

ارزیابی بیومکانیکی مدل‌های هایپرالاستیک داربست عصبی

مهرداد شیخلو، آرش عبدالملکی

- ۱- استادیار، گروه علوم مهندسی، دانشکده فن آوری‌های نوین، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران
- ۲- استادیار، گروه بیوانفورماتیک، دانشکده فن آوری‌های نوین، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

Email: sheikhlou@uma.ac.ir
Email: abdolmalekiarash1364@uma.ac.ir

چکیده

پیش بینی خصوصیات مکانیکی بافت های نرم برای تولید ایمپلنت ها از اهمیت حیاتی برخوردار است. به دلیل رفتار مکانیکی غیرخطی که معمولاً این بافت ها از خود نشان می دهند، از مدل های ساختاری هایپرالاستیک برای مدلسازی رفتار مکانیکی این مواد استفاده می شود. در این مطالعه رفتار مکانیکی نمونه هایی از عصب و داربست سلول زدایی شده آن با ابعاد مشخص تحت آزمایش کشش تک محوری قرار گرفته است و ثابت های ماده برای توابع چگالی انرژی کرنش دو مدل مختلف مواد هایپرالاستیک از طریق روش های معکوس محاسبه شده است. از جعبه ابزار بهینه سازی نرم افزار متلب برای برازش داده های تجربی استفاده شده است. در این الگوریتم جستجو برای یافتن یک مقدار بهینه برای هر مجموعه از پارامترهای مواد با استفاده از روش مینیمم مجموع مربعات خطا انجام می شود. نتایج بدست آمده نشان داد که مدل مونی-ریولین پنج جمله ای با دقت بسیار خوبی قادر به پیش بینی رفتار مکانیکی غیرخطی داربست سلول زدایی شده بافت عصب می باشد.

کلمات کلیدی: بافت عصب سیاتیک، ترمیم، داربست سلول زدایی شده، رفتار هایپرالاستیک.

۱. مقدمه

پزشکی ترمیمی شاخه ای از علم پزشکی است که هدف آن جایگزینی بافت های از بین رفته با بافت زنده و دارای عملکرد مناسب، می باشد. در این شاخه از علم، پزشکان، از سلول و به خصوص سلول های بنیادی برای جبران سلول های از دست رفته بافتی، از دارو برای تحریک و فعال سازی سازوکارهای ترمیمی موجود در بدن، و از مهندسی بافت برای ایجاد بافت در آزمایشگاه و پیوند آن به جای بافت از بین رفته استفاده می کنند. هدف پزشکی ترمیمی احیا عملکرد بافت یا اندام آسیب دیده یا جایگزینی آن با اجزا زنده

است [۳-۱]. در جراحات منجر به قطع اعصاب محیطی، در صورتی که فاصله ایجاد شده میان دو سر عصب کمتر ۱ تا ۲ سانتیمتر (در انسان) باشد می توان با بخیه زدن انتها به انتهای دو سر عصب تا حدودی زمینه ترمیم عصب را فراهم آورد. ولیکن در فواصل طولانی تر به دلیل ایجاد تانسین ناشی از کشش اتصال مستقیم امکان پذیر نیست [۴]. در این موارد روش درمانی مورد استفاده در کلینیک که به استاندارد طلایی معروف است پیوند اتوگرافت های عصبی جهت پر کردن فاصله میان دو سر پروگزیمال و دیستال عصب قطع شده است [۵]. با این حال بکارگیری اتوگرافت های عصبی نیز دارای محدودیت هایی همچون نیاز به جراحی ثانویه، از دست رفتن عملکرد حسی اندام دهنده پیوند و احتمال شکل گیری نوروما و تولید درد می باشد. به همین دلیل پژوهشگران حوزه ترمیم اعصاب و مهندسی بافت به دنبال روش های جایگزینی هستند که ضمن کارایی درمانی بالا محدودیت های فوق الذکر را نداشته باشند [۶]. داربست های زیستی با شبیه سازی ماتریکس خارج سلولی اعصاب محیطی بستر مناسبی را برای رشد آکسون های در حال ترمیم فراهم می آورند. چنین داربست هایی باید ویژگی هایی همچون استحکام مکانیکی مناسب، عدم ایجاد پاسخ ایمنی، قابلیت سیگنالینگ، تخلخل و قطر منافذ مناسب به منظور تغذیه سلول ها و دفع ضایعات سلولی به خارج داربست و قابلیت رگ زایی داشته باشند [۷]. برخی از بافت های نرم می توانند تغییر شکل های بزرگی را تحمل نموده و پس از باربرداری به حالت اولیه باز گردند، به همین دلیل این مواد را به عنوان مواد هایپرالاستیک می شناسند. روابط تنش- کرنش مواد هایپرالاستیک با فرض رفتار همسانگرد و تراکم ناپذیر بودن توسط رونالد ریولین [۸] و ملوین مونی [۹] بررسی گردید، آنها برای اولین بار مدل های هایپرالاستیک نئو هوک و و مونی- ریولین را ارائه دادند. هدف از پژوهش حاضر ارزیابی ویژگی های بیومکانیکی مدل های هایپرالاستیک داربست های سلول زدایی شده عصبی تهیه شده در مقایسه با عصب تازه جهت کاربرد در ترمیم اعصاب محیطی بود. در این تحقیق برای انتخاب کردن بهترین مدل ساختاری که بتواند رفتار الاستیک غیرخطی بافت عصب و داربست را پیش بینی کند، از جعبه ابزار بهینه سازی متلب استفاده شد. با استفاده از روش مینیم کردن مجموع مربعات خطا، برای هر یک از مدل های رفتاری برازش منحنی غیر خطی بر داده های آزمایشگاهی بدست آمده از تست کشش اعمال گردید و ضرایب تابع چگالی انرژی کرنشی محاسبه شد.

۲. مواد و روش ها

۲.۱. آماده سازی داربست های عصبی سلول زدایی شده:

به منظور تهیه داربست های فاقد سلول، قطعاتی به طول ۲۰ میلی متر از عصب سیاتیک موش های صحرایی در بالاتر از محل سه شاخه شدن عصب برداشته شد و پس از پاکسازی بافت های زائد به روش ساندل [۱۰] سلول زدایی شدند. بطور خلاصه در این روش ابتدا قطعات عصب سیاتیک به مدت ۷ ساعت در آب مقطر دیونیزه غوطه ور می شوند. 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 زدائی شده در بافر فسفات (PBS) ۱۰ میلی مولار حاوی پنی سیلین / جنتامایسین با $\text{PH} = 7.2$ و دمای ۴ درجه سانتیگراد ذخیره گردید.

۲.۲. ارزیابی های بافتی داربست های عصبی سلول زدایی شده:

بعد از فیکس کردن، آبگیری و قالبگیری با پارافین توسط میکروتوم برشهایی با قطر ۵ میکرون تهیه شد. برای رنگ آمیزی مقاطع بافتی، ابتدا مقاطع با محلول زایلین، پارافین زدایی شدند و سپس توسط اتانول با درجات نزولی آبدهی شدند، در ادامه رنگ آمیزی با هماتوکسیلین و اتوزین برای بررسی مقاطع عصب و داربست صورت گرفت.

۳. تئوری هایپرالاستیک و معادلات ساختاری

رفتار متشکله ماده هایپرالاستیک از تابع چگالی انرژی کرنش (W) بر اساس سه نامتغیر کرنش I_1 ، I_2 و I_3 به دست می آید. چگالی انرژی کرنشی برابر انرژی ذخیره شده در واحد حجم ماده مرجع به عنوان تابعی از کرنش در آن نقطه از ماده است و برای یک ماده تراکم ناپذیر ($I_3 = 0$) به صورت زیر خواهد بود [۱۱]:

$$W = f(I_1, I_2) \quad (۱)$$

که در آن I_1 ، I_2 و I_3 سه نامتغیر تانسور تغییر شکل گرین هستند که برحسب نسبت های کشش اصلی λ_1 ، λ_2 و λ_3 به صورت زیر تعریف می شوند:

$$\begin{aligned} I_1 &= \lambda_1^2 + \lambda_2^2 + \lambda_3^2 \\ I_2 &= \lambda_1^2 \lambda_2^2 + \lambda_2^2 \lambda_3^2 + \lambda_1^2 \lambda_3^2 \end{aligned} \quad (۲)$$

نسبت های کشش اصلی (stretch ratio) مطابق رابطه زیر تعریف می شوند:

$$\lambda = \frac{L_f}{L_0} \quad (۳)$$

که در رابطه فوق L_f طول نهایی و L_0 طول اولیه هر یک از وجوه می باشد. بنابراین مقادیر λ_i به وسیله عبارت $(\lambda_i = 1 + \varepsilon_i)$ قابل تعریف است.

۳.۱. روابط مدل های رفتاری در مواد هایپرالاستیک:

مدل نتوهوک: این مدل ساده ترین مدل هایپرالاستیک است. برخلاف قانون هوک که برای پیش بینی رفتار الاستیک خطی مواد استفاده می شود، مدل نتوهوک [۸] برای پیش بینی رفتار تنش - کرنش غیر خطی مواد به کار می رود. استفاده از آن ساده است و می تواند در کرنش های نسبتاً کوچک تقریب خوبی از رفتار ماده داشته باشد. اما برای کرنش های بالا نمی تواند رفتار تنش - کرنش را درست پیش بینی کند. این مدل بر اساس نامتغیر اول کرنش به صورت زیر بیان می شود:

$$W = C_{10}(I_1 - 3) \quad (۴)$$

که در آن C_{10} یک ثابت ماده است.

مدل مونی-ریولین: مدل مونی-ریولین شکل بهبود یافته مدل نئو هوک است. این مدل کاستی‌های مدل نئو هوک را با اضافه کردن جمله‌های شامل نامتغیر دوم (I_2)، بر طرف کرده است. این مدل برای مدل‌سازی رفتار غیرخطی مواد تراکم ناپذیر در کرنش‌های بزرگ متداول است. می‌توان آن را بر حسب نامتغیرهای اول و دوم کرنش به صورت زیر بیان کرد [۹، ۱۲]:

$$W = \sum_{i+j=1}^n C_{ij}(I_1 - 3)^i(I_2 - 3)^j \quad (5)$$

این سری اغلب کوتاه می‌شود تا عبارت‌های کمتری را شامل شود، در غیر این صورت مجهولات موجود در معادله به طور قابل توجهی افزایش می‌یابد. تابع انرژی کرنش مونی-ریولین سه جمله‌ای به صورت زیر ارائه می‌شود:

$$W = C_{10}(I_1 - 3) + C_{01}(I_2 - 3) + C_{11}(I_1 - 3)(I_2 - 3) \quad (6)$$

تابع انرژی کرنش مونی-ریولین پنج جمله‌ای که شامل ترم‌های مرتبه بالاتر نامتغیر اول کرنش I_1 می‌باشد و برای پیش‌بینی رفتار غیر خطی مواد در بازه کرنش‌های بزرگتر قابل استفاده است به صورت زیر ارائه می‌شود:

$$W = C_{10}(I_1 - 3) + C_{01}(I_2 - 3) + C_{11}(I_1 - 3)(I_2 - 3) + C_{20}(I_1 - 3)^2 + C_{30}(I_1 - 3)^3 \quad (7)$$

۳.۲. محاسبه تنش‌ها در مواد هایپر الاستیک:

با جایگذاری نامتغیرهای کرنش برای بارگذاری تک محوری در جهت ۱ در تابع چگالی کرنشی مدل نئو هوک و مشتق‌گیری نسبت به λ ، تنش مهندسی در همان جهت از رابطه زیر بدست می‌آید [۱۳]:

$$\sigma_1 = 2C_{10}(\lambda - 1/\lambda^2) \quad (8)$$

با جایگذاری نامتغیرهای کرنش برای بارگذاری تک محوری در جهت ۱ در تابع چگالی کرنشی مدل مونی-ریولین و مشتق‌گیری نسبت به λ ، تنش مهندسی در همان جهت از روابط زیر بدست می‌آید [۱۳]:

سه جمله‌ای:

$$\sigma_1 = 2C_{10}(\lambda - 1/\lambda^2) + 2C_{01}(1 - 1/\lambda^3) + 6C_{11}(\lambda^2 - \lambda - 1 + 1/\lambda^2 + 1/\lambda^3 - 1/\lambda^4) \quad (9)$$

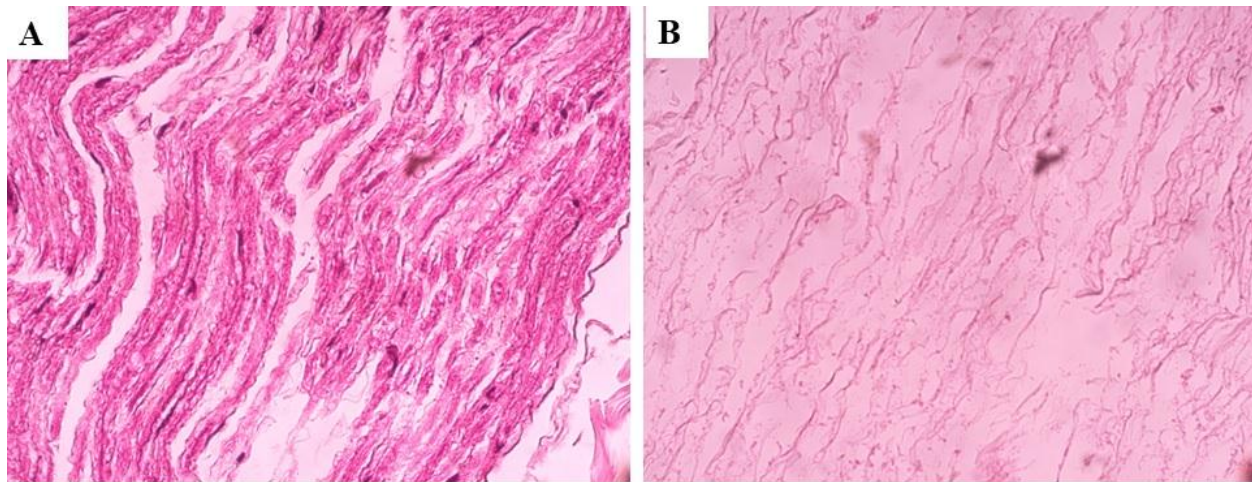
پنج جمله‌ای:

$$\sigma_1 = 2C_{10}(\lambda - 1/\lambda^2) + 2C_{01}(1 - 1/\lambda^3) + 6C_{11}(\lambda^2 - \lambda - 1 + 1/\lambda^2 + 1/\lambda^3 - 1/\lambda^4) + 4C_{20}(\lambda^3 - 3\lambda + 3/\lambda^2 - 2/\lambda^3 + 1) + 4C_{02}(2\lambda - 1/\lambda^2 + 3/\lambda^3 - 1/\lambda^5 - 3)$$

۳. نتایج

۳.۱. حاصل از بررسی بافت شناسی داربست‌های سلول‌زدایی شده عصب سیاتیک در سطح میکروسکوپ نوری:

سلول‌زدایی مناسب، فرایندی 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 بافت شناسی داربست سلول‌زدایی شده در مقایسه با عصب دست نخورده با استفاده از رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین (H&E) نشان داد که در داربست‌های سلول‌زدایی شده هیچ گونه هسته سلولی دیده نمی‌شود اما در مقطع عصب دست نخورده هسته سلول‌ها به رنگ بنفش قابل مشاهده است (شکل ۱)، که نشان دهنده حذف کامل سلول‌ها در فرایند سلول‌زدایی می‌باشد.



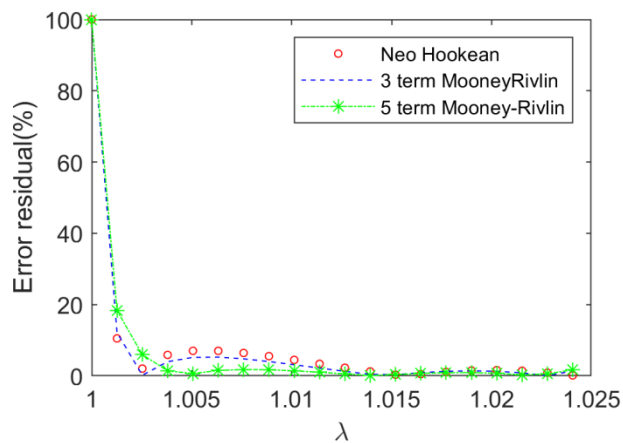
شکل ۱: تصویر بافت عصب سیاتیک نمونه کنترل (A) و داربست سلول‌زدایی شده (B). تصویر نشان دهنده حذف کامل سلول‌ها در نمونه داربست می‌باشد.

۳.۲. نتایج عددی:

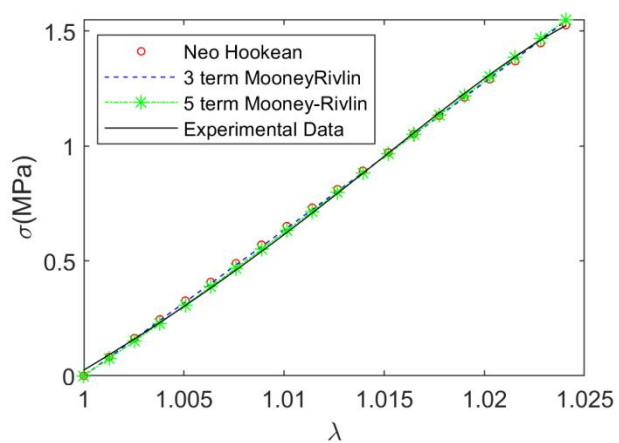
این تحقیق با هدف مطالعه آزمایشگاهی و عددی رفتار مکانیکی غیرخطی بافت عصب و داربست و مقایسه آنها انجام می‌شود و خواص هایپروالاستیک دقیق بافت عصب و داربست را ارائه می‌دهد که می‌تواند در مدل‌های بیومکانیکی استفاده شود. ضرایب تابع چگالی انرژی مدل‌های هایپروالاستیک پیشنهادی با استفاده از روش برازش منحنی غیر خطی بر روی نتایج آزمایشگاهی تست کشش تک محوری بافت عصب و داربست محاسبه شده‌اند و می‌توان از آنها برای پیش‌بینی پاسخ مکانیکی بافت عصب و داربست تحت شرایط بارگذاری کلی استفاده کرد. ثابت‌های مواد برای هر مدل تابع چگالی انرژی کرنشی در جدول ۱ فهرست شده است. شکل‌های ۲ و ۳ (الف) پاسخ‌های تنش برحسب نسبت کشش تک محوری را برای مدل‌های بررسی شده در مقایسه با نتایج آزمایشگاهی به ترتیب برای عصب و داربست نشان می‌دهند. در شکل‌های ۲ و ۳ (ب) تجزیه و تحلیل خطا برای هر یک از مدل‌های هایپروالاستیک به نشان داده شده است. نتیجه آزمایش رسم شده میانگین مقادیر تولید شده از همه نمونه‌ها است. از مجموع مربعات خطا (SSE) به عنوان معیار انتخاب مدل مناسب برای پیش‌بینی رفتار مواد هایپروالاستیک استفاده شده است.

جدول ۱: مقدار ضرایب مدل های هایپر الاستیک برای عصب و داربست.

مدل هایپر الاستیک	پارامتر	عصب	داربست
نئو هوک	C_{10}	10.8263	0.1431
	sse	0.1776	5.4569
مونی-ریولین ۳ جمله ای	C_{10}	10.6245	0.1021
	C_{01}	2.2204×10^{-14}	2.2204×10^{-14}
	C_{11}	100.00	0.0088
	sse	0.1030	1.5266
مونی-ریولین ۵ جمله ای	C_{10}	100.00	0.0407
	C_{01}	-90.2349	0.0049
	C_{11}	-100.00	0.0115
	C_{20}	-100.00	-0.0058
	C_{02}	-63.9006	0.0608
	sse	0.0444	0.0043

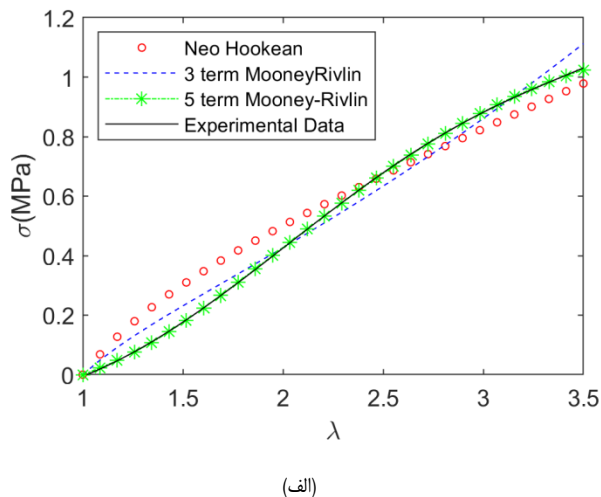
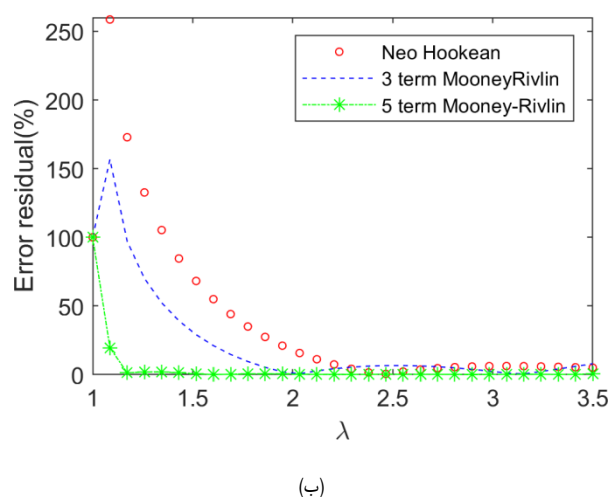


(ب)



(الف)

شکل ۲: مقایسه نتایج تئوری و آزمایشگاهی بدست آمده از تست کشش تک محوری و مدل های ساختاری هایپر الاستیک برازش شده بر آن برای عصب: الف) نمودار تنش مهندسی بر حسب نسبت کشش ب) درصد مانده خطا برای مدل های ساختاری.



شکل ۳: مقایسه نتایج تئوری و آزمایشگاهی بدست آمده از تست کشش تک محوری و مدل های ساختاری هایپر الاستیک برازش شده بر آن برای داربست: الف) نمودار تنش مهندسی بر حسب نسبت کشش (ب) درصد مانده خطا برای مدل های ساختاری.

با توجه به شکل های ۲ و ۳ (ب) می توان مشاهده کرد که برای همه مدل ها، خطاها همیشه در ناحیه کشش های کوچک بیشتر است. مطابق شکل ها مدل نئوهوک قادر به پیش بینی رفتار غیرخطی بافت عصب و داربست تحت شرایط بارگذاری کشش تک محوری نمی باشد. با توجه به شکل ۲ می توان مشاهده کرد که تابع های چگالی انرژی کرنشی مونی ریولین سه و پنج جمله ای رفتار مشابهی دارند و هر دو تابع توانایی کافی برای پیش بینی رفتار بافت عصب را برای محدوده داده های آزمایش از خود نشان می دهند، چون مقدار تغییر شکل ها برای عصب کوچک است. با توجه به شکل ۳ می توان مشاهده کرد که تابع های چگالی انرژی کرنشی مونی ریولین سه و پنج جمله ای برای تغییر شکل های کوچک رفتار مشابهی دارند ولی برای تغییر شکل های بزرگ تابع پنج جمله ای رفتار بهتری دارد و می توان گفت که مدل مونی ریولین پنج جمله ای توانایی عالی برای مدل سازی رفتار داربست برای کل محدوده داده های آزمایش از خود نشان می دهد.

۴. بحث و نتیجه گیری:

تاکنون داربست های مختلفی برای ترمیم ضایعات ناشی از قطع اعصاب محیطی مورد استفاده قرار گرفته اند. هر کدام از این داربست های سنتزی دارای یکسری مزایا و معایب می باشند. داربست های سنتزی بدلیل کاستی هایی همچون زیست سازگاری محدود، ضعف بیومکانیکی و عملکرد زیستی پایین موفقیت در بازسازی عصب را کاهش می دهند [۱۴، ۱۵]. از این رو استفاده از داربست های سلول زدایی شده به دلیل داشتن خصوصیات همچون فراهم کردن محیطی مشابه با ماده زمینه برون سلولی برای سلول ها، خواص آنتی ژنی کم و توانایی بهبود چسبندگی سلولی بسیار مورد توجه می باشند [۱۶]. در این پژوهش از مدل های بیومکانیکی برای ارزیابی ویژگی های کشسانی داربست های تهیه شده به منظور کاربرد در مهندسی بافت عصب استفاده شده است. نتایج حاصل از این مدل ها

نشان داد که داربست نسبت به عصب تغییر شکل های بزرگتری دارد و بنابر این رفتار غیر خطی بیشتری نسبت به عصب خواهد داشت و مدل مونی-ریولین پنج جمله ای که شامل ترم های غیر خطی مرتبه بالاتر است رفتار هایپرالاستیک غیر خطی داربست را بهتر می تواند پیش بینی کند. با توجه به نتایج ارائه شده می توان نتیجه گرفت که تابع چگالی انرژی کرنشی مونی ریولین پنج جمله ای برای مدلسازی رفتار هایپرالاستیک عصب و داربست مدل رفتاری مناسبی می باشد. تمام مدل های مواد آزمایش شده دقت کمتری در ناحیه کشش های کوچک نشان دادند.

۵. مراجع:

۱. Sarkar, A., et al., *Understanding stem cells and its pivotal role in regenerative medicine*. Life sciences, 2021. 273: p. 119270.
۲. Abdolmaleki, A., et al., *Role of Tissue Engineering and Regenerative Medicine in Treatment of Sport Injuries*. Trauma Monthly, 2020. 25(3): p. 106-112.
۳. Abdolmaleki, A., et al., *The Role of Neural Tissue Engineering in the Repair of Nerve Lesions*. The Neuroscience Journal of Shefaye Khatam, 2020. 8(3): p. 80-96.
۴. Whitlock, E.L., et al., *Processed allografts and type I collagen conduits for repair of peripheral nerve gaps*. Muscle & Nerve: Official Journal of the American Association of Electrodiagnostic Medicine, 2009. 39(6): p. 787-799.
۵. Fox, I.K., et al., *Schwann-cell injection of cold-preserved nerve allografts*. Microsurgery: Official Journal of the International Microsurgical Society and the European Federation of Societies for Microsurgery, 2005. 25(6): p. 502-507.
۶. Jesuraj, N.J., et al., *Schwann cells seeded in acellular nerve grafts improve functional recovery*. Muscle & nerve, 2014. 49(2): p. 267-276.
۷. Gao, S., et al., *Comparison of morphology and biocompatibility of acellular nerve scaffolds processed by different chemical methods*. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 2014. 25(5): p. 1283-1291.
۸. Rivlin, R.S., G.I. Barenblatt, and D.D. Joseph, *Collected papers of RS Rivlin*. Vol. 1. 1997: Springer Science & Business Media.
۹. Mooney, M., *A theory of large elastic deformation*. Journal of applied physics, 1940. 11(9): p. 582-592.
۱۰. Sondell, M., G. Lundborg, and M. Kanje, *Regeneration of the rat sciatic nerve into allografts made acellular through chemical extraction*. Brain research, 1998. 795(1): p. 44-54.
۱۱. Ali, A., M. Hosseini, and B. Sahari, *A review of constitutive models for rubber-like materials*. American Journal of Engineering and Applied Sciences, 2010. 3(1): p. 232-239.
۱۲. Rivlin, R.S., *Large elastic deformations of isotropic materials. 1. Fundamental concepts*. Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series a-Mathematical and Physical Sciences, 1948. 240(822): p. 459-508.
۱۳. Phothiphatcha, J. and T. Puttapitukporn, *Determination of material parameters of PDMS material models by MATLAB*. Engineering Journal, 2021. 25(4): p. 11-28.
۱۴. Dhandayuthapani, B., et al., *Polymeric scaffolds in tissue engineering application: a review*. International journal of polymer science, 2011. 2011.
۱۵. Lin, M.Y., G. Manzano, and R. Gupta, *Nerve allografts and conduits in peripheral nerve repair*. Hand clinics, 2013. 29(3): p. 331-34.
۱۶. Badylak, S.F., D.O. Freytes, and T.W. Gilbert, *Extracellular matrix as a biological scaffold material: structure and function*. Acta biomaterialia, 2009. 5(1): p. 1-13.