

Comparison of Nano-Biomechanical Structure of Injured Anterior Cruciate Ligament Cell between Athletic and Non-Athletic Men

Parastoo Shamshekhohan*¹, Heydar Sadeghi², Mehdi Khaleghi³, Esmail Ebrahimi-Takamjani⁴

1. PhD of Sport Biomechanics, School of Physical Education and Sport Sciences, Kharazmi University of Tehran, Tehran, Iran
2. Full Professor of Sport Biomechanics, School of Physical Education and Sport Sciences, Kharazmi University of Tehran, Tehran, Iran
3. Assistant Professor of Sport Biomechanics, School of Physical Education and Sport Sciences, Kharazmi University of Tehran, Tehran, Iran
4. Full Professor of Physiotherapy, School of Rehabilitation, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Received: 2018.June.18

Revised: 2018. August.07

Accepted: 2018.August.14

Abstract

Background and Aim: The knee joint is one of the most complex and largest synovial joints in the body, which is injured in sports injuries and accidents, due to its location and the type of physical stress it entails. Also, no previous research has reviewed the difference between the mechanics of patients' and athletes' tissue in the form of ultrastructural and nano analysis. The present study was carried out with the aim of comparing the nano-biomechanical structure of injured anterior cruciate ligament cell between athletic and non-athletic men to improve the science of cell biomechanics and to help better the knowledge in the field of human body mechanics.

Materials and Methods: In the current study, statistical samples were seven athletes and seven non-athlete men with anterior cruciate ligament injury. Tissue samples were obtained by each participants' orthopedic surgeon and they were prepared to determine the number and diameter of fibrils, roughness, and cell topography by atomic force microscopy. Finally, the obtained images and data were calculated using the Dual Scope™ / Raster Scope™ (SPM) software. Statistical analysis of the data was done using SPSS software set at the significance level of 0.05 running independent samples T-test.

Results: The findings showed that the nano-biomechanical structure of damaged anterior cruciate ligament cell, including the level of roughness (nm), the number of fibrils per unit, and fibrils diameter (nm), were different between athletic and non-athletic men. Also, topographic images taken from different regions of two-dimensional and three-dimensional injured ligament tissue in longitudinal and transverse sections of these groups showed some irregular makeup areas of collagen fibers, and fibrils were not in the same direction.

Conclusion: Regarding the relative mean of athletes in the present study and also considering that the muscles around the knee area in athletes are stronger than non-athletes, the adjacent muscles removed the pressure from the ACL and caused the differences between mechanical properties of the cell and the ACL tissue among athletes and non-athlete in the present study.

Keywords: Nano-biomechanical structure; Injured Anterior Cruciate Ligament cell; Roughness; Topography of Tissue

Cite this article as: Parastoo Shamshekhohan, Heydar Sadeghi, Mehdi Khaleghi, Esmail Ebrahimi-Takamjani. Comparison of Nano-Biomechanical Structure of Injured Anterior Cruciate Ligament Cell between Athletic and Non-Athletic Men. J Rehab Med. 2019; 7(4): 227-235

* **Corresponding Author:** PhD of Sport Biomechanics, School of Physical Education and Sport Sciences, Kharazmi University of Tehran, Tehran, Iran.
Email: parastooshams@yahoo.com

DOI: 10.22037/jrm.2018.111258.1868

مقایسه ساختار نانوبیومکانیکی سلول لیگامان صلیبی قدامی آسیب دیده بین مردان ورزشکار و غیرورزشکار

پرستو شمسه کهن^{۱*}، حیدر صادقی^۲، مهدی خالقی^۳، اسماعیل ابراهیمی تکامجانی^۴

۱. دکتری بیومکانیک ورزشی، گروه بیومکانیک و آسیب شناسی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران
۲. استاد تمام گروه بیومکانیک و آسیب شناسی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران
۳. استادیار گروه بیومکانیک و آسیب شناسی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران
۴. استاد تمام گروه فیزیوتراپی دانشکده توانبخشی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

* دریافت مقاله ۱۳۹۷/۰۳/۲۸ بازنگری مقاله ۱۳۹۷/۰۵/۱۶ پذیرش مقاله ۱۳۹۷/۰۵/۲۳ *

چکیده

مقدمه و اهداف

مفصل زانو یکی از پیچیده ترین و بزرگ ترین مفاصل سینوویال موجود در بدن می باشد که به جهت موقعیت قرارگیری و نوع استرس های فیزیکی وارد بر آن، در ضایعات ضربه ای ناشی از ورزش و تصادفات در معرض ابتلا به آسیب قرار دارد. همچنین از آنجایی که هیچ تحقیقی تفاوت بین مکانیک بافت سلولی بیماران و ورزشکاران را به صورت فراساختاری و نانو بررسی نکرده است، مطالعه حاضر با هدف مقایسه ساختار نانوبیومکانیکی سلول لیگامان صلیبی قدامی آسیب دیده بین مردان ورزشکار و غیرورزشکار، می تواند در توسعه علم بیومکانیک سلول و کامل شدن دانش در حیطه مکانیک بدن انسان بسیار مؤثر باشد.

مواد و روش ها

در مطالعه حاضر نمونه های آماری شامل ۷ مرد ورزشکار و ۷ مرد غیرورزشکار با آسیب لیگامان صلیبی قدامی بودند که به صورت در دسترس انتخاب شدند. توسط جراح ارتوپد مخصوص هر آزمودنی، نمونه بافت گرفته شد و برای بررسی تعداد و قطر فیبریل ها، رافنس و توپوگرافی سلول با میکروسکوپ نیروی اتمی آماده سازی شدند. در نهایت نیز تصاویر و داده های به دست آمده توسط نرم افزار تحلیل تصویر (Dual Scope™/Raster Scope™- SPM) محاسبه شد. تحلیل آماری داده ها در سطح معناداری ۰/۰۵ با استفاده از نرم افزار SPSS انجام و جهت مقایسه داده ها از آزمون آماری t مستقل برای نمونه های مستقل استفاده شد.

یافته ها

یافته ها نشان داد که ساختار نانوبیومکانیکی سلول لیگامان صلیبی قدامی آسیب دیده، شامل میزان رافنس سطح (nm)، تعداد فیبریل در هر واحد و قطر فیبریل (nm)، بین مردان ورزشکار و غیرورزشکار متفاوت است. همچنین تصاویر توپوگرافی گرفته شده از نواحی مختلف بافت لیگامان آسیب دیده به صورت دوبعدی و سه بعدی در برش های طولی و عرضی این دو گروه، در بعضی از نواحی آرایش نامنظمی از فیبریل های کلاژنی را نشان دادند و فیبریل ها در یک جهت نبودند.

نتیجه گیری

با توجه به میانگین نسبی ورزشکاران در متغیرهای تحقیق حاضر و همچنین با در نظر گرفتن اینکه عضلات اطراف ناحیه زانو در ورزشکاران قوی تر از غیرورزشکاران است، عضلات مجاور فشار را از روی ACL برداشته و باعث شده است که بین ویژگی های مکانیکی سلول و بافت ACL مردان ورزشکار و غیرورزشکار در مطالعه حاضر تفاوت وجود داشته باشد.

واژه های کلیدی

ساختار نانوبیومکانیکی سلول؛ لیگامان صلیبی قدامی آسیب دیده؛ رافنس سطح؛ توپوگرافی بافت

نویسنده مسئول: پرستو شمسه کهن، دکتری بیومکانیک ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه خوارزمی

آدرس الکترونیکی: parastooshams@yahoo.com

امروزه بدن انسان را می‌توان از جنبه‌های مختلفی بررسی کرد که با پیشرفت علم و ایجاد ابزار جدید، بررسی فراساختاری و سلولی یکی از جنبه‌های پایه‌ای و مهم می‌باشد.^[۲-۱] با بررسی بافت به وسیله ابزارهای جدید آزمایشگاهی می‌توان ویژگی‌های آن را با دقت و در مقیاس نانو و میکرو اندازه‌گیری کرد.^[۴-۳] در حوزه‌های گوناگون فناوری، از روش‌های آنالیز سطح برای کنترل کیفی محصولات استفاده می‌شود.^[۷-۵] کاربرد هر روش علمی، به‌ویژه روش‌های جدید، به مطالعه اصول کار و موارد استفاده آن در زمینه‌های مختلف پژوهشی نیاز دارد. استفاده از میکروسکوپ‌های پروبی روبشی، از جمله این روش‌ها است که نقش کاملاً تعیین‌کننده‌ای برای پژوهش در حوزه فناوری نانو ایفا نموده‌است.^[۸] میکروسکوپ روبشی نیروی اتمی^۱ (AFM)، کاربرد گسترده‌ای در زمینه تعیین توپوگرافی سطوح و مطالعه مکانیک بافت پیدا کرده‌است.^[۱۱-۹،۲] از جمله ویژگی‌های این روش به توانایی بررسی جزئیات در مقیاس میکرو و نانو، کاربری آسان و امکان بررسی نمونه‌های مختلف، می‌توان اشاره کرد. میکروسکوپ نیروی اتمی (AFM) و تکنیک‌های وابسته به آن، نقشی کلیدی در گسترش انقلاب تکنولوژی نانو دارد.^[۱۳-۱۱،۸] و بسیاری از مشکلات بیومکانیکی سلول را با توجه به ارزیابی‌های هم‌زمان ویژگی‌های مکانیکی و توپوگرافی سلول‌های زنده در رزولوشن بالا حل کرده است.^[۱۴] شناسایی ویژگی‌های مکانیکی بافت‌های بدن انسان به صورت فراساختاری و سلولی، به کسب دانشی عمیق از ماهیت آسیب‌ها، پیش‌گیری از آنها و بازتوانی پس از آسیب به متخصصان ورزشی و علوم توانبخشی کمک می‌کند.

آسیب لیگامان صلیبی قدامی^۲ (ACL) یکی از مهم‌ترین ضایعات مفصل زانو بوده که متعاقب ایجاد آن، عوارض متعدد دیگری همچون تخریب زودرس سطوح مفصلی، بی‌ثباتی مفصل در درجات مختلف حرکت و در صفحات مختلف حرکتی و نهایتاً عدم کارایی مفصل زانو در فعالیت‌های روزمره پدیدار خواهد شد.^[۱۵] درک ساختار نانویومکانیکی زانو می‌تواند به روشن شدن مکانیسم‌هایی که در آن سلول‌های ACL بافت سالم به دست می‌آورند یا به پاسخی در جهت بهبود پس از آسیب منجر شود.^[۱۶-۱۸] پارگی ACL در فعالیت‌های ورزشی رایج است و قابلیت بازسازی محدودی دارد.^[۱۵، ۱۹] توپوگرافی سلول، رافنس سطح، تعداد و قطر فیبریل‌ها نقش مهمی در بسیاری از جنبه‌های فراساختاری سلول مانند چسبندگی سلول، حرکت، تغییر شکل و انتقال سیگنال دارند.^[۲۰] استایلیانو (۲۰۱۷) نیز که بررسی مواد کلاژنی پرداخته بود، بیان داشت که با AFM می‌توان بدون از بین بردن ساختار فیبری کلاژن، اطلاعات کمی و کیفی مفیدی از این بافت به دست آورد.^[۴] ژانمی و میلر (۲۰۱۱)، بوکسبویم و همکاران (۲۰۱۰) و بائو و سورس (۲۰۰۳) بیان داشتند که سلول می‌تواند و باید به بارهای مکانیکی مختلف بدن پاسخ دهد.^[۲۳-۲۱] هاسه و پلینگ (۲۰۱۵) در تحقیق خود به این نتیجه رسیدند که درک و توصیف پاسخ سلولی به نیرو با توجه به مکانیک سلول و نیروهای خارج سلولی که فرآیندهای مهم سلولی را جهت می‌بخشند، حیاتی است و پاسخ سلولی به نیروهای مکانیکی نتیجه ویژگی‌های ساختاری و مکانیکی آن می‌باشد.^[۲] کیم و همکاران (۲۰۰۸) نیز ارتباط بین محرک‌های مکانیکی و پاسخ مرتبط با آن را در سلول‌های زنده برای درک رفتار سلولی و شناسایی ساختار سلولی مهم دانستند.^[۱۲] همچنین طبق تحقیقات، میزان تخریب مکانیکی مفاصل و همچنین میزان شیوع آسیب مفصل ACL در بین زنان و مردان یکسان نیست.^[۲۴] در حال حاضر بالاترین میزان آسیب ACL در زنان ۱۴ تا ۱۷ ساله و در مردان ۱۸ تا ۲۱ ساله می‌باشد^[۲۵]؛ از این رو در تحقیق حاضر بررسی فراساختاری سلول ACL آسیب‌دیده تنها بین مردان انجام می‌گردد و از آنجایی که عملکرد بهینه با حداقل آسیب‌دیدگی به عنوان اصلی مهم در حوزه ورزش مطرح شود، موضوع حاضر با تکیه بر در معرض قرار گرفتن ورزشکاران با آسیب و آسیب لیگامنت متقاطع قدامی به عنوان آسیبی شایع و لزوم شناسایی ریسک‌فاکتورها با هدف حذف و یا حداقل کاهش پتانسیل بروز آسیب مذکور انجام می‌گردد.

ساختار ACL به صورت نانو می‌تواند به وسیله AFM نشان داده شود و به دلیل کیفیت مناسب این دستگاه، توزیع ابعاد، جهت‌گیری فیبرها، و ویژگی‌های نانویومکانیکی ACL به خوبی مشخص می‌گردد. اگرچه به تازگی تحقیقاتی در شناسایی ویژگی‌های مکانیکی بافت‌های بدن به صورت مکانیکی انجام گرفته است، اما اکثر تحقیقات فراساختاری و سلولی روی بافت حیوانی یا اجساد انسان انجام شده است، هیچ تحقیقی نیز تفاوت بین مکانیک بافت سلولی بیماران و ورزشکاران را به صورت فراساختاری و نانو بررسی نکرده است. همچنین از آنجایی که مفصل زانو یکی از پیچیده‌ترین و بزرگ‌ترین مفاصل سینوویال موجود در بدن می‌باشد و به جهت موقعیت قرارگیری و نوع استرس‌های فیزیکی وارد بر آن، در ضایعات ضربه‌ای ناشی از ورزش و تصادفات در معرض ابتلا به آسیب قرار دارد، در نتیجه مطالعه حاضر با هدف مقایسه ساختار نانویومکانیکی سلول لیگامان صلیبی قدامی آسیب‌دیده بین مردان ورزشکار و غیرورزشکار، می‌تواند در توسعه علم بیومکانیک سلول و کامل شدن دانش در حیطه مکانیک بدن انسان بسیار مؤثر باشد.

مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر از نوع بنیادی و روش نیمه‌تجربی می‌باشد. جامعه آماری این تحقیق را مردان ۱۷ تا ۲۷ سال مراجعه‌کننده به کلینیک‌ها و

¹ Atomic Force Microscopy

² Anterior Cruciate Ligament

مطب‌های ارتوپدی تهران و اصفهان در شش ماهه دوم سال ۱۳۹۵ و شش ماهه اول سال ۱۳۹۶ با سابقه آسیب ACL تشکیل می‌دهند که ۳ ماه بعد از آشنایی با تحقیق جراحی داشتند و از آسیب آن‌ها حداکثر شش ماه گذشته بود. نمونه‌های آماری تحقیق طبق مطالعات پیشین ۱۶ مرد (۸ ورزشکار و ۸ غیرورزشکار) با آسیب ACL هستند که به صورت در دسترس انتخاب شدند.

محققان ابتدا با چند جراح متخصص ارتوپدی صحبت کردند و تعدادی از آنها آمادگی خود را برای معرفی بیماران مناسب با شرایط تحقیق (آزمودنی‌ها) اعلام داشتند. آزمودنی‌ها فرم آشنایی با مراحل تحقیق را مطالعه و در صورت توافق به همکاری، رضایت‌نامه شرکت در این تحقیق را امضاء کردند. یک نفر از گروه ورزشکاران به دلیل انصراف از جراحی زانو، از حضور در تحقیق خودداری کرد و در نتیجه از ۱۵ نفر آزمودنی باقی‌مانده حین جراحی زانو توسط جراح ارتوپد مخصوص خود، نمونه بافت ACL گرفته شد که ACL یک مرد غیرورزشکار نیز به دلیل داشتن عارضه آرتروز قابل استفاده نبود.

پس از جراحی آماده‌سازی نمونه بافت ACL آسیب‌دیده انجام شد (تصویر ۱)؛ بدین‌صورت که بافت ACL جدا شده حین جراحی در محلول گلوپتارآلدئید ۲٪ جهت فیکس شدن قرار گرفت و سپس محقق به کمک متخصص پاتالوژی بافت را در پارافین قالب‌گیری کرد. از دستگاه میکروتوم برای برش نمونه‌های در بلوک پارافینی استفاده شد (ضخامت ۱ میکرومتر و برش طولی و عرضی) و در نهایت نیز پس از برش از زایلین و الکل اتانول برای پارافین‌زدایی برش‌ها استفاده گردید و برای مشاهده با AFM روی لام و به وسیله هوا خشک شد.



تصویر ۱: فرآیند آماده‌سازی نمونه بافت ACL آسیب‌دیده

اطلاعات بافت ACL آماده‌شده روی لام، در ۳ نقطه ثابت ۵*۵ میکرومتر توسط AFM به دست آمد (برش‌های طولی و عرضی) و بهترین تصویر انتخاب شد (رزولوشن=۲۵۶). سیستم کنترل ارتعاش^۱، سوزن و پیزوالکتریک که به نوپز بسیار حساس هستند، در ابتدا توسط پژوهشگر و اپراتور دستگاه چک شد. از آشکار ساز و سیستم کنترل بازخورد^۲ برای تأمین یک نیروی ثابت بین پروب و سطح نمونه به کار گرفته شد (نیرو=۰/۱N). نرمال کردن به صورت ارتفاع ثابت انجام گشت. سرعت آنالیز نمونه‌ها نسبتاً بالا است که به وسیله بازه بزرگ-نمایی^۳ و بازه عمودی^۴ انجام شد (Scan Rate=۳Hz) و ویژگی‌های بافت نیز به صورت نمودار نشان داده شد (تصویر ۲).



تصویر ۲: بررسی بافت ACL آسیب‌دیده توسط دستگاه AFM

توسط دستگاه AFM، تعداد و قطر فیبریل‌ها، رافنس و توپوگرافی سلول ACL آسیب‌دیده بررسی شد. جهت پروب نمونه از مد غیرتماسی (AC Probe) دستگاه AFM ساخت کشور آلمان (Scanning Probe Microscopy, DME, Model: Dual Scope C-26) استفاده شد. جهت تشریح ساختار بافت، تصاویر دوبعدی و سه‌بعدی توپوگرافی و میانگین قطر فیبریل‌های ACL گزارش می‌گردد و جهت

¹ Vibration Control System

² Feedback Control

³ Magnification

⁴ Vertical Range

به دست آوردن رافنس سلول ACL از میانگین ارتفاعات زبری (Ra) استفاده شد.^[۲۶] رافنس یا زبری خاصیتی از بافت سطحی ماده است که با توپوگرافی ناهموار آن در مقایسه با یک سطح صاف ایده آل شناسایی می‌شود. سطح بافت حاوی ناهمواری، برآمدگی و فرورفتگی‌هایی است که به فاصله بسیار کم از یکدیگر قرار گرفته‌اند. در نهایت نیز تصاویر و داده‌های به دست آمده توسط نرم‌افزار تحلیل تصویر (Dual ScopeTM/Raster ScopeTM-SPM) محاسبه شد. تحلیل آماری داده‌ها در سطح معناداری ۰/۰۵ با استفاده از نرم‌افزار SPSS انجام شد. نرمال بودن توزیع داده‌ها با استفاده از آزمون شاپیرو-ویلک بررسی و جهت مقایسه داده‌ها از آزمون آماری برای نمونه‌های مستقل (Independent Samples T-Test) استفاده شد.

یافته‌ها

نتایج بررسی توصیفی اطلاعات دموگرافیکی آزمودنی‌ها در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱: مشخصات دموگرافیکی آزمودنی‌ها

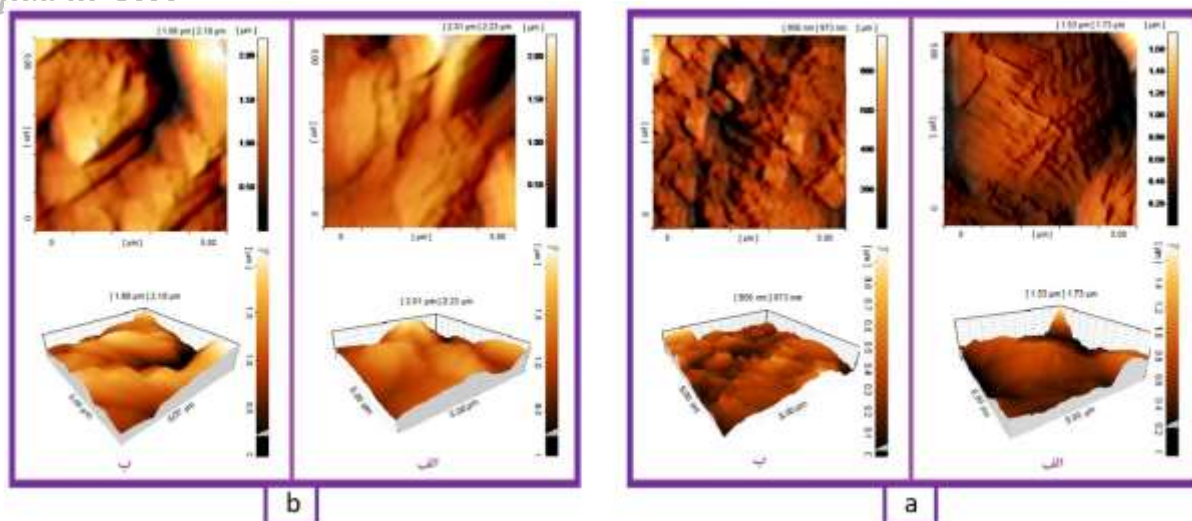
گروه	سن (سال)	وزن (kg)	قد (cm)
ورزشکار (n=۷)	۲۳/۲۹±۳/۰۴	۸۴/۱۴±۴/۵۲	۱۸۳/۰۰±۴/۴۳
غیرورزشکار (n=۷)	۲۴/۴۲±۱/۹۰	۸۴/۸۶±۸/۳۳	۱۷۹/۷۱±۳/۱۴

همچنین میانگین و انحراف استاندارد متغیرهای تحقیق از قبیل میزان رافنس سطح و ویژگی‌های ساختار بافت (تعداد فیبریل در هر واحد و میانگین قطر فیبریل‌ها) در جدول ۲ ارائه شده است.

جدول ۲: میانگین و انحراف استاندارد متغیرهای تحقیق

متغیر	گروه	ورزشکار	غیرورزشکار
میزان رافنس سطح (nm)		۲۵۳/۴۲±۱۱/۴۲	۲۵۷/۸۶±۱۳/۰۹
ویژگی‌های ساختار بافت	تعداد فیبریل در هر واحد	۱۸۷/۵۷±۴/۸۶	۱۶۸/۴۳±۱۹/۷۱
	ماکزیمم و مینیمم قطر فیبریل (nm)	۱۷۹-۱۹۳	۱۳۱-۱۸۹
	قطر فیبریل (nm)	۵۶/۷۱±۱/۳۸	۴۹/۸۶±۳/۴۸

طبق گزارش جدول ۲ میزان رافنس سطح (nm) ACL آسیب‌دیده در گروه غیرورزشکاران بیشتر از گروه ورزشکاران است (۲۵۷/۸۶±۱۳/۰۹ در مقابل ۲۵۳/۴۲±۱۱/۴۲)، ولی میانگین و انحراف استاندارد تعداد فیبریل در هر واحد ۵*۵ میکرومتر ACL آسیب‌دیده گروه غیرورزشکاران، ۱۶۸/۴۳±۱۹/۷۱ می‌باشد که کمتر از تعداد فیبریل در هر واحد ۵*۵ میکرومتر ACL آسیب‌دیده گروه ورزشکاران (۱۸۷/۵۷±۴/۸۶) است. همچنین قطر فیبریل‌های (nm) ACL آسیب‌دیده گروه ورزشکاران بیشتر از گروه غیرورزشکاران می‌باشد (به ترتیب: ۵۶/۷۱±۱/۳۸ و ۴۹/۸۶±۳/۴۸). همچنین تصاویر گرفته‌شده دوبعدی و سه‌بعدی به وسیله AFM، از برش‌های طولی و عرضی ACL آسیب‌دیده یک آزمودنی ورزشکار و غیرورزشکار در تصویر ۳ نشان داده شده است.



تصویر ۳. تصاویر دوبعدی و سه بعدی از برش طولی (a) و عرضی (b) ACL آسیب دیده یک نمونه از گروه ورزشکاران (الف) و غیرورزشکاران (ب)

یافته‌های به دست آمده از آزمون شاپیرو-ویلک نشان می‌دهد که سطح معناداری به دست آمده در تمام متغیرهای تحقیق به تفکیک گروه، بیش از مقدار ۰/۰۵ است و در نتیجه می‌توان گفت که توزیع متغیرهای مورد بررسی در نمونه آماری دارای توزیع نرمال می‌باشد و در نتیجه برای مقایسه ساختار نانویومکانیکی (میزان رافنس سطح، تعداد و قطر فیبریل‌ها در هر واحد) سلول لیگامان صلیبی قدیمی آسیب دیده بین مردان ورزشکار و غیرورزشکار از روش آماری Independent Samples T-Test استفاده شد که نتایج آن در جدول ۳ ارائه شده است.

جدول ۳. مقایسه ساختار نانویومکانیکی سلول لیگامان صلیبی قدیمی آسیب دیده بین مردان ورزشکار و غیرورزشکار

P	Df	T	لون		انحراف استاندارد	میانگین	گروه	متغیر	ویژگی‌های ساختار
			Sig	F					
۰/۰۰۵ *	۱۲	-۳/۴۱۴	۰/۹۰۵	۰/۰۱۵	۱۱/۴۲	۲۵۳/۴۲	ورزشکار (n=۷)	میزان رافنس سطح (nm)	
					۱۳/۰۹	۲۷۲/۸۶	غیرورزشکار (n=۷)		
۰/۰۴۳ *	۶/۷۲۷	۲/۴۹۴	۰/۰۳۳ *	۵/۸۰۹	۴/۸۶	۱۸۷/۵۷	ورزشکار (n=۷)	تعداد فیبریل در هر واحد	ناپاکی
					۱۹/۷۱	۱۶۸/۴۳	غیرورزشکار (n=۷)		
P<۰/۰۰۱ *	۱۲	۴/۸۴۱	۰/۱۳۶	۲/۵۴۸	۱/۳۸	۵۶/۷۱	ورزشکار (n=۷)	قطر فیبریل (nm)	
					۳/۴۸	۴۹/۸۶	غیرورزشکار (n=۷)		

* P≤۰/۰۵

این جدول شامل دو آزمون (لون و t مستقل) است. در متغیر اول، آزمون لون برابری واریانس‌ها را با مقدار ۰/۰۱۵ برای متغیر میزان رافنس سطح و با معیار تصمیم ۰/۹۰۵ نشان می‌دهد و فرض برابری واریانس‌ها را نمی‌توان رد کرد؛ یعنی با توجه به اطلاعات این متغیر، واریانس میزان رافنس سطح در مردان ورزشکار و غیرورزشکار با هم برابر است. آزمون بعدی، آزمون مقایسه میانگین‌ها است که با فرض برابری واریانس‌ها، معیار تصمیمی (Sig (Z-tailed)) برابر با ۰/۰۰۵ دارد که کوچکتر از ۰/۰۵ می‌باشد. در نتیجه می‌توان گفت به طور معناداری میزان رافنس سطح سلول لیگامان صلیبی قدیمی آسیب دیده در مردان ورزشکار و غیرورزشکار متفاوت است.

در متغیر دوم، آزمون لون برابری واریانس‌ها را با مقدار ۵/۸۰۹ برای متغیر تعداد تارچه در هر واحد و با معیار تصمیم ۰/۰۳۳ نشان می‌دهد و فرض برابری واریانس‌ها رد می‌شود. یعنی با توجه به اطلاعات این متغیر، واریانس تعداد فیبریل در هر واحد در مردان ورزشکار و غیرورزشکار با هم برابر نیست. آزمون بعدی، آزمون مقایسه میانگین‌ها است که با فرض برابر نبودن واریانس‌ها، معیار تصمیمی برابر با ۰/۰۴۳ دارد که کوچکتر از ۰/۰۵ می‌باشد. در نتیجه می‌توان گفت به طور معناداری تعداد فیبریل در هر واحد سلول لیگامان صلیبی قدیمی آسیب دیده در مردان ورزشکار و غیرورزشکار متفاوت است.

در متغیر سوم، آزمون لون برابری واریانس‌ها را با مقدار $2/548$ برای متغیر قطر فیبریل و با معیار تصمیم $0/136$ نشان می‌دهد و فرض برابری واریانس‌ها را نمی‌توان رد کرد؛ یعنی با توجه به اطلاعات این متغیر، واریانس قطر فیبریل‌ها در مردان ورزشکار و غیرورزشکار با هم برابر است. آزمون بعدی، آزمون مقایسه میانگین‌ها است که با فرض برابری واریانس‌ها، معیار تصمیمی برابر با $P < 0/01$ دارد و در نتیجه می‌توان گفت به طور معناداری قطر فیبریل‌های سلول لیگامان صلیبی قدامی آسیب‌دیده در مردان ورزشکار و غیرورزشکار متفاوت است.

بحث و نتیجه‌گیری

مفصل زانو یکی از پیچیده‌ترین و بزرگ‌ترین مفاصل سینوویال موجود در بدن می‌باشد که به جهت موقعیت قرارگیری و نوع استرس‌های فیزیکی وارد بر آن، در ضایعات ضربه‌ای ناشی از ورزش و تصادفات در معرض ابتلا به آسیب قرار دارد. طبیعی به نظر می‌رسد که آسیب ACL یکی از مهم‌ترین ضایعات مفصل زانو بوده که متعاقب ایجاد آن، عوارض متعدد دیگری همچون تخریب زودرس سطوح مفصلی، بی‌ثباتی مفصل در درجات مختلف حرکت و در صفحات مختلف حرکتی و نهایتاً عدم کارایی مفصل زانو در فعالیت‌های روزمره پدیدار خواهد شد.^[۲۰] تصاویر توپوگرافی گرفته‌شده از نواحی مختلف بافت ACL آسیب‌دیده به صورت دوبعدی و سه‌بعدی در برش‌های طولی و عرضی، مرفولوژی‌های متفاوتی را نشان دادند که با یافته‌های استایلیانو (۲۰۱۷) با عنوان میکروسکوپ نیروی اتمی برای نانوبایومواد کلاژنی، هم‌راستا می‌باشد.^[۴] وی بیان داشت که بررسی کلاژن می‌تواند کاربرد گسترده بایومواد، مهندسی بافت و تحقیقات پزشکی را شامل شود و به دلیل اینکه کلاژن نوع I فراوان‌ترین پروتئین در ماتریکس خارج سلولی می‌باشد، و با توجه به ویژگی‌های منحصر به فرد آن، به طور گسترده‌ای به عنوان بایومواد شناخته می‌گردد. همچنین به این یافته دست یافت که تشخیص کامل از ساختار و خواص این نانومواد را می‌توان با استفاده از AFM و بدون از بین بردن ساختار فیبری کلاژن انجام داد و اطلاعات کمی و کیفی آن را به دست آورد. علاوه بر این موارد، تصاویر توپوگرافی از ژل کلاژن، نیروی حجم ژل کلاژن و تصویر ژل کلاژن را با استفاده از AFM به دست آورد. این تصاویر توپوگرافی، مانند تصاویر توپوگرافی تحقیق حاضر بود که در بعضی از نواحی آرایش نامنظمی از فیبریل‌های کلاژنی را نشان داد و فیبریل‌ها در یک جهت نبود. بعضی از فیبریل‌های کوچک‌تر به صورت عمودی به فیبریل‌های موازی بزرگ‌تر متصل بودند که این یکسان نبودن راستای فیبریل‌های کلاژنی در تصاویر آنها مشهود بود. این یکسان نبودن راستای فیبریل‌های کلاژنی و درهم‌تنیدگی آنها از نقطه نظر بیومکانیکی می‌تواند منجر به کم شدن قدرت مکانیکی شده و شانس پارگی را افزایش دهد که این نتیجه با مطالعه هاشمی و همکاران (۲۰۰۸) هم‌راستا می‌باشد.^[۲۸] آنها بیان داشتند که نامنظم بودن ظاهر فراساختاری کلاژن، یکی از مسائل مهم در بررسی ویژگی‌ها و رفتار مکانیکی آن می‌باشد و همچنین بیان داشتند که ترک‌خوردگی فیبرها پیش‌بین مناسبی برای ویژگی‌های ACL می‌باشد.

مطالعه چن و همکاران (۲۰۰۹) نیز با عنوان مشاهده فراساختار بافت گرافت لیگامنت متقاطع قدامی با استفاده از میکروسکوپ نیروی اتمی، فراساختار بافت گرافت بازیابی‌شده از بازسازی ACL را با استفاده از AFM نشان می‌دهد که با تحقیق حاضر هم‌راستا است.^[۷] تصاویر AFM از مناطق مختلف برش گرافت طولی گرفته شد و آرایش منظمی از فیبرهای کلاژن در مناطق خاصی از گرافت مشاهده شد. با این حال در بسیاری از مناطق، فیبرها به خوبی در جهت خاصی مرتب نشدند و با برخی از فیبرهای کوچک‌تر به صورت عمودی به فیبرهای موازی بزرگ‌تر مرتب شدند. عبور و درهم بودن فیبرها در گرافت ACL، در تصویر سه‌بعدی AFM نشان داده شد. آنها بیان داشتند که این اختلال فراساختار گرافت ممکن است تغییر محیط مکانیکی را بعد از بازسازی ACL نشان دهد. این مطالعه اهمیت و کفایت مشاهده فراساختار گرافت ACL را به وسیله AFM نشان داد. در کل تحقیق حاضر در همین راستا بیان دارد که یکسان نبودن جهت فیبریل‌ها در نمایش سه‌بعدی آنها کاملاً مشهود است و این نامنظم بودن فیبریل‌ها می‌تواند منجر به کاهش قدرت مکانیکال شده و در نهایت به پارگی بیانجامد. در بین نمونه‌های ورزشکار و غیرورزشکار، تفاوت مرفولوژیکی مشهودی دیده نشد و تمامی نمونه‌ها دارای فیبریل‌های کلاژنی نامنظم و درهم‌تنیده‌ای بودند که میزان درهم‌تنیدگی فیبریل‌های کلاژنی در تصاویر غیرورزشکاران بیشتر بود که می‌تواند نشان‌دهنده میزان رافنس بالاتر باشد که از نتایج آماری نیز چنین برداشت شد.

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که ساختار نانوبیومکانیکی سلول لیگامان صلیبی قدامی آسیب‌دیده، شامل میزان رافنس سطح (nm)، تعداد فیبریل در هر واحد و قطر فیبریل (nm)، بین مردان ورزشکار و غیرورزشکار متفاوت است. بافت سلول ACL غیرورزشکاران در مقایسه با ورزشکاران، شامل غلظت فیبریل کمتر و درصد حجمی فیبرهای کلاژن کمتری بود ($P < 0/05$). اسونسون و همکاران (۲۰۱۳) نیز از AFM برای بررسی بافت کلاژنی تاندون استفاده کردند و بیان داشتند که تاندون‌ها وظیفه مهم تحمل بار را در بدن ایفا می‌کنند که اغلب در رابطه با ورزش و کار، آسیب می‌بینند.^[۲۷] فیبرهای کلاژن بارهای مکانیکی زیادی که بر بافت تاندون اعمال می‌شوند را تحمل می‌کنند. به نظر می‌رسد با توجه به میانگین نسبی ورزشکاران در متغیرهای تحقیق حاضر و همچنین با در نظر گرفتن اینکه عضلات اطراف ناحیه زانو در ورزشکاران قوی‌تر از غیرورزشکاران است، عضلات مجاور فشار را از روی ACL برداشته و باعث شده است که بین ویژگی‌های مکانیکی سلول و بافت ACL مردان ورزشکار و غیرورزشکار در مطالعه حاضر تفاوت وجود داشته باشد. با توجه به محدوده سنی ورزشکاران، به نظر می‌رسد که این تفاوت ناشی از قدرت بیشتر عضلات ورزشکاران و همچنین عدم ورود آنها به محدوده سنی دژنره شدن

لیگامان باشد. همچنین می‌توان گفت که همراه این تغییرات شاید عضلات و سایر بافت‌های همبند مؤثر بر مفصل زانو از منظر شاخصه‌های مکانیکی نیز در سطح میکرو و نانو تغییر کنند. در کل شناسایی ویژگی‌های مکانیکی بافت‌های بدن انسان به صورت فراساختاری و سلولی، به کسب دانشی عمیق از ماهیت آسیب‌ها، پیش‌گیری از آنها و بازتوانی پس از آسیب به متخصصان ورزشی و علوم توانبخشی کمک می‌کند.

همان‌طور که گفته شد، شناخت هرچه بیشتر مکانیک ACL به صورت فراساختاری، میکرو و نانو می‌تواند در شناخت ضایعات این مفصل، پیش‌آگاهی نوع آسیب، تدوین برنامه درمانی و میزان موفق بودن برنامه ارائه‌شده، مؤثر واقع شود. برای فهم یک بافت از لحاظ مکانیکی، دانستن ساختار آن بسیار اهمیت دارد. در همین راستا، به جهت تعیین توپوگرافی و نمایش پستی و بلندی‌های سطح سلول‌های طبیعی برای وضوح در اندازه‌های نانو، میکروسکوپ نیروی اتمی به عنوان ابزاری مناسب برای این مهم به شمار می‌آید. ساختار ACL به صورت نانو می‌تواند به وسیله AFM نشان داده شود و به دلیل کیفیت مناسب این دستگاه، توزیع ابعاد، جهت‌گیری فیبرها، رافنس سطح و برخی دیگر از ویژگی‌های مکانیکی ACL به خوبی مشخص می‌گردد. بهبود درک از مکانیک بافت سالم می‌تواند ادراک پایه‌ای برای تغییر در مکانیک ACL در پاتولوژی باشد. علاوه بر این مطالعاتی از این دست می‌تواند پارامترهای مفیدی برای بیومتریال‌های مصنوعی ساخته‌شده جهت جایگزینی بافت آسیب‌دیده را آشکار سازد. در کل بررسی بافت سلول ACL به صورت فراساختاری و نانو می‌تواند در توسعه علم بیومکانیک سلول و کامل شدن دانش در حیطه مکانیک بدن انسان بسیار مؤثر باشد.

تشکر و قدردانی

مطالعه حاضر برگرفته از رساله دکتری خانم دکتر پرستو شمسه‌کهن به راهنمایی آقایان پروفسور حیدر صادقی و دکتر مهدی خالقی و مشاوره پروفسور اسماعیل ابراهیمی تکامجانی می‌باشد. نویسندگان مقاله از تمامی آزمودنی‌ها و عزیزانی که در اجرای تحقیق حاضر یاری نمودند، کمال تشکر و قدردانی را دارند.

منابع

- Brennan DA, Conte AA, Kanski G, Turkula S, Hu X, Kleiner MT, Beachley V. Mechanical considerations for electrospun nanofibers in tendon and ligament repair. *Advanced Healthcare Materials*. 2018; 7 (1): 62-77.
- Haase K, Pelling AE. Investigating cell mechanics with atomic force microscopy. *Journal of the Royal Society Interface*. 2015; 12(104): 1-16.
- Brunella MF, Serafini A, Tanzi MC. Characterization of 2D polymeric biomaterial structures or surfaces. *In Characterization of Polymeric Biomaterials*. 2017: 3-19.
- Stylianou A. Atomic force microscopy for collagen-based nanobiomaterials. *Journal of Nanomaterials*. 2017; <https://doi.org/10.1155/2017/9234627>.
- Hu S, Li J, Liu L, Dai R, Sheng Z, Wu X, Jiang Y. Micro/nanostructures and mechanical properties of trabecular bone in ovariectomized rats. *International Journal of Endocrinology*. 2015; 1-10.
- Stewart MP, Toyoda Y, Hyman AA, Muller DJ. Tracking mechanics and volume of globular cells with atomic force microscopy using a constant-height clamp. *Nature Protocols*. 2012; 7(1): 143-154.
- Chen HH, Lintner DM, Luo ZP. Observation of the ultrastructure of anterior cruciate ligament graft by atomic force microscopy. *Scanning*. 2009; 31(1): 19-23.
- Oncins MG, Diaz MJ. Atomic force microscopy: Probing the nanoworld. *Capitol del llibre: Handbook of instrumental techniques for materials, chemical and biosciences research, Centres Científics i Tecnològics. Universitat de Barcelona, Barcelona, 2012. Part I. Materials technologies*. 2012; 7: 10-18.
- Gong T, Lam DV, Liu R, Won S, Hwangbo Y, Kwon S, Kim J, Sun K, Kim JH, Lee SM, Lee C. Thickness dependence of the mechanical properties of free-standing graphene oxide papers. *Advanced Functional Materials*. 2015; 25(24): 3756-3763.
- Shamsekhohan P, Sadeghi H. Overview of the mechanical function of tissue cells affecting human movement. *Scientific Journal of Rehabilitation Medicine*. 2017; 5(4): 271-281.
- Hu S, Li J, Liu L, Dai R, Sheng Z, Wu X, Jiang Y. Micro/nanostructures and mechanical properties of trabecular bone in ovariectomized rats. *International Journal of Endocrinology*. 2015; 1-10.
- Kim Y, Shin JH, Kim J. Atomic force microscopy probing for biomechanical characterization of living cells. *In Biomedical Robotics and Biomechatronics, 2008. BioRob 2008. 2nd International Conference on IEEE*. 889-894.
- Alcaraz J, Buscemi L, Grabulosa M, Trepas X, Fabry B, Farre R, Navajas D. Microrheology of human lung epithelial cells measured by atomic force microscopy. *Biophysical Journal*. 2003; 84(3): 2071-2079.
- Kuznetsova TG, Starodubtseva MN, Yegorenkov NI, Chizhik SA, Zhdanov RI. Atomic force microscopy probing of cell elasticity. *Micron*. 2007; 38(8): 824-833.
- McLean SG, Mallett, KF, Arruda EM. Deconstructing the anterior cruciate ligament: What we know and do not know about function, material properties, and injury mechanics. *Journal of Biomechanical Engineering*. 2015; 137(2): 1-19.

16. Kwaees TA, Pearce A, Ring J, Sutton P, Charalambous CP. Nanotechnology and its applications in knee surgery. In *Micro and Nanomanufacturing*. 2018; 2(1): 35-53. Springer, Cham.
17. Li H, Li J, Jiang J, Lv F, Chang J, Chen S, Wu C. An osteogenesis/angiogenesis-stimulation artificial ligament for anterior cruciate ligament reconstruction. *Acta biomaterialia*. 2017; 54: 399-410.
18. Sanchez-Adams J, Athanasiou KA. Biomechanics of meniscus cells: regional variation and comparison to articular chondrocytes and ligament cells. *Biomechanics and Modeling in Mechanobiology*. 2012; 11(7): 1047-1056.
19. Karunaratne A, Li S, Bull AM. Nano-scale mechanisms explain the stiffening and strengthening of ligament tissue with increasing strain rate. *Scientific Reports*. 2018; 8(1): 370-382.
20. Gibson LJ. Biomechanics of cellular solids. *Journal of Biomechanics*. 2005; 38(3): 377-399.
21. Janmey PA, Miller RT. Mechanisms of mechanical signaling in development and disease. *Journal of Cell Science*. 2011; 124(1): 9-18.
22. Buxboim A, Ivanovska IL, Discher DE. Matrix elasticity, cytoskeletal forces and physics of the nucleus: how deeply do cells 'feel' outside and in? *Journal of Cell Science*. 2010; 123(3): 297-308.
23. Bao G, Suresh S. Cell and molecular mechanics of biological materials. *Nature Materials*. 2003; 2(11): 715-725.
24. Hashemi J, Chandrashekar N, Mansouri H, Slauterbeck JR, Hardy DM. The human anterior cruciate ligament: Sex differences in ultrastructure and correlation with biomechanical properties. *Journal of Orthopaedic Research*. 2008; 26(7): 945-950.
25. Csintalan RP, Inacio MC, Funahashi TT. Incidence rate of anterior cruciate ligament reconstructions. *The Permanente Journal*. 2008; 12(3): 17-24.
26. Wang Y, Xu C, Jiang N, Zheng L, Zeng J, Qiu C, Xie S. Quantitative analysis of the cell-surface roughness and viscoelasticity for breast cancer cells discrimination using atomic force microscopy. *Scanning*. 2016; 38(6): 558-563.
27. Svensson RB, Mulder H, Kovanen V, Magnusson SP. Fracture mechanics of collagen fibrils: Influence of natural cross-links. *Biophysical Journal*. 2013; 104(11): 2476-2484.