش عملکرد بافتی می شود (۴). از طرفی روش سلول زدایی با توجه به تراکم سلول ها، دانسیته همبندی (ماتریکس) و ملاحظات هندسی بافت نظیر ضخامت بافتی و شکل آن متفاوت می باشد سلول زدایی

یونی نظیر تریتون ایکس ۱۰۰ قادر به حل نمودن پروتئین ها با حفظ ساختار طبیعی پروتئین های بافتی هستند اما خواص سلول زدایی مناسب و قابل قبولی ندارد. البته برخلاف Grauss، در سال ۲۰۰۷ Liao و همکارانش توانستند به این یافته دست یابند (۱۲، ۱۳). اطلاعات حاصل از تحقیق ما با استفاده از SDS به همراه بهره گیری از خلأ قابلیت سلول زدایی و حذف ۹۵ درصدی سلول ها و حذف DNA (آزمایش دی) و هسته سلول بافت لیگامان کف پای شترمرغ را با حفظ ساختار سه بعدی و قدرت کششی و تحمل فشار قابل قبول نشان داد که نتیجه حاصل از تحقیق نویسندگان این مقاله با مطالعه ناکایاما و همکاران در سال ۲۰۱۰ موافقت داشت ان ها به سلول زدایی وسیع با حل نمودن مؤثر غشا سیتوپلاسمی، لیپید ها و DNA از بافت کلیه میمون نائل شدند (۱۲). هر چند که این محققان یافتند اثر مناسب SDS از عمده مزایای استفاده از شوینده های یونی به منظور تهیه بافت دسلولاریزه است اما باقی مانده این ماده شیمیایی از ماتریکس همبندی از عمده مشکلات و عوارض جانبی ناشی از استفاده از آن می باشد. تحقیقاتی بر روی ترکیبات بدون بار زوئترونیک یا خنثی (zwitterionic) از محلول های شوینده آب دوست انجام پذیرفت نتایج حاکی از آن بود که بیشترین میزان حفظ ساختار ماتریکس خارج سلولی روند سلول زدایی نتیجه استفاده از سولفوبتائین ۱۰ و یا سولفوبتائین ۱۶ حاصل گردید استفاده از شوینده با بار الکتریکی خنثی آب دوست شیمیایی توسط Gilbert و همکاران در سال ۲۰۰۶ نشان داد که ترکیب سولفوبتائین ۱۰ و یا سولفوبتائین ۱۶ بیشتر از SDS یونی قادر به برداشت سلول با حفظ GAG و رشته های الاستین ساختار ماتریکس خارج سلولی بوده است این محققان همچنین نشان دادند که غشا پایه بافت ها در استفاده از ترکیبات با بار الکتریکی خنثی کمتر از موارد استفاده از شوینده های یونی (سدیم دی اکسی چولات ۴

SDS و استفاده از شرایط خلأ، ۹۵ درصد از سلول های بافت لیگامان کف پای شترمرغ برداشته شد و این در حالی بود که ساختار سه بعدی بدون تغییر با حفظ خواص ویسکوالاستیسیته حفظ شد و امکان استفاده از این منبع غنی از کلاژن و در دسترس و ارزان قیمت را فراهم نمود (۷)، (۸). Tsuchiya و همکاران در سال ۲۰۱۴ دریافتند که استفاده از اسید ها باعث تخریب ساختار آرشیتکتی ماتریکس خارج سلولی بافت ریه در روند سلول زدایی می گردد که این روند باعث ایجاد فیبروز اما با حداکثر میزان برداشت سلول از بافت به همراه بوده است (۹). تحقیق دیگری توسط Mendoza و همکاران در سال ۲۰۱۶ نشان داد که برداشت سلولی با استفاده از ترکیب اکسید کلسیم بازی میزان GAG (گلیکوزامینوگلیکان) و خواص وزیکوالاستیسیته بافتی و فاکتور های رشد را به میزان قابل توجهی در بافت شریان خوک کاهش می دهد (۴). محققان تحقیق حاضر نشان دادند که خواص وزیکوالاستیسیته و ساختار سه بعدی ماتریکس همبندی خارج سلولی با روش شوینده یونی SDS و خلأ تغییرات معنی داری را به همراه ندارد (۱۰). Dong و همکاران در سال ۲۰۰۹ با استفاده از استیک اسید موفق به سلول زدایی بافت زیر مخاط روده کوچک و ماتریکس مئانه شدند اما این حذف سلولی باعث تخریب کلاژن ماتریکس همبندی و کاهش قدرت کشش بافتی گردیده است. مطالعه حاضر با توجه به انجام آزمایش های قدرت تحمل کشش و تحمل فشار تغییرات معنی داری را نسبت به گروه فراوری نشده نشان نداد. این از اهمیت ویژه در روند استفاده از بافت های اشاره شده در پیوند می باشد (۱۱). Grauss و همکاران در سال ۲۰۰۳ قادر به سلول زدایی درجه ائورت رت با استفاده از شوینده های غیر یونی نشدند و اعلام داشتند که استفاده از شوینده تریتون ایکس ۱۰۰ نهایتاً ۱ تا ۵ درصد قادر به سلول زدایی می باشد، ان ها نتیجه گیری کردند که شوینده های غیر

سلول ها با ساختار کلاژن در پی در معرض قرار گیری طولانی با انزیم تخریب می گردد (۱۶).

Meyer و همکاران در سال ۲۰۰۶ و Brown و همکاران در سال ۲۰۱۱ به ترتیب استفاده از انزیم تریپسین ۰/۵ درصد بر روی دریچه ی ائورت پس از گذشت ۴۸ ساعت و ۰/۲ درصد به مدت یک ساعت در روند سلول زدایی بافت چربی خوک تغییرات ساختاری در ساختمان سه بعدی پروتئین وسیع را به ترتیب مشاهده نمودند (۱۷, ۱۸).

Prasertung سانگ و همکاران در سال ۲۰۰۸ با استفاده از تریپسین یک درصد نشان دادند که در معرض قرارگیری درم پوست خوک بیش از ۲۴ ساعت باعث تغییرات ساختاری در کلاژن می گردد. تحقیق پراسوت سانگ و همکارانشان همچنین نشان داد از سویی که به دلیل ازاد شدن مهارکننده ای پروتئاز های طبیعی از سلول های لیز شده نقش و اثر انزیم ها پس از گذشت ۱۲ ساعت تا میزان ۶۰ درصد کاهش می یابد (۱۹). تحقیقاتی اعلام داشته اند برداشت کامل هسته سلول با ترکیبات شلات کننده نظیر EDTA و EGTA به همراه تریپسین و گاهی با شوینده ها حاصل شده است (۱۴, ۱۹).

سم دریایی لاترونکولین B باعث تخریب اکتین سیتواسکلتال می گردد. استفاده این سم با سالین هیپرتونیک و انزیم دناز (DNase) تخریب کامل هسته سلول در بافت ماهیچه اسکلتی را نشان دادند. میزان استفاده از این ماده شیمیایی، GAG را تا ۴۰ درصد کاهش داد این در حالی است که ساختار فیبریلار عمدتاً بدون تغییر باقی می ماند (۲۰). نتایج حاصل از تحقیقات حاصل با مطالعات محققان متعاقب استفاده از انزیم نظیر Meyer و همکاران و Brown و همکاران موافقت ندارد اما با نتایج Gillies در سال ۲۰۱۱ مطابقت دارد (۲۱).

بنابراین می توان نتیجه گرفت که استفاده از SDS به همراه خلأ نقش مؤثری در تخریب سلول ها و برداشت بقایای

درصد) و شوینده های غیر یونی (تریتون ایکس ۱۰۰) تخریب شده است که در تحقیق حاضر به دلیل نوع ساختار بافتی مورد استفاده یعنی لیگامان کف پای شتر مرغ غشا پایه مورد بررسی ریزیینی قرار نگرفت (۱۴).

Lumpkins و همکاران در سال ۲۰۰۸ نتایج حاصل از استفاده الکل اتانول ۷۵ درصد به همراه استون ۲۵ درصد را به منظور سلول زدایی دیسک مفصل فکی-گیجگاهی خوک منتشر نمودند (۱۵). این محققان ثابت کردند که پس از گذشت ۲۴ ساعت هیچ گونه سلولی و هسته سلولی در مطالعات ریزیینی یافت نشد. ولی سختی بافت دیسک مفصل تا سه برابر پس از در معرض الکل قرار گرفتن افزایش یافت که البته مورد اخیر در مطالعه ما مشاهده نشد. لامپکینز علت سختی بافت را به دلیل نفوذ الکل در داخل سلول و خروج اب از سیتوپلاسم سلول اعلام نمود. حلال های الی از دیگر مواد شیمیایی مورد استفاده در تحقیقات در سلول زدایی بافت ها می باشد که با تخریب اتصال پروتئین به پروتئین باعث جداسازی سلول ها می گردد. تری ان بوتیل فسفات یکی از مواد مورد نظر است. این ترکیب به همراه SDS قابلیت برداشت سلول از بافت های تاندونی و لیگامانی را دارا می باشد. در این تحقیق که توسط Horowitz و همکاران در سال ۱۹۹۲ انجام گردید نشان داد که ساختار کلاژن همبندی، GAG و برداشت بقایای پروتئین های سیتواسکلتال نظیر ویمنتین و تغییر در خواص بیومکانیکی (شامل قدرت کششی و الاستیسیته) پس از روند سلول زدایی، تغییرات بارز و مشخصی را به همراه نداشت (۱۶). نویسندگان مقاله حاضر به نتایج اشاره شده Horowitz و همکاران دست یافتند. در تحقیق Horowitz و همکاران بقایای پروتئین های سیتواسکلتال (به طور مثال ویمنتین) به طور کامل حذف نشد. انزیم ها، به طور بسیار ویژه بر روی سلول های بافتی اثر گذاشته و اتصالات بین سلولی را از یکدیگر گسسته و باعث حذف



- graft. *Journal of Artificial Organs*. 2008;11(2):91-9.
7. McInnes AD, Moser MA, Chen X. Preparation and Use of Decellularized Extracellular Matrix for Tissue Engineering. *Journal of Functional Biomaterials*. 2022;13(4):240.
  8. Moridpour R, Fattahian H, Mortazavi P. Using Cell-free Matrix Derived from Ostrich Plantar Ligament for Repair of Articular Cartilage Defect of Rabbit. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*. 2017;23(5).
  9. Tsuchiya T, Balestrini JL, Mendez J, Calle EA, Zhao L, Niklason LE. Influence of pH on extracellular matrix preservation during lung decellularization. *Tissue Eng Part C Methods*. 2014;20(12):1028-36.
  10. Mendoza-Novelo B, Castellano L, Delgado J, Quintero-Ortega I, Vargas-Mancilla J, Vega-Gonzalez A. Decellularized laminate tissues and their derivatives as templates intended for abdominal wall regeneration. *Materials Letters*. 2016;164:659-64.
  11. Dong X, Wei X, Yi W, Gu C, Kang X, Liu Y, et al. RGD-modified acellular bovine pericardium as a bioprosthetic scaffold for tissue engineering. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2009;20(11):2327-36.
  12. Grauss R, Hazekamp M, Van Vliet S, Gittenberger-de Groot A, DeRuiter M. Decellularization of rat aortic valve allografts reduces leaflet destruction and extracellular matrix remodeling. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*. 2003;126(6).
  13. Liao J, Yang L, Grashow J, Sacks MS. The relation between collagen fibril kinematics and mechanical properties in the mitral valve anterior leaflet. 2007.
  14. Gilbert TW, Sellaro TL, Badylak SF. Decellularization of tissues and organs. *Biomaterials*. 2006;27(19):3675-83.
  15. Lumpkins SB, Pierre N, McFetridge PS. A mechanical evaluation of three decellularization methods in the design of a

سلولی و DNA تا ۹۵ درصد دارد و این در حالی است که ساختار سه بعدی و قدرت کششی و تحمل فشار ساختار لیگامان کف پای شترمرغ تغییر معنی داری نداشته است و می تواند به عنوان منبع وسیع و ارزان قیمت بافت زئوگرافت با حداقل امکان انتقال بیماری های مشترک بین انسان و حیوانات و فارغ از مشکلات شرعی و فقهی با آزمایش ها و بررسی آزمایشگاهی و بالینی در محیط زنده مورد بررسی و محک آزمون قرار گیرد.

### فهرست منابع

1. Banigo AT, Iwuji SC, Iheaturu NC. Application of biomaterials in tissue engineering: a review. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*. 2019;11(4):1-16.
2. Kim TH, Yan J-J, Jang JY, Lee G-M, Lee S-K, Kim BS, et al. Tissue-engineered vascular microphysiological platform to study immune modulation of xenograft rejection. *Science Advances*. 2021;7(22):eabg2237.
3. Fabbriani C, Lucania L, Milano G, Panni AS, Evangelisti M. Meniscal allografts: cryopreservation vs deep-frozen technique An experimental study in goats. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*. 1997;5(2):124-34.
4. Keane TJ, Swinehart IT, Badylak SF. Methods of tissue decellularization used for preparation of biologic scaffolds and in vivo relevance. *Methods*. 2015;84:25-34.
5. Hopf A, Al-Bayati L, Schaefer DJ, Kalbermatten DF, Guzman R, Madduri S. Optimized Decellularization Protocol for Large Peripheral Nerve Segments: Towards Personalized Nerve Bioengineering. *Bioengineering*. 2022;9(9):412.
6. Narita Y, Kagami H, Matsunuma H, Murase Y, Ueda M, Ueda Y. Decellularized ureter for tissue-engineered small-caliber vascular

- xenogenic scaffold for tissue engineering the temporomandibular joint disc. *Acta Biomater.* 2008;4(4):808-16.
16. Horowitz B, Bonomo R, Prince AM, Chin SN, Brotman B, Shulman RW. Solvent/detergent-treated plasma: a virus-inactivated substitute for fresh frozen plasma. *Blood.* 1992;79(3):826-31.
  17. Brown BN, Freund JM, Han L, Rubin JP, Reing JE, Jeffries EM, et al. Comparison of three methods for the derivation of a biologic scaffold composed of adipose tissue extracellular matrix. *Tissue Eng Part C Methods.* 2011;17(4):411-21.
  18. Meyer SR, Chiu B, Churchill TA, Zhu L, Lakey JR, Ross DB. Comparison of aortic valve allograft decellularization techniques in the rat. *J Biomed Mater Res A.* 2006;79(2):254-62.
  19. Prasertsung I, Kanokpanont S, Bunaprasert T, Thanakit V, Damrongsakkul S. Development of acellular dermis from porcine skin using periodic pressurized technique. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2008;85(1):210-9.
  20. Vavken P, Joshi S, Murray MM. TRITON-X is most effective among three decellularization agents for ACL tissue engineering. *J Orthop Res.* 2009;27(12):1612-8.
  21. Gillies AR, Smith LR, Lieber RL, Varghese S. Method for decellularizing skeletal muscle without detergents or proteolytic enzymes. *Tissue Eng Part C Methods.* 2011;17(4):383-9.