

اندازه گیری خواص مکانیکی مغز موش با استفاده از تست کشش

علی رضا کریمی* - دکتر احمد شجاعی** - دکتر مهدی نویدبخش*** - دکتر برهان بیگزاده**** - دکتر شهاب فقیهی*****

* دانشجوی دکترای مهندسی مکانیک، دانشگاه علم و صنعت ایران

** دانشیار دانشگاه علوم پزشکی بقیه اله

*** دانشیار دانشکده مهندسی مکانیک، دانشگاه علم و صنعت ایران

**** استادیار دانشکده مهندسی مکانیک، دانشگاه علم و صنعت ایران

***** استادیار دپارتمان مهندسی بافت، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری

چکیده

زمینه و هدف: محاسبه خواص مکانیکی بافت مغز به منظور داشتن درک کامل و جامع از تغییرات ایجاد شده در آن، می تواند بسیار سودمند و کاربردی باشد. بافت مغز در زمره بافت های خیلی نرم قرار می گیرد که نمی تواند بار زیادی را تحمل کند. خواص مکانیکی این بافت می تواند در شرایط خاصی از بیماری تغییر یابد. پلاسمودیوم فالسیپاروم (*Plasmodium falciparum*) یکی از انواع انگل های کشنده مالاریا است که می تواند با تغییر در خواص مکانیکی گلبول قرمز خون، منجر به این تغییر شود. تغییر خواص در بافت مغز در پلاسمودیوم فالسیپاروم، مالاریای مغزی نامیده می شود که با گیر کردن گلبول های قرمز آلوده در مغز ایجاد می شود. گیر کردن گلبول های قرمز آلوده که نسبت به گلبول های قرمز سالم بسیار سخت تر شده اند، می تواند منجر به کما در بیمار و در نهایت مرگ آن شود. بنابراین می توان با محاسبه و بررسی روند تغییرات خواص مکانیکی در بافت مغز آلوده به انگل پلاسمودیوم فالسیپاروم نکاتی را درباره آن آشکار کرد. اما به دلیل محدودیت های موجود در بررسی این بیماری در پلاسمودیوم فالسیپاروم، مدل حیوانی آن یعنی پلاسمودیوم برگه ای نوع آنکا (*Plasmodium berghei*-ANKA) می تواند مورد استفاده قرار بگیرد که در ایجاد مالاریای مغزی با انگل پلاسمودیوم فالسیپاروم شباهت های بسیاری دارد.

روش ها: در مطالعه حاضر پس از آلوده کردن هفت موش به انگل پلاسمودیوم برگه ای نوع آنکا، بافت مغز آن ها جدا شده و برای بررسی خواص مکانیکی در دستگاه تست کشش قرار گرفت. نمودار تنش- کرنش برای هر نمونه استخراج گردید و از ناحیه الاستیک خطی هر نمودار میزان دقیق سختی (مدول الاستیک) برای هر نمونه به دست آمد. در این جا منظور از تنش و کرنش به ترتیب حاصل نیروی اعمالی به نمونه بر مساحت آن، و میزان تغییر طول نمونه نسبت به طول اولیه آن می باشد. همچنین منظور از مدول الاستیک حاصل تقسیم تنش بر کرنش در ناحیه خطی نمودار تنش-کرنش می باشد.

یافته ها: نتایج نشان داد که با افزایش میزان رشد انگل در خون موش از ۱/۵٪ به ۶٪، میزان سختی مغز ۳/۴۴ برابر گردید. در حالی که همین مقایسه بین میزان انگل در خون ۵/۵٪ با ۶٪، حکایت از افزایش ۱/۷۸ برابری داشت. اما مقایسه بین نمونه مغزهای کنترل و مغز آلوده با میزان انگل ۶٪، نشان از افزایش ۴/۰۷٪ مدول یانگ مغز داشت.

نتیجه گیری: نتیجه ای که از تلاش حاضر می توان گرفت این است که با رشد میزان انگل در خون، سختی مغز با رابطه ای کاملاً مستقیم افزایش می یابد. انتظار این است که عامل اصلی این سختی در مغزهای آلوده به پلاسمودیوم برگه ای نوع آنکا، سخت شدن گلبول های قرمز و گیر کردن آن ها در عروق مغزی باشد.

واژگان کلیدی: مالاریا، پلاسمودیوم برگه ای نوع آنکا، بافت مغز، خواص مکانیکی، مدول الاستیک

وصول مقاله: ۱۳۹۲/۴/۶

تأیید مقاله: ۱۳۹۲/۸/۴

نویسنده پاسخگو: تهران، دانشگاه علم و صنعت ایران، دانشکده مکانیک، ۱۶۸۴۴، تلفن: ۰۲۱-۷۷۲۴۰۵۲۳ - mnavid@iust.ac.ir

مقدمه

داشته است که هرساله حدود ۳۰۰ میلیون نفر در سراسر دنیا به انگل کشنده پلاسمودیوم فالسیپاروم (*Plasmodium falciparum*) آلوده می شوند. به علاوه سالانه ۲ میلیون کودک در کشورهای آفریقایی جان خود را تسلیم این بیماری انگلی می کنند (۱، ۲) که نشان دهنده اهمیت زیاد این بیماری انگلی می باشد. در حال حاضر ۱۰۹ کشور

مالاریا به عنوان خطرناک ترین بیماری انگلی جهان از سوی سازمان جهانی بهداشت معرفی شده است. همینطور این سازمان اعلام

مغز بهره‌مند گردند و مدل‌های مناسب‌تری را ارائه دهند (۱۷-۱۱). مطالعاتی که تاکنون انجام شده است فقط بر روی بافت مغز در حالت سالم بوده است و هیچ‌گونه بررسی در مورد بافت مغز در حالت بیمار و یا آلوده صورت نگرفته است (۹).

در مطالعه حاضر با آلوده کردن ۷ موش به انگل پلاسمودیوم برگه‌ای نوع آنکا، نمودار تنش-کرنش برای هر کدام از بافت‌های مغز استخراج گردید و مدول الاستیک آن‌ها در ناحیه خطی (هوکین) تعیین گردید.

روش بررسی

آماده‌سازی نمونه‌ها

۹ مغز موش مرد ۱۲-۱۰ هفته‌ای (وزن بین ۲۵۰-۲۴۰ گرم) برای آزمایش استفاده شدند. ۷ موش با حدود 1×10^6 انگل پلاسمودیوم که منجر به مالاریای مغزی موشی می‌شود از ناحیه شکمی آلوده شدند. تمام موش‌ها در شرایط سالم و پاک نگهداری می‌شدند و در گروه‌های ۳ تایی در قفس‌های پلاستیکی نگهداری می‌شدند. موش‌ها در طول مدت نگهداری از ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی بهره‌مند بودند و از غذا و آب سالم و کافی تغذیه می‌کردند.

پس از آلوده‌سازی، مرگ آن‌ها هر دو یا سه روز یکبار بررسی می‌شد. موش‌های آلوده در حدود ۹-۷ روز پس از آلودگی مردند. میزان آلودگی در موش‌ها هر روز با گرفتن مقداری خون از آنها و قرار دادن بر روی لام، و رنگ‌آمیزی بررسی می‌شد. پس از جداسازی مغز موش‌ها، مقدار مناسبی از مغز از ناحیه یکسان در همه موش‌ها استخراج گردید که در مطالعه حاضر بین ناحیه سفید و خاکستری تفاوتی در نظر گرفته نشده است (۱۸). میزان آلودگی در موش‌های مورد نظر در مطالعه حاضر بین ۷۲۰-۱۲۰ (۹٪-۱۵٪) بود.

بافت‌های مغزی طبق روشی که در کار (۱۲) توضیح داده شده بودند برای تست تک محوری آماده شدند. نمونه‌های استوانه‌ای که حدود ۱۵ میلی‌متر قطر و همین‌طور ۱۵ میلی‌متر ارتفاع داشتند، برای انجام آزمایش آماده گردیدند. این کار توسط لوله آهنی که برای این منظور تهیه شده بود، صورت گرفت. لبه‌های لوله آهنی تیز شده بودند تا برش بافت، دقیق و به درستی صورت پذیرد. به دلیل چسبیدن بافت مغز به دیواره داخلی لوله، از چاقوی جراحی برای جداسازی بافت از دیواره لوله استفاده شد. به هر حال به دلیل مشکل بودن این کار شاید کمی تغییر در اندازه نمونه‌ها ایجاد می‌گردید که به همین دلیل سطح و ارتفاع متوسط برای نمونه‌ها به دست آمد و در محاسبات وارد گردید.

دستگاه آزمایش

تست کشش تک محوری توسط دستگاه دقیقی که به همین

مالاریا خیز با بیش از ۳ میلیارد نفر جمعیت در معرض خطر این بیماری انگلی در دنیا وجود دارد. ۴ نوع پلاسمودیوم از انواع انگل مالاریا در دنیا شناخته شده است که شامل: پلاسمودیوم مالاریه، پلاسمودیوم اواله، پلاسمودیوم ویواکس، و پلاسمودیوم فالسیپاروم است. اما پلاسمودیوم فالسیپاروم خود را به عنوان خطرناک‌ترین نوع انگل مالاریا معرفی کرده است که می‌تواند منجر به مالاریای مغزی در انسان شود. علت اصلی مالاریای مغزی، گلبول‌های قرمز آلوده و سخت شده‌ای که در عروق مغزی گیر می‌کنند. گیر کردن گلبول‌های قرمز سخت شده و تغییر شکل یافته از حالت سالم (۳)، که می‌تواند شخص را به کما برده و در نهایت جان او را بگیرد. همچنین این مطالعات نشان داده‌اند که مالاریای مغزی می‌تواند بعضی از خصوصیات فیزیکی مغز را تحت‌تاثیر قرار دهد. اما می‌توان با آلوده کردن موش به انگل پلاسمودیوم برگه‌ای نوع آنکا این شرایط را به طور کامل در یک مدل حیوانی ایجاد کرده و به بررسی آن پرداخت (۴). مطالعات حاکی از این است که، گلبول‌های قرمز آلوده و سخت شده، در برخورد با سلول‌های دیواره‌ای عروق مغزی باعث ایجاد آسیب به آن‌ها می‌شوند که بعضاً خون‌ریزی را در این نواحی ایجاد می‌کند و در نهایت به بافت مغزی آسیب جبران‌ناپذیری را وارد می‌کنند. همچنین سمی که این انگل در مغز بر جای می‌گذارد، اثرات بسیار خطرناکی در عملکرد مغز ایجاد می‌کند. به علاوه گیر کردن گلبول‌های قرمز آلوده در عروق مغز، باعث مسدود کردن راه عبور جریان خون شده و در نتیجه فشار خون را در مغز بالا برده و حجم آن را افزایش می‌دهد (۴، ۳).

به هر حال ضروری به نظر می‌رسد تا مشکلات ذکر شده بر روی مدل‌های مناسب از جمله انسان، خوک، و یا جوندگان (موش) به دقت مورد بررسی قرار گیرد. اما با توجه به محدودیت‌های موجود در بررسی بر روی مغز انسان، مدل جوندگان می‌تواند بسیار مناسب و ایده‌آل باشد. زیرا مدل موش خصوصیت‌های یکسان بسیاری با مدل انسانی دارد و مالاریای مغزی که نکته مهمی در کار حاضر محسوب می‌شود، در موش هم، به طور کاملاً یکسان با انسان ایجاد می‌شود (۷-۴، ۲). اما محدودیت‌هایی در بررسی خصوصیات مکانیکی مغز وجود دارد که منجر به این موضوع شده است که تا به حال هیچ گونه مطالعه‌ای در مورد تفاوت‌های مکانیکی به وجود آمده بین بافت مغز در حالت سالم و بیمار انجام نشود (۸). ولی محاسبه این خصوصیات می‌تواند کاربردهای بسیاری در تحقیقات پزشکی، آزمایشگاهی و درمانی داشته باشد. مدل‌های آزمایشی مغز، که امروزه در این شبیه‌سازی‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد به دلیل نبود خواص مکانیکی دقیق، فقط از خواص آناتومیک بهره می‌گیرند، که البته تلاش حاضر می‌تواند این مشکل را مرتفع سازد (۱۰، ۹). ولی هنوز هم تعیین خصوصیات مکانیکی بافت‌های نرم از دیدگاه آزمایشگاهی و تحلیلی با چالش‌های زیادی روبرو است، زیرا این گونه بافت‌های نرم نمی‌توانند بار زیادی را تحمل کنند و بررسی و تحلیل را با مشکل روبرو می‌کنند. همچنین مدل‌های ریاضی- مکانیکی بافت مغز می‌تواند از خواص مکانیکی دقیق



شکل ۱- نمونه استوانه‌ای شکل بافت مغز در دستگاه کشش محوری.

قرمز سالم می‌شوند. همچنین اشاره گردید که پلاسمودیوم فالسیپاروم و پلاسمودیوم برگه‌ای نوع آنکا شباهت‌های بسیاری را در ایجاد مالاریای مغزی با یکدیگر دارند (۲۵-۲۳). پس می‌توان این مطلب را بیان کرد که سختی ایجاد شده در بافت‌های مغز آلوده ناشی از سختی گلبول‌های قرمز آلوده‌ای است که در عروق مغزی گیر کرده‌اند. همچنین گلبول‌های قرمز سخت شده‌ای که در عروق مغزی گیر کرده‌اند، باعث افزایش فشار خون در این عروق شده و همینطور حجم مغز را افزایش می‌دهند. به علاوه آن‌ها می‌توانند سلول‌های دیواره مغز را نابود کرده و خونریزی در مغز را باعث شوند. تمام عوامل ذکر شده می‌تواند منجر به تغییر خواص مغز شده و در نهایت منجر به سختی مغز گردد (۲۶، ۲۷). هم چنین نتایج مربوط به نمودار تنش-کرنش در قبلی این گروه ذکر شده است (۲۸).

خلاصه و نتیجه‌گیری

در مطالعه‌ای که صورت پذیرفت، تلاش شد تا با آلوده کردن تعدادی موش به انگل پلاسمودیوم برگه‌ای نوع آنکا، تغییر خاصیت مکانیکی مغز را در حالت آلوده نسبت به حالت سالم مورد بررسی قرار دهیم. به این منظور مغز موش‌های آلوده استخراج شده و در دستگاه کشش تک محوری قرار گرفت، و نمودار تنش-کرنش هر نمونه به طور مشخص استخراج گردید. نتایج با بافت مغز سالم مقایسه گردید. نتایج این مطلب را بیان می‌کند که میزان رشد انگل در خون موش کاملاً در ارتباط با میزان افزایش سختی در بافت مغز است. به این ترتیب که با افزایش میزان آلودگی، سختی مغز هم افزایش می‌یابد. ما بر این باور هستیم که گلبول‌های قرمز آلوده و سخت شده‌ای که در عروق مغزی گیر کرده‌اند، این سختی را در بافت مغز باعث شده‌اند. نتایج پژوهش حاضر می‌تواند در مدل‌سازی‌های مکانیکی، ایجاد مدل‌های شبیه‌سازی برای جراحان و پزشکان، و همچنین مطالعه‌های کلینیکی و درمانی مورد استفاده قرار بگیرد. به هر حال مطالعه حاضر می‌تواند با بررسی بر روی نمونه‌های بیشتر مورد تحلیل و بررسی بهتری قرار بگیرد.

منظور تهیه گردیده بود، صورت پذیرفت (۱۹، ۲۰). به طور خلاصه، نمونه‌های استوانه‌ای تهیه شده به گیره‌ها دستگاه کشش تهیه شده توسط چسب جراحی (Surgical glue cyanoacrylate type, ETHICON, USA) چسبانده شدند و برای مدت ۲۰ ثانیه در همان حالت باقی می‌ماندند تا خوب محکم شوند. سپس با اعمال نیرویی در حدود ۰/۰۲ نیوتن از چسبانده شدن نمونه‌ها به گیره‌ها اطمینان حاصل شد. در ادامه نیرو تا حد گسیختگی به نمونه‌ها اعمال گردید و نمودار تنش-کرنش برای آن‌ها رسم گردید.

نتایج

نمونه مغز و شماتیک نیروی اعمالی به آن به ترتیب در شکل‌های ۱ نشان داده شده است. جدول ۱ مدول الاستیک و میزان آلودگی هر نمونه را به طور کامل نشان می‌دهد. مقایسه بین ۵/۵٪ و ۶٪ میزان آلودگی تنها ۱/۸۷ برابر افزایش سختی را نشان می‌دهد. همچنین مقایسه بین نمونه‌های کنترل و ۶٪ آلودگی، بیش‌تر از ۴/۰۷ برابر سختی را ایجاد کرده است. نتایج این مطلب را تصریح می‌نماید که بین میزان آلودگی و سختی ایجاد در مغز رابطه مستقیمی وجود دارد. به طوری که با افزایش میزان آلودگی، سختی هم افزایش می‌یابد.

بحث

مطالعه انجام شده در (۲۲، ۲۱) نشان داده است که گلبول‌های قرمز آلوده به انگل پلاسمودیوم فالسیپاروم سخت‌تر از گلبول‌های

جدول ۱- میزان انگل در خون نمونه‌ها و مدول الاستیک هر کدام از آن‌ها را نشان می‌دهد

میزان انگل	مدول الاستیک (کیلوپاسکال)
کنترل اول	۴۶/۱۵
کنترل دوم	۴۷/۱۲
۱/۵٪	۵۴/۵۴
۲٪	۶۰/۰۸
۳٪	۸۰/۰۱
۴٪	۸۵/۷۱
۵/۵٪	۱۰۰/۱۲
۶٪	۱۰۰/۰۳
۹٪	۲۶۶/۶۷

تقدیر و تشکر

با تشکر فراوان از حمایت‌های آزمایشگاهی دانشکده مکانیک

دانشگاه علم و صنعت ایران و همچنین سازمان پزشکی قانونی کشور که بدون کمک آن‌ها انجام این کار میسر نمی‌شد.

References

- 1- Medana IM, Turner GD. Human cerebral malaria and the blood-brain barrier. *Int J Parasitol* 2006; 36(5): 555-568.
- 2- Core A, Hempel C, Kurtzhals JA, Penkowa M. Plasmodium berghei ANKA: erythropoietin activates neural stem cells in an experimental cerebral malaria model. *Exp Parasitol* 2011; 127(2): 500-505.
- 3- Karimi A, Navidbakhsh M, Motevalli Haghi A, Faghihi S. An innovative shape equation to quantify the morphological characteristics of parasitized red blood cells by Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine* 2013; 227(4): 428-437.
- 4- Combes V, El-Assaad F, Faille D, Jambou R, Hunt NH, Grau GE. Microvesiculation and cell interactions at the brain-endothelial interface in cerebral malaria pathogenesis. *Prog Neurobiol*; 91(2): 140-151.
- 5- Lirussi F, Pussard E. Quinine distribution in pregnant mice with Plasmodium berghei malaria. *Eur J Pharm Sci* 2006; 28(4): 284-290.
- 6- Schmidt KE, Schumak B, Specht S, Dubben B, Limmer A, Hoerauf A. Induction of pro-inflammatory mediators in Plasmodium berghei infected BALB/c mice breaks blood-brain-barrier and leads to cerebral malaria in an IL-12 dependent manner. *Microbes Infect*; 13 (10): 828-836.
- 7- Golenser J, McQuillan J, Hee L, Mitchell AJ, Hunt NH. Conventional and experimental treatment of cerebral malaria. *Int J Parasitol* 2006; 36(5): 583-593.
- 8- Sack I, Beierbach B, Wuerfel J, Klatt D, Hamhaber U, Papazoglou S, et al. The impact of aging and gender on brain viscoelasticity. *Neuroimage* 2009; 46(3): 652-657.
- 9- Kaster T, Sack I, Samani A. Measurement of the hyperelastic properties of ex vivo brain tissue slices. *J Biomech* 2011; 44(6): 1158-1163.
- 10- Van Dommelen JA, van der Sande TP, Hrapko M, Peters GW. Mechanical properties of brain tissue by indentation: interregional variation. *J Mech Behav Biomed Mater* 2010; 3(2): 158-166.
- 11- Morriss L, Wittek A, Miller K. Compression testing of very soft biological tissues using semi-confined configuration--a word of caution. *J Biomech* 2008; 41(1): 235-238.
- 12- Miller K. How to test very soft biological tissues in extension? *J Biomech* 2001; 4(5): 651-657.
- 13- Miller K. Method of testing very soft biological tissues in compression. *J Biomech* 2005; 8(1): 153-158.
- 14- Miller K, Chinzei K. Constitutive modelling of brain tissue: experiment and theory. *J Biomech* 1997; 30(12-11): 1115-1121.
- 15- Miller K, Chinzei K, Orssengo G, Bednarz P. Mechanical properties of brain tissue in-vivo: experiment and computer simulation. *J Biomech* 2000; 33(11): 1369-1376.
- 16- Miller K, Chinzei K. Mechanical properties of brain tissue in tension. *J Biomech* 2002; 35(4): 483-490.
- 17- Davis GB, Kohandel M, Sivaloganathan S, Tenti G. The constitutive properties of the brain parenchyma Part 2. Fractional derivative approach. *Med Eng Phys* 2006; 28(5): 455-459.
- 18- Libertiaux V, Pascon F, Cescotto S. Experimental verification of brain tissue incompressibility using digital image correlation. *J Mech Behav Biomed Mater*; 4(7): 1177-1185.
- 19- Karimi A, Navidbakhsh M, Shojaei A, Faghihi S. Measurement of the uniaxial mechanical properties of healthy and atherosclerotic human coronary arteries. *Materials Science and Engineering: C* 2013; 33(5): 2550-2554.
- 20- Karimi A, Navidbakhsh M, Faghihi S, Shojaei A, Hassani K. A finite element investigation on plaque vulnerability in realistic healthy and atherosclerotic human coronary arteries. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine* 2013; 227(2): 148-160.

- 21- Suwanarusk R, Cooke BM, Dondorp AM, Silamut K, Sattabongkot J, White NJ, et al. The deformability of red blood cells parasitized by *Plasmodium falciparum* and *P. vivax*. *J Infect Dis* 2004; 189(2): 190-194.
- 22- Fedosov DA, Caswell B, Suresh S, Karniadakis GE. Quantifying the biophysical characteristics of *Plasmodium-falciparum*-parasitized red blood cells in microcirculation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 108(1): 35-39.
- 23- Van der Heyde HC, Nolan J, Combes V, Gramaglia I, Grau GE. A unified hypothesis for the genesis of cerebral malaria: sequestration, inflammation and hemostasis leading to microcirculatory dysfunction. *Trends Parasitol* 2006; 22(11): 503-508.
- 24- Adams S, Brown H, Turner G. Breaking down the blood-brain barrier: signaling a path to cerebral malaria? *Trends Parasitol* 2002; 18(8): 360-366.
- 25- Sarfo BY, Wilson NO, Bond VC, Stiles JK. *Plasmodium berghei* ANKA infection increases Foxp 3, IL-10 and IL-2 in CXCL-10 deficient C57 BL/6 mice. *Malar J* 2011; 10: 69.
- 26- Martins YC, Smith MJ, Pelajo-Machado M, Werneck GL, Lenzi HL, Daniel-Ribeiro CT, et al. Characterization of cerebral malaria in the outbred Swiss Webster mouse infected by *Plasmodium berghei* ANKA. *Int J Exp Pathol* 2009; 90(2): 119-130.
- 27- Ohayon A, Golenser J, Sinay R, Tamir A, Altman A, Pollack Y, et al. Protein kinase C theta deficiency increases resistance of C57 BL/6J mice to *Plasmodium berghei* infection-induced cerebral malaria. *Infect Immun* 2010; 78(10): 4195-4205.
- 28- Karimi A, Navidbakhsh M, Motevalli Haghi A, Faghihi S. Measurement of the uniaxial mechanical properties of rat brains infected by *Plasmodium berghei* ANKA. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine* 2013; 227(5): 609-614.