



## Preparing Decellularized Scaffolds from Ovine Peripheral Nerves and Evaluating their Histological Features and Mechanical Properties for Use in Peripheral Nerve Repair

Somayeh Mahmoudi Yeganeh<sup>1</sup>, Javad Sadeghinezhad<sup>2</sup>, Sirous Sadeghian Chaleshtori<sup>3,5</sup>,  
Mir Sepehr Pedram<sup>4,5</sup>, Ali Bayat Khomejini<sup>1</sup>, Neda Sabetzadeh<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Graduated from the Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

<sup>2</sup> Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

<sup>3</sup> Department of Internal Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

<sup>4</sup> Department of Surgery & Radiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

<sup>5</sup> Institute of Biomedical Research, University of Tehran, Tehran, Iran

Received: 23 April 2024, Accepted: 26 June 2024

doi: [10.22059/jvr.2023.361946.3366](https://doi.org/10.22059/jvr.2023.361946.3366)

### Abstract

**BACKGROUND:** Peripheral nerve injuries often require surgical intervention to repair nerves. Autologous nerve grafting is a standard method for the repair of peripheral nerves. However, autologous nerve grafts have limitations such as restricted availability. Thus, the development of alternative strategies to address nerve defects is essential.

**OBJECTIVES:** This study aims to develop and prepare decellularized nerve scaffolds from ovine peripheral nerves and evaluate their histological features and mechanical properties for use in peripheral nerve repair.

**METHODS:** Brachial plexus nerves were isolated from male sheep cadavers under aseptic conditions and decellularized using detergent agents according to a decellularization protocol. The decellularization process was assessed using hematoxylin-eosin staining (H&E), Masson's trichrome staining method, and electron microscopy. The resistance and mechanical properties of the extracellular matrix structure were examined by tensile testing. The DNA content of decellularized nerves and intact nerves was also measured using a kit and NanoDrop.

**RESULTS:** The evaluations showed that cells were completely removed from the nerve scaffolds, and the extracellular matrix was well preserved in the nerve scaffold. Tensile testing revealed that decellularized nerve scaffolds relatively maintained their mechanical properties compared to control nerves. Examining the DNA content of scaffolds and intact nerves also showed that the DNA content of nerves was significantly reduced after the decellularization process.

**CONCLUSIONS:** The prepared decellularized peripheral nerve grafts can preserve extracellular matrix components. The decellularized nerve scaffolds have the potential to be alternatives to artificial nerve conduits and autografts for peripheral nerve repair.

**Keywords:** Decellularization, Extracellular matrix, Nerve graft, Peripheral nerve, Tissue engineering

Copyright © Journal of Veterinary Research: Open Access; Copying, distribution and publication are free for full use with attribution. ©The Author(s).

Publisher: University of Tehran

Conflict of interest: The authors declared no conflict of interest.

**Corresponding author:** Sirous Sadeghian Chaleshtori, Tel/Fax: +9821-61117000 / +9821-66933222



### How to cite this article:

Mahmoudi Yeganeh S, Sadeghinezhad J, Sadeghian Chaleshtori S, Pedram MS, Bayat Khomejini A, Sabetzadeh N. Preparing Decellularized Scaffolds from Ovine Peripheral Nerves and Evaluating their Histological Features and Mechanical Properties for Use in Peripheral Nerve Repair. J Vet Res, 2024; 79(3): 145-156.  
doi: [10.22059/jvr.2023.361946.3366](https://doi.org/10.22059/jvr.2023.361946.3366)

### Figure Legends and Table Captions

**Figure 1.** Images of the longitudinal and transverse sections of decellularized nerve (A,B) and intact nerve (C,D) in sheep (H&E × 200). Arrows indicate the nucleus of the cells.

**Figure 2.** Light microscopic image of the longitudinal section of decellularized nerves (Alcian blue staining × 100).

**Figure 3.** Light microscopic image of the transverse section of the decellularized nerve (Masson's trichrome staining × 100).

**Figure 4.** Scanning electron microscopic images of the longitudinal section of intact nerve (A), and decellularized nerve (B) in sheep.

**Figure 5.** Comparison of tensile test results for intact and decellularized nerves.

**Figure 6.** Comparison of DNA content between intact and decellularized nerves.



دوره ۷۹، شماره ۳، ۱۴۰۳، ۱۵۶-۱۴۵

## تهیه داربست سلول‌زدایی شده از اعصاب محیطی گوسفند و ارزیابی ویژگی‌های بافت‌شناسی و خواص مکانیکی آن جهت کاربرد در ترمیم اعصاب محیطی

سمیه محمودی یگانه<sup>۱</sup>، جواد صادقی نژاد<sup>۲</sup>، سیروس صادقیان چالشتری<sup>۳،۵</sup>، میر سپهر پدram<sup>۴،۵</sup>،علی بیات‌خمجینی<sup>۱</sup>، ندا ثابت‌زاده<sup>۵</sup><sup>۱</sup> دانش‌آموخته دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران<sup>۲</sup> گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران<sup>۳</sup> گروه بیماری‌های داخلی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران<sup>۴</sup> گروه جراحی و رادیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران<sup>۵</sup> پژوهشکده تحقیقات زیست پزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۴ اردیبهشت ماه ۱۴۰۳، تاریخ پذیرش: ۶ تیر ماه ۱۴۰۳

doi: [10.22059/jvr.2023.361946.3366](https://doi.org/10.22059/jvr.2023.361946.3366)

### چکیده

**زمینه مطالعه:** آسیب‌های عصب محیطی اغلب نیاز به مداخله جراحی برای بازگرداندن تداوم و عملکرد عصب دارند. پیوند عصب اتولوگ به‌عنوان یک راهکار استاندارد برای ترمیم نقایص عصب محیطی در نظر گرفته می‌شود. با این حال پیوند عصب اتولوگ دارای معایبی مانند دسترسی محدود است. از این رو ایجاد راهکارهای جایگزین جهت رفع نقایص عصبی ایجاد شده امری ضروری به نظر می‌رسد.

**هدف:** مطالعه حاضر باهدف توسعه و تهیه داربست‌های عصبی سلول‌زدایی شده از اعصاب محیطی گوسفند و ارزیابی ویژگی‌های بافت‌شناسی و خواص مکانیکی آن‌ها به‌منظور استفاده در ترمیم اعصاب محیطی انجام شده است.

**روش کار:** اعصاب شبکه بازویی از لاشه گوسفندان نر تحت شرایط آسپتیک جدا و با استفاده از مواد شوینده طبق پروتکل سلول‌زدایی شد. فرایند سلول‌زدایی با استفاده از رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین‌ائوزین، تری کروم ماسون و همچنین میکروسکوپ الکترونی ارزیابی شد. مقاومت ساختار ماتریکس خارج سلولی و خواص مکانیکی نیز توسط تست کششی بررسی گردید. همچنین میزان محتوای DNA اعصاب سلول‌زدایی شده و اعصاب کامل با استفاده از روش کیت و نانودراپ اندازه‌گیری شد.

**نتایج:** ارزیابی‌های انجام شده نشان داد سلول‌ها از داربست‌های عصب به‌طور کامل حذف شدند و ماتریکس خارج سلولی به‌خوبی در داربست عصبی حفظ شده است. تست کشش نشان داد داربست‌های عصبی سلول‌زدایی شده خواص مکانیکی خود را به‌طور نسبی در مقایسه با اعصاب کنترل حفظ کردند. بررسی محتوای DNA داربست‌ها و اعصاب دست‌نخورده هم نشان داد محتوای DNA اعصاب، پس از فرایند سلول‌زدایی به‌طور قابل توجهی کاهش یافته بود.

**نتیجه‌گیری نهایی:** پیوند عصب محیطی سلول‌زدایی شده را می‌توان با حفظ اجزای ماتریکس خارج سلولی تهیه کرد. این داربست‌های عصبی به‌طور بالقوه می‌توانند به‌عنوان جایگزینی برای کاندوئیت‌های هدایت عصب مصنوعی و اتوگرافت‌ها برای ترمیم اعصاب محیطی استفاده شوند.

**کلمات کلیدی:** پیوند عصب، سلول‌زدایی، عصب محیطی، ماتریکس خارج سلولی، مهندسی بافت

کپی‌رایت © مجله تحقیقات دامپزشکی: دسترسی آزاد؛ کپی‌برداری، توزیع و نشر برای استفاده کامل با ذکر منبع آزاد است. © نویسندگان.

ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.



نویسنده مسئول: سیروس صادقیان چالشتری، گروه بیماری‌های داخلی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران؛ پژوهشکده

تحقیقات زیست پزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران

## مقدمه

آسیب‌های عصب محیطی (Peripheral nerve injuries) سالانه تقریباً ۱ میلیون نفر را در سراسر جهان تحت تأثیر قرار می‌دهد (۱). آسیب‌های عصب محیطی بار اقتصادی قابل توجهی را بر جامعه تحمیل می‌کند و به از دست دادن عملکرد اندام منجر می‌شود که به شدت کیفیت زندگی بیماران را مختل می‌کند (۳، ۴).

سیستم عصبی محیطی، احساس، حرکت و هماهنگی حرکات بدن را کنترل می‌کند. اعصاب محیطی می‌توانند به راحتی در اثر ضربه یا بیماری‌های تخریب‌کننده عصب آسیب ببینند. شایع‌ترین این آسیب‌ها در کشش، ایسکمی، پارگی، فشار و سوختگی رخ می‌دهد. به طور کلی سیستم اعصاب محیطی دارای ظرفیت احیای بالاتری نسبت به سیستم اعصاب مرکزی است و باعث بهبود طبیعی بافت عصبی می‌شود. به دنبال آسیب عصب محیطی، در بخش انتهایی آکسون، دژنراسیون والرین رخ می‌دهد که باعث عصب‌زدایی ارگان‌های اطراف می‌شود (۵). در ابتدا بدن از طریق سلول‌های شوان با تشکیل غلاف میلین، تکثیر سلولی، فاگوسیتوز و آزادسازی سیتوکین‌ها به آسیب ایجادشده پاسخ می‌دهد. در ترمیم اعصاب محیطی، رشد آکسون‌ها در جهت درست برای ایجاد آناستوموز و موفقیت ترمیم حائز اهمیت است (۶). در صدمات شدید عصب محیطی، آکسون‌ها با اینکه قادر به بازسازی خود می‌باشند، اما رشد آن‌ها در جهت نادرست و عدم تشکیل آناستوموز به ناموفق بودن فرایند ترمیم منجر می‌شود (۷). در موارد شدید پاسخ بدن قادر به ترمیم و بهبودی آسیب نمی‌باشد و فرد ناگزیر به استفاده از روش‌های درمانی خواهد بود.

درمان‌های رایج شامل جراحی نورورافی، پیوند عصب اتولوگ، داروهای ضدالتهاب، فیزیوتراپی و تکنیک‌های توان‌بخشی برای بازسازی عصب، متعاقب آسیب موفقیت محدودی دارند. علت این مسئله آناتومی پیچیده بافت عصبی و موانع مهارتی موجود در موضع آسیب است. از سوی دیگر محدودیت در دسترس بودن بافت عصبی به منظور پیوند عصب، عدم تطابق اندازه بافت عصبی دهنده و گیرنده، وجود تعداد ناکافی از اعصاب اتولوگ برای عصب اصلی معیوب (۸) و تشکیل نورومای احتمالی از موارد مهم محدودکننده پیوند عصب اتولوگ به عنوان یک روش درمانی است (۹-۱۴).

به دلیل این چالش‌ها که استفاده از پیوندهای عصبی اتولوگ را محدود می‌کنند، دانشمندان استفاده از مجرای پیوند عصبی (Nerve graft conduit) را برای ترمیم عصب بررسی کرده‌اند (۱۵). همچنین برخی کاندوئیت‌ها نیز تأییدیه سازمان غذا و دارو (Food and Drug Administration (FDA)) را دریافت کرده‌اند و در دستیابی به ترمیم عملکردی نویدبخش بوده‌اند (۱۶، ۱۷). از طرفی مجراهای پیوند عصبی موجود عمدتاً لوله‌های توخالی می‌باشند که ساختار سه‌بعدی یا ترکیب ماتریکس خارج سلولی (Extra Cellular Matrix) اعصاب طبیعی را تقلید نمی‌کنند (۱۸، ۱۹). برای غلبه بر این چالش‌ها، محققین از ساخت مجراهای پیوند عصبی پیشرفته که ساختار داخلی اعصاب اتولوگ را شبیه‌سازی می‌کنند، استفاده کرده‌اند. این شامل طرح‌هایی، مانند مجراهای پیوند عصبی متخلخل، شیاردار، چندکاناله و پرشده است (۲۰-۲۲). اگرچه مجراهای پیوند عصبی متخلخل، شیاردار، چندکاناله و توپر نتایج ترمیم بهتری نسبت به کاترهای توخالی داشته‌اند، اما ساختار آن‌ها هنوز به طور قابل توجهی با معماری پیچیده سه‌بعدی اعصاب طبیعی متفاوت است (۲۳-۲۵).

در بین پل‌های عصبی مختلف، پیوند عصب سلول‌زدایی‌شده (Acellular Nerve Graft) با دقت بیشتری از اعصاب طبیعی در ساختار و ترکیب تقلید می‌کنند. به این ترتیب، عصب سلول‌زدایی‌شده جایگزین بسیار امیدوارکننده‌ای برای پیوندهای عصبی اتولوگ برای ترمیم نقایص عصبی می‌باشند (۲۶). استفاده از اعصاب زونژن، منابع پیوند را به طور گسترده افزایش می‌دهد، بنابراین دارای یک چشم‌انداز دلگرم‌کننده برای درمان‌های بالینی است. استفاده از زونگرفت‌های سلول‌زدایی‌شده نیاز به سرکوب سیستم ایمنی ندارد و برای ترمیم آسیب‌های اعصاب محیطی ایمن و مؤثر است (۲۷). ایجاد یک داربست با از بین بردن مواد تشکیل‌دهنده ایمنی‌زای بافت و باقی ماندن عناصر ماتریکس خارج سلولی و ساختار سه‌بعدی آن صورت می‌گیرد. همچنین عناصر ماتریکس خارج سلولی به طور گسترده در میان گونه‌های مختلف مشابه می‌باشند (۶).

چندین رویکرد برای سلول‌زدایی جهت تولید داربست‌های عصبی سلول‌زدایی‌شده از عصب اهداکننده ثبت شده است (۲۸). هدف از هر فرایند سلول‌زدایی، حذف کارآمد کلیه مواد سلولی و هسته‌ای است، درحالی‌که می‌بایست هرگونه اثر سوء آن بر ترکیب، فعالیت بیولوژیکی و یکپارچگی مکانیکی ماتریکس خارج سلولی باقیمانده به حداقل برسد. باوجود این هر فرایندی که به حذف سلول‌ها نیاز داشته

باشد، احتمالاً ساختار سه بعدی ماتریکس خارج سلولی را تغییر خواهد داد. روش های زیادی برای تهیه داربست های سلولی وجود دارد. با وجود تفاوت های موجود، تمام روش های پردازش با هدف کاهش ایمنی زایی بافت و افزایش ظرفیت بازسازی از طریق حفظ ماتریکس خارج سلولی به کار برده می شوند. رویکردهای سلول زدایی شیمیایی روش سودمندتر می باشند (۲۹، ۳۰).

Sondell و همکاران در سال ۱۹۹۸ توانستند با استفاده از شوینده های تریتون و سدیم داکسی کولات همراه با مجموعه ای از محلول های شست و شو داربست های عصبی سلول زدایی شده ای طراحی کنند که علی رغم فقدان خواص ایمونوژنیسیته، به طور چشمگیری از رشد آکسون ها و مهاجرت سلول های شوان برای ترمیم آسیب های عصبی پشتیبانی می کردند (۳۱). همچنین در مطالعه دیگر، Hudson و همکاران در سال ۲۰۰۴، با استفاده از شوینده های زوتریونی سولفونائین همراه با شوینده آنیونی تریتون یک داربست عصبی سلول زدایی شده ایجاد کردند که ساختارهای غشای پایه و ماتریکس خارج سلولی را به نحو مناسبی حفظ کرد (۳۲).

اگرچه مواد شیمیایی و مراحل خاص بین روش های مطرح شده متفاوت است، اما هدف همه آنها حذف سلول ها از بافت عصبی و درعین حال حفظ ماتریکس خارج سلولی است. روش ها در انواع شوینده های مورد استفاده و همچنین مراحل اضافی، مانند انجماد یا ذوب یا استخراج دی اکسید کربن فوق بحرانی، متفاوت می باشند. به طور کلی روش های متعددی وجود دارد که می تواند برای ایجاد پیوندهای عصبی سلول زدایی شده برای کاربردهای مهندسی بافت عصبی استفاده شود.

هدف از مطالعه حاضر توسعه عصب های سلول زدایی شده زیست سازگار و غیر ایمنی زا با منبع زانوژنیک و با استفاده از محلول های شست و شوی کم خطر و پربازده است. این روش یک گزینه جدید و جایگزین برای تولید عصب های سلول زدایی شده است که به عنوان یکی از روش های درمان آسیب های عصبی محیطی معرفی می شود.

## مواد و روش کار

**تهیه عصب سلول زدایی شده:** اعصاب شبکه بازویی، به طول حدودی ۳۰ میلی متر و به تعداد ۳۰ عدد که برای اهداف درون تنی (In vivo) بعدی، از نظر قطر با عصب سیاتیک رت مطابقت داشتند، از لاشه گوسفندان نر تحت شرایط آسپتیک بلافاصله پس از کشتار جدا شدند. روش تهیه بافت عصبی سلول زدایی شده براساس روشی بود که توسط Hudson و همکاران در سال ۲۰۰۴ توسعه داده شده بود و مطالعات مختلفی در این زمینه صورت گرفته است (۳۲، ۳۳). ابتدا چربی خارجی، بافت همبند و خون از اعصاب جمع آوری شده پاک سازی شد و نمونه های عصبی توسط بافر نمکی فسفات هاوی ۱ درصد پنی سیلین و استرپتومایسین به مدت ۱ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی گراد و با سرعت ۶۰ دور در دقیقه شست و شو داده شدند. سپس در محلول بافر نمکی فسفات هاوی ۴ درجه تا ۲۴ ساعت نگهداری شدند. اعصاب جدا شده به بخش های ۱۰ میلی متری برش داده شدند و جهت انجام روند سلول زدایی با مواد شوینده تحت تیمار قرار گرفتند. ابتدا از بافر نمکی فسفات (PBS) به مدت ۱۲ ساعت و سپس از محلول هیپرتونیک کلرید سدیم ۶ درصد به مدت ۱۸ ساعت به عنوان تیمار اولیه برای از بین بردن سلول ها استفاده شد. در مرحله بعد عصب های جدا شده ابتدا توسط محلول چپس (CHAPS) ۳- (Sigma chemical, USA) (3-cholamidopropyl dimethylammonio -1-propanesulfonate hydrate) با غلظت ۶ درصد در بافر نمکی فسفات و سپس توسط تریتون (Triton X-100)، (Merck, Germany) با غلظت ۲ درصد محلول در بافر نمکی فسفات هریک به مدت ۲۴ ساعت تحت تیمار قرار گرفتند. در مرحله نهایی ساختارهای عصبی تهیه شده در محلول DNase (SinaClon, Iran) و RNase (SinaClon, Iran) در بافر نمکی فسفات، شامل ۱ واحد بر میلی لیتر RNase و ۵۰ واحد بر میلی لیتر DNase به مدت ۶ ساعت قرار گرفتند. بین هر کدام از مراحل ۳ بار شست و شو با آب مقطر و هر بار به مدت ۱۵ دقیقه صورت گرفت. پس از هر بار شست و شو محلول های مورد استفاده تعویض شدند. تمام مراحل تحت شیکر با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه و در دمای محیط انجام شد و PH تمام محلول های مورد استفاده ۷/۵ بود. ساختارهای تهیه شده برای انجام آزمون های درون تنی پس از فرایند شست و شو به مدت ۳ ساعت در محلول پراستیک اسید (PAA) (Merck, Germany) با غلظت ۰/۱ درصد در دمای اتاق استریل شدند و برای ادامه مطالعات در محلول بافر نمکی فسفات هاوی ۱ درصد پنی سیلین و استرپتومایسین در دمای ۴ درجه نگهداری شدند.

**بررسی بافت شناسی و ارزیابی اجزای ماتریکس خارج سلولی:** بافت های عصبی سلول زدایی شده برای ثبوت بافتی در فرمالین ۱۰ درصد غوطه ور شد. پس از آن آگیری با اتانول، شفاف سازی با گزلیول و غوطه ور سازی در پارافین مذاب انجام شد. نهایتاً قالب های

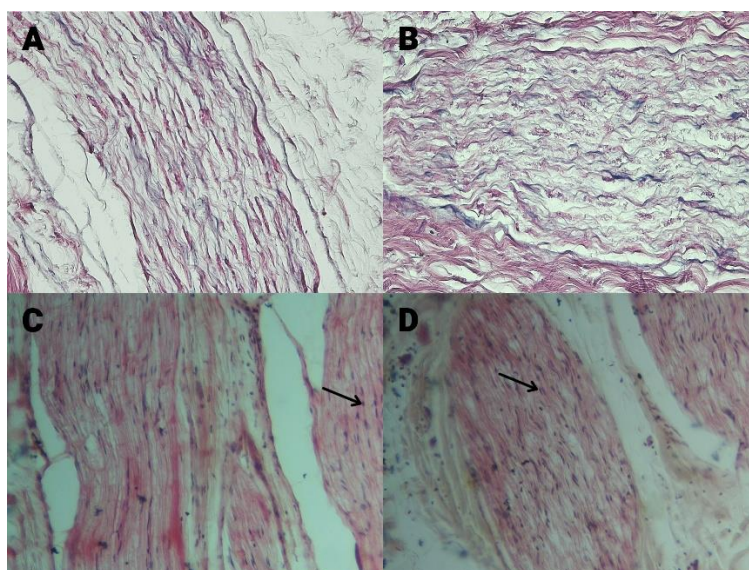
پارافینی و برش‌هایی با ضخامت ۵ میکرومتر با استفاده از میکروتوم تهیه شد. رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین‌ئوزین برای ارزیابی حذف اجزای سلولی، تری کروم ماسون برای بررسی خصوصیات ریخت‌شناسی الیاف کلاژن و آلسین‌بلو برای سنجش گلیکوز‌آمینوگلیکان‌های سولفات‌ها استفاده شد (۳۴).

**ارزیابی میکروسکوپ الکترونی نگاره:** برای بررسی دقیق‌تر تغییرات ساختاری در داربست‌های سلول‌زدایی‌شده و نمونه‌های بافتی عصب سالم، از میکروسکوپ الکترونی نگاره استفاده شد. نمونه‌ها در گلو تار آل‌دئید ۲/۵ درصد به مدت ۲ ساعت تثبیت شدند و مقاطع طولی آن‌ها با طلا پوشانده شد و ریزساختار نمونه‌ها و تخلخل آن‌ها توسط میکروسکوپ الکترونی نگاره (مدل AIS2300C، ساخت کره جنوبی) با استفاده از ۲۲ هزار ولت تصویربرداری شد.

**بررسی استحکام کششی نمونه‌ها:** به منظور بررسی میزان استحکام کششی داربست‌های سلول‌زدایی‌شده، همراه با نمونه‌های کنترل عصب، از دستگاه آزمون کششی ایکس استفاده شد. بدین منظور ابتدا قطر نمونه‌ها به کمک کولیس دیجیتال اندازه‌گیری شد و سپس قطعات نمونه‌ها به طول ۱ سانتی‌متر به بازوهای دستگاه متصل شدند. برای محکم کردن نمونه‌ها روی بازوهای دستگاه از چسب مایع قوی استفاده شد. در ادامه نمونه‌ها با سرعت ثابت ۰/۱ میلی‌متر در ثانیه تحت کشش قرار گرفتند. در طول اندازه‌گیری، نمونه‌ها با استفاده از نرمال سالین مرطوب نگه داشته شدند. هر نمونه به‌طور کامل تا حداکثر نیروی کششی و تا زمان قطع شدن کشیده شد (۳۵).

**تعیین محتوای DNA داربست‌ها:** با ارجاع به مطالعه منتشرشده (۳۶)، یک کیت سنجش (High yield DNA Kit Purification (DNP™ (SinaClon Iran) برای تعیین محتوای DNA ۳ نمونه بافت عصب پس از سلول‌زدایی استفاده شد. به‌طور خلاصه، ۳ نمونه عصب سلول‌زدایی‌شده و ۳ نمونه عصب دست‌نخورده گوسفند به یک میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتری حاوی ۵۰۰ میکرولیتر بافر لیز سلولی اضافه شد، ۱ ساعت تحت انکوباسیون قرار گرفت و ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد و سپس مراحل استخراج DNA انجام شد. مقدار DNA باقیمانده با استفاده از طیف‌سنج نانودراپ (BOECO Germany) اندازه‌گیری شد. اندازه‌گیری‌ها ۳ بار تکرار شد و پس از قرائت، تمام داده‌ها به یک واحد اندازه‌گیری تبدیل شدند.

**تجزیه و تحلیل آماری:** ابتدا برای نرمال بودن داده‌ها از تست کولموگوروف اسمیرنوف (Kolmogorov-Smirnov) و سپس برای تحلیل داده‌ها، از آزمون T مستقل (Independent samples T-test) استفاده شد. مقادیر  $P < 0/05$  به عنوان حداقل سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد و تمام تحلیل‌های آماری توسط نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۴ انجام شد.

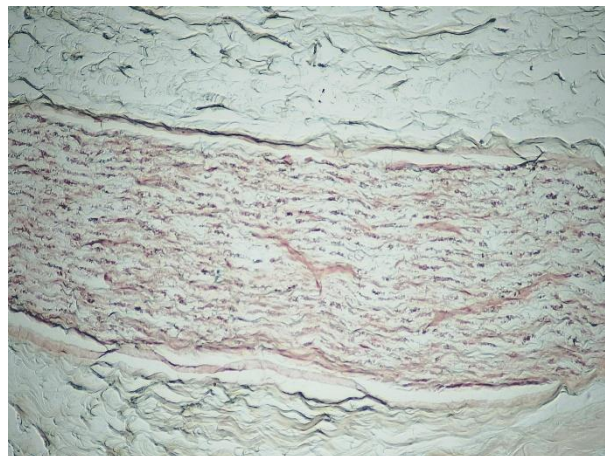


**تصویر ۱.** تصاویر میکروسکوپ نوری از مقطع طولی (A) و عرضی (B) بافت عصب سلول‌زدایی‌شده با بزرگنمایی ۲۰۰× و رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین‌ئوزین. تصاویر میکروسکوپ نوری از مقطع طولی (C) و عرضی (D) بافت عصب دست‌نخورده گوسفند با بزرگنمایی ۲۰۰× و رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین‌ئوزین (پیکان‌ها نشان‌دهنده هسته سلول‌ها می‌باشند).

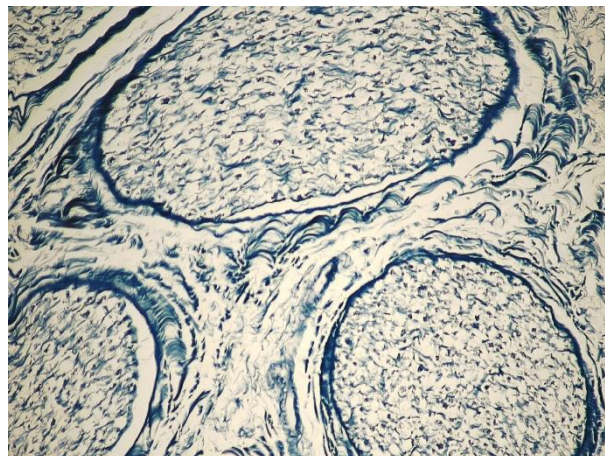
## نتایج

بررسی‌های میکروسکوپ نوری داربست‌های عصب سلول‌زدایی شده نشان داد سلول‌زدایی مناسب منجر به حذف کامل سلول‌ها و همچنین حفظ ماتریکس خارج سلولی شده و محیط مناسبی برای کشت و مطالعه رفتار سلولی فراهم آمده است. در مقاطع بافت‌شناسی با رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین‌ئوزین، هسته سلولی قابل مشاهده در داربست‌های سلول‌زدایی شده وجود نداشت، درحالی که هسته سلولی به رنگ بنفش در مقاطع عصب دست‌نخورده قابل مشاهده بود که این نشان‌دهنده حذف کامل سلول‌ها از طریق فرایند سلول‌زدایی بود (تصویر ۱).

آلسین‌بلو یک رنگ فتالوسیانیین حاوی مس است که به پلی‌آنیون‌ها یا ماکرومولکول‌های با بار منفی متصل می‌شود. این رنگ‌آمیزی امکان شناسایی و طبقه‌بندی پلی‌آنیون‌ها در بافت عصبی را براساس ترکیب شیمیایی آن‌ها و فعل‌وانفعالات آنیونی فراهم می‌کند که یک راه برای مطالعه محیط ماکرومولکولی سازه‌هایی، مانند گره رانویه (Ranvier) را به وجود می‌آورد (۳۷). این رنگ نشانگر مناسبی جهت نشان دادن گره‌های رانویه و آکسون‌ها می‌باشد که نتایج حاصل از این رنگ‌آمیزی نیز نشان داد در داربست‌های تهیه شده از عصب‌های سلول‌زدایی شده هیچ سلولی دیده نمی‌شود و سلول‌زدایی به‌طور کامل انجام شده است (تصویر ۲).



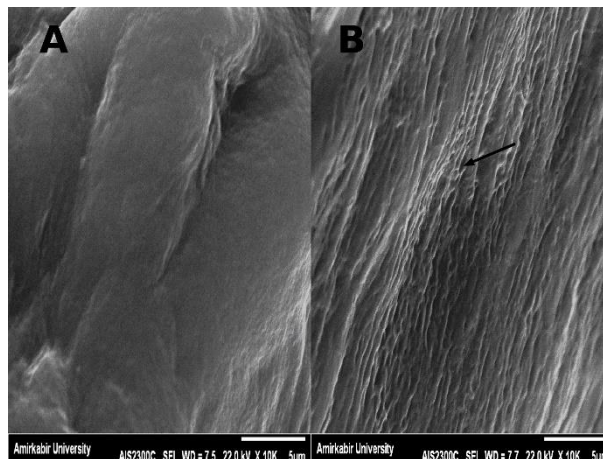
تصویر ۲. تصویر میکروسکوپ نوری از مقطع طولی بافت عصب سلول‌زدایی شده با بزرگنمایی  $\times 100$  و رنگ‌آمیزی آلسین‌بلو. در رنگ آلسین‌بلو گره‌های رانویه و آکسون‌ها در صورت وجود به رنگ آبی دیده می‌شوند. همان‌طور که در تصویر دیده می‌شود سلول‌های عصبی به‌طور کامل از بافت سلول‌زدایی شده حذف شده‌اند.



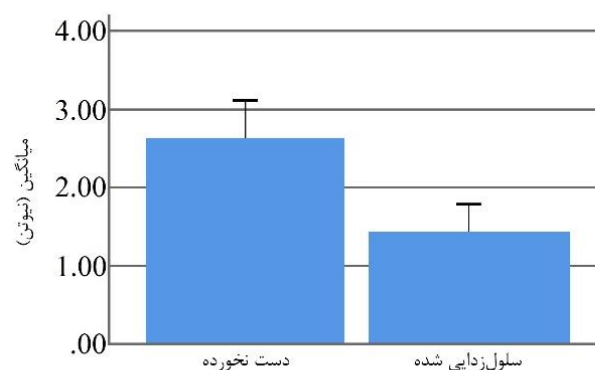
تصویر ۳. تصویر میکروسکوپ نوری از مقطع عرضی بافت عصب سلول‌زدایی شده با بزرگنمایی  $\times 100$  و رنگ‌آمیزی تری کروم ماسون. همان‌طور که مشاهده می‌شود الیاف کلاژن در بافت داربست می‌باشد.

محتوای ماتریکس خارج سلولی، از جمله ساختار و تراکم رشته‌های کلاژن با رنگ‌آمیزی تری کروم ماسون ارزیابی شد. این رنگ‌آمیزی امکان تمایز فیبرهای کلاژن ماتریکس خارج سلولی را از سایر انواع ساختارها فراهم می‌کند (۳۸، ۳۹). این رنگ‌آمیزی نشان داد در طی روند سلول‌زدایی رشته‌های کلاژن در ماتریکس خارج سلولی به‌طور نسبی حفظ شده‌اند (تصویر ۳). مقایسه داربست سلول‌زدایی شده با عصب دست‌نخورده در سطح میکروسکوپ الکترونی نگاره نشان داد در عصب سلول‌زدایی شده همه سلول‌ها از بین رفته‌اند و ساختار ماتریکس خارج سلولی عصب به‌طور نسبی حفظ شده است (تصویر ۴). آزمون کششی نشان داد میانگین نیروی بیشینه موردنیاز برای پاره شدن عصب دست‌نخورده ۲/۶ نیوتن و برای عصب سلول‌زدایی شده ۱/۴ نیوتن بود که تفاوت معنی‌داری را از لحاظ آماری نشان می‌داد ( $P < 0.05$ ) (تصویر ۵). همچنین افزایش طول تا نقطه پارگی عصب در ۲ گروه متفاوت بود.

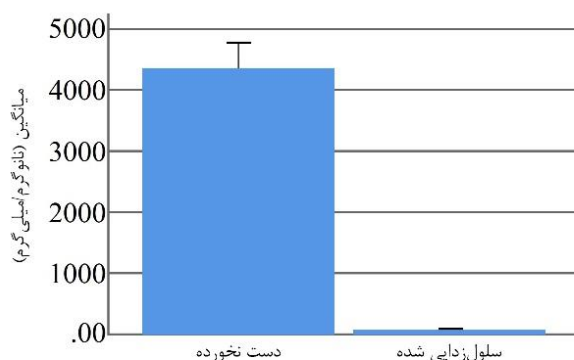
بررسی محتوای DNA داربست‌ها و اعصاب دست‌نخورده هم نشان داد محتوای DNA اعصاب دست‌نخورده بالا بود. در اعصاب طبیعی در هر میلی‌گرم نمونه  $4362/2 \pm 364/1$  نانوگرم، DNA وجود داشت که محتوای آن پس از فرایند سلول‌زدایی به‌طور قابل توجهی کاهش یافته بود، به طوری که در داربست‌ها در هر میلی‌گرم نمونه  $68/8 \pm 4/3$  نانوگرم DNA وجود داشت. بررسی آماری نیز اختلاف معنی‌داری را میان عصب‌های سلول‌زدایی شده و دست‌نخورده نشان داد ( $P < 0.05$ ) (تصویر ۶).



تصویر ۴. تصاویر میکروسکوپ الکترونی نگاره از مقطع طولی عصب دست‌نخورده گوسفند (A) و عصب سلول‌زدایی شده (B). باقی ماندن نسبی ساختار ماتریکس خارج سلولی پس از فرایند سلول‌زدایی در تصاویر قابل مشاهده است. همچنین ساختار متخلخل و جای خالی سلول‌ها با پیکان مشخص شده است.



تصویر ۵. مقایسه نتایج آزمون کششی در عصب‌های دست‌نخورده و سلول‌زدایی شده. آزمون کششی نشان داد تفاوت معنی‌داری از لحاظ آماری میان عصب‌های دست‌نخورده و سلول‌زدایی شده وجود دارد ( $P < 0.05$ ) (محور عمودی بیانگر مقدار نیروی قابل تحمل تا نقطه پاره شدن در هر گروه است).



**تصویر ۶.** مقایسه مقدار محتوای DNA در عصب‌های دست‌نخورده و سلول‌زدایی‌شده. مقایسه آماری مقدار محتوای DNA، اختلاف معنی‌داری را میان عصب‌های سلول‌زدایی‌شده و دست‌نخورده نشان داد ( $P < 0.05$ ) (محور عمودی بیانگر مقدار محتوای DNA در نمونه‌ها برحسب نانوگرم بر میلی‌گرم نمونه است).

## بحث

رویکردهای متعددی برای کاهش چالش‌های درمان ضایعات بافت عصبی پیشنهاد و به‌عنوان جایگزین استفاده از پیوندهای عصبی مشتق از بیمار ارائه شده است. با این حال تاکنون هیچ روشی که به اندازه پیوند اتوگرفت کارآمد باشد توسعه نیافته است (۴۰). محصولاتی با منشأ انواع بافت‌های زونژنیک از استراتژی‌های درمانی جدید است که برای بهبود و به‌ویژه تسریع بازسازی عصب از اهمیت زیادی برخوردار است (۲۷). استفاده از بافت زونژنیک می‌تواند یک روش جایگزین مناسب برای عصب آسیب‌دیده در انسان باشد. برخی از اعضای حیوانات از نظر ساختاری مشابه اندام‌های انسانی می‌باشند و می‌توان از آن‌ها به‌عنوان یک گزینه درمانی برای پیوند استفاده کرد (۴۱).

امروزه استفاده از داربست‌های مختلفی جهت استفاده در ترمیم جراحات اعصاب محیطی گزارش شده است (۴۲، ۴۳). در مقایسه با کاندوئیت‌های هدایت عصب مصنوعی که با استفاده از پلیمرهای طبیعی یا پلیمرهای مصنوعی تهیه می‌شوند، پیوندهای عصبی سلول‌زدایی‌شده مشتق شده از اعصاب طبیعی دارای مزایای بیونیک در ترکیب و ساختار می‌باشند که مواد پلیمری آن را ندارند. از جمله این مزایا می‌توان به زیست‌سازگاری مطلوب، خواص بیومکانیکی بهتر و عملکرد زیستی بالا و همچنین موفقیت بیشتر آن‌ها در ترمیم جراحات عصبی اشاره کرد (۴۴).

از طرفی چندین رویکرد برای سلول‌زدایی جهت تولید پیوندهای عصبی سلول‌زدایی‌شده از عصب اهداکننده ثبت شده است؛ از جمله این موارد پروتکل توسعه‌یافته توسط Sondell و همکاران در سال ۱۹۹۸ است که در این روش استخراج شیمیایی سلول‌ها از اعصاب با استفاده از غوطه‌وری هیپوتونیک و به دنبال آن تیمارهای شوینده متناوب با تریتون و سدیم دی‌اکسی کولات انجام می‌شود. همچنین در روشی دیگر که براساس پروتکل Hudson و همکاران در سال ۲۰۰۴ است، از تیمارهای شیمیایی با سولفوتائین‌ها، تریتون و سدیم دی‌اکسی کولات و به دنبال آن شست‌وشو و استریل کردن استفاده می‌شود. مشابه این روش برای ایجاد داربست‌های عصبی سلول‌زدایی‌شده دمیلینه شده حیوانی و داربست‌های عصبی سلول‌زدایی‌شده انسان هم استفاده شده است. همچنین روش‌های جدیدتر دیگر شامل انجماد و ذوب، تیمار با سدیم دودسیل سولفونات (SDS)، اولتراسوند، محلول‌های DNase/RNase و استخراج دی‌اکسید کربن فوق‌بحرانی برای سلول‌زدایی کردن بافت استفاده می‌شوند (۴۵).

هدف از هر فرایند سلول‌زدایی، حذف کارآمد کلیه مواد سلولی و هسته‌ای است؛ درحالی‌که می‌بایست هرگونه اثر سوء آن بر ترکیب، فعالیت بیولوژیکی و یکپارچگی مکانیکی ماتریکس خارج سلولی باقیمانده به حداقل برسد. تمام روش‌های سلول‌زدایی با هدف کاهش ایمنی‌زایی بافت و افزایش ظرفیت بازسازی از طریق حفظ ماتریکس خارج سلولی به کار برده می‌شوند (۴۶).

ارزیابی‌های هیستولوژیک با رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین‌ائوزین نشان داد سلول‌ها به‌طور کامل در داربست‌ها حذف شده‌اند. همچنین با ارزیابی محتوای ماتریکس خارج سلولی، از جمله ساختار و تراکم رشته‌های کلاژن با استفاده از رنگ‌آمیزی تری کروم ماسون مشخص



شد ساختار ماتریکس خارج سلولی در داربست‌ها به‌طور مناسبی حفظ شده است. بررسی‌های دقیق‌تر توسط میکروسکوپ الکترونی نیز نشان‌دهنده این بود که حذف سلول‌ها به‌خوبی انجام شده و ساختار کلی بافت محصول نیز حفظ شده است. همچنین مقاومت مکانیکی و ساختاری داربست‌های تهیه‌شده توسط تست استحکام کششی تأیید شد. بخشی از سیمان بافتی در فرایند سلول‌زدایی از بین می‌رود. به همین دلیل بافت حاصل مقداری از قابلیت مقاومت در برابر پارگی و شکنندگی خود را از دست می‌دهد. از طرفی الیاف کلاژن و الاستیک باقیمانده نسبت به کشش ایجادشده مقاومت نشان می‌دهند که این مقاومت به‌صورت دو پیک خود را نشان می‌دهد که پیک اول مربوط به رشته‌های کلاژن و پیک دوم مربوط به رشته‌های الاستیک است. جای خالی سیمان بافتی و سلول‌های حذف‌شده باعث متخلخل شدن داربست محصول می‌شود که این سبب فراهم شدن زمینه نفوذ و چسبندگی سلول‌ها درون داربست و همچنین افزایش قابلیت کشسانی آن جهت آماده‌سازی داربست‌های سلول‌زدایی‌شده مناسب می‌شود (۴۷، ۴۸).

مطالعات نشان داده‌اند ایمنی‌زایی اجزای ماتریکس خارج سلولی اعصاب، مانند پروتئین لامینین و فیبرونکتین ضعیف و حتی تقریباً ناچیز است. بنابراین ایمنی‌زایی احتمالی داربست‌های عصبی عمدتاً در نتیجه سلول‌های باقیمانده در بافت آن‌ها پس از فرایند سلول‌زدایی است (۴۹، ۵۰). نتایج مطالعات انجام‌شده نشان‌دهنده این است که استفاده از شوینده‌ها در فرایند سلول‌زدایی و از بین بردن بقایای سلولی در بافت‌های عصبی به‌طور موفقیت‌آمیزی مؤثر واقع شده است (۴۹، ۵۱).

**نتیجه‌گیری نهایی:** بررسی‌های انجام‌شده در مطالعه حاضر در مجموع بیانگر این بود که داربست‌های تهیه‌شده از بافت‌های طبیعی عصبی زئون از طریق فرایند سلول‌زدایی با شوینده‌ها، ویژگی‌های ساختاری مناسبی جهت ایجاد بستر رشد سلولی فراهم می‌کنند.

## سپاسگزاری

از پژوهشکده تحقیقات زیست‌پزشکی دانشگاه تهران تشکر و قدردانی می‌شود.

## تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

## References

1. Sun X, Wang Y, Guo Z, Xiao B, Sun Z, Yin H, et al. Acellular cauda equina allograft as main material combined with biodegradable chitin conduit for regeneration of long-distance sciatic nerve defect in rats. *Adv Healthc Mater.* 2018;7(17):e1800276. doi: [10.1002/adhm.201800276](https://doi.org/10.1002/adhm.201800276) PMID: [30044554](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30044554/)
2. Magaz A, Faroni A, Gough JE, Reid AJ, Li X, Blaker JJ. Bioactive silk-based nerve guidance conduits for augmenting peripheral nerve repair. *Adv Healthc Mater.* 2018;7(23):e1800308. doi: [10.1002/adhm.201800308](https://doi.org/10.1002/adhm.201800308) PMID: [30260575](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30260575/)
3. Gu X, Ding F, Williams DF. Neural tissue engineering options for peripheral nerve regeneration. *Biomaterials.* 2014;35(24):6143-56. doi: [10.1016/j.biomaterials.2014.04.064](https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.04.064) PMID: [24818883](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24818883/)
4. Sarker MD, Naghieh S, McInnes AD, Schreyer DJ, Chen X. Regeneration of peripheral nerves by nerve guidance conduits: Influence of design, biopolymers, cells, growth factors, and physical stimuli. *Prog Neurobiol.* 2018. doi: [10.1016/j.pneurobio.2018.07.002](https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2018.07.002) PMID: [30077776](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30077776/)
5. Hall S. The response to injury in the peripheral nervous system. *J Bone Joint Surg Br.* 2005;87(10):1309-19. doi: [10.1302/0301-620X.87B10.16700](https://doi.org/10.1302/0301-620X.87B10.16700) PMID: [16189300](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16189300/)
6. Zilic L, Wilshaw SP, Haycock JW. Decellularisation and histological characterisation of porcine peripheral nerves. *Biotechnol Bioeng.* 2016;113(9):2041-53. doi: [10.1002/bit.25964](https://doi.org/10.1002/bit.25964) PMID: [26926914](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26926914/)

7. Walsh S, Midha R. Practical considerations concerning the use of stem cells for peripheral nerve repair. *Neurosurg Focus*. 2009;26(2):E2. doi: [10.3171/FOC.2009.26.2.E2](https://doi.org/10.3171/FOC.2009.26.2.E2) PMID: [19435443](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19435443/)
8. Siemionow M, Sonmez E. Nerve allograft transplantation: a review. *J Reconstr Microsurg*. 2007;23(8):511-20. doi: [10.1055/s-2007-1022694](https://doi.org/10.1055/s-2007-1022694) PMID: [18189213](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18189213/)
9. Marchesi C, Pluderi M, Colleoni F, Belicchi M, Meregalli M, Farini A, et al. Skin-derived stem cells transplanted into resorbable guides provide functional nerve regeneration after sciatic nerve resection. *Glia*. 2007; 55(4):425-38. doi: [10.1002/glia.20470](https://doi.org/10.1002/glia.20470) PMID: [17203471](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17203471/)
10. Hu J, Zhu QT, Liu XL, Xu YB, Zhu JK. Repair of extended peripheral nerve lesions in rhesus monkeys using acellular allogenic nerve grafts implanted with autologous mesenchymal stem cells. *Exp Neurol*. 2007;204(2):658-66. doi: [10.1016/j.expneurol.2006.11.018](https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2006.11.018) PMID: [17316613](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17316613/)
11. Kingham PJ, Kalbermatten DF, Mahay D, Armstrong SJ, Wiberg M, Terenghi G. Adipose-derived stem cells differentiate into a Schwann cell phenotype and promote neurite outgrowth in vitro. *Exp Neurol*. 2007;207(2):267-74. doi: [10.1016/j.expneurol.2007.06.029](https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2007.06.029) PMID: [17761164](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17761164/)
12. Chalfoun CT, Wirth GA, Evans GR. Tissue engineered nerve constructs: where do we stand? *J Cell Mol Med*. 2006;10(2):309-17. doi: [10.1111/j.1582-4934.2006.tb00401.x](https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2006.tb00401.x) PMID: [16796801](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16796801/)
13. IJkema-Paassen J, Jansen K, Gramsbergen A, Meek MF. Transection of peripheral nerves, bridging strategies and effect evaluation. *Biomaterials*. 2004;25(9):1583-92. doi: [10.1016/s0142-9612\(03\)00504-0](https://doi.org/10.1016/s0142-9612(03)00504-0) PMID: [14697860](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14697860/)
14. Bini TB, Gao S, Xu X, Wang S, Ramakrishna S, Leong KW. Peripheral nerve regeneration by microbraided poly(L-lactide-co-glycolide) biodegradable polymer fibers. *J Biomed Mater Res A*. 2004;68(2):286-95. doi: [10.1002/jbm.a.20050](https://doi.org/10.1002/jbm.a.20050) PMID: [14704970](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14704970/)
15. Singh A, Asikainen S, Teotia AK, Shiekh PA, Huutilainen E, Qayoom I, et al. Biomimetic photocurable three-dimensional printed nerve guidance channels with aligned cryomatrix lumen for peripheral nerve regeneration. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2018;10(50):43327-43342. doi: [10.1021/acsami.8b11677](https://doi.org/10.1021/acsami.8b11677) PMID: [30460837](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30460837/)
16. Kehoe S, Zhang XF, Boyd D. FDA approved guidance conduits and wraps for peripheral nerve injury: a review of materials and efficacy. *Injury*. 2012;43(5):553-72. doi: [10.1016/j.injury.2010.12.030](https://doi.org/10.1016/j.injury.2010.12.030) PMID: [21269624](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21269624/)
17. MacEwan MR, Zellmer ER, Wheeler JJ, Burton H, Moran DW. Regenerated sciatic nerve axons stimulated through a chronically implanted macro-sieve electrode. *Front Neurosci*. 2016;10:557. doi: [10.3389/fnins.2016.00557](https://doi.org/10.3389/fnins.2016.00557) PMID: [28008303](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28008303/)
18. Sarker M, Naghieh S, McInnes AD, Schreyer DJ, Chen X. Strategic design and fabrication of nerve guidance conduits for peripheral nerve regeneration. *Biotechnol J*. 2018;13(7):e1700635. doi: [10.1002/biot.201700635](https://doi.org/10.1002/biot.201700635) PMID: [29396994](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29396994/)
19. Sun B, Zhou Z, Wu T, Chen W, Li D, Zheng H, et al. Development of nanofiber sponges-containing nerve guidance conduit for peripheral nerve regeneration in vivo. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2017;9(32):26684-26696. doi: [10.1021/acsami.7b06707](https://doi.org/10.1021/acsami.7b06707) PMID: [28718615](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28718615/)
20. Yao L, de Ruitter GC, Wang H, Knight AM, Spinner RJ, Yaszemski MJ, et al. Controlling dispersion of axonal regeneration using a multichannel collagen nerve conduit. *Biomaterials*. 2010;31(22):5789-97. doi: [10.1016/j.biomaterials.2010.03.081](https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.03.081) PMID: [20430432](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20430432/)
21. Wang J, Xiong H, Zhu T, Liu Y, Pan H, Fan C, et al. Bioinspired multichannel nerve guidance conduit based on shape memory nanofibers for potential application in peripheral nerve repair. *ACS Nano*. 2020;14(10):12579-12595. doi: [10.1021/acs.nano.0c03570](https://doi.org/10.1021/acs.nano.0c03570) PMID: [32786254](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32786254/)

22. Vijayavenkataraman S. Nerve guide conduits for peripheral nerve injury repair: A review on design, materials and fabrication methods. *Acta Biomater.* 2020;106:54-69. [doi: 10.1016/j.actbio.2020.02.003](https://doi.org/10.1016/j.actbio.2020.02.003) [PMID: 32044456](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32044456/)
23. Yang S, Wang C, Zhu J, Lu C, Li H, Chen F, et al. Self-assembling peptide hydrogels functionalized with LN- and BDNF- mimicking epitopes synergistically enhance peripheral nerve regeneration. *Theranostics.* 2020;10(18):8227-8249. [doi: 10.7150/thno.44276](https://doi.org/10.7150/thno.44276) [PMID: 32724468](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32724468/)
24. Rao F, Wang Y, Zhang D, Lu C, Cao Z, Sui J, et al. Aligned chitosan nanofiber hydrogel grafted with peptides mimicking bioactive brain-derived neurotrophic factor and vascular endothelial growth factor repair long-distance sciatic nerve defects in rats. *Theranostics.* 2020;10(4):1590-1603. [doi: 10.7150/thno.36272](https://doi.org/10.7150/thno.36272) [PMID: 32042324](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32042324/)
25. Wang J, Cheng Y, Wang H, Wang Y, Zhang K, Fan C, et al. Biomimetic and hierarchical nerve conduits from multifunctional nanofibers for guided peripheral nerve regeneration. *Acta Biomater.* 2020;117:180-191. [doi: 10.1016/j.actbio.2020.09.037](https://doi.org/10.1016/j.actbio.2020.09.037) [PMID: 33007489](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33007489/)
26. Cerqueira SR, Lee YS, Cornelison RC, Mertz MW, Wachs RA, Schmidt CE, et al. Decellularized peripheral nerve supports Schwann cell transplants and axon growth following spinal cord injury. *Biomaterials.* 2018;177:176-18. [doi: 10.1016/j.biomaterials.2018.05.049](https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.05.049) [PMID: 29929081](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29929081/)
27. Jia H, Wang Y, Tong XJ, Liu GB, Li Q, Zhang LX, et al. Sciatic nerve repair by acellular nerve xenografts implanted with BMSCs in rats xenograft combined with BMSCs. *Synapse.* 2012;66(3):256-69. [doi: 10.1002/syn.21508](https://doi.org/10.1002/syn.21508) [PMID: 22127791](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22127791/)
28. Moore AM, MacEwan M, Santosa KB, Chenard KE, Ray WZ, Hunter DA, et al. Acellular nerve allografts in peripheral nerve regeneration: a comparative study. *Muscle Nerve.* 2011;44(2):221-34. [doi: 10.1002/mus.22033](https://doi.org/10.1002/mus.22033) [PMID: 21660979](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21660979/)
29. Fu SY, Gordon T. The cellular and molecular basis of peripheral nerve regeneration. *Mol Neurobiol.* 1997;14(1-2):67-116. [doi: 10.1007/BF02740621](https://doi.org/10.1007/BF02740621) [PMID: 9170101](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9170101/)
30. Hundepool CA, Nijhuis TH, Kotsougiani D, Friedrich PF, Bishop AT, Shin AY. Optimizing decellularization techniques to create a new nerve allograft: an in vitro study using rodent nerve segments. *Neurosurg Focus.* 2017;42(3):E4. [doi: 10.3171/2017.1.FOCUS16462](https://doi.org/10.3171/2017.1.FOCUS16462) [PMID: 28245670](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28245670/)
31. Sondell M, Lundborg G, Kanje M. Regeneration of the rat sciatic nerve into allografts made acellular through chemical extraction. *Brain Res.* 1998;795(1-2):44-54. [doi: 10.1016/s0006-8993\(98\)00251-0](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(98)00251-0) [PMID: 9622591](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9622591/)
32. Hudson TW, Zawko S, Deister C, Lundy S, Hu CY, Lee K, et al. Optimized acellular nerve graft is immunologically tolerated and supports regeneration. *Tissue Eng.* 2004;(11-12):1641-51. [doi: 10.1089/ten.2004.10.1641](https://doi.org/10.1089/ten.2004.10.1641) [PMID: 15684673](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15684673/)
33. Bae JY, Park SY, Shin YH, Choi SW, Kim JK. Preparation of human decellularized peripheral nerve allograft using amphoteric detergent and nuclease. *Neural Regeneration Research.* 2021;16(9):1890-1896. [doi: 10.4103/1673-5374.306091](https://doi.org/10.4103/1673-5374.306091) [PMID: 33510098](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33510098/)
34. Fischer AH, Jacobson KA, Rose J, Zeller R. Hematoxylin and eosin staining of tissue and cell sections. *CSH Protoc.* 2008;pdb.prot4986. [doi: 10.1101/pdb.prot4986](https://doi.org/10.1101/pdb.prot4986) [PMID: 21356829](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21356829/)
35. Zhao Z, Wang Y, Peng J, Ren Z, Zhang L, Guo Q, et al. Improvement in nerve regeneration through a decellularized nerve graft by supplementation with bone marrow stromal cells in fibrin. *Cell Transplant.* 2014;23(1):97-110. [doi: 10.3727/096368912X658845](https://doi.org/10.3727/096368912X658845) [PMID: 23128095](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23128095/)

36. Gu Y, Zhu J, Xue C, Li Z, Ding F, Yang Y, et al. Chitosan/silk fibroin-based, Schwann cell-derived extracellular matrix-modified scaffolds for bridging rat sciatic nerve gaps. *Biomaterials*. 2014;35(7):2253-63. [doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.11.087](https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.11.087) PMID: 24360577
37. Langley OK. The interaction between peripheral nerve polyanions and Alcian blue. *J Neurochem*. 1970;17(11):1535-41. [doi: 10.1111/j.1471-4159.1970.tb03723.x](https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1970.tb03723.x) PMID: 4097507
38. Raimondo S, Fornaro M, Di Scipio F, Ronchi G, Giacobini-Robecchi MG, Geuna S. Chapter 5: Methods and protocols in peripheral nerve regeneration experimental research: part II-morphological techniques. *Int Rev Neurobiol*. 2009;87:81-103. [doi: 10.1016/S0074-7742\(09\)87005-0](https://doi.org/10.1016/S0074-7742(09)87005-0) PMID: 19682634
39. Carriel V, Garzón I, Alaminos M, Cornelissen M. Histological assessment in peripheral nerve tissue engineering. *Neural Regen Res*. 2014;9(18):1657-60. [doi: 10.4103/1673-5374.141798](https://doi.org/10.4103/1673-5374.141798) PMID: 25374585
40. Wakimura Y, Wang W, Itoh S, Okazaki M, Takakuda K. An experimental study to bridge a nerve gap with a decellularized allogeneic nerve. *Plast Reconstr Surg*. 2015;136(3):319e-327e. [doi: 10.1097/PRS.0000000000001556](https://doi.org/10.1097/PRS.0000000000001556) PMID: 26313836
41. Zaminy A, Sayad-Fathi S, Kasmaie FM, Jahromi Z, Zendedel A. Decellularized peripheral nerve grafts by a modified protocol for repair of rat sciatic nerve injury. *Neural Regen Res*. 2021;16(6):1086-1092. [doi: 10.4103/1673-5374.300449](https://doi.org/10.4103/1673-5374.300449) PMID: 33269754
42. Dhandayuthapani B, Yoshida Y, Maekawa T, Kumar DS. Polymeric scaffolds in tissue engineering application: a review. *Int J Polym Sci*. 2011 Jul 19;2011. [doi: 10.1155/2011/290602](https://doi.org/10.1155/2011/290602)
43. Lin MY, Manzano G, Gupta R. Nerve allografts and conduits in peripheral nerve repair. *Hand Clin*. 2013;29(3):331-48. [doi: 10.1016/j.hcl.2013.04.003](https://doi.org/10.1016/j.hcl.2013.04.003) PMID: 23895714
44. Badylak SF, Freytes DO, Gilbert TW. Extracellular matrix as a biological scaffold material: Structure and function. *Acta Biomater*. 2009;5(1):1-13. [doi: 10.1016/j.actbio.2008.09.013](https://doi.org/10.1016/j.actbio.2008.09.013) PMID: 18938117
45. Wei S, Hu Q, Ma J, Dai X, Sun Y, Han G, et al. Acellular nerve xenografts based on supercritical extraction technology for repairing long-distance sciatic nerve defects in rats. *Bioact Mater*. 2022;18:300-320. [doi: 10.1016/j.bioactmat.2022.03.014](https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2022.03.014) PMID: 35387172
46. Kawazoye S, Tian SF, Toda S, Takashima T, Sunaga T, Fujitani N, et al. The mechanism of interaction of sodium dodecyl sulfate with elastic fibers. *J Biochem*. 1995;117(6):1254-60. [doi: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a124852](https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a124852) PMID: 7490268
47. Wang Q, Zhang C, Zhang L, Guo W, Feng G, Zhou S, et al. The preparation and comparison of decellularized nerve scaffold of tissue engineering. *J Biomed Mater Res A*. 2014;102(12):4301-8. [doi: 10.1002/jbm.a.35103](https://doi.org/10.1002/jbm.a.35103) PMID: 24497414
48. Chenite A, Chaput C, Wang D, Combes C, Buschmann MD, Hoemann CD, et al. Novel injectable neutral solutions of chitosan form biodegradable gels in situ. *Biomaterials*. 2000;21(21):2155-61. [doi: 10.1016/S0142-9612\(00\)00116-2](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(00)00116-2) PMID: 10985488
49. Hess JR, Brenner MJ, Fox IK, Nichols CM, Myckatyn TM, Hunter DA, et al. Use of cold-preserved allografts seeded with autologous Schwann cells in the treatment of a long-gap peripheral nerve injury. *Plast Reconstr Surg*. 2007;119(1):246-259. [doi: 10.1097/01.prs.0000245341.71666.97](https://doi.org/10.1097/01.prs.0000245341.71666.97) PMID: 17255680
50. Choi J, Enis DR, Koh KP, Shiao SL, Pober JS. T lymphocyte-endothelial cell interactions. *Annu Rev Immunol*. 2004; 22:683-709. [doi: 10.1146/annurev.immunol.22.012703.104639](https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.22.012703.104639) PMID: 15032593
51. Johnson PJ, Wood MD, Moore AM, Mackinnon SE. Tissue engineered constructs for peripheral nerve surgery. *Eur Surg*. 2013;45(3):122-135. [doi: 10.1007/s10353-013-0205-0](https://doi.org/10.1007/s10353-013-0205-0) PMID: 24385980