

ساختار میکروسکوپی لیگامان متقاطع قدامی در خرگوش

*فرزانه محمد زاده، **دکتر محمد بیات، **دکتر محمد رخشان

*کارشناس ارشد آناتومی، ** مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

خلاصه

لیگامان متقاطع قدامی مفصل زانو ساختمان پیچیده‌ای است که ساختمان و بیولوژی آن ارتباط مستقیمی با عملکرد آن به عنوان کنترل کننده حرکات مفصل دارد. با توجه به اینکه قطر فیبریل‌های کلاژن آن براساس روند بلوغ، میزان حرکت و افزایش سطح استرس تغییر می‌کند و در جراحی ترمیمی آن نقش دارد، به نظر می‌رسد تعیین قطر و توزیع آنها از اهمیت بسیاری برخوردار باشد. هدف تحقیق حاضر شناخت دقیق ساختمان لیگامان متقاطع قدامی، به وسیله میکروسکوپی نوری، الکترونی اسکینینگ و انتقالی در خرگوش است.

سی راس خرگوش نر سالم به وسیله کلروفورم کشته شدند. پس از تشریح مفصل زانو، لیگامانهای متقاطع قدامی از استخوانهای تیبا و ران جدا شد. سپس این نمونه‌ها به روشهای میکروسکوپی نوری و الکترونی اسکینینگ و انتقالی مطالعه و مورد بررسیهای کمی و توصیفی قرار گرفتند. مطالعه به روش میکروسکوپی نوری مقاطع عرضی لیگامان نشان داد که کل لیگامان درون یک مجموعه قرار گرفته و میانگین سطح مقطع آن $1/93 \pm 13/08$ میلیمتر مربع است. در نمونه‌های طولی در برخی موارد امتداد دستجات رشته‌های کلاژن به صورت مستقیم و در موارد دیگر به حالت موج بود. در تصاویر تهیه شده به وسیله میکروسکوپ الکترونی اسکینینگ مشاهده شد که لیگامان از دستجات (fascicles) رشته‌های کلاژن موج در هم بافته‌ای تشکیل شده است که جهت اصلی آنها به موازات محور طولی لیگامان است. نوع دیگر اجتماع دسته‌های کلاژن برای بار اول مشاهده شد که عبارتند از: اجتماعی از رشته‌های کلاژن که شبکه توری مانند سه بعدی را تشکیل داده بودند. در تصاویر مربوط به میکروسکوپ الکترونی انتقالی مشاهده شد که لیگامان اغلب از فیبریل‌های با اقطار $13/2$ الی $125/7$ نانومتر تشکیل شده که به وسیله بافت همبند سست از همدیگر جدا شده‌اند و میانگین آنها در خرگوشهای مورد بررسی $20/7 \pm 49/2$ نانومتر بود.

کلمات کلیدی: لیگامان متقاطع قدامی، فیبریل کلاژن، فراساختان کلاژن، خرگوش

مقدمه

ساختمان (۸)، آناتومی دستجات فیبرها (۱۳)، تغییرات فیبریل‌های آن در هنگام پارگی (۱۶)، تغییرات سلولی آن (۱۵)، تغییرات ساختمانی لیگامان متقاطع به دنبال ترمیم و پیوند با لیگامانهای دیگر (۱۲، ۱۴، ۱۸) و موقعیت گیرنده‌های مکانیکی، ارزیابی بیومکانیکی و سازمان دهی سلولی لیگامان (۱۱، ۱۹)، انجام شده است. قطر فیبریل‌های کلاژن لیگامان طی روند بلوغ، حرکت، افزایش سطح استرس روی بافت تغییر می‌کند (۱۲). بنابراین به نظر می‌رسد شناخت دقیق قطر و توزیع فیبریل‌های کلاژن آن از جنبه هیستولوژی، فیزیولوژی و جراحی‌های ترمیمی آن (۶) از اهمیت بسیاری برخوردار باشد. در همین

لیگامان متقاطع قدامی مفصل زانو ساختمان پیچیده‌ای است که ساختمان و بیولوژی آن ارتباط مستقیمی با عملکرد لیگامان به عنوان کنترل کننده حرکات مفصل زانو دارد. به دلیل همین پیچیدگی ترمیم (duplication) آن بسیار مشکل است (۴). این لیگامان اغلب طی فعالیتهای شدید ورزشی دچار جراحات می‌شود که التیام آن به کندی روی داده و اغلب کارآیی ورزشکار را با اختلال مواجه می‌کند (۲۰). علیرغم تحقیقات گسترده که در این زمینه انجام شده است لیگامان متقاطع قدامی همچنان عرصه پژوهشهای متعدد است. در سالهای اخیر نیز تحقیقات روی این لیگامان از جنبه ابعاد و

روش رنگ آمیزی هاتوکسیلین و اتوزین رنگ شدند. در نمونه‌های عرضی (شش نمونه) سطح مقطع برشها به وسیله دستگاه میکروپروژکتور Ken-A-Vision ساخت آمریکا روی ورقه شفاف منتقل شد و توسط صفحه شطرنجی مساحت سطح مقطع محاسبه و بر بزرگنمایی میکروپروژکتور تقسیم شد. نمونه‌های طولی (چهار نمونه) لیگامان به روش توصیفی مطالعه شدند.

مطالعه به روش میکروسکوپ الکترونی اسکینینگ: سری اول: نمونه‌های طولی لیگامان منقطع قدامی کامل چهار راس از خرگوشها بلافاصله پس از جداسازی درون محلول گلو تار آلژین سد درصد در بافر فسفات $\text{pH} = 7/3$ تثبیت و سپس درون اسید اسمیک یک درصد تثبیت ثانویه شدند. در ادامه به منظور مطالعه به روش استاندارد نمونه‌ها به مدت یک ساعت درون محلول بافر فسفات قرار داده شدند و طی این مدت محلول بافر پنج تا شش بار عوض شد.

سری دوم: به منظور مطالعه دقیق ساختار لیگامان و از بین رفتن غلاف و بافت هبند اطراف رشته‌های کلاژن از دو آنزیم هضم کننده هیالورونیداز و الاستاز استفاده شد. آنزیمها محصول شرکت Sigma Aldrich آمریکا بود. ۱۵۰۰ واحد پودر آنزیم هیالورونیداز درون ۱۵۰ میلی لیتر بافر سدیم استات با $\text{pH} = 5/4$ و مولاریته ۰/۱ حل شد. ۱۰ mg الاستاز در ۱۰۰ میلی لیتر بافر سدیم کریئات با $\text{pH} = 8/8$ و مولاریته ۰/۵ حل شد. چهار نمونه تازه لیگامان که بلافاصله پس از نمونه برداری ابتدا با محلول کلوروسدیم ۰/۹ درصد شستشو شده بودند، به مدت ۶ الی ۱۸ ساعت درون آنزیمهای هیالورونیداز و الاستاز در درجه حرارت 37°C قرار گرفتند. نمونه‌ها سپس درون محلول گلو تار آلژین سد درصد در بافر فسفات تثبیت و پس از آن با اسید اسمیک یک درصد تثبیت ثانویه شدند. در ادامه نمونه‌ها درون محلول استن با غلظتهای ۷۰، ۸۰، ۹۰ و ۱۰۰ درجه قرار گرفته و آبگیری شدند. سپس نمونه‌ها درون ظرف حاوی (Isopentan (FLUKA قرار گرفته و به آرامی درون تانک حاوی ازت مایع فرو برده شدند

زمینه نتایج مطالعات انجام شده با یکدیگر متفاوت است. تحقیقات قطر فیبرلها را بین ۱۵۰ الی ۲۵۰ نانومتر (۳) و قطر متوسط فیبرلهای لیگامان را که بین ۲۰ الی ۱۸۵ نانومتر بودند، ۷۵ نانومتر (۱۶) گزارش کرده‌اند. فیبرلها را از نظر قطر به دو تیپ کوچک و بزرگ تقسیم نموده‌اند. فیبرلهای کوچک با حداکثر قطر (peak) ۴۵ نانومتر و فیبرلهای بزرگ که در سه دسته با قطرهای ۳۵، ۵۰ و ۷۵ نانومتر قرار گرفته‌اند (۲۰). متوسط قطر فیبرلهای لیگامان منقطع خرگوش را در ۳۳ الی ۴۰ ماهگی، $0/005 \times 0/069$ میلیمتر و در سن ۲ ماهگی $0/006 \times 0/077$ میلی متر گزارش کرده اند (۹).

از طرف دیگر، تاکنون تحقیقی روی لیگامان منقطع قدامی به وسیله کاربرد همزمان روشهای میکروسکوپیهای نوری، الکترونی اسکینینگ و انتقالی انجام نشده است. بنابراین با توجه به اینکه خرگوش یک مدل رایج تحقیقاتی لیگامانهای اطراف زانو است (۱۰)، هدف از این تحقیق شناخت دقیق ساختمان لیگامان منقطع قدامی با به کار بردن روشهای فوق در خرگوش است.

مواد و روش کار

۳۰ راس خرگوش نر سالم نژاد DUTCH، ۵ الی ۶ ماهه که از انستیتو پاستور ایران تهیه شده بودند، به روش استنشاق کلروفورم در فضای بسته کشته شدند. پس از تشریح مفصل زانوی راست آنها، اتصالات لیگامان منقطع قدامی به آرامی از استخوانهای تیبیا و ران جدا شد و به وسیله روشهای میکروسکوپ نوری، الکترونی اسکینینگ و انتقال مطالعه شدند.

مطالعه به روش میکروسکوپ نوری: نمونه‌های لیگامانهای منقطع قدامی کامل ده راس از خرگوشها بلافاصله پس از جداسازی از بدن آنها، در فرمالین سالین غوطه‌ور شده و پردازش بافتی گردید. به صورت عمودی و طولی درون قالبهای پارافینی قالب گیری شده و به وسیله میکروتوم با تیغه ثابت برشهایی با ضخامت پنج میکرون زده شد. برشها با

عکسبرداری و به صورت توصیفی و کمی مطالعه شدند. به منظور انجام مطالعه کمی قطر بر اساس روش Hart et al (۹) و Moeller et al (۱۲)، در ۲۹۰۰-۱۰۰۰ فیبریل کلاژن، ابتدا بزرگنمایی عکس چاپ شده نسبت به فیلم عکاسی محاسبه شد و این بزرگنمایی در بزرگنمایی میکروسکوپ الکترونی ضرب و بزرگنمایی نهایی به دست آمد. سپس کمترین هر قطر فیبریل کلاژن به وسیله خط کش مدرج میلیمتری اندازه گیری و میانگین و انحراف معیار و حداقل و حداکثر قطر هر فیبریل و دامنه قطر آنها با کمک برنامه نرم‌افزاری SPSS در فیبریل‌های هر نمونه و کل ۶ نمونه محاسبه شد و کل قطرهای مورد بررسی به زیر گروه‌هایی تقسیم و فراوانی قطرهای مورد بررسی و درصد قطر مورد نظر از کل قطرهای مورد بررسی و درصد تجمعی آنها محاسبه شد.

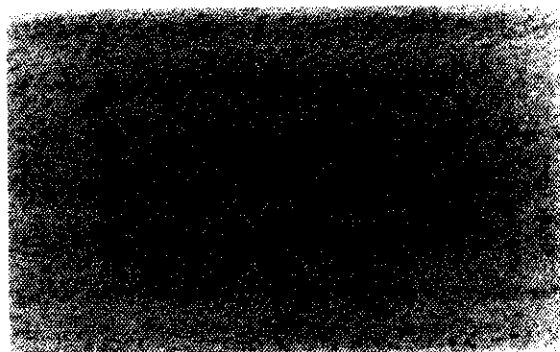
نتایج

نتایج مطالعه به روش میکروسکوپ نوری در دو بخش مطالعه توصیفی و کمی تنظیم و در بخش مطالعه توصیفی نمونه‌ها به دو صورت برشهای عرضی و طولی بررسی شدند. در تمام برشهای عرضی، شکل لیگامان تقریباً بیضوی بوده و از دو ناحیه کاملاً متفاوت تشکیل شده است. یک قسمت بافت هبند سست احاطه کننده رشته‌های کلاژن و قسمت دیگر دستجات رشته‌های کلاژن تشکیل دهنده لیگامان است (شکل ۱). بافت هبند احاطه کننده کل لیگامان (پری‌تونن) که کل رشته‌های تشکیل دهنده لیگامان را درون یک مجموعه در بر گرفته بود، قابل مشاهده است (شکل ۱). در برخی از برشهای طولی دسته‌های کلاژن امتداد مستقیم داشته و در برشهای دیگر به صورت موج هستند. در محل اتصال لیگامان به استخوان نمای ظاهری بافت تغییر و نمای غضروف فیبرو را پیدا می‌کند. تعداد سلولها بیشتر و دسته‌های کلاژن پراکنده می‌شوند. سلولها به شکل بیضوی بوده و توسط فضاهای مشابه با لاکونای غضروف احاطه می‌شوند. سلولها به صورت ردیف و پشت سر هم قرار می‌گیرند (شکل ۲). اندازه‌گیری سطح مقطع لیگامانها در شش نمونه خرگوش نشان

و بلافاصله به دستگاه فریز درایر (Edward) منتقل شدند و به مدت حدود ۶ ساعت در درجه حرارت 20°C - و در شرایط خلاء تحت مکش بودند و به این ترتیب نمونه‌ها به طور کامل خشک شدند. بعد از انجام مراحل فوق نمونه‌ها زیر استریومیکروسکوپ و توسط ترکیب چسب انتلان و پودر نترات نقره به پایه‌های (stub) آلومینیومی میکروسکوپ چسبانده شدند. سپس سطح نمونه‌ها به وسیله ورقه نازکی از طلا به ضخامت حدود ۳۰ نانومتر توسط دستگاه sputter coater مارک SCD-005 پوشانده شد. نمونه‌ها به وسیله میکروسکوپ الکترونی اسکینینگ ZIESS DSM940A، ۱۵ KV مشاهده شدند. نمونه‌ها با بزرگنمایی ۱۰۰ الی ۵۰۰۰ برابر با میکروسکوپ بررسی و از نواحی مورد نظر با استفاده از فیلم سیاه و سفید KODAK 135 عکسبرداری شد.

مطالعه به روش میکروسکوپ الکترونی انتقالی: به منظور بررسی ضخامت مقاطع فیبریل‌های کلاژن لیگامان از شش نمونه تازه لیگامان که با محلول کلوروسدیم شسته شده بودند، نوارهای طولی با ضخامت حدود یک میلی‌متر تهیه و درون محلول گلو تار آلدئید سه درصد در بافر فسفات (pH=۷/۳) تثبیت شد. سپس درون اسیداسمیک یک درصد تثبیت ثانویه شدند. نمونه‌ها درون الکل با غلظتهای افزایشنده قرار گرفته و آگیری و سپس رزین دهی شدند. قالبها توسط دستگاه اولترامیکروتوم LEICA ULTRACUT R برش زده شدند. ابتدا برشهای نیمه نازک (semithin) تهیه و رنگ آمیزی در محلول آبی تولوئیدین بلو یک درصد انجام شد و از موقعیت صحیح نمونه اطمینان حاصل گردید. سپس برشهای خیلی نازک (Ultrathin) به ضخامت ۹۰-۶۰ نانومتر تهیه و روی گریدهای (Grids) مسی قرار داده شدند و رنگ آمیزی دوگانه توسط محلول اشباع استات اورانیوم و محلول سیترات سرب انجام شد. نمونه‌ها توسط میکروسکوپ الکترونی انتقالی ZIESS EM900 با بزرگنمایی ۴۴۰۰ الی ۱۲۰۰۰ برابر مشاهده و از نواحی مورد نظر با استفاده از فیلم کدک ۱۲۰

ساختار میکروسکوپی لیگامان متقاطع قدامی

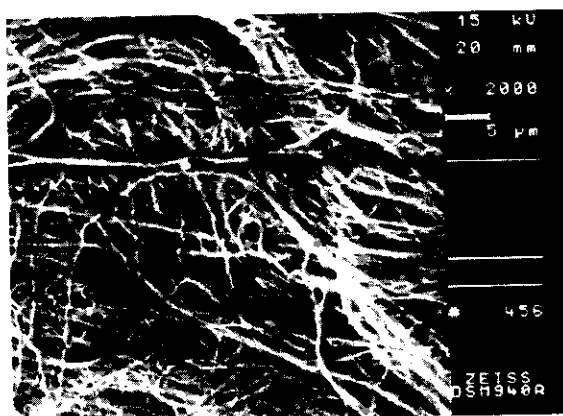
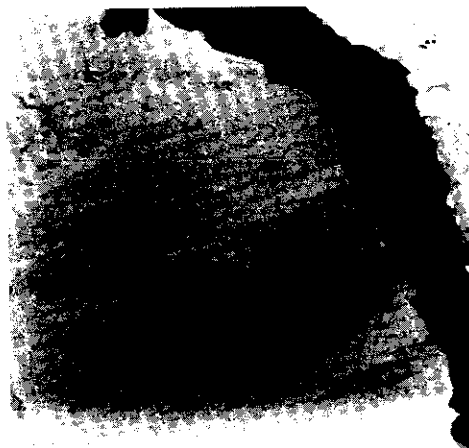


شکل ۲: مقطع طولی لیگامان در محل اتصال به استخوان. به سلولهای غضروفی (*) توجه نمایید (رنگ آمیزی H&E، بزرگنمایی ۱۰۰ برابر).

شکل ۱: مقطع عرضی لیگامان متقاطع قدامی. L = قسمت بافت همبند سست، C = قسمت مقطع عرضی رشته‌های کلاژن، P = پری تنون (رنگ آمیزی H&E، بزرگنمایی ۳۲ برابر).



شکل ۳: سطح لیگامان با میکروسکوپ الکترونی اسکینینگ که با روش استاندارد آماده شده است. به رشته‌های کلاژن (F) در قطرهای متفاوت و چگونگی بافته شدن آنها به یکدیگر و فضای بین آنها (D) توجه نمایید (بزرگنمایی میکروسکوپ ۲۰۰۰ برابر).



شکل ۵: میکروگراف الکترونی از مقطع عرضی لیگامان متقاطع قدامی که فیبریلها (F) و دسته‌های کلاژن (F) را نشان می‌دهد. به بافت همبند سست بین دسته‌های کلاژن (L) توجه نمایید (بزرگنمایی نهایی ۱۸۴۸۰ برابر می‌باشد).

شکل ۴: سطح لیگامان با میکروسکوپ الکترونی اسکینینگ پس از آماده سازی آنژیومی لیگامان. به آرایش توری مانند و سه بعدی و جهت متفاوت بعضی از دسته‌ها توجه نمایید (بزرگنمایی میکروسکوپ ۲۰۰۰ برابر).

بحث

مطالعه برشهای عرضی به وسیله میکروسکوپ نوری، نمایانگر يك قسمتی بودن لیگامان بود، در حالی که به دنبال بررسی ماکروسکوپی لیگامان در نمونه‌های تثبیت شده سگ و خرگوش و انسان نشان می‌دهد که لیگامان متقاطع قدامی از دو باند تشکیل شده است (۲). همچنین مشاهدات ماکروسکوپی نشان دهنده تقسیم بندی لیگامان متقاطع قدامی به دو قسمت داخلی و خارجی است (۲۱)، اما با توجه به اینکه در مشاهده مقاطع عرضی تحقیق حاضر به روش میکروسکوپی نوری، وجود بافت همبند احاطه کننده کل لیگامان (پری تنون) کاملاً محرز و آشکار بود، به نظر می‌رسد باندها و قسمت داخلی و خارجی ذکر شده توسط سایر محققین بصورت لایه‌های کاملاً منظم نبوده و در همه مقاطع قابل مشاهده نمی‌باشند.

برشهای طولی مربوط به بلوکهای پارافینی تحقیق Strocchi et al نمایانگر دستجات موجی شکل ساخته شده از رشته‌های کلاژن بود (۲۰). این مشاهدات با نتایج مربوط به تحقیق حاضر همخوانی دارد اما در برشهای طولی تحقیق حاضر دسته‌های کلاژن با امتدادهای مستقیم هم مشاهده شد که هر چند مغایر نتایج Strocchi et al است اما با نتایج Yahia & Drovin که دسته‌های کلاژن با امتداد مستقیم را در نواحی عمقی تر لیگامان مشاهده کردند، همخوانی دارد (۲۲). در برشهای میکروسکوپی نوری لیگامان که در نزدیکی استخوان قرار دارند، سلولهای شبیه به غضروف مشاهده شد. هر چند به این یافته در تحقیق Strocchi et al که عنوان مطالعه بافت‌شناسی و فراساختار لیگامان متقاطع قدامی را داشت، اشاره نشد اما در تحقیق Clark & Sidles به وجود این نوع سلولها در نزدیکی محل اتصال لیگامان به استخوان اشاره شده است. مشاهده این سلولها تایید کننده وجود استرس در این ناحیه است (۲). در تصاویر میکروسکوپ الکترونی اسکینینگ که از سطح نمونه‌های تیمار شده با آنزیم تهیه شده بود، دستجات کلاژنی به صورت شبکه سه بعدی مشاهده شد که تاکنون به آنها اشاره نشده است و به نظر می‌رسد که

داد که میانگین سطح مقطع لیگامان متقاطع قدامی $1/93 \pm 13/08$ میلیمتر مربع می‌باشد.

نتایج بررسی لیگامان به روش استاندارد توسط میکروسکوپ الکترونی اسکینینگ نشان می‌دهد که لیگامان متقاطع قدامی از دستجات متشکل از رشته‌های کلاژن موج و در هم بافته تشکیل می‌شود که جهت اصلی آنها به موازات محور طولی لیگامان است و آرایش، جهت و قطر آنها با یکدیگر متفاوت است (شکل ۳). همچنین فضای خالی بین دسته‌های کلاژن قابل مشاهده می‌باشد.

پس از تیمار لیگامان با آنزیمهای هیالورونیداز و الاستاز می‌توان مشاهده نمود که لیگامان متقاطع قدامی آرایش پیچیده‌تری نسبت به آنچه تاکنون مشاهده شد، دارد. در شکل ۴ پس از اعمال اثر آنزیمها و از بین رفتن ماده زمینه‌ای دستجات فرعی که روی دستجات اصلی تکیه کرده‌اند، مشاهده می‌شوند که مطالعه دقیقتر آنها نشان می‌دهد دارای مسیر، جهت و آرایشهای متفاوتی هستند. همچنین دسته‌های کلاژن به طوری که در شکل مشاهده می‌شود که مجموع شبکه توری مانند سه بعدی را تشکیل داده‌اند. مطالعه توصیفی تصاویر میکروسکوپ الکترونی انتقالی لیگامان نشان داد که دو قسمت ساختمانی متفاوت در ساختمان لیگامان وجود دارد:

۱) بافت همبند سست پوشاننده لیگامان که استتالهای آن سبب جداسازی و تقسیم بندی ریزتر لیگامان می‌شود.
۲) فیبریلهای کلاژن که دارای مقاطع گرد تا بیضی هستند فضای بین فیبریلها به صورت ماده بی شکل و یکنواخت مشهود است (شکل ۵). نتایج حاصل از اندازه‌گیری مقاطع عرضی فیبریلهای کلاژن به این شرح می‌باشد که:

تعداد مقاطع مورد بررسی در هر کدام از خرگوشها بین ۱۰۰۶ تا ۲۹۰۵ عدد و میانگین قطر آنها ۴۰ الی ۵۹/۸ نانومتر بود. تعداد کل مقاطع مورد بررسی ۱۰۲۲۳ عدد و میانگین کل قطر آنها $20/7 \times 49/2$ نانومتر بود. حداقل قطر فیبریلها $13/2$ نانومتر و حداکثر قطر آنها $125/7$ نانومتر بود که تقریباً به طور مساوی در این محدوده پخش شده‌اند.

می‌رسد که فرض نمائیم که گروه‌های مختلف فیبریلها عملکردهای متفاوتی دارند. فیبریلهای با قطر زیاد برای مقاومت در مقابل قدرت کشش مناسب هستند و فیبریلهای با قطر کم ساختمان سه بعدی لیگامان را حفظ می‌کنند. در نتایج تحقیق حاضر فیبریلهای با قطرهای مختلف مشاهده شد که هر دو نوع عملکرد را برای لیگامان امکان‌پذیر می‌سازد.

لیگامان متقاطع قدامی خرگوش دارای الگوهای آرایش رشته‌های کلاژن در هم بافته طولی و شبکه سه بعدی رشته‌های کلاژن است. علیرغم اینکه فیبریلهای کلاژن از نظر قطر، دامنه وسیعی دارند ولی تقریباً به طور مساوی در یک محدوده پخش شده‌اند.

تقدیر و تشکر

مقاله حاضر نتیجه طرح تحقیقاتی شماره ۱۶۱۱ حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی است. نویسندگان مقاله مراتب تقدیر و تشکر خود را از آن معاونت و همکار محترم جناب آقای دکتر کاظمی و بخش میکروسکوپ الکترونی بیمارستان بقیه‌الله تهران و مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی دانشگاه متبوع و دکتر فروزنده مقدم و خانم زرنندی از دانشگاه تربیت مدرس اعلام می‌دارند.

References

1. Arcand M. A., Rhlami S., Rivard C. H., 2000, Quantification of mechanoreceptors in the canine anterior cruciate ligament, *Int. Orthop.*, 24(5): 272-5.
2. Clark J. M., Sidles J. A., 1990, The interrelation of fiber bundles in the anterior cruciate ligament, *Orthop. Res.*, 8 : 180-188.
3. Danylchuk K. D., Finlay J. B., Kreck J. P., 1978, Microstructural organization of human and bovine cruciate ligament's , *Clin. Orthop. Relat. Res.*, 131:294-298.
4. Dodds J. A., Arnoczky S. P., 1994, Anatomy of the anterior cruciate ligament: a blue print for repair and reconstruction, *Arthroscopy*, 10(2): 132-139.
5. Flint M. H., Craig A. S., Reilly H. C., Gillard G. C., Parry D. A. D., 1984, Collagen fibre diameters and glycosaminoglycan content of skin indices of tissue maturity and function, *Connect. tissue Res.*, 13,69-81.
6. Frank C. Woo S. L. Y., Andriacchi T., Brand R., Oakes B., Dahners L., De Heven K., Lewis J., Sabiston P., Normal ligament: structure of function and composition, in: Woo S.L. Y.,

الگوی سه بعدی لیگامان متقاطع قدامی را پیچیده‌تر از آنچه که تاکنون تصور می‌شد، ساخته‌اند.

Strocchi et al اختلاف بین ضخامت قطر فیبریلها را در تحقیق خود (۲۰) با تحقیق Danylchuck et al (۳) متذکر شدند اما دلیلی برای آن قائل نشدند. در تحقیق حاضر قطر فیبریلهای کلاژن بین ۱۳/۲ تا ۱۲۵/۷ نانومتر بود که تقریباً به طور مساوی بین این دو حد پخش شده‌اند و این از نظر توزیع فیبریلها با نتایج تحقیق Hart et al (۹) همخوانی دارد. قطر فیبریلها در تحقیق حاضر تقریباً با نتایج تحقیق Strocchi et al (۲۰) هم مشابه است اما با نتایج Danylchuck et al (۳) متفاوت است. دلیل احتمالی این تفاوت ممکن است روش مطالعه و اجرای تحقیق باشد. در تحقیق حاضر موارد زیر جهت افزایش دقت محاسبه قطر فیبریلهای کلاژن صورت گرفت:

الف) استفاده از روش میکروسکوپی الکترونی انتقالی برای محاسبه قطر فیبریلها (۹، ۱۲ و ۲۰).

ب) به علت ماریجی بودن مسیر رشته‌های کلاژن، حداقل قطر فیبریلها مبنای محاسبه قرار گرفت تا به دلیل جهت مایل فیبریلها قطر آنها اشتباه محاسبه نگردد (۱۲).

ج) در هر نمونه شمارش در بین ۱۰۰۰ الی ۲۹۰۰ فیبریل انجام شد تا از نظر آماری، کار دقیق‌تری صورت گیرد (۹).

توزیع قطرهای فیبریلهای کلاژن و میانگین قطرهای فیبریلهای بافت همبندی وابسته به عوامل متعددی است. جمعیت فیبریلهای کلاژن در طی دوران بلوغ، بی حرکتی و با افزایش درجه استرس روی بافت تغییر می‌کند. برخی از محققان پیشنهاد کرده‌اند میانگین قطر فیبریلهای کلاژن در بافت همبند در ارتباط با مقاومت در برابر حداکثر استرسهای مکانیکی است که اعمال می‌شود (۱۲).

از طرفی قطر فیبریلها بیانگر عملکرد ویژه فیبریل است (۱۶). با افزایش سن و افزایش پیوندهای عرضی قطر فیبریلها هم افزایش می‌یابد و این به نوبه خود موجب افزایش قدرت کشش بافت می‌شود (۱۷) با توجه به موارد فوق منطقی به نظر

- human anterior cruciate ligament of rupture, *J. Bone Joint Surg. Am.*, 82 A (10): 1387-1397.
15. Neurath M. F., Printz H., Stofft E., 1994, Cellular ultrastructure of the ruptured anterior cruciate ligament, *Acta Orthop. Scand.*, 65(1): 71-76.
 16. Neurath M. F., Stofft E., 1992, Collagen ultrastructure in ruptured cruciate ligaments, *Acta Orthop. Scand.*, 63 :507-510.
 17. Nimmi M. E., 1983, Collagen structure, function and metabolism in normal and fibrotic, *Semin in Arthritis and Rheum*, 13 (1):1-86.
 18. Ohno K., Pamaybo A., Schmidt C. C., Levine R. E., Ohland K. J., Woo S. L. Y., 1995, Healing of the medial collateral ligament after a combined medial collateral and anterior cruciate ligament injury and reconstruction of the anterior cruciate ligament: comparison of repair and nonrepair of medial collateral ligament in rabbits, *J. Orthop. Res.*, 13:442-449.
 19. Pangabi M. M., Courtney T. W., 2001, High-speed subfailure stretch of rabbit anterior cruciate ligament: changes in elastic, failure and viscoelastic characteristic, *Clin. Biomech.*, 16(4): 334-40.
 20. Strocchi R., Depasquale V., Gubellini P., Faccini A., Marcacci M., Buda R., Zaffagninis, Rugger A. 1992, The human anterior cruciate ligament : histological and ultrastructural observation, *J. Anat.*, 80: 515-519.
 21. Woo S. L. Y., Newton P. O., Mackenna D. A., Lyon R. M., 1992, A comparative evaluation of the mechanical properties of the rabbit medial collateral and anterior cruciate ligaments, *J. Biomech*, 25: 377-386.
 22. Yahia L. H., Drovin G., 1989, Microscopical investigation of canine anterior cruciate ligament and patellar tendon collagen fascicle morphology and architecture, *J. Orthop. Res.*, 7:243-251.
 - Buckwalter J. (eds), *Injury and repair of musculoskeletal soft tissues*, American Academy of Orthopaedic Surgeons, Park Ridge, 1988, 45-101.
 7. Fuss F., 1991, Anatomy and function of the cruciate ligaments of the domestic pig (*suss crofa domestica*) a comparison with human cruciates, *J. Anat.*, 178:11-20.
 8. Harner C. D., Livesay G. A., Kashiwaguchi S., Fujie H., Choi N. Y., Woo S. L., 1995, Comparative study of the size and shape of human anterior and posterior cruciate ligament, *Orthop. Res.*, 13:429-434
 9. Hart R. A., Akeson W. H., Spratt K., Amiel D., 1999, Collagen fibril diameter distributions in rabbit anterior cruciate and medial collateral ligaments: changes with maturation, *Iawa Orthop. J.*, 19:66-70.
 10. King G. J. W., Edwards P., Brant R. F., 1999, Intraoperative graft tensioing alerts viscoelastic but not failure behavior of rabbit collateral ligament out graft, *J. Orthop. Res.*, 13:915-922.
 11. Lo I. K., Ou Y., Rattner J. P., Hart D. A., Marchuk L. L., Frank C. D., Rattner J. B., 2002, The cellular networks of normal ovine medial collateral and anterior cruciate ligaments are not accurately recapitulated in scar tissue, *J. Anat.*, 200(pt3):282-96.
 12. Moeller H. D., Bosch U., Decker B., 1995, Collagen fibril diameter distribution in patellar tendon autograft after posterior cruciate ligament reconstruction in sheep: change over time, *J. Anat.*, 187: 161-167.
 13. Mommersteeg T. J. A., Kooloos J. G., Blankvoort L., Huiske R., Roling F. Q. C., 1995, The fibre bundle anatomy of human cruciate ligaments, *J. Anat.*, 187:461-471.
 14. Murrar M. M., Martin S. D., Martin T. L., Spector M., 2000, Histological changes in the