مطالعه تجربی فرآوری قرنیه بدون سلول شترمرغ به عنوان زنوگرافت

مریم فتوره‌چی*[۱]، حمیدرضا فتاحیان[۲]، عبدالمحمد کجباف‌زاده[۳]

چکیده

قرنیه سالم مهمترین عامل در مسیر اپتیکی چشم محسوب می‌شود. کوری قرنیه به علل و شدت‌های متفاوتی رخ می‌دهد و در اغلب موارد مناسب‌ترین درمان پیوند آلوگرافت است. محدودیت‌های نگهداری و کمبود بافت آلوگرافت، استفاده از بافت زنوگرافت را در کنار بیومتریال‌های سنتتیک و قرنیه مصنوعی، به عنوان جایگزین مطرح ساخته است. تحقیق حاضر با توجه به نیاز دسترسی به منابع دهنده بافتی، با استفاده از قرنیه شترمرغ و بهره‌گیری از فناوری بدون سلول کردن بافت، به تهیه ماتریکس خارج سلولی از قرنیه می‌پردازد.

ده عدد سر شترمرغ از کشتارگاه تهیه شد. پس از آماده سازی و جداسازی قرنیه، با ترکیب دو روش شیمیایی مکانیکی و دترجنت یونی، دیسک آسلولار تهیه گردید. به‌منظور تأیید حذف سلول‌ها و حفظ ساختار قرنیه، مقاطع بافتی با میکروسکوپ نوری و الکترونی، مورد مطالعه ریزبینی و فوق ریزبینی قرار گرفتند. ارزیابی شفافیت و ضخامت قرنیه به صورت ماکروسکوپی صورت گرفت.

مطالعه ریز بینی نمونه‌های فرآوری شده نشان دهنده حذف سلول‌های قرنیه و حفظ یکپارچه غشاء پایه بود. بررسی بافت همبندی در مطالعه فراساختاری حاکی از عدم بهم ریختگی در ساختار کلاژنی به همراه افزایش فاصله بین دستجات کلاژنی بود. دیسک آسلولار با درجاتی از کدورت، پس از غوطه ور سازی در گلیسرول ۱۰۰ درصد شفاف گردید.

مطالعه حاضر نشان داد با روش کار اشاره شده، دستیابی به بافت بدون سلول از قرنیه شترمرغ امکان پذیر می‌باشد و پس از انجام سایر آزمایش‌ها نظیر کشت سلول، ایمنی و بیومکانیک، قابلیت کاربرد در مطالعات بالینی تجربی را خواهد داشت.

واژگان کلیدی: *قرنیه بدون سلول، ماتریکس خارج سلولی، زنوگرافت، شترمرغ*

تاریخ دریافت: ۹۳/۱۱/۱۹ تاریخ پذیرش: ۹٤/۲/۲٤

مقدمه

قرنیه‌ی سالم یکی از مهمترین عوامل بینایی چشم محسوب می‌شود و مانند سد فیزیکی چشم را در برابر محیط خارج حفظ می‌نماید (۱۱). بنابراین آسیب به قرنیه منجر به کدورت قرنیه، اختلال در بینایی و حتی کوری می‌شود (۱٤). در حال حاضر تنها درمان مورد پذیرش و مؤثر برای آسیب‌های برگشت ناپذیر قرنیه، پیوند قرنیه است، دسترسی به قرنیه سالم و کمبود پیوندهای آلوگرفت این نوع از درمان را با محدودیت‌های بسیاری در پزشکی و دامپزشکی مواجه ساخته است (۷). بیش از ده میلیون نفر در سراسر جهان از کوری ناشی از بیماری‌ها و آسیب‌های قرنیه رنج می‌برند (۱۱)، این در حالیست که تنها ۱۲۰،۰۰۰ قرنیه در سال جهت انجام پیوند دریافت می‌شود (۵). محدودیت جهانی دسترسی به قرنیه دهنده مناسب، منجر به توسعه روش‌های جایگزین گردیده است و در این راستا بسیاری از محققان به ساخت جایگزینی معادل با قرنیه، از قبیل قرنیه مصنوعی و ساختارهای مهندسی بافت اقدام کرده‌اند (۷) تا از این طریق بر معایب آلوگرافت غلبه کنند، علی رغم پیشرفت در طراحی داربست‌های زیستی، این هدف هنوز به طور کامل حاصل نگردیده است (۱۱و ۷). از سویی ویژگی‌های منحصر به فرد ایمنی قرنیه، این بافت را به عنوان یک کاندید جهت زنوگرافت مطرح می‌سازد و پتانسیل استفاده از قرنیه حیوانی را بیان می‌دارد (۷). تلاش‌های بسیاری با هدف انجام پیوند قرنیه از حیوانات به انسان صورت گرفته است، قرنیه گاو، سگ، ماهی، ژیبون، خوک، گوسفند و خرگوش تا کنون مورد آزمایش قرار گرفته‌اند. قرنیه خوک به دلیل دارا بودن مشابهت در فیزیولوژی و خاصیت انکساری با قرنیه انسان و همچنین دسترسی ساده و به صرفه بودن از نظر اقتصادی بیشتر از سایر حیوانات مورد استفاده و آزمایش قرار گرفته است و تلاش برای استفاده بالینی از زنوگرافت‌های خوک همچنان ادامه دارد. البته در برخی از نقاط دنیا استفاده از قرنیه خوک به منظور پیوند

*۱- دانش آموخته دکتری حرفه ای، دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران. m_fatourehchi@yahoo.com

۲- گروه آموزشی علوم درمانگاهی، دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۳- مرکز تحقیقات ارولوژی اطفال، قسمت مهندسی بافت و طب بازساختی، قطب علمی کودکان ایران (مرکز طبی کودکان)، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

Archive of SID

www.SID.ir

قرنیه بر اساس دستورات مذهبی (اسلام، یهودیت، برهما و بودا) قابل قبول نمی‌باشد (٤و ٣). انتظار می‌رود که بافت زنوگرافت منابع کافی از ارگان‌ها را برای پیوند بالینی فراهم کند، البته خصوصیات ایمونولوژی که باعث نادیده گرفته شدن پیوند توسط سیستم ایمنی می‌شود، در زنوگرافت مطلق نمی‌باشد (١٤) و زنوگرافت‌ها با سرعت بیشتری نسبت به آلوگرافت‌ها در گیرنده پیوند پس زده می‌شوند. یکی از روش‌های دیگر آماده‌سازی بستر در کنار بیومتریال‌ها و پلیمرهای صناعی، استفاده از بافت پیوندی آسلولار شده با برداشت کامل سلول‌ها و مولکول‌های واکنش دهنده ایمنی است (١٦). پروتکل آسلولار شامل چندین مرحله به منظور تحریک کردن لیز غشاء سلولی، جدا سازی ترکیبات سلولی از ماتریکس خارج سلولی، حل کردن هسته سلول و ترکیبات سیتوپلاسم و خارج ساختن خرده‌های سلولی از بافت می‌باشد. در نهایت پروتئین‌های ساختاری و عملکردی، ماتریکس خارج سلولی باقی مانده را، تشکیل می‌دهد (١٥). در راستای تهیه بافت فاقد سلول از بافت‌هایی با منابع زنو، عدم تخریب ساختار و ماتریکس بافتی در طی این مراحل ایده‌آل می‌باشد(١٥). قرنیه آسلولار شده به دلیل ساختار ذاتی‌اش، از قرنیه‌های صناعی و ساختارهای مهندسی بافت که به صورت مصنوعی ساخته یا سنتز شده‌اند متفاوت است (٩).

در بین مطالعات انجام شده در چشم پزشکی به امکان استفاده از قرنیه شترمرغ در پیوند قرنیه اشاره شده است، از طرفی بزرگ بودن قطر و ضخامت قرنیه شترمرغ امکان تهیه قرنیه‌ای متناسب با اندازه قرنیه انسان و سایر گونه‌ها را بیان می‌دارد (١٢و ١٠، ٦). با توجه به اهمیت فرآوری بافت قرنیه با اهداف بالینی، طرح تحقیقاتی حاضر به منظور تهیه بافت بدون سلول از قرنیه شترمرغ طراحی گردید.

مواد و روش کار

تهیه قرنیه شترمرغ و آماده سازی قرنیه

ده عدد سر شترمرغ تهیه شده از یک مزرعه پرورش شترمرغ (شهریار، تهران)، پس از کشتار توسط ماشین‌های مخصوص حمل بار گوشت شترمرغ، به منظور جداسازی قرنیه به محل دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات ارسال گردید. بعد از کشتار شترمرغ‌ها، به منظور کاهش تغیرات پس از مرگ، پلک‌ها به طور کامل بسته شدند و با قرار دادن بسته‌هایی از یخ بر روی آنها، در محفظه ای بسته، نگهداری گردیدند.

قرنیه تمام ضخامت شترمرغ به همراه ٢ میلیمتر از بافت صلبیه از کره چشم جدا شد، سپس جهت ارزیابی بافت شناسی به فالکون حاوی فرمالین بافر ١٠٪ انتقال داده شد. فاصله زمانی جدا سازی قرنیه‌ها و کشتار شترمرغ‌ها به طور متوسط هشت ساعت بود.

روش آسلولار کردن قرنیه شتر مرغ

ابتدا لایه اپیتلیوم قرنیه به روش مکانیکی با سواب آغشته به اتانول برداشته شد. پس از برش دادن قرنیه، دیسک‌های تهیه شده به محلول فسفات بافر نمکی (Phosphate-Buffered Saline/PBS) انتقال داده شد. سپس کلیه نمونه‌ها با توجه به وسعت و ضخامت مورد نظر، در محلول ١- ٠/٥ درصد سدیم دودسیل سولفات (Sodium Dodecyle Sulfate/SDS) قرار گرفتند و با سرعت ٨٠ دور بر دقیقه تکان داده شدند. پس از ٨ بار شستشو با محلول PBS، در محلول PBS آنتی‌بیوتیک نگهداری گردیدند.

بافت شناسی قرنیه شترمرغ

قرنیه تازه شترمرغ به منظور تثبیت بافت در محلول فرمالین بافر ١٠ درصد قرار داده شد. آماده سازی بافتی به روش معمول صورت گرفت و قالب‌های پارافین تهیه گردیدند. پس از قرار گیری نمونه‌ها بر روی لام، نمونه‌ها با دو روش رنگ آمیزی هماتوکسلین و ائوزین (H&E) و پریودیک اسید شیفت (PAS) رنگ آمیزی گردیدند و با میکروسکوپ نوری مورد بررسی بافت شناسی قرار گرفتند.

www.SID.ir

به منظور ارزیابی میزان آسلولار شدن، سه قطعه از بافت‌های فرآوری شده، به طور تصادفی انتخاب گردید و طی روند بافت‌شناسی با استفاده از H&E و PAS رنگ آمیزی شد و سپس با میکروسکوپ نوری جهت تأیید روش آسلولار مورد بررسی قرار گرفتند.

میکروسکوپ الکترونی روبشی Scanning Electron Microscope (SEM)

تثبیت اولیه نمونه‌های قرنیه تازه و آسلولار بوسیله گلوتارآلدهید و تثبیت ثانویه با تتراکساید اسمیم صورت گرفت. روند دهیدراته کردن با سری صعودی اتانول انجام شد. در نهایت نمونه‌ها در دستگاه خشک کن انجمادی قرار داده شدند. پس از رسانا شدن با بزرگنمایی ده هزار برابر تصاویر نمونه‌ها تهیه و ثبت شدند.

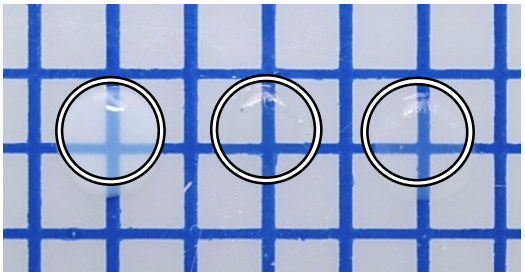
خصوصیات ماکروسکوپیک قرنیه آسلولار

قرنیه آسلولار شترمرغ در فالکون‌های استریل حاوی گلیسرول ۱۰۰ درصد قرار داده شد، و در دمای اتاق دهیدراته گردید. میزان شفافیت قرنیه آسلولار اولیه و قرنیه آسلولار دهیدراته با قرنیه تازه به صورت ماکروسکوپی مورد مقایسه قرار گرفت.

نتایج

شفافیت و ضخامت قرنیه آسلولار شترمرغ

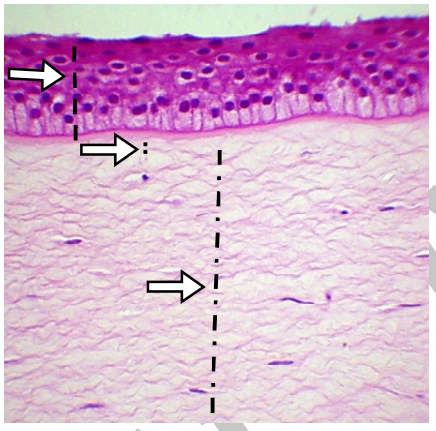
دیسک‌های فرآوری شده از قرنیه شترمرغ در طول روند آسلولار صورت گرفته در مشاهدات ماکروسکوپی، به طور قابل ملاحظه‌ای دچار ادم شده بودند و از میزان شفافیت آنها کاسته و بر ضخامتشان افزوده شده بود. دیسک‌های آسلولار پس از غوطه ور سازی در محلول گلیسرول ۱۰۰ درصد، به سرعت شفافیت و ضخامت اولیه خود را در مقایسه با قرنیه نرمال باز یافتند (نگاره ۱).



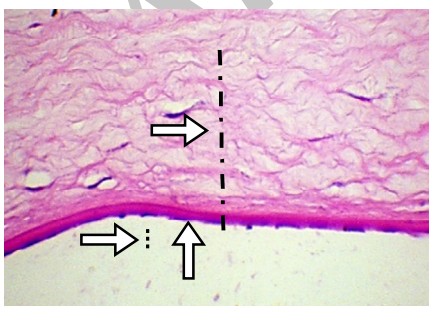
نگاره ۱: قرنیه آسلولار، قرنیه اصلاح شده در گلیسرول، قرنیه نرمال (به ترتیب از راست به چپ)

ساختار بافتی قرنیه نرمال شترمرغ

پنج لایه اپیتلیوم، بومن، استروما، دسمه و اندوتلیوم در قرنیه نرمال شترمرغ مشاهده شد (نگاره ۲). لایه بومن در زیر اپیتلیوم در رنگآمیزی H&E و PAS به طور واضح مشخص بود (نگاره ۲ و۳).



الف

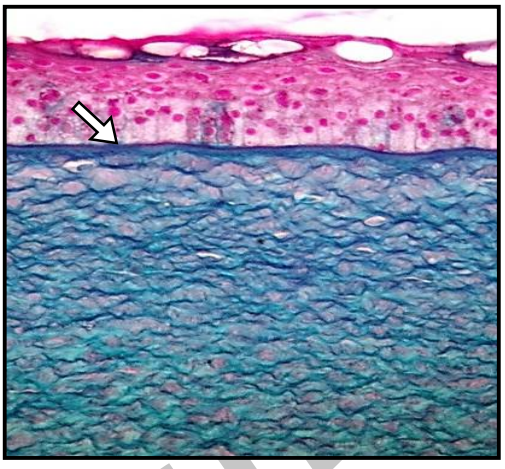


ب

نگاره ۲: بافت شناسی قرنیه نرمال شترمرغ، (الف) از خارج به داخل لایه‌های اپیتلیوم، بومن و استروما، (ب) از داخل به خارج لایه‌های اندوتلیوم، دسمه و استروما (H&E، ٤٠x)

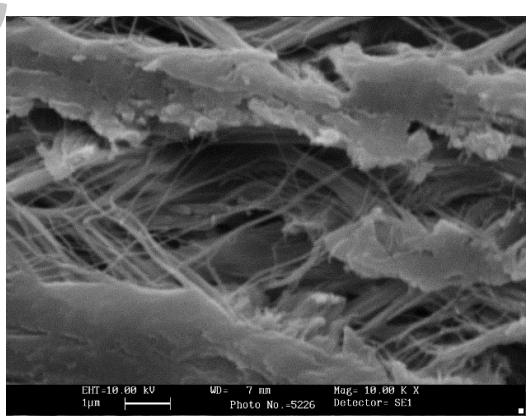
Archive of SID

www.SID.ir



نگاره ۳: بافت شناسی قرنیه نرمال شترمرغ، غشاء پایه در مرز اپیتلیوم و استروما (پیکان) مشاهده می‌شود (PAS، ٤٠x)

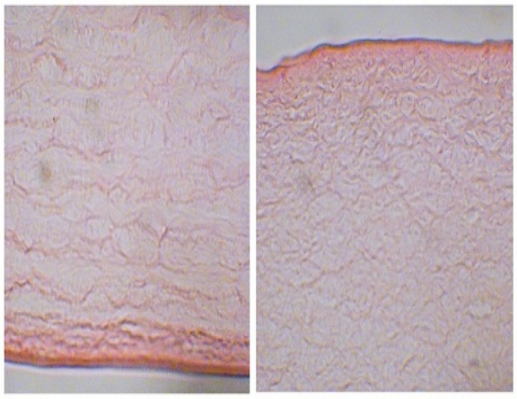
در بررسی تصاویر تهیه شده در میکروسکوپ الکترونی استروما قرنیه نرمال، یکپارچگی ساختار بافتی مشاهده گردید (نگاره ٤).



نگاره ٤: تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی استروما قرنیه نرمال، یکپارچگی رشته های کلاژن مشاهده می‌شود، بزرگنمایی ۱۰،۰۰۰x

ساختار بافتی قرنیه آسلولار شترمرغ

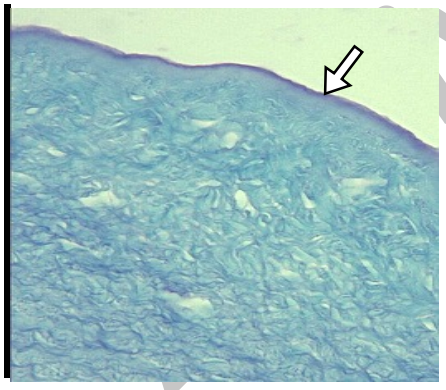
پس از انجام پروسه آسلولار، حذف سلول‌های لایه اپیتلیوم و استروما قرنیه شترمرغ با رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین مورد تأیید قرار گرفت (نگاره ٥).



الف ب

نگاره ٥: قرنیه آسلولار شترمرغ (الف) قرنیه پس از حذف سلول های لایه اپیتلیال و کراتوسیت ها، (ب) قرنیه پس ازحذف سلول های لایه اندوتلیوم وکراتوسیت ها (H&E، بزرگنمایی ٤٠x)

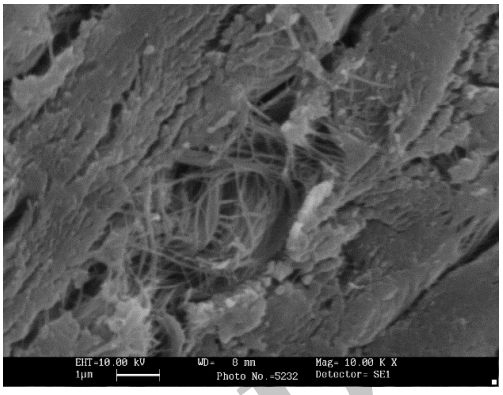
ارزیابی غشاء پایه اپیتلیوم با رنگ آمیزی PAS صورت گرفت. غشاء پایه در دیسک آسلولار قرنیه شترمرغ در رنگ‌آمیزی PAS دیده شد (نگاره ٦).



نگاره ٦: حفظ غشاء پایه اپیتلیوم قرنیه آسلولار شترمرغ پس از حذف سلول های لایه اپیتلیال (PAS، بزرگنمایی ٤٠x)

در تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی در دیسک قرنیه آسلولار رشته‌های کلاژن منظم بودند و افزایش فاصله نسبی بین رشته‌ها نسبت به قرنیه نرمال قابل مشاهده بود و نشانه‌ای از بهم ریختگی و دژنره شدن رشته‌های کلاژن دیده نشد و ساختار بافتی به طور کلی حفظ شده بود (نگاره ۷).

www.SID.ir



نگاره ۷: تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی استروما قرنیه آسلولار، بزرگنمایی ۱۰،۰۰۰X

بحث

قرنیه، پوشش قدامی ـ بیرونی و فیبروزی و بیرونی چشم است و از اجزاء اصلی در مسیر بینایی چشم محسوب می‌شود (۱۱و ۸). بیماری‌های قرنیه بیش از ٤١ درصد ضایعات چشمی را در حیوانات تشکیل می‌دهد (۲) و به نسبت شدت و وسعت ضایعه، بینایی را تحت تأثیر قرار می دهد. علاوه بر این در جوامع انسانی بیش از ده میلیون نفر در سراسر دنیا در انتظار درمان کوری قرنیه به سر می‌برند. در حال حاضر تنها گزینه درمانی برای مواجه با چنین جراحاتی که منجر به کاهش دید و حتی کوری می‌شود، پیوند قرنیه است (١٤). در حالیکه پیوند قرنیه یکی از موفق‌ترین روش‌ها در میان انواع مختلف پیوند بافت و عضو محسوب می‌شود، کمبود قرنیه به ویژه در کشورهای آسیایی و آفریقایی همچنان از اهمیت زیادی برخوردار است و تهیه بافت دهنده در مقایسه با افزایش تقاضا، پیوند آلوگرافت قرنیه را با محدودیت مواجه کرده است (۷).

ساختار سازمان یافته و منحصر به فرد قرنیه این بافت را به عنوان بیومتریال مطرح ساخته است. قابل ذکر است که هیچ بافتی در بدن دارای تشکیلات کلاژن در یک ساختار تیغه ای شفاف نمی‌باشد. در حالیکه بافت‌های بسیاری مانند صلبیه، تاندون، لیگامنت، سخت‌شامه و لایه فیبروزی کپسول مفصلی با الاستیسیته مشابه با قرنیه وجود دارند. علاوه بر ترکیبات ساختاری، بافت قرنیه دارای سیگنال‌های بیولوژیکی مانند پروتئین و اسید آمینه می‌باشد که عملکرد سلولی را تنظیم می کنند (۹). بنابر این در مطالعه حاضر استفاده از بافت قرنیه نسبت به سایر بافت‌های طبیعی غیر از قرنیه مانند غشاء آمنیوتیک جنین و بافت روده و همچنین ساختارهای مصنوعی سنتز شده در مهندسی بافت ارجح دانسته شد، هدف از مطالعه حاضر بر اساس مطالعه منابع و بررسی پژوهش‌های اخیر، ارزیابی اثر روش آسلولار با ترکیبات شیمیایی و دترجنت بر روی قرنیه شترمرغ به عنوان یک منبع متفاوت بوده است. چشم شترمرغ با قطری در حدود ۵۰ میلیمتر بزرگترین اندازه را در بین مهره‌داران دارد و از نوع مسطح می‌باشد (۱). در این مطالعه قرنیه شترمرغ که یک بافت دور ریز کشتارگاهی، منبع بلااستفاده و ارزان قیمت محسوب می‌شود، مورد بررسی قرار گرفت. بنابر این با توجه به وسعت و ضخامت قابل توجه قرنیه شتر مرغ و هم چنین شباهت لایه‌های بافتی قرنیه شترمرغ با انسان به دلیل وجود لایه بومن (۲) و ساختار پنج لایه، این منبع در پژوهش حاضر مورد آزمایش قرار گرفت.

از سال‌ها پیش و با پیشرفت فنون و فناوری بافت و دستگاه‌های آزمایشگاهی، قرنیه مصنوعی و ساختارهای مهندسی بافت در جهت رفع این محدودیت تحقیقات فراوانی انجام گرفته است. ایده مهندسی بافت با ایجاد تغییری محسوس در جراحی پیوند قرنیه به صورت تئوری، پتانسیل غلبه بر محدودیت جهانی قرنیه دهنده را اظهار داشت (۱۵). تاکنون چندین نوع از بافت قرنیه تولید شده است، اگرچه همچنان مشکلات بسیاری در مهندسی بافت قرنیه و کاربرد بالینی آن پیش روی جراحان چشم و پزشکان و دامپزشکان می‌باشد (۱۵).

اولین تجربه استفاده بالینی از پیوند قرنیه زنوگرافت، تقریباً بیش از نیم قرن جلوتر از آنکه Zirm در سال ۱۹۰۵ میلادی از قرنیه آلوگرافت جهت انتقال پیوند استفاده کند، در سال ۱۸۳۸ میلادی توسط Kissam از قرنیه خوک به انسان صورت گرفت

Archive of SID

www.SID.ir

(٤). بر اساس این مطالعه و سایر مطالعات انتظار می‌رود زنوگرافت ها منابع کافی بافتی را برای انتقال پیوند در پاسخ به نیازهای پزشکی و دامپزشکی فراهم سازند (۷). از سویی، تولید و فرآوری یک بافت نرم همسان با نمونه اصلی آن، از طریق مواد صناعی و بیومتریال‌ها به سادگی امکان پذیر نمی‌باشد (۱۵). با توجه به مطالعات پایه‌ای و نتایج حاصل از آنها مشخص شده است که مناسب‌ترین ماتریکس در مهندسی بافت قرنیه، خود قرنیه است و این کاملاً پر واضح است که منبع انسانی قرنیه با محدودیت مواجه، ولی مواد قرنیه زنوژنیک از فراوانی کافی برخوردار می‌باشد (۱۵).

در مطالعات بسیاری قرنیه خوک منبع جایگزین بالقوه‌ای در پیوند زنوگرافت قرنیه عنوان شده است، با پیشرفت علم مهندسی ژنتیک و تولید خوک‌های دستکاری شده از نظر ژنتیکی، ممکن است حتی با قرنیه انسان قابل مقایسه باشد (٤).

تا کنون روش استانداردی به منظور تهیه بافت آسلولار قرنیه عنوان نشده است و نتایج متفاوتی با درجات مختلفی از موفقیت گزارش گردیده است. این روش‌ها سال‌ها توسط محققان مورد محک قرار گرفتند، استفاده از غلظت‌های متفاوت SDS، تریتون X، روش‌های آنزیمی همانند Dnase و Rnase ، تریپسین و دیسپاز به همراه SDS، NaCl به همراه نوکلئاز و بهره گیری از روش‌های فشار هیدروستاتیک، خلاء و نیتروژن مایع، همراه یا بدون مواد فوق از جمله تحقیقات آزمایشگاهی می‌باشند که تا کنون انجام پذیرفته است(۱۱و ۵، ٤). نتایج حاصل از روش‌های اشاره شده امکان تهیه بافت آسلولار از قرنیه خوک، میمون رزوس، انسان، گربه، گاو و... را فراهم ساخت (٤). در مطالعه حاضر، بافت قرنیه شترمرغ بر پایه SDS و اتانول آسلولار گردید. همچنین نتایج حاصل از تهیه بافت آسلولار قرنیه نشان داد، غشاء پایه در بافت‌های تحت پروسه تغییرات میکروسکوپی قابل ملاحظه‌ای نداشت. نویسندگان مطالعه حاضر بر این باور می‌باشند که غلظت‌های بالای محلول‌های دترجنت مانند SDS قادر به آسیب گسترده و عمیق به لایه‌های بافت پیوندی می‌شود و این در حالی است که غشاء پایه با غلظت ۰/۵ درصد در تحقیق حاضر تغییرات ساختاری را به همراه نداشت.

یکی از مشکلات پس از تهیه بافت آسلولار قرنیه، کدورت بافتی می‌باشد که با توجه به خاصیت قرنیه در عبور نور، کارایی آن را به منظور پیوند کاهش می‌دهد. شفافیت قرنیه به اتصالات محکم اپیتلیوم و جلوگیری از جریان مایعات وابسته می‌باشد (١٤). از این‌رو دلایلی متعددی در توجیه کدورت قرنیه در طی روند آسلولار وجود دارد.

Zhou و همکاران در سال ۲۰۰۸ و همچنین Yoeruek و همکاران در سال ۲۰۱۲ نشان دادند که روند آسلولار بافت قرنیه با استفاده از SDS منجر به کاهش شفافیت قرنیه خوک می‌شود. آن‌ها با استفاده از گلیسرول با روند دهیدارته کردن شفافیت قابل قبولی را در بافت مورد نظر فراهم نمودند (۱۵و ١٤). Yoeruek و همکاران کاهش شفافیت قرنیه را محتمل بر بی نظمی اندک فیبرهای کلاژن دانسته و آن را با رنگ آمیزی بافتی تأیید کردند (۱۵). همچنین Zhou و همکاران مشاهده کردند که با جذب آب، عبور نور در ماتریکس آسلولار کاهش می‌یابد، این در حالی است که اما زیست سازگاری و بیومکانیک ساختار فرآوری شده مشابه قرنیه نرمال می‌باشد (۱۵).

از سویی Li و همکاران نشان دادند که کدر شدن ماتریکس آسلولار قرنیه خوک احتمالاً به دلیل هیدراته شدن پروتئوگلیکان‌ها می‌باشد، که با افزایش فاصله فیبریل‌های کلاژن و متورم شدن داربست در این امر دخالت دارند. مطالعه این محققان نشان داد که ساختار کلاژن به دلیل استفاده از SDS تغییر می‌نماید و در صورتیکه ساختار قرنیه غیر قابل بازگشت تغییر نماید، شفافیت قرنیه به طور کامل بر نمی‌گردد، بنابر این شفاف شدن قرنیه پس از غوطه ورسازی قرنیه آسلولار در گلیسرول ۱۰۰ درصد، دلیل بر عدم تغییر دائمی ساختار استروما قرنیه در طی روند آسلولار است (۷).

www.SID.ir

در مطالعه حاضر همان طور که در بخش نتایج آورده شد با استفاده از رنگ‌آمیزی‌های بافتی نظیر H&E و PAS، در مطالعات ریزبینی و فراساختاری، ساختار قرنیه شترمرغ به طور کامل فاقد ترکیبات هتروژن مانند سلول‌ها و هسته‌ها شد و ساختار استروما حفظ گردید، هم چنین در این مطالعه تجربی با استفاده از غلظت ۱۰۰ درصد گلیسرول، بافت آسلولار با درجاتی از کدورت، شفافیت مناسب به منظور پیوند را به همراه داشت.

بر اساس نتایج به دست آمده از بافت سلولار و آسلولار شتر مرغ در این مطالعه، با توجه به امکان تهیه قرنیه‌ای متناسب با اندازه قرنیه انسان و سایر گونه‌ها به دلیل بزرگ بودن قطر و ضخامت و ساختار پنج لایه قرنیه شترمرغ، و همچنین طبق گزارش Xian-ning و همکاران مبنی بر ارزیابی عدم سمیت بالفعل استرومای بدون سلول شتر مرغ روی سلول‌های قرنیه، می‌توان قرنیه شترمرغ را به عنوان داربست زیستی مناسب مطرح ساخت (۱۳).

در نهایت می‌توان بیان داشت که با توجه به نوع آنتی‌ژنسیته بافت پیوندی (اتو، ایزو، آلو و زنو)، پاسخ‌های ایمنی از بسیار ناچیز تا بسیار شدید قابل انتظار می‌باشند و با روند آسلولار نمودن در بافت‌های پیوندی آلو و زنو این احتمال وجود دارد که با حذف سلول‌ها، مخزن ژنتیکی (هسته) و برخی از پروتئین‌های سلولی واکنش‌های ایمنی نسبت به بافت سلولار به حداقل برسد. با توجه به نتایج حاصل از تحقیق مقدماتی حاضر، مبنی بر بدون سلول شدن قرنیه شترمرغ با استفاده از روش اشاره شده می‌توان ادعا نمود که به دلیل دسترسی دشوار به منابع تأمین کننده بافت پیوندی ایزو و آلو، انتقال برخی از بیماری‌ها و همچنین محدودیت در استفاده از منبع حیوانی قرنیه خوک در برخی از مذاهب و ادیان، بافت فرآوری شده زنو، بافتی مناسب در انجام تحقیقات بالینی در الگوی حیوانی می‌باشد و با کاهش واکنش‌های ایمنی، امید است که نتایج بالینی تجربی مناسبی را به همراه داشته باشد.

فهرست منابع

1. Bezuidenhout, A.J. (1999): Anatomy. In: The ostrich biology, production and health. 1st edition (ed. Deeming DC). CABI: Oxon (UK); 13-50.
2. Gilger, B.C., Bentley, E., Ollivier, F.J. (2007): Disease and surgery of canine cornea and sclera. In: Veterinary ophthalmology, 4th edition (ed. Gelatt KN). Blackwell: Ames, lowa; 690-752.
3. Hara, H., Cooper, D.K.C. (2010): The immunology of corneal xenotransplantation: a review of the literature. Xenotransplantaion. 17(5): 338-349.
4. Hara, H., Cooper, D.K.C. (2011): Xenotransplantation-The future of corneal transplantation. Invest. Cornea. 30(4): 371-378.
5. Hashimoto, Y., Funamoto, S., Sasaki, S., Honda, T., Hattori, S., Nam, K., Kimura, T., Mochizuki, M., Fujisato, T., Kobayashi, H., Kishida, A. (2010): Preparation and characterization of decellularized cornea using high-hydrostatic pressurization for corneal tissue engineering. Biomaterials. 31(14): 3941-3948.
6. Joy, A. (2005): Ostrich farming then and now. Misset World Poultry. 21(3): 33-35.
7. Li, A., Pan, Z., Jie, Y., Sun, Y., Luo, F., Wang, L. (2011): Comparison of immunogenicity and porcine-to-rhesus lamellar corneal xenografts survival between fresh preserved and dehydrated porcine corneas. Xenotransplantation. 18(1): 46-55.
8. Maggs, D.J. (2008): Cornea and sclera. In: Slatter's fundamentals of veterinary ophthalmology, 4th edition (ed. Maggs DJ, Miller PE, Ofri R). W-B Saunders CO: Philadelphia; 175-202.
9. Martin, G.R., Ashash, U., Katzir, G. (2002): Ostrich ocular optics. Brain Behav. Evol. 58(2): 115-120.
10. Marquez, S.P., Martinez, V.S., Ambrose, W.M., Wang, J., Gantxegui, G., Schein, O., Elisseeff, J. (2009): Decellularization of bovine corneas for tissue engineering applications. Acta. Biomater. 5(6): 1839-1847.

Archive of SID

www.SID.ir

11. Pang, K., Du, L., Wu, X. (2010): A rabbit anterior cornea replacement derived from acellular porcine cornea matrix, epithelial cells and keratocytes. Biomaterials. 31(28): 7257-7265.
12. Shanawany, M. (1995): Recent developments in ostrich farming. World Animal Review (FAO). 83: 3-8.
13. Xian-ning, L., Xiu-ping, Z., Jie, W., Li-fang, W., Yang, Y. (2013): Cytotoxicity of dehydrated ostrich acellular corneal stroma as a carrier material. CRTER. 17(33): 5995-6000.
14. Xu, Y.G., Xu, Y.S., Huang, C., Feng, Y., Li, Y., Wang, W. (2008): Development of a rabbit corneal equivalent using an acellular corneal matrix of a porcine substrate. Mol. Vis. 14: 2180-2189.
15. Yoeruek, E., Bayyoud, T., Maurus, C., Hofmann, J., Spitzer, M.S., Bartz-Schmidt, K.U., Szurman, P. (2012): Decellularization of porcine corneas and repopulation with human corneal cells for tissue-engineered xenografts. Acta. Ophthalmol. 90: 125-131.
16. Yoeruek, E., Bayyoud, T., Maurus, C., Hofmann, J., Spitzer, M., Bartz-Schmidt, K.U., Szurman, P. (2012): Reconstruction of corneal stroma with decellularization porcine xenografts in a rabbit model. Acta. Ophthalmol. 90(3): 206-210.

Archive of SID

www.SID.ir