

*Research Article***Preparation of Decellularized Bovine Vein Scaffolds and Evaluation of Hyperelastic Models for Use in Vascular Tissue Engineering****Mehrdad Sheikhlou^{1*}, Arash Abdolmaleki², Abbas Sabahi namini³**

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

2- Department of Biophysics, Faculty of Advanced Technologies, University of Mohaghegh Ardabili, Namin, Iran

*Corresponding author: sheikhlou@uma.ac.ir

Received: 10 January 2025

Accepted: 14 March 2025

DOI:

Abstract

Coronary artery disease (CAD) is responsible for approximately 30% of deaths worldwide. The purpose of this research was to prepare a decellularized bovine vein scaffold and compare it with the control sample and evaluate its mechanical behavior. Modeling and selection of structural equations is of vital importance for analyzing the mechanical behavior of tissues. It is common to use hyperelastic structural models to predict the nonlinear behavior of soft tissues, however, hyperelastic models depend on a set of material constants that must be calculated experimentally. In this study, a computational/laboratory method was used to study the nonlinear mechanical behavior of vessel and scaffold tissues under uniaxial tension. Material constants were calculated for three different hyperelastic material models through inverse methods. The search for an optimal value for each set of material constants was performed using the sum of squared error minimization method. The accuracy of the fitted theoretical stress-stretch ratio relationship was evaluated with the experimental results. It was observed that the tissue of the vessel shows more resistance to tension compared to the scaffold; the higher mechanical properties of the vessel are due to the elastin and collagen content in the vessel wall. For the vessel, the Yeo and Ogden models fit well with the laboratory results, but for the scaffold, the best results were obtained with the Yeo model. All of the investigated material models showed less accuracy in the area of small tension ratios. It was observed that three material parameters and in some cases two material parameters are needed to model the mechanical behavior of vessels and scaffolds. Overall, the results show that scaffolds obtained from decellularization are an ideal model for vascular tissue engineering applications, considering the preservation of the main components of the desired tissue as well as appropriate mechanical strength.

Keywords: Mechanical properties, Hyperelastic, Cardiovascular tissue engineering, Regenerative medicine, Scaffold.



مقاله پژوهشی

تهیه داربست‌های سلول‌زدایی‌شده‌ی رگ گاو و ارزیابی مدل‌های هایپرالاستیک به منظور کاربرد در مهندسی بافت عروق

مهرداد شیخلو^{۱*}، آرش عبدالملکی^۲، عباس صباحی نمینی^۱

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

۲- گروه بیوفیزیک، دانشکده فناوری‌های نوین، دانشگاه محقق اردبیلی، نمین، ایران

* مسئول مکاتبات: sheikhlou@uma.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۲/۲۴

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۰/۲۱

DOI:

چکیده

بیماری عروق کرونر مسئول تقریباً ۳۰ درصد از کل مرگ و میرها در سراسر جهان است. هدف از این پژوهش تهیه داربست سلول‌زدایی‌شده رگ گاو و مقایسه آن با نمونه کنترل و همچنین ارزیابی رفتار مکانیکی آن بود. مدل‌سازی و انتخاب صحیح معادلات ساختاری برای تحلیل رفتار مکانیکی بافت‌ها از اهمیت حیاتی برخوردار است. استفاده از مدل‌های ساختاری هایپرالاستیک برای پیش‌بینی رفتار مکانیکی غیر خطی بافت‌های نرم رایج است، با این حال، مدل‌های هایپرالاستیک به مجموعه‌ای از ثابت‌های مواد بستگی دارند که باید به صورت آزمایشگاهی محاسبه شوند. در این مطالعه از یک روش محاسباتی/آزمایشگاهی برای مطالعه رفتار مکانیکی غیرخطی بافت‌های رگ و داربست تحت کشش تک محوری استفاده شد. ثابت‌های ماده برای سه مدل مختلف مواد هایپرالاستیک از طریق روش‌های معکوس محاسبه شد. جستجو برای یک مقدار بهینه برای هر مجموعه از پارامترهای مواد با استفاده از روش مینیمم کردن مجموع مربعات خطا انجام شد. دقت برازش رابطه تنش-نسبت کشش تئوری با نتایج آزمایشگاهی ارزیابی شد. مشاهده شد که بافت رگ در مقایسه با داربست در مقابل کشش مقاومت بیشتری از خود نشان می‌دهد، خواص مکانیکی بالاتر رگ به خاطر الاستین و محتوای کلاژن موجود در دیواره رگ می‌باشد. برای رگ مدل‌های یئو و آگدن به خوبی با نتایج آزمایشگاهی برازش کردند ولی برای داربست بهترین نتایج با مدل یئو به دست آمد. تمام مدل‌های مواد بررسی شده دقت کمتری در ناحیه کشش‌های کوچک نشان دادند. مشاهده شد که برای مدل‌سازی رفتار مکانیکی رگ و داربست به سه پارامتر ماده و در برخی موارد دو پارامتر ماده نیاز است. به طور کلی نتایج نشان می‌دهد که داربست‌های حاصل از سلول‌زدایی با توجه به حفظ ترکیبات اصلی بافت مورد نظر و همچنین مقاومت مکانیکی مناسب، مدلی ایده‌آل برای کاربردهای مهندسی بافت عروق می‌باشد.

کلمات کلیدی: خصوصیات مکانیکی، هایپرالاستیک، مهندسی بافت قلبی عروقی، پزشکی ترمیمی، داربست.

مقدمه

بیماری‌های قلبی عروقی و آترواسکروز همچنان از علل اصلی مرگ‌ومیر در سراسر جهان هستند (۳۸). جراحی‌های بای‌پس به عنوان بهترین راه حل شناخته می‌شوند. با این حال، به دلیل عدم وجود پیوندهای اتولوگ مناسب و محدودیت در استفاده از پیوندهای مصنوعی مانند درد، التهاب و ترومبوز، جایگزین‌های دیگری مورد نیاز است (۱۳، ۲۱). مهندسی بافت به عنوان یک رویکرد امیدوارکننده برای غلبه بر این

موانع در نظر گرفته می‌شود. در عمل، داربست‌های مناسب با سلول‌های اتولوگ کاشته می‌شوند و در محیط تنظیم‌شده کشت می‌شوند. جایگزین زیست تخریب پذیر و کاربردی به دست آمده به عنوان یک پیوند در بدن بیمار برای بازسازی بافت کاشته می‌شود. اثربخشی این رویکرد تا حد زیادی به استفاده از یک منبع سلولی قابل اعتماد و یک داربست سه بعدی مناسب بستگی دارد (۱۲، ۳۹). داربست شامل پروتئین‌ها، فاکتورهای رشد و سیتوکین‌ها است و همچنین سیگنال‌های ماتریکس را برای تسهیل بازسازی بافت بدون ایجاد پاسخ‌های التهابی ارائه می‌دهد (۳، ۳۵). در پرداختن به این موضوع، طیف وسیعی از داربست‌ها بررسی شده است. داربست‌های مصنوعی شکل پذیری خوبی دارند اما شبیه ساختار اصلی بافت نیستند و نمی‌توانند با سلول‌ها تعامل داشته باشند یا سیگنال‌های کافی برای افزایش چسبندگی و تکثیر سلولی ارائه دهند. علاوه بر این، اثربخشی آنها می‌تواند به دلیل واکنش‌های سمی و التهابی محدود شود (۴۳). از سوی دیگر داربست‌های طبیعی از مواد بیولوژیکی طبیعی ساخته می‌شوند و به دلیل زیست سازگاری بالا از واکنش‌های التهابی جلوگیری می‌کنند (۱، ۲، ۳۱). این داربست‌ها همچنین می‌توانند با سلول‌زدایی بافت‌های مختلف با حفظ معماری ماتریکس خارج سلولی (ECM) برای حفظ اثرات القایی آن بر چسبندگی، مهاجرت، تکثیر و تمایز سلولی آماده شوند (۱۱، ۲۵). ماتریکس خارج سلولی همچنین برای سیگنال‌دهی ضروری است و می‌تواند بازسازی بافت را هدایت کند. این ویژگی‌ها منجر به کاربرد گسترده این گروه از داربست‌های طبیعی در مهندسی بافت شده است (۴۲). از طرفی یکی از ویژگی‌های ضروری برای داربست‌های زیستی دارا بودن استحکام مکانیکی کافی است تا بتواند در برابر تنش‌های ناشی از حرکت اندام‌ها و فشار وارده

بر بافت‌های بدن مقاومت کند. رفتار و خواص مکانیکی برخی بافت‌های نرم با رفتار معمول بافت‌های دیگر تفاوت دارد، یکی از مهمترین ویژگی‌های بافت‌های نرم رفتار غیرخطی آنها می‌باشد. برخی از بافت‌های نرم رفتار غیرخطی و پیچیده‌ای بین تنش و کرنش (حتی در کمترین کرنش‌ها) از خود نشان می‌دهند و در کرنش‌های بالا خواص الاستیک خود را حفظ می‌کنند. برای مدل کردن این رفتار غیرخطی، بافت‌های نرم به صورت ماده هایپر الاستیک در نظر گرفته می‌شوند (۲۷). در هنگام مطالعه پاسخ و تکامل اندام‌ها در شرایط فیزیولوژیکی و پاتولوژیک، به دست آوردن مدل‌های ساختاری قابل اعتماد برای رفتار بافت‌ها تحت بارها از اهمیت بالایی برخوردار است. به علت اهمیت این موضوع، تا به امروز مدل‌سازی‌های گوناگونی روی بافت‌های نرم و مواد مشابه نظیر انواع پلیمرها، مواد عروقی و موادی که از خود رفتار هایپر الاستیک نشان می‌دهند، صورت گرفته است (۲۳، ۲۴، ۳۳). هایشی و همکاران بیان کردند که یک رابطه ساختاری ساده، مانند خواص مکانیکی نمایی یا لگاریتمی بافت‌های بیولوژیکی نرم، سودمندتر از روابط پیچیده‌تر مبتنی بر توابع انرژی کرنش است (۱۸). در این فرمول‌های ساده تعداد ضرایب کاهش می‌یابد، در حالی که معنای فیزیکی آنها حفظ می‌شود. از نقطه نظر عملی، بیان خواص الاستیک توسط یک پارامتر واحد مفیدتر از یک عبارت کامل اما ترکیبی بر اساس چندین پارامتر است (۳۷، ۱۵). با این حال، باید توجه داشت که چنین خواص مکانیکی خطی نمی‌تواند رفتار مکانیکی غیرخطی اکثر بافت‌های نرم را پیش‌بینی کند و استفاده از مدل‌های مواد غیرخطی بر اساس توابع چگالی انرژی کرنشی برای شبیه‌سازی دقیق و نتایج مدل‌سازی مهم تلقی می‌شود (۱۹). از این رو هدف از این پژوهش ارزیابی بافتی و استحکام مکانیکی

پس از پارافین‌زدایی با محلول زایلن و آبدهی‌شدن با درجات نزولی از اتانول، نمونه‌ها با همتوکسیلین و ائوزین و DAPI برای بررسی کیفیت سلول‌زدایی رنگ‌آمیزی شدند (۶).

مدل‌های هایپیرالاستیکی: رونالد ریولین (۳۲) و ملوین مونی (۸) برای اولین بار مدل‌های هایپیرالاستیک نئو هوک و و مونی ریولین را ارائه دادند. از آن زمان تا به حال مدل‌های بسیاری برای مواد هایپیرالاستیک ارائه گردیده است که می‌توان به مدل‌های معروف اگدن (۲۸) و آرودا-جویس (۵) و یئو (۴۱) اشاره کرد. روش معمول در مدل‌سازی ساختاری، برازش داده‌های تک محوری به‌دست‌آمده تحت فشرده‌سازی یا کشش کنترل‌شده، با مدل‌های مواد استاندارد است. این به دلیل محدودیت‌های کلی تجربی (و تا حدی تحلیلی) برای انجام ارزیابی مناسب تنش‌ها و تغییر شکل‌ها در موقعیت‌های بارگذاری متعدد است. در این تحقیق برای انتخاب کردن بهترین مدل ساختاری که بتواند رفتار الاستیک غیرخطی بافت رگ و داربست را پیش‌بینی کند، از جعبه ابزار بهینه‌سازی متلب استفاده شد. با استفاده از روش مینیمم کردن مجموع مربعات خطا ($\text{minimizing the sum of square errors}$)، برای هر یک از مدل‌های رفتاری فوق برازش منحنی غیرخطی بر داده‌های آزمایشگاهی بدست آمده از تست کشش اعمال گردید و ضرایب تابع چگالی انرژی کرنشی محاسبه شد.

تئوری هایپیرالاستیک و معادلات ساختاری: رفتار تنش-کرنش مواد هایپیرالاستیک غیرخطی است و برای توصیف رفتار آنها یک مدول الاستیسیته ساده دیگر کافی نمی‌باشد. بنابراین، توصیف رفتار الاستیک مواد غیرخطی بسیار قابل انبساط (highly extensible) از اهمیت بالایی برخوردار است (۱۶). رفتار ساختاری ماده هایپیرالاستیک از تابع چگالی انرژی کرنش (میزان انرژی الاستیک ذخیره شده در

داربست‌های حاصل از سلول‌زدایی رگ گاو می‌باشد. همچنین، در این تحقیق مطالعه آزمایشگاهی و عددی رفتار مکانیکی غیرخطی بافت رگ و داربست و مقایسه آنها انجام شد و خواص هایپیرالاستیک دقیق بافت رگ و داربست ارائه شد که می‌تواند در مدل‌های بیومکانیکی استفاده شود.

مواد و روش‌ها

عروق تازه گاو از کشتارگاه محلی تهیه شده و در بافر فسفات سالین (PBS) سرد حاوی 100 U/ml پنی سیلین و 100 گرم/لیتر استرپتومایسین به آزمایشگاه منتقل شدند. نمونه‌ها در آزمایشگاه به منظور حذف آثار خون، چربی و بافت همبند تمیز شده و سپس جهت سلول‌زدایی در PBS استریل در دمای 20°C - درجه سانتیگراد نگهداری شدند. این پژوهش مطابق با اصول اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه محقق اردبیلی و با کد اخلاقی IR.UMA.REC.1401.089 به تصویب رسیده است.

سلول‌زدایی: عروق گاو در فلاسک‌های استاندارد با Triton X-100 و TnBP در دمای 37°C درجه سانتی-گراد سلول‌زدایی شدند. به طور خلاصه، عروق در محلول $1\% \text{ Triton X-100 (v/v)}$ غوطه‌ور شده و به آرامی به مدت ۱۵ ساعت تکان داده شدند. پس از شستشو با آب مقطر، نمونه‌ها در محلول $1\% \text{ TnBP (v/v)}$ به مدت ۴ ساعت به طور مداوم تکان داده شدند. پس از شستشوی نمونه‌ها با آب مقطر با $1\% \text{ Triton X-100}$ به مدت ۸ ساعت دیگر انکوبه شدند. در نهایت، نمونه قبل از نگهداری در PBS حاوی آنتی‌بیوتیک به مدت ۲۴ ساعت در PBS شستشو داده شدند (۱۰، ۳۴).

ارزیابی‌های بافتی داربست‌های رگ سلول‌زدایی شده: نمونه‌ها پس از فیکس‌شدن، آبگیری و قالب‌گیری با پارافین، از برش‌هایی به قطر ۵ میکرون تهیه شدند.

واحد حجم ماده) بر اساس سه نامتغیر کرنش I_1, I_2 و I_3 به صورت زیر به دست می‌آید (۴):

$$W = W(I_1, I_2, I_3)$$

که در آن I_1, I_2 و I_3 سه نامتغیر تانسور تغییر شکل گرین هستند که برحسب نسبت‌های کشش اصلی λ_1, λ_2 و λ_3 به صورت زیر تعریف می‌شوند:

$$\begin{aligned} I_1 &= \lambda_1^2 + \lambda_2^2 + \lambda_3^2 \\ I_2 &= \lambda_1^2 \lambda_2^2 + \lambda_2^2 \lambda_3^2 + \lambda_1^2 \lambda_3^2 \\ I_3 &= \lambda_1^2 \lambda_2^2 \lambda_3^2 \end{aligned}$$

نسبت‌های کشش اصلی (stretch ratio) مطابق رابطه زیر تعریف می‌شوند: $\lambda = \frac{L_f}{L_0}$

که در رابطه فوق L_f طول نهایی و L_0 طول اولیه هر یک از وجوه نمونه می باشد. بنابراین مقادیر λ_i به وسیله عبارت $(\lambda_i = 1 + \varepsilon_i)$ قابل تعریف است. برای یک ماده تراکم ناپذیر، I_3 برابر صفر بوده و تنها دو نامتغیر دیگر I_1 و I_2 باقی خواهند ماند. به همین دلیل چگالی انرژی کرنشی تابعی از I_1 و I_2 خواهد بود:

$$W = W(I_1 - 3, I_2 - 3)$$

مدل‌های هایپرالاستیک مختلفی وجود دارند که می‌توانند رابطه بین تنش و کرنش را مشخص کنند.

مدل یئو: مدل یئو (۳۰) یک مدل پدیدار شناختی برای تغییر شکل مواد الاستیک تقریباً غیرقابل تراکم و غیرخطی است. تابع چگالی انرژی کرنش فقط به نامتغیر اول کرنش، I_1 بستگی دارد. به آن مدل چند جمله ای کاهش یافته نیز می‌گویند و به صورت زیر

$$W = \sum_{i=1}^n C_{i0} (I_1 - 3)^i$$

نوشته می‌شود: که در آن C_{i0} ثابت‌های ماده هستند. استفاده از جمله‌های مرتبه بالاتر I_1 در تابع چگالی انرژی کرنش یئو، در پیش‌بینی رفتار تنش-کرنش برای موده‌های مختلف تغییر شکل یعنی تک محوری، دو محوری و برشی در کرنش‌های متوسط تا بزرگ مفید است (۹).

مدل آگدن: مدل آگدن یک مدل هایپرالاستیک عمومی است که در آن چگالی انرژی کرنشی به جای نامتغیرهای کرنش بر حسب کشش‌های اصلی بیان می‌شود. تابع چگالی انرژی کرنش آن به صورت زیر بیان می‌شود: $W = \sum_{i=1}^n \frac{\mu_i}{\alpha_i} (\lambda_1^{\alpha_i} + \lambda_2^{\alpha_i} + \lambda_3^{\alpha_i} - 3)$

که در آن μ_i ثابت‌های ماده و α_i ضرایب بی بعد هستند ($\mu_i \alpha_i > 0$). این مدل قابلیت استفاده در تغییر شکل‌های بزرگ را دارد که اندازه‌گیری مقادیر کشش-های اصلی یکی از مزیت‌های مدل آگدن محسوب می‌شود (۲۹).

مدل آرودا-بویس: مدل آرودا-بویس (۲۹) بر اساس زنجیره‌های شبکه‌ی مولکولی تعریف شده است و در آن تابع چگالی انرژی کرنشی بر حسب نامتغیر اول کرنش I_1 به صورت زیر تعریف می‌شود:

$$\begin{aligned} W &= \mu \sum_{i=1}^5 \frac{C_i}{\lambda_m^{2i-2}} (I_1^i - 3^i) \\ C_1 &= \frac{1}{2}, C_2 = \frac{1}{20}, C_3 = \frac{11}{1050}, C_4 = \frac{19}{7000}, C_5 = \frac{519}{673750} \end{aligned}$$

که در آن μ مدول برش و λ_m کشش قفل شدگی است.

محاسبه تنش‌ها در مواد هایپرالاستیک: علت تعریف تابع چگالی انرژی کرنشی این است که روابط تنش-کرنش می‌توانند با دیفرانسیل‌گیری از این تابع نسبت به اندازه کرنش‌ها حاصل گردند. تنش مهندسی را می‌توان از مشتق تابع چگالی انرژی کرنشی نسبت به

$$\sigma_i = \frac{\partial W}{\partial \lambda_i} \quad (۷):$$

کشش محاسبه کرد که در آن σ_i و λ_i به ترتیب تنش مهندسی و نسبت کشش در جهت‌های اصلی هستند. علاوه بر این، بسیاری از مدل‌های ساختاری (constitutive models) بر حسب نامتغیرها نوشته شده‌اند. بنابراین، اگر W

تابعی از I_1 و I_2 باشد، می‌توان تنش مهندسی در جهت i را از رابطه زیر بدست آورد:

$$\sigma_i = \frac{\partial W}{\partial I_1} \frac{\partial I_1}{\partial \lambda_i} + \frac{\partial W}{\partial I_2} \frac{\partial I_2}{\partial \lambda_i}$$

برای تست کشش تک محوری نسبت‌های کشش اصلی به ترتیب برابر $\lambda_1 = \lambda$ ، $\lambda_2 = \lambda_3 = 1/\sqrt{\lambda}$ هستند و نامتغیرهای غیر صفر کرنش از روابط بدست می‌آید: $I_1 = \lambda^2 + 2/\lambda$ و $I_2 = 2\lambda + 1/\lambda^2$

با جایگذاری نامتغیرهای کرنش برای بارگذاری تک محوری از روابط بالا در تابع چگالی انرژی کرنشی مدل‌های ساختاری مواد هایپرالاستیک و مشتق‌گیری نسبت به λ ، تنش مهندسی در جهت اصلی کشش بدست می‌آید. تنش مهندسی محاسبه شده برای هر مدل در جدول ۱ لیست شده است.

روش برازش منحنی و تحلیل خطا: برای برازش سه مدل ساختاری هایپرالاستیک بر روی نتایج آزمایشگاهی تست کشش تک محوری از روش حداقل مربعات استفاده شد. روش حداقل مربعات یک روش عددی استاندارد است که در آن معادلات پیچیده ای $\sigma_t(\lambda)$ تابع $\sigma_e(\lambda)$ بر اساس حداقل مجموع خطاها یا $\sigma_e(\lambda)$ مجموع مربعات خطاها

برازش می‌شوند. با در نظر گرفتن مجموعه‌ای از داده های تنش و نسبت کشش تجربی به صورت (σ_1, λ_1) ، (σ_2, λ_2) ، ...، (σ_n, λ_n) ، مجموع مربعات خطا به صورت زیر تعریف می‌شود:

$sse = \sum_{j=1}^n (\sigma_j - f(\lambda_j, p))^2$ که در آن تابع f به مدل ساختاری انتخاب شده برای مدلسازی رفتار هایپرالاستیک ماده بستگی دارد و برای تست کشش تک محوری از توابع ارائه شده در جدول ۱ استفاده خواهد شد. این تابع علاوه بر نسبت کشش متغیر (λ) در راستای نیروی کششی تک محوری به پارامترهای برداری (p) نیز بستگی دارد. در واقع درایه‌های p ضرایب مدل ساختاری هایپرالاستیک است. هدف یافتن مقداری برای p هست به طوری که به ازای آن sse به حداقل مقدار خود برسد (۲۲). برای ارزیابی بهتر تطابق بین نتایج تئوری $\sigma_t(\lambda)$ و آزمایشگاهی $\sigma_e(\lambda)$ ، داده‌های بافت رگ و داربست را با استفاده از یک خطای نرمالیزه شده (۲۶) در نظر می‌گیریم که نزدیکی بین نتایج تئوری و آزمایشگاهی را در هر سطح کشش نشان می‌دهد. این مانده خطا به صورت درصدی با رابطه زیر تعریف می‌شود:

جدول ۱- تابع تنش مهندسی بر حسب نسبت کشش برای مدل‌های ساختاری استفاده شده

تنش مهندسی محاسبه شده برای کشش تک محوری	مدل هایپرالاستیک
$\sigma_1 = \sum_{i=1}^n 2iC_{i0}(\lambda - 1/\lambda^2)(\lambda^2 + 2/\lambda - 3)^{i-1}$	یثو
$\sigma_1 = \sum_{i=1}^n \mu_i(\lambda^{\alpha_i-1} - \lambda^{-0.5\alpha_i-1})$	آگدن
$\sigma_1 = 2\mu(\lambda - 1/\lambda^2) \sum_{i=1}^5 \frac{iC_i}{\lambda_m^{2i-2}} (\lambda^2 + 2/\lambda)^{i-1}$	آرودا-بویس

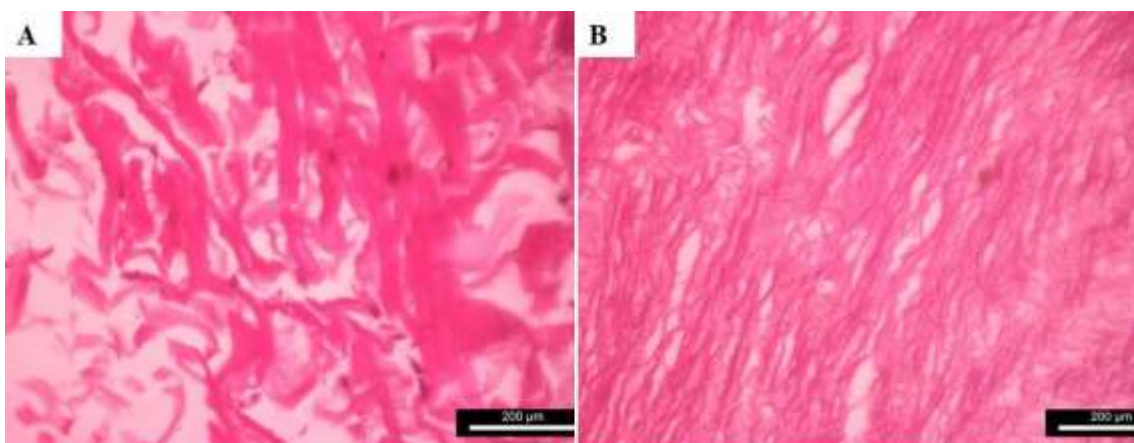
نتایج

آمیزی H&E و DAPI، حذف اجزا و هسته‌های سلولی را تایید کرد. در رنگ‌آمیزی H&E، برخلاف

مقایسه نتایج بافت‌شناسی داربست سلول‌زدایی شده در مقایسه با رگ دست نخورده با استفاده از رنگ-

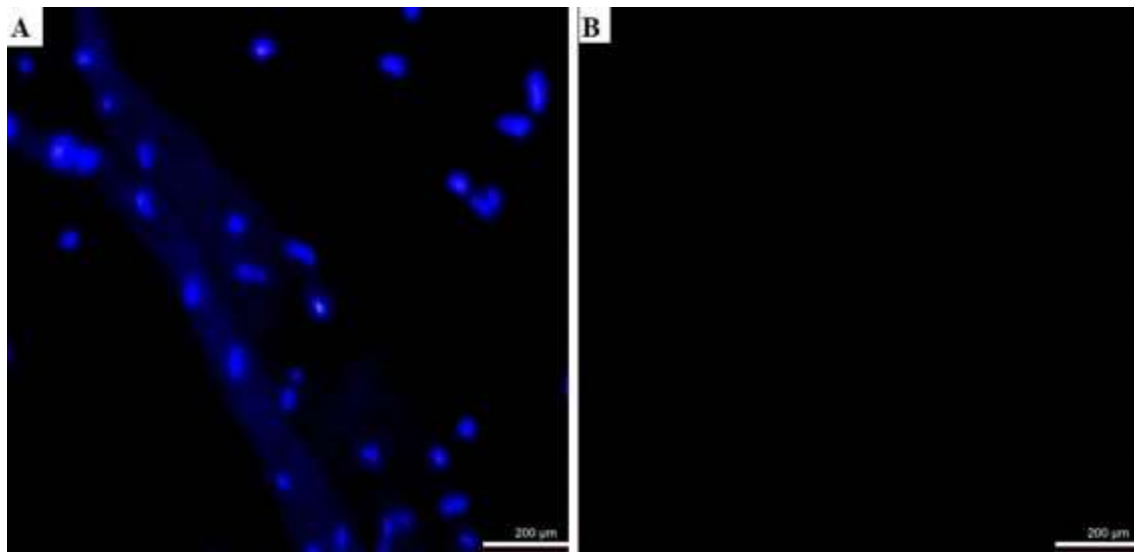
شرایط بارگذاری کلی استفاده کرد. ثابت‌های مواد برای هر مدل تابع چگالی انرژی کرنشی در جدول ۲ فهرست شده است. از مجموع مربعات خطا به عنوان معیار انتخاب مدل مناسب برای پیش‌بینی رفتار مواد هایپرالاستیک استفاده شده است. شکل‌های ۳ و ۴(الف) پاسخ‌های تنش برحسب نسبت کشش تک محوری را برای مدل‌های بررسی‌شده در مقایسه با نتایج آزمایشگاهی به ترتیب برای رگ و داربست نشان می‌دهند. نتیجه آزمایشگاهی رسم شده میانگین مقادیر تولید شده از همه نمونه‌ها است. در شکل‌های ۳ و ۴ (ب) تجزیه و تحلیل خطا برای هر یک از مدل‌های هایپرالاستیک نشان داده شده است.

عروق دست نخورده که هسته‌های سلولی به رنگ بنفش و سیتوپلاسم به رنگ صورتی مشاهده می‌شود (شکل ۱)، در داربست سلول‌زدایی شده هیچ‌گونه هسته سلولی قابل مشاهده نیست (شکل ۱). علاوه بر این، نتایج رنگ‌آمیزی DAPI تأیید کرد که هسته‌های سلولی در عروق سلول‌زدایی شده قابل مشاهده نیستند. در مقابل در عروق دست نخورده هسته‌ها به رنگ آبی فلورسانت دیده می‌شوند (شکل ۲). ضرایب تابع چگالی انرژی مدل‌های هایپرالاستیک پیشنهادی با استفاده از روش برازش منحنی غیرخطی بر روی نتایج آزمایشگاهی تست کشش تک محوری بافت رگ و داربست محاسبه شده‌اند و می‌توان از آنها برای پیش‌بینی پاسخ مکانیکی بافت رگ و داربست تحت



شکل ۱- نتایج حاصل از رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین برای نمونه رگ (A) و برای نمونه داربست (B). همانطور که در تصویر دیده می‌شود در نمونه داربست هسته سلول‌ها حذف شده است.

Fig. 1. Results of hematoxylin-eosin staining for the vessel sample (A) and for the scaffold sample (B). As can be seen in the image, the cell nuclei have been removed in the scaffold sample.

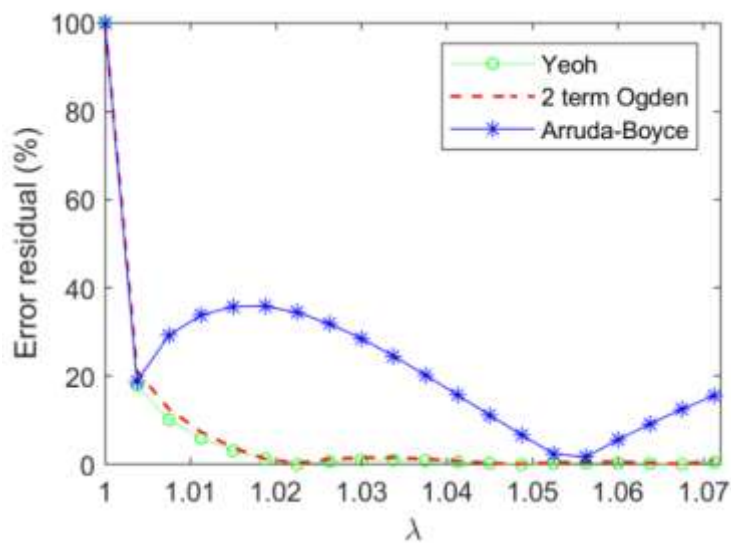


شکل ۲- نتایج حاصل از رنگ آمیزی DAPI برای نمونه رگ (A) و برای نمونه داربست (B). همانطور که در تصویر دیده می‌شود در نمونه داربست هسته‌های درخشان آبی رنگ سلول‌ها حذف شده است.

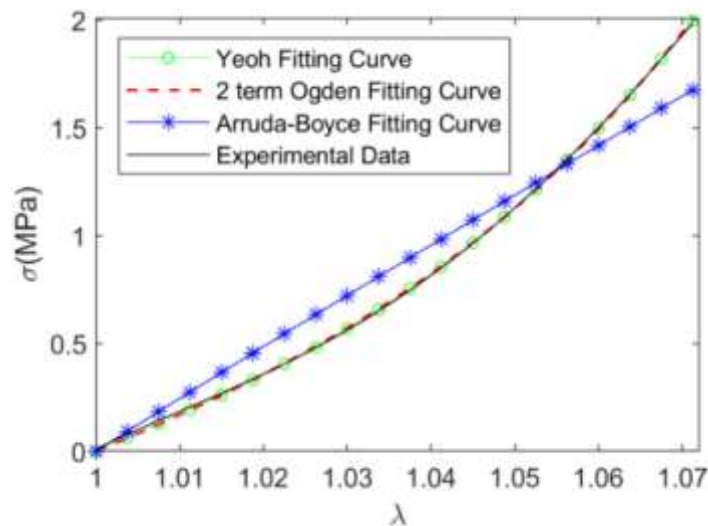
Fig. 2. Results of DAPI staining for the vessel sample (A) and for the scaffold sample (B). As can be seen in the image, the bright blue nuclei of the cells have been removed in the scaffold sample.

جدول ۲- مقدار ضرایب مدل‌های هایپرالاستیک برای رگ و داربست

Table 2. The values of the coefficients of hyperelastic models for the vessel and scaffold			
Hyperelastic models	Parameters	Vessel	Scaffold
3-Parameter Yeoh	C_{10}	2.8343	0.0443
	C_{20}	78.7228	0.0108
	C_{30}	-200.4872	-2.928×10^{-4}
	sse	0.0051	0.0023
2-Parameter Ogden	μ_1	200	4.7707×10^{-12}
	α_1	0.011	1.9119×10^{-10}
	μ_2	0.3105	0.0694
	α_2	27.3750	3.2584
	sse	0.0093	3.3348
Arruda Boyce	μ	1.6166×10^{-17}	0.1755
	λm	0.0058	2.5530
	sse	1.6620	18.7250



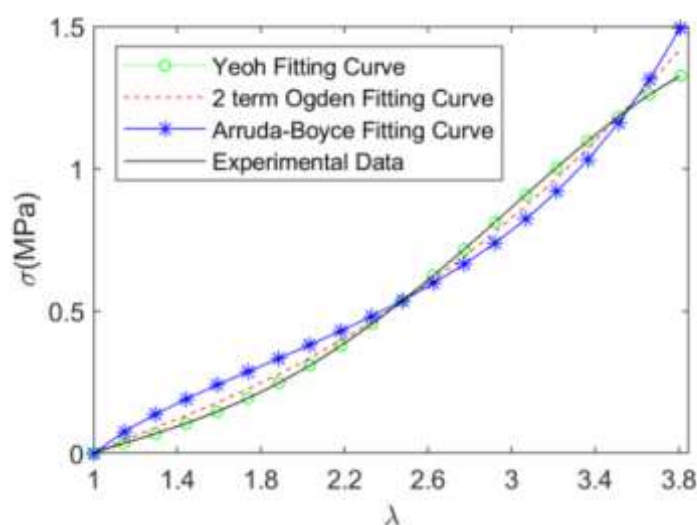
(A)



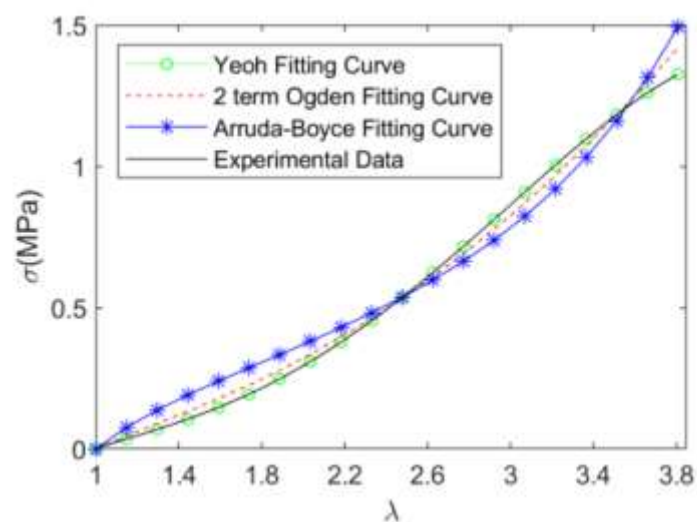
(B)

شکل ۳- مقایسه نتایج تئوری و آزمایشگاهی بدست آمده از تست کشش تک محوری و مدل‌های ساختاری هایپر الاستیک برآزش شده بر آن برای رگ: A: درصد مانده خطا برای مدل‌های ساختاری، B: نمودار تنش مهندسی بر حسب نسبت کشش.

Fig. 3. Comparison of theoretical and experimental results obtained from uniaxial tensile testing and hyperelastic structural models fitted to it for the vessel: A: Residual error percentage for structural models, B: Engineering stress graph in terms of tensile ratio.



(A)



(B)

شکل ۴- مقایسه نتایج تئوری و آزمایشگاهی بدست آمده از تست کشش تک محوری و مدل‌های ساختاری هاپر الاستیک برازش شده بر آن برای داریست: A: درصد مانده خطا برای مدل‌های ساختاری، B: نمودار تنش مهندسی بر حسب نسبت کشش.

Fig. 4. Comparison of theoretical and experimental results obtained from uniaxial tensile testing and hyperelastic structural models fitted to it for scaffolding: A: Residual error percentage for structural models, B: Engineering stress diagram in terms of tensile ratio

بحث

در غیر این صورت یک التهاب حاد می‌تواند باعث رد ایمپلنت شود (۴۰). در اینجا، مفهوم بازسازی بافت پدیدار می‌شود، که یک ریزمحیط ۳ بعدی بیومیمتیک نفوذ سلول‌ها، اتصال آنها و تکثیر را با کشت یک اندام مهندسی شده آسان می‌کند. طی سال‌های گذشته، محققان زمان و تلاش زیادی را برای ایجاد داریست‌های مناسب برای مهندسی بافت عروق خونی

به دلیل افزایش تعداد افرادی که از بیماری‌های عروقی رنج می‌برند، از این رو، تحقیقات بر روی ایمپلنت-های عروقی مصنوعی در حال رونق می‌باشد (۳۰). با این حال، همچنان برای بیماری‌های قلبی عروقی پیشرفته، جراحی بای پس شریان درمان اولیه می‌باشد (۱۷). علاوه بر ابعاد، زیست‌سازگاری ایمپلنت و قابلیت آن برای ادغام با بافت میزبان ضروری است.

صرف کرده‌اند. با این حال، ساختار چند لایه ظریف و پیچیده و تنش‌های چرخه‌ای پیوسته، آن را به‌ویژه در نقاط شریان‌های کوچک چالش‌برانگیز کرده است. انواع پلیمرهای مصنوعی و طبیعی ایجاد شده با روش‌های مختلف تاکنون آزمایش شده‌اند، اما هنوز فاقد شرایط شیمیایی یا فراساختار مناسب هستند، بنابراین معمولاً نمی‌توانند مسیرهای سیگنالینگ و ریزمحیط مناسب برای اتصال و تکثیر سلولی را فراهم کنند (۱۴، ۳۶). داربست‌های سلول‌زدایی شده اخیراً با توجه به ریزساختار طبیعی خود، مورد توجه بسیاری قرار گرفته‌اند. دو روش اصلی شیمیایی و فیزیکی برای سلول‌زدایی بافت وجود دارد (۳۰). در بین تمامی روش‌های سلول‌زدایی، پروتکل‌های سلول‌زدایی شیمیایی با استفاده از مواد شوینده یکی از ساده‌ترین، ارزان‌ترین و پرکاربردترین روش‌ها هستند. مواد شوینده می‌توانند غشای سلولی و بخش‌های سلولی را مختل کنند و همچنین DNA را از پروتئین‌ها جدا کنند (۲۰). در این مطالعه، با استفاده از روش سلول‌زدایی شیمیایی، نتایج رنگ‌آمیزی H&E و DAPI حذف هسته‌های سلولی و اجزای سلولی از عروق سلول‌زدایی شده را تأیید کردند. همچنین Zhiwen Cai و همکاران در مطالعه خود، از Triton X-100 و SDS با غلظت‌های مختلف برای سلول‌زدایی عروق خوک استفاده کرده‌اند و یافته‌های آن‌ها حاکی از این بوده است که رویکرد سلول‌زدایی Triton X-100 ۰/۵ درصد برای ۲۴ ساعت همراه با SDS ۰/۲۵ درصد برای ۷۲ ساعت می‌تواند به دستیابی به عروق سلول‌زدایی با حداقل تخریب کمک کند (۱۰). با توجه به شکل‌های ۳ و ۴ (ب) می‌توان مشاهده کرد که برای هر مدل، خطاها همیشه در ناحیه کشش‌های کوچک بیشتر است. مطابق شکل‌ها مدل آرودا-بویس قادر به پیش‌بینی رفتار غیرخطی بافت رگ و داربست تحت شرایط بارگذاری کشش تک

محوری نمی‌باشد. با توجه به شکل ۳ می‌توان مشاهده کرد که تابع‌های چگالی انرژی کرنشی آگدن و یئو رفتار مشابهی دارند و هر دو تابع توانایی کافی برای پیش‌بینی رفتار بافت رگ را برای محدوده داده‌های آزمایش از خود نشان می‌دهند، چون مقدار تغییر شکل‌ها برای رگ کوچک است. با توجه به شکل ۴ می‌توان مشاهده کرد که تابع‌های چگالی انرژی کرنشی آگدن و یئو برای تغییر شکل‌های کوچک رفتار مشابهی دارند ولی برای تغییر شکل‌های بزرگ تابع یئو رفتار بهتری دارد و می‌توان گفت که مدل یئو توانایی عالی برای مدل‌سازی رفتار داربست برای کل محدوده داده‌های آزمایش از خود نشان می‌دهد. با توجه به شکل‌ها می‌توان مشاهده کرد که داربست نسبت به رگ تغییر شکل‌های بزرگتری دارد و بنابر این رفتار غیر خطی بیشتری نسبت به رگ خواهد داشت و مدل یئو که شامل ترم‌های غیرخطی مرتبه بالاتر است رفتار هائپرالاستیک غیر خطی داربست را بهتر می‌تواند پیش‌بینی کند. با توجه به نتایج ارائه شده می‌توان نتیجه گرفت که تابع چگالی انرژی کرنشی یئو برای مدل‌سازی رفتار هائپرالاستیک رگ و داربست مدل رفتاری مناسبی می‌باشد. علیرغم نتایج امیدوارکننده، مطالعه کنونی ما همچنان محدودیت‌هایی، همچون عدم ارزیابی اثرات غلظت‌های مختلف تریتون و TnBP را بر سلول‌زدایی عروق دارد. نتایج روش سلول‌زدایی شیمیایی مورد استفاده در مطالعه کنونی نشان داد که می‌تواند با موفقیت عروق گاو را سلول‌زدایی کند. در این مقاله خواص مکانیکی رگ و داربست با استفاده از ابزار تست کششی تک محوری بررسی گردید و خواص مکانیکی این مواد هائپرالاستیک مشخص شد. برای این منظور، توابع چگالی انرژی کرنش آگدن، یئو و آرودا-بویس استفاده شد. از مزایای این مدل‌ها می‌توان به کلی بودن آنها و تعداد نسبتاً کم پارامترهای مواد اشاره کرد.

protein-based biomaterials. *Biochemical Society Transactions*, 49(2):953-964.

4. Ali, A., Hosseini, M., Sahari, B. 2010. A review of constitutive models for rubber-like materials. *American Journal of Engineering and Applied Sciences*, 3(1):232-239.

5. Arruda, E.M., Boyce, M.C. 1993. A three-dimensional constitutive model for the large stretch behavior of rubber elastic materials. *Journal of the Mechanics and Physics of Solids*, 41(2):389-412.

6. Arzanipur, Y., Abdolmaleki, A., Asadi, A., Zahri, S. 2021. Synthesis, Characterization, Evaluation of Supportive Properties, and Neuroprotective Effects of Cerium Oxide Nanoparticles as a Candidate for Neural Tissue Engineering. *The Neuroscience Journal of Shefaye Khatam*, 9(3):55-63.

7. Attard, M.M., Hunt, G.W. 2004. Hyperelastic constitutive modeling under finite strain. *International Journal of Solids and Structures*, 41(18-19):5327-5350.

8. Boulanger, P., Hayes, M. 2001. Finite-amplitude waves in Mooney-Rivlin and Hadamard materials. *Topics in finite elasticity*: Springer; p:131-167.

9. Boyce, M.C., Arruda, E.M. 2000. Constitutive models of rubber elasticity: a review. *Rubber Chemistry and Technology*, 73(3):504-23.

10. Cai, Z., Gu, Y., Xiao, Y., Wang, C., Wang, Z. 2021. Porcine carotid arteries decellularized with a suitable concentration combination of Triton X-100 and sodium dodecyl sulfate for tissue engineering vascular grafts. *Cell and Tissue Banking*, 22:277-286.

11. Celikkin, N., Rinoldi, C., Costantini, M., Trombetta, M., Rainer, A., Świążkowski, W. 2017. Naturally derived proteins and glycosaminoglycan scaffolds for tissue engineering applications. *Materials Science and Engineering: C*, 78:1277-1299.

از مجموع مربعات خطاها (SSE) به عنوان شاخصی برای تعیین مناسب‌ترین مدل استفاده شد. مشاهده شد که بافت رگ در مقایسه با داربست در مقابل کشش مقاومت بیشتری از خود نشان می‌دهد، خواص مکانیکی بالاتر رگ به خاطر الاستین و محتوای کلاژن موجود در دیواره رگ می‌باشد. برای رگ مدل‌های یئو و آگدن به خوبی با نتایج آزمایشگاهی برازش کردند ولی برای داربست بهترین نتایج با مدل یئو به دست آمد. تمام مدل‌های ساختاری بررسی شده در ناحیه کشش‌های کوچک دقت کمتری داشتند. مشاهده شد که برای مدل‌سازی رفتار مکانیکی رگ و داربست به سه پارامتر ماده و در برخی موارد دو پارامتر ماده نیاز است.

نتیجه‌گیری

به‌طور کلی نتایج نشان می‌دهد که داربست‌های حاصل از سلول‌زدایی با توجه به حفظ ترکیبات اصلی بافت مورد نظر و همچنین مقاومت مکانیکی مناسب، مدلی ایده‌آل برای کاربردهای مهندسی بافت بوده و امکان استفاده بالینی از این داربست‌ها را برای اختلالات عروق محیطی فراهم می‌کند.

منابع

1. Abbaszadeh, S., Asadi, A., Zahri, S., Abdolmaleki, A., Mahmoudi, F. 2020. Does phenytoin have neuroprotective role and affect biocompatibility of decellularized sciatic nerve scaffold? *Gene, Cell and Tissue*, 8(1):e108726.
2. Abdolmaleki, A., Ghayour, M.B., Zahri, S., Asadi, A., Behnam-Rassouli, M. 2019. Preparation of acellular sciatic nerve scaffold and its mechanical and histological properties for use in peripheral nerve regeneration. *Tehran University Medical Journal*, 77(2):115-122.
3. Agnieray, H., Glasson, J., Chen Q., Kaur, M., Domigan, L. 2021. Recent developments in sustainably sourced

- promising approach for preparation of extracellular matrix. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 159(1):12-17.
21. Huang, H., Hsu, S. 2013. Current advances of stem cell-based approaches to tissue-engineered vascular grafts. *OA Tissue Engineering*, 1(1):2.
22. Kelley, C.T. 1999. Iterative methods for optimization. In SIAM (Society for Industrial and Applied Mathematics Philadelphia) *Frontiers in Applied Mathematics* (Vol. 19). Philadelphia, PA: Society for Industrial and Applied Mathematics.
23. Khajehsaeid, H., Arghavani, J., Naghdabadi, R. 2013. A hyperelastic constitutive model for rubber-like materials. *European Journal of Mechanics-A/Solids*, 38:144-151.
24. Khalil, A.S., Bouma, B.E., Kaazempur Mofrad, M.R. 2006. A combined FEM/genetic algorithm for vascular soft tissue elasticity estimation. *Cardiovascular Engineering*, 6(3):93-102.
25. Lee, E., Milan, A., Urbani, L., De Coppi, P., Lowdell, M.W. 2017. Decellularized material as scaffolds for tissue engineering studies in long gap esophageal atresia. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 17(5):573-584.
26. Meaney, D.F. 2003. Relationship between structural modeling and hyperelastic material behavior: application to CNS white matter. *Biomechanics and Modeling in Mechanobiology*, 1(4):279-293.
27. Mehrabian, H., Samani, A., 2008. An iterative hyperelastic parameters reconstruction for breast cancer assessment. *Proc. SPIE 6916, Medical Imaging 2008: Physiology, Function, and Structure from Medical Images*, 69161C (12 March 2008), <https://doi.org/10.1117/12.770971>.
28. Ogden, R.W. 1972. Large deformation isotropic elasticity—on the correlation of
12. Chan, X.Y., Elliott, M.B., Macklin, B., Gerecht, S. 2017. Human pluripotent stem cells to engineer blood vessels. *Engineering and Application of Pluripotent Stem Cells*, 147-168.
13. Chen, S.G., Ugwu, F., Li W.C., Caplice, N.M., Petcu, E., Yip, S.P. 2021. Vascular tissue engineering: advanced techniques and gene editing in stem cells for graft generation. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 27(1):14-28.
14. Dimopoulos, A., Markatos, D.N., Mitropoulou, A., Panagiotopoulos, I., Koletsis, E., Mavrilas, D. 2021. A novel polymeric fibrous microstructured biodegradable small-caliber tubular scaffold for cardiovascular tissue engineering. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 32:1-12.
15. Fung, Y., Fronek, K., Patitucci, P. 1979. Pseudoelasticity of arteries and the choice of its mathematical expression. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 237(5):H620-H631.
16. Gent, A.N. 2012. *Engineering with rubber: how to design rubber components*: Carl Hanser Verlag GmbH Co KG, 3rd Edition, 451 p.
17. Hannan, E.L., Racz, M.J., Walford, G., Ryan, T.J., Isom, O.W., Bennett, E., 2003. Predictors of readmission for complications of coronary artery bypass graft surgery. *Jama*, 290(6):773-80.
18. Hayashi, K. 1993. Experimental approaches on measuring the mechanical properties and constitutive laws of arterial walls. *Journal of Biomechanical Engineering*, 115(4B):481-488.
19. Hellevik, L.R., Kiserud, T., Irgens, F., Stergiopoulos, N., Hanson, M. 1998. Mechanical properties of the fetal ductus venosus and umbilical vein. *Heart and Vessels*, 13(4):175-180.
20. Hrebikova, H., Diaz, D., Mokry, J. 2015. Chemical decellularization: a

36. Su, Z., Xing, Y., Wang, F., Xu, Z., Gu, Y. 2022. Biological small-calibre tissue engineered blood vessels developed by electrospinning and in-body tissue architecture. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 33(10):67.
37. Vaishnav, R.N., Young, J.T., Patel, D.J. 1973. Distribution of stresses and of strain-energy density through the wall thickness in a canine aortic segment. *Circulation Research*, 32(5):577-583.
38. Virani, S.S., Alonso, A., Aparicio, H.J., Benjamin, E.J., Bittencourt, M.S., Callaway C.W., et al. 2021; Heart disease and stroke statistics—2021 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*, 143(8):e254-e743.
39. Wang, L., Hu, J., Sorek, C.E., Chen, E.Y., Ma, P.X., Yang, B. 2016; Fabrication of tissue-engineered vascular grafts with stem cells and stem cell-derived vascular cells. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 16(3):317-330.
40. Williams, D.F. 2008. On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials*, 29(20):2941-2953.
41. Yeoh, O.H. 1993. Some forms of the strain energy function for rubber. *Rubber Chemistry and Technology*, 66(5):754-771.
42. Yi, S., Ding, F., Gong, L., Gu, X. 2017. Extracellular matrix scaffolds for tissue engineering and regenerative medicine. *Current Stem Cell Research and Therapy*, 12(3):233-246.
43. Zhao, P., Gu, H., Mi, H., Rao, C., Fu, J., Turng, L.S. 2018. Fabrication of scaffolds in tissue engineering: A review. *Frontiers of Mechanical Engineering*, 13(1):107-119.
- theory and experiment for incompressible rubberlike solids. *Proceedings of the Royal Society of London A Mathematical and Physical Sciences*, 326(1567):565-84.
29. Ogden R.W. 1997. Non-Linear Elastic Deformations. Courier Corporation, Chelmsford.
30. Omid, H., Abdollahi, S., Bonakdar, S., Haghighipour, N., Shokrgozar, M.A., Mohammadi, J. 2023. Biomimetic vascular tissue engineering by decellularized scaffold and concurrent cyclic tensile and shear stresses. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 34(3):12.
31. Rajab, T.K., O'Malley, T.J., Tchantchaleishvili, V. 2020. Decellularized scaffolds for tissue engineering: Current status and future perspective. *Artificial Organs*, 44(10):1031-1043.
32. Rivlin, R.S., Barenblatt, G.I. 2013. Collected papers of RS Rivlin. Springer New York, 2829 p.
33. Sasso, M., Palmieri, G., Chiappini, G., Amodio, D. 2008. Characterization of hyperelastic rubber-like materials by biaxial and uniaxial stretching tests based on optical methods. *Polymer Testing*, 27(8):995-1004.
34. Schneider, K.H., Enayati, M., Grasl, C., Walter, I., Budinsky, L., Zebic, G., 2018. Acellular vascular matrix grafts from human placenta chorion: Impact of ECM preservation on graft characteristics, protein composition and in vivo performance. *Biomaterials*, 177:14-26.
35. Stegemann, J.P., Kaszuba, S.N., Rowe, S.L. 2007. Advances in vascular tissue engineering using protein-based biomaterials. *Tissue Engineering*, 13(11):2601-2613.