

بررسی ترمیم نقص جزئی استخوان ران با استفاده از غشای ژلاتین- کیتوسان و سلول‌های بنیادی مغز استخوان در موش صحرایی نر بالغ نژاد Albino Wistar (ارزیابی هیستومورفومتریک و ایمونوهیستوشیمی)

آسا اجودانی ^۱M.Sc. Student، مهر انگیز صدوقی ^۲Ph.D.، سید همایون صدراپی ^۳Ph.D.*، غلامرضا کاکا ^۴Ph.D.

- ۱- دانشجوی گروه زیست‌شناسی تکوینی جانوری، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، دانشکده علوم زیستی، تهران، ایران
 - ۲- دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، دانشکده علوم زیستی، گروه زیست‌شناسی، تهران، ایران
 - ۳- دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، مرکز تحقیقات علوم اعصاب و گروه علوم تشریح، تهران، ایران
 - ۴- دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، مرکز تحقیقات علوم اعصاب، تهران، ایران
- * پست الکترونیک نویسنده مسئول: h_sadraie@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۵/۲۴

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۲/۱۴

چکیده

هدف: این تحقیق به بررسی هیستومورفومتریک و ایمونوهیستوشیمی ترمیم نقص جزئی استخوان ران توسط سلول‌های BMSCs و غشای ژلاتین- کیتوسان در موش صحرایی بالغ نژاد آلبینو - ویستار پرداخته است.

مواد و روش‌ها: در این بررسی تجربی ۶۰ سر موش صحرایی نر بالغ نژاد آلبینو- ویستار به‌طور تصادفی در پنج گروه مساوی قرار گرفتند: گروه شاهد که بعد از ایجاد نقص هیچ درمانی دریافت نکردند، گروه شم که بعد از ایجاد نقص محیط کشت به‌صورت موضعی در محل تزریق شد، گروه ژلاتین - کیتوسان که از غشا در محل نقص استفاده شد، گروه سلول که پیوند غیر اتولوگ سلول‌های BMSC به‌صورت موضعی در محل نقص انجام شد، گروه سلول - غشاء که سلول به‌همراه غشاء ژلاتین - کیتوسان در محل نقص پیوند شد.

نتایج: میانگین مساحت تراکولای استخوانی در گروه‌های غشا و سلول نسبت به گروه شاهد افزایش معنی‌داری را نشان داد. میانگین تعداد استئوسیت‌ها در ناحیه نقص در گروه سلول نسبت به گروه شاهد افزایش معنی‌داری نشان داد. میانگین تعداد استئوسیت‌ها در گروه‌های شم و غشا نسبت به گروه شاهد اختلاف معنی‌داری نداشت ولی این میانگین در گروه سلول - غشا نسبت به گروه شاهد کاهش معنی‌داری داشت ($p < 0.001$).

نتیجه‌گیری: پیوند سلول‌ها در ترمیم نقص موثر بوده و غشا هم می‌تواند به ترمیم نقص کمک نماید ولی استفاده از سلول به‌همراه غشا کمک چندانی به ترمیم نقص جزئی استخوان ران نمی‌کند.

واژگان کلیدی: سلول‌های استرومایی مغز استخوان، پیوند سلول، غشای ژلاتین، کیتوسان، ترمیم استخوان، موش صحرایی

مقدمه

یکی از معضلات و مشکلات پیش روی علم پزشکی، وجود شکستگی‌های دیر جوش خورنده استخوان و نواقص استخوانی است. اقدامات درمانی مختلفی در جهت ترمیم و بهبود نقص استخوان و شکستگی‌ها همچون استفاده از سیمان استخوانی، پیوند سلول‌های بنیادی، استفاده از پروتئین‌های شکل دهنده استخوان و کاربرد مواد زیست تخریب پذیر صورت می‌پذیرد (۱)، (۲، ۳ و ۴). سلول‌های بنیادی مزانشیمی (Mesenchymal Stem Cells) (MSCs) سلول‌های چند استعدادی و پرتوانی هستند که به راحتی تلخیص و تکثیر شده و می‌توانند تبدیل به سلول‌های استخوانی، غضروفی، فیبروبلاست، عضلانی و غیره شوند و می‌توان از آن‌ها برای پیوند استفاده کرد (۵ و ۶). سلول‌های بنیادی را می‌توان از منابع مختلف از جمله مغز استخوان، (۵) درم، (۷) پالپ دندان، (۸) سینوویوم، (۹) و دندان شیری به دست آورد (۱۰). سلول‌های ایده‌آل برای پیوند باید چندین خصوصیت از جمله دستیابی آسان، قدرت تکثیر سریع در محیط کشت، قدرت حیات طولانی و عدم رد پیوند در میزبان را داشته باشند. سلول‌های استرومایی مغز استخوان (Bone Marrow Stromal Cells) (BMSCs) تمامی این صفات را دارا می‌باشند. (۴ و ۱۱)

امروزه در مهندسی بافت، داربست‌های زیست تخریب پذیر به عنوان بستری برای سلول‌های بنیادین ساخته می‌شوند (۱۲) و (۱۳). در مهندسی بافت، داربست سلولی به تعیین شکل سه بعدی، افزایش بقای سلول و ایجاد چسبندگی مکانیکی اولیه کمک نموده و نیز به تجمع سلولی و ایجاد بافت و شکل‌گیری ساختار بافتی کمک کرده و می‌تواند بافت طبیعی و کاملی را حاصل کند (۱۴).

مهندسی بافت استخوان نیز به طور معمول به کمک داربست‌هایی که القاگر تشکیل استخوان بوده و قدرت هدایت و رشد سلول‌های استخوانی را دارند، انجام می‌شود. انواع متفاوتی از داربست‌ها در آزمایشگاه و در موجود زنده مورد بررسی قرار گرفته‌اند. ژلاتین، کیتوسان و کلاژن موادی زیست تخریب پذیر بوده و می‌توانند به عنوان ماده‌ی اولیه داربست سلولی در مهندسی بافت به کار گرفته شوند (۱۴)

در مطالعه یوجی بین و همکاران (۱۴) گزارش شده است که غشا ژلاتین - کیتوسان و بتا تری کلسیم فسفات با استفاده از تکنیک Freeze - Drying تولید و اثرات پوستی آن بر روی خرگوش مورد بررسی قرار گرفته است. نتایج حاصل از این تحقیق نشان می‌دهد که این غشا می‌تواند به عنوان غشای مناسب در مهندسی بافت استخوانی نیز مورد استفاده قرار گیرد. در تحقیق Caplen و همکاران (۱۵)، نشان داده شده است که

پیوند MSC کشت شده بر روی ژل کلاژن به خرگوش‌های مبتلا به ضایعات استخوانی و غضروفی سبب تشکیل مجدد استخوان و غضروف در ناحیه آسیب دیده شده است اما بافت تشکیل شده در این محل از نظر خصوصیات مکانیکی با بافت نرمال به طور قابل توجهی متفاوت بوده و طی ۲۴ هفته بافت از بین رفته است (۱۵).

نتایج هیستومورفومتری حاصل از تحقیقات استوکمن (۱۶) بر روی نقص جمجمه خوک که در آن پیوند سلول‌های استرومایی صورت گرفته بود، نشان داد که سی روز بعد از ایجاد نقص، گروه شاهد و تجربی از نظر حجم استخوان ترمیم شده به حجم کل نقص تفاوتی نشان ندادند.

با توجه به اهمیت سلول‌های بنیادی در ترمیم نواقص بافتی و از طرفی وجود گزارشاتی مبنی بر اثر مثبت داربست‌های زیست تخریب پذیر در تسریع ترمیم بافت‌ها، هدف از تحقیق حاضر بررسی ترمیم نقص جزئی استخوان ران توسط سلول‌های استرومایی مغز استخوان همراه با غشا ژلاتین - کیتوسان در موش صحرایی با استفاده از روش‌های هیستومورفومتری و ایمونوهیستوشیمی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش تجربی از ۶۰ سر موش صحرایی نر و بالغ نژاد آلبینو- ویستار با وزن حدود ۲۰۰ تا ۲۵۰ گرم استفاده شد. خوراک دام موش‌ها به صورت حبه به همراه آب و به صورت آزاد در دسترس موش‌ها قرار گرفت. حیوانات در دمای حیوان‌خانه که حدود 22 ± 2 درجه سانتی‌گراد و روشنایی آن به طور متناوب دوره روشنایی و تاریکی ۱۲ ساعته بود در شرایط مطلوب و استاندارد حیوان‌خانه دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله نگهداری شدند. موازین اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی که مورد تایید کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله بود، هنگام کار با حیوانات آزمایشگاهی رعایت شد. حیوانات به طور تصادفی به پنج گروه تقسیم شدند. ۱- گروه شاهد (Control) شامل حیواناتی که بر روی استخوان ران پای راستشان در ناحیه فوقانی اپیفیز دیستال سوراخی به صورت دو طرفه ایجاد نموده و هیچ درمانی دریافت نکردند. ۲- گروه شم (Sham) گروهی که ۷۲ ساعت بعد از ایجاد آسیب، ۵۰ میکرولیتر از محیط کشت به صورت موضعی، در محل نقص استخوان تزریق شد. ۳- گروه (ژلاتین - کیتوسان) که پس از ایجاد نقص استخوان ران و گذشت ۳ روز پیوند غشای ژلاتین-کیتوسان در محل آسیب انجام شد ۴- گروه سلول (BMSCs) که ۷۲ ساعت بعد از ایجاد نقص استخوانی تعداد ۱۵۰/۰۰۰ سلول BMSCs به صورت

در زیر هود (JAL TAJHIZ کشور ایران) قرار گرفته و به کف پلیت‌های آغشته به محلول ژلاتین استریل یک درصد، منتقل شدند. سپس قطعات غشا را به آرامی بر روی پلیت پهن نموده و کمی در داخل هود قرار داده تا خشک شوند. در این هنگام سلول‌های استرومایی را از کف پلیت به وسیله آنزیم تریپسین (Germany, Merck) جدا کرده و بر روی غشا ریخته و کمی محیط کشت حاوی محلول سرم گاوی به آن اضافه شد. سپس پلیت‌ها در دستگاه انکوباتور (MMM کشور انگلیس) قرار داده شدند. پس از دو روز غشاها را در زیر میکروسکوپ (Leica کشور آلمان) مشاهده کرده تا از وجود سلول استرومایی اطمینان حاصل شود.

ایجاد نقص استخوانی: حیوانات به وسیله مخلوط کتامین هیدروکلرید (۶۰ mg/kg) و زایلازین هیدروکلرید (۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) (هر دو Holland, Alfasan) بی‌هوش شده و پوست خلفی خارجی ران، توسط بتادین و الکل استریل شد. به منظور ایجاد نقص استخوان با استفاده از جراحی، پس از بی‌هوش کردن حیوانات، سطح خارجی ناحیه ران راست آن‌ها تراشیده شد و با بتادین استریل شد. سپس برشی به طول دو سانتی‌متر در ناحیه خارجی پای راست حیوانات ایجاد و پس از کنار زدن عضلات، استخوان ران در معرض دید قرار گرفت، سپس سوراخی به قطر ۱ میلی‌متر به صورت دو طرفه (Transcortical) در ناحیه بالای اپی‌فیز دیستال استخوان ران ایجاد شد و در پایان عضلات و پوست به وسیله نخ ۴ صفر قابل جذب دوخته شد و مراقبت‌های پس از عمل جراحی از حیوانات به عمل آمد. پس از گذشت ۷۲ ساعت از جراحی ناحیه عمل مجدداً باز شد و در گروه‌های پیوند سلول مقدار ۵۰ میکرو لیتر محیط کشت حاوی ۱۵۰/۰۰۰ سلول نشان دار شده با (UK- Brdu) GIBCO (که ۷۲ ساعت قبل از پیوند در معرض Brdu با غلظت ۱/۵ میلی‌مولار قرار گرفته بودند) و در گروه شم فقط ۵۰ میکرو لیتر محیط کشت تزریق شد. در گروه غشا که غشا ژلاتین - کیتوسان در محل نقص استخوانی پیوند زده شد و گروه سلول - غشا که غشایی که سلول روی آن کشت داده شده بود در محل نقص پیوند زده شد و سپس عضلات و پوست مجدداً با نخ ۴ صفر قابل جذب دوخته شد.

نمونه برداری از حیوانات: موش‌ها ۲۸ روز بعد از جراحی دوم با استفاده از دوز بالای کلروفورم کشته شده و پس از برداشتن استخوان‌ها، ارزیابی‌های هیستومورفومتریکی و ایمونوهیستوشیمی بر روی آن‌ها صورت گرفت.

غیر اتولوگ و موضعی در محل آسیب تزریق شد. ۵ - گروه سلول - غشا (BMGC) که نقص استخوانی در ران ایجاد شده و ۳ روز بعد ۱۵۰/۰۰۰ سلول بنیادی مغز استخوان به همراه غشای ژلاتین-کیتوسان در محل آسیب پیوند شد.

روش تهیه غشا: ابتدا کیتوسان (Germany, Merck) (Ch) (Darmstadt) با نسبت ۱ درصد وزنی به محلول آب مقطر ۲ بار تقطیر که با درجه حرارت ۴۰ درجه سانتی‌گراد اضافه شد محلول حاصل به وسیله‌ی دستگاه همزن (Germany, IKA-RH) مخلوط شد. سپس میزان ۰/۵ میلی لیتر اسید استیک خالص به آن اضافه و ژلاتین (Sigma-Aldrich هند، Bangalore) با نسبت ۱ درصد وزنی به آن اضافه و به دمای جوش رسانده شد. محلول حاصل به وسیله‌ی اتوکلاو استریل گردید.

استخراج سلول: ابتدا موش‌های صحرایی بالغ نر نژاد Albino wistar با وزن حدود ۲۰۰ تا ۲۵۰ گرم به صورت تصادفی انتخاب شده و به وسیله مخلوط کتامین (۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و زایلازین (۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) (هر دو Holland, Alfasan) بی‌هوش شدند. سپس استخوان ران پای چپ و راست اکسیوز شده و توسط قیچی استخوان بر، شکستگی کامل در استخوان ایجاد شده و با کمک سرنگ ۵ میلی‌لیتری حاوی ۱ میلی‌لیتر محیط MEM (UK- GIBCO) و سرم جنین گاوی FBS (UK- (Fetal bovine serum) (UK- GIBCO) ۱۰ درصد و یک سر سوزن ۱۸G مغز استخوان را از هر دو انتهای پروگزیمال و دیستال استخوان آسپیره کرده و تمام محتویات سرنگ را به درون یک فلاسک ۲۵ میلی‌لیتر تخلیه و در انکوباتور با pH= ۷/۲، دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و میزان CO₂، ۵ درصد و در محیط مرطوب انکوباتور (MMM کشور انگلیس) برای مدت ۲۴ ساعت نگهداری نموده و سپس محیط کشت تعویض شد. هنگام تعویض محیط، سلول‌ها توسط (Phosphate Buffer Saline) PBS استریل شسته شدند. پس از آن تعویض محیط هر ۲ تا ۳ روز تا تخلیه کامل سلول‌های خونی و خونساز و پر شدن بیش از ۸۰ درصد کف فلاسک ادامه یافت. بعد از پاساژ دوم، سلول‌ها آماده پیوند شدند.

کشت سلول‌های BMSC بر روی غشاء ژلاتین - کیتوسان: پس از تهیه غشا و قرار دادن قطعات ۱×۱ سانتی‌متر آن به مدت یک هفته در محیط کشت MEM (UK- GIBCO) حاوی سرم، آن را به وسیله محلول PBS و الکل ۹۶ درصد شستشو داده و غشاها در پلیت‌های شش خانه ای استریل

به‌عنوان درجه معنی‌داری در نظر گرفته شد.

نتایج

تعیین میزان حیات سلول‌ها

بر اساس viability test درصد سلول‌های BMSCs در انتهای مراحل کشت نشان دهنده این واقعیت بود که پس از پاساژ چهارم و پرشدن بیش از هشتاد درصد کف پلیت، میزان BMSCs زنده، به بیش از ۹۱ درصد رسید.

هیستومورفومتری بافت استخوان

میانگین درصد وسعت تیغه‌های استخوانی (Trabeculae) شکل گرفته در محل نقص استخوانی در گروه‌های مختلف بر حسب میکرومتر مربع به‌ترتیب در گروه شاهد ($2/130 \pm 69/23$)، در گروه ششم ($2/07 \pm 69/91$)، در گروه غشا ($1/46 \pm 86/18$)، در گروه سلول ($1/71 \pm 81/52$) و در گروه سلول-غشا ($1/16 \pm 70/79$) بوده است. مقایسه میانگین درصد تیغه‌های استخوانی گروه‌ها با یکدیگر نشان داد که تفاوت معنی‌داری در گروه ششم نسبت به گروه شاهد وجود نداشته است ولیکن این غیرمعنی‌داری افزایش را نشان می‌دهد. در گروه‌های غشا و سلول (هر دو $p < 0/001$) نسبت به گروه شاهد افزایش چشمگیر معنی‌داری را نشان داده است، حال آن‌که این میانگین در گروه سلول-غشا نسبت به گروه شاهد افزایش غیرمعنی‌داری داشته است. این میانگین در دو گروه غشا و سلول نسبت به گروه ششم افزایش چشمگیر و معنی‌داری را نشان داده است ($p < 0/001$).

ولی گروه سلول-غشا نسبت به گروه ششم دارای افزایش غیرمعنی‌داری بوده است و در گروه سلول در مقایسه با گروه غشا دارای کاهش غیرمعنی‌دار بود. حال آن‌که میانگین درصد تیغه‌های استخوانی در گروه سلول - غشا نسبت به گروه غشا دارای کاهش معنی‌داری بود ($p < 0/001$). در نهایت این میانگین در گروه سلول - غشا در مقایسه با گروه سلول دارای کاهش معنی‌داری بود ($p < 0/001$).

میانگین درصد بافت همبندی-عروقی (Connective Vascular Tissue) شکل گرفته در محل نقص استخوانی در گروه‌های مختلف بر حسب میکرومتر مربع به ترتیب در گروه شاهد ($3/06 \pm 2/082$)، گروه ششم ($2/07 \pm 29/96$)، گروه غشا ($1/46 \pm 13/82$)، گروه سلول ($1/69 \pm 18/05$) و گروه سلول-غشا ($1/25 \pm 29/10$) بوده است. از مقایسه اعداد این نتیجه حاصل شد که میانگین درصد بافت همبندی-عروقی در گروه‌های غشا و سلول نسبت به گروه شاهد دارای کاهش

شمارش سلولی و بررسی میزان زنده بودن سلول‌ها

(Viability test) برای مشخص کردن زنده بودن سلول‌ها، به نسبت مساوی حجمی از سوسپانسیون سلولی و تریپان بلو ($0/4$ درصد) بر روی لام نئوبار ریخته و سلول‌های زنده و مرده توسط میکروسکوپ اینورت (Leica کشور آلمان) با بزرگ‌نمایی ۴۰۰ بررسی و شمارش شدند و از آنجایی که سلول‌های مرده توسط تریپان بلو به رنگ آبی درمی‌آیند و سلول‌های زنده شفاف می‌باشند، تعداد سلول‌های زنده و مرده شمارش شده و درصد آن‌ها محاسبه و ثبت شدند.

مطالعه هیستومورفومتری: جهت بررسی میزان تراکولا موجود

در محل کال استخوانی از مجموعه سخت‌افزاری (کامپیوتر و میکروسکوپ متصل به دوربین Tsview) (INFINITY1) کشور کانادا) و سیستم نرم‌افزاری Motic استفاده شد. بدین ترتیب که از هر نمونه استخوان پس از کلسیم زدایی با اسید فرمیک ۱۰ درصد و فیکساسیون و پردازش بافتی، مقاطع طولی سریالی ۵ میکرونی از نمونه‌ها تهیه و با نسبت ۱ به ۴ تعداد ۷ مقطع از ناحیه کال تهیه و رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین انجام شد. جهت مطالعه هیستومورفومتری، از مقاطع بافتی، تصاویر با بزرگ‌نمایی ۱۰۰ برابر تهیه و میزان تراکولاها و بافت همبندی عروقی در مساحتی برابر با ۵۰۰۰۰ میکرومتر مربع اندازه‌گیری و ثبت شدند.

شمارش سلولی

تعداد استئوسیت‌های موجود در تیغه‌های استخوانی در سطحی معادل ۵۰۰۰۰ میکرومتر مربع با بزرگ‌نمایی ۴۰۰ برابر محاسبه و ثبت شدند.

ردیابی سلول‌های تزریق شده به روش ایمونوهیستوشیمی:

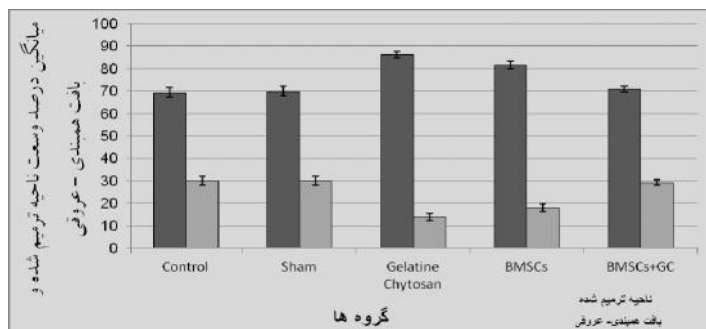
در پایان هفته چهارم، از ناحیه نقص استخوانی از گروه‌های مختلف مقاطع پارافینی به ضخامت ۵ میکرومتر تهیه و وجود سلول‌های نشاندار شده موجود در محل ترمیم استخوان با استفاده از روش ایمونوهیستوشیمی و بهره‌گیری از آنتی Brdu ردیابی و تایید شدند.

آنالیز آماری

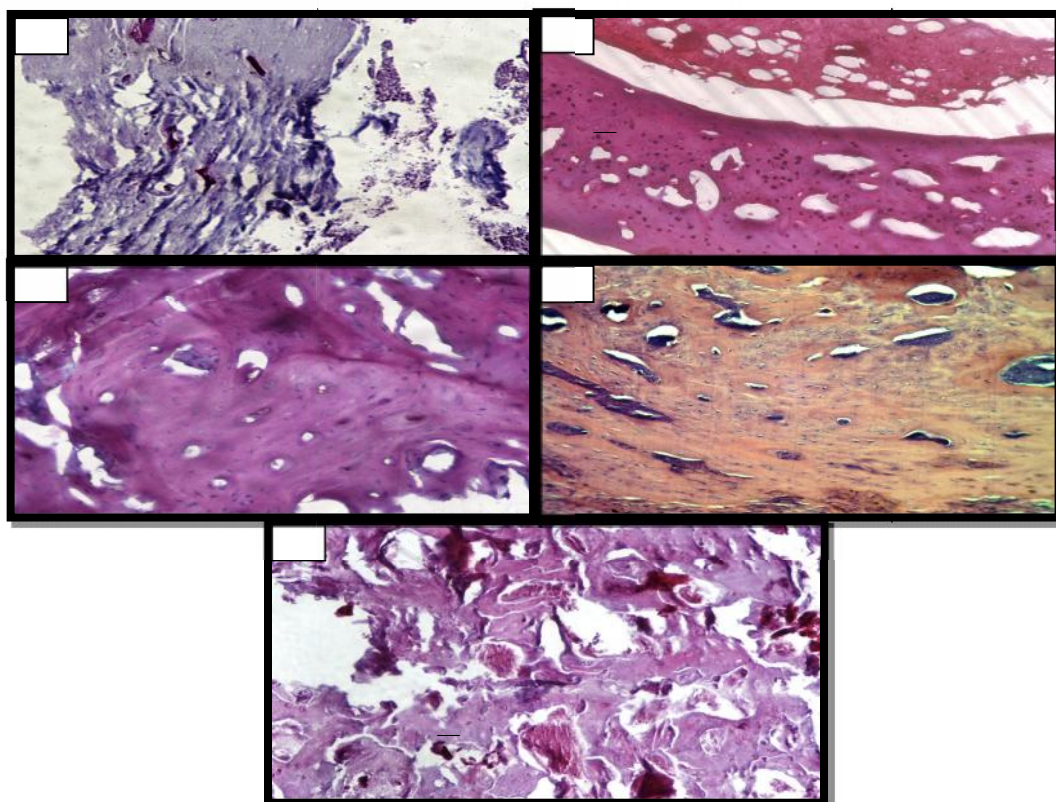
ارزیابی آماری داده‌ها با استفاده از آزمون آماری ANOVA و آزمون تکمیلی Post Hoc Tukey انجام شد. در انجام آزمون‌های آماری از نرم‌افزار SPSS استفاده شد. کلیه اطلاعات ارائه شده بر حسب Mean \pm SEM می‌باشد. میزان $p < 0/05$

همبندی - عروقی در گروه غشا نسبت به گروه سلول کاهش معنی دار داشته است و گروه سلول - غشا نسبت به گروه غشا دارای افزایش معنی دار و چشمگیری بود ($p < 0/001$). در انتها گروه سلول نسبت به گروه سلول - غشا دارای کاهش معناداری بود ($p < 0/001$) (نمودار ۱) (شکل ۱).

معنی دار بوده ($p < 0/001$)، حال آن که این میانگین درد و گروه شم و سلول - غشا نسبت به گروه شاهد رابطه معنی داری را نشان نداد. دو گروه غشا و سلول نسبت به گروه شم معنی دار بوده و کاهش چشمگیری را نشان دادند ($p < 0/001$) ولیکن در گروه سلول - غشا نسبت به گروه شم کاهش معنی داری را نشان داد. در ادامه بررسی ها این نتیجه حاصل آمد که میانگین درصد بافت



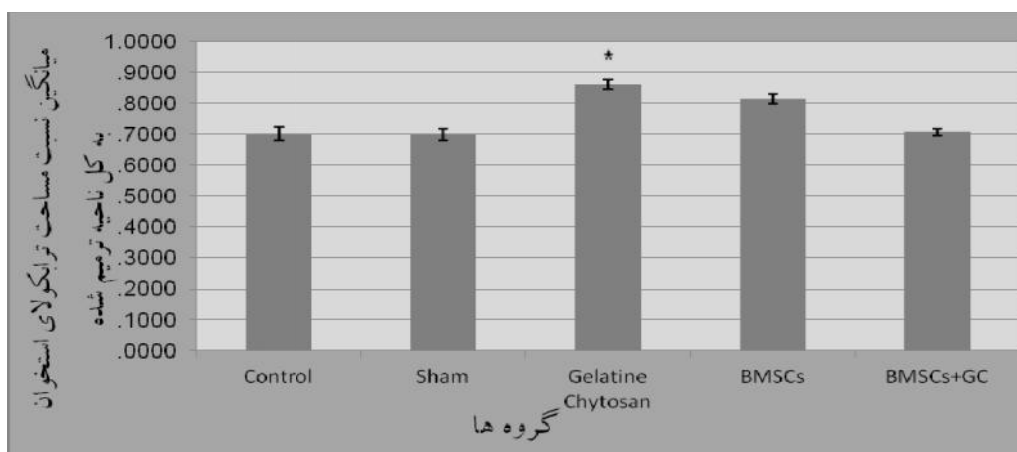
نمودار ۱: میانگین درصد وسعت ناحیه ترمیم شده استخوان و درصد بافت همبندی - عروقی در محل آسیب ران چهار هفته بعد از جراحی. * اختلاف معنی دار با گروه شاهد ($p < 0/05$)



شکل ۱: تصاویر مقاطع بافت استخوانی ناحیه ترمیم شده مربوط به حیوانات گروه شاهد (A)، گروه شم (B)، گروه غشاء (C)، گروه سلول (D) و گروه سلول - غشا (E) در پایان هفته چهارم. تراکولار استخوان (T)، فضاهای پیوندی عروقی (C)، وسعت تراکولاری در C و D نسبت به A و B/افزایش یافته و برعکس وسعت عروقی کاهش یافته است. (رنگ آمیزی هماتوکسیلین-انوزین، بزرگنمایی $\times 100$)

سلول- غشا نسبت به گروه شم دارای افزایش غیرمعنی دار بوده است. در ادامه بررسی‌ها مشخص شد که نسبت تراپکولای استخوانی به کل ناحیه اندازه‌گیری شده در گروه سلول نسبت به گروه غشا کاهش غیر معنی‌داری را نشان داده است حال آن‌که نسبت تراپکولای استخوانی به کل ناحیه اندازه‌گیری شده در گروه سلول- غشا نسبت به گروه غشا دارای کاهش چشم‌گیر و معنی‌داری بوده است ($p < 0/001$). در نهایت این نسبت در گروه سلول در مقایسه با گروه سلول- غشا دارای افزایش چشمگیر و معنی‌دار بوده است ($p < 0/001$) (نمودار ۲).

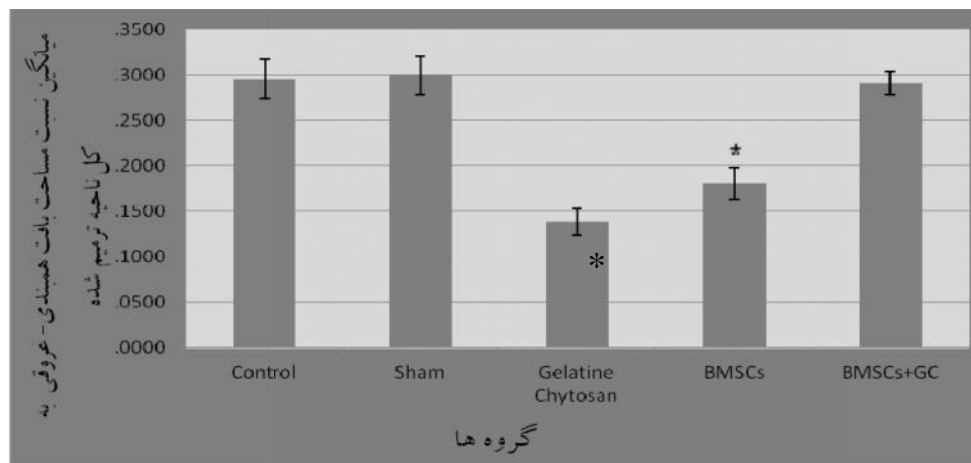
در اندازه‌گیری‌های حاصل از مساحت تراپکولای استخوان چنین به دست آمد که نسبت تراپکولای استخوانی به کل ناحیه اندازه‌گیری شده در گروه‌های شاهد ($0/70 \pm 0/023$)، شم ($0/699 \pm 0/020$)، غشا ($0/86 \pm 0/014$)، سلول ($0/17 \pm 0/011$) و سلول-غشا ($0/70 \pm 0/011$) بود. این نسبت در گروه شم نسبت به شاهد کاهش غیرمعنی‌دار و در گروه سلول - غشا نسبت به شاهد دارای اختلاف معنی‌داری نبود. در صورتی‌که این نسبت در گروه‌های غشا و سلول نسبت به گروه شاهد افزایش چشمگیر و معنی‌داری را نشان داد ($p < 0/001$). نسبت مورد بررسی در دو گروه غشا و سلول نسبت به گروه شم دارای افزایش معنی‌دار و چشمگیری بود ($p < 0/001$) حال آن‌که گروه



نمودار ۲: میانگین نسبت مساحت تراپکولای استخوان به کل ناحیه ترمیم شده در محل نقص بر حسب میکرومتر مربع در چهار هفته بعد از جراحی. مساحت تراپکولا در گروه شاهد و شم اختلافی نداشتند. *تفاوت معنی‌دار با گروه شاهد ($p < 0/05$)

معنی‌دار و چشم‌گیری بود ($p < 0/001$) حال آن‌که در گروه سلول - غشا نسبت به گروه شم رابطه معنی‌داری وجود نداشت. در ادامه بررسی‌ها مشخص شد که گروه سلول نسبت به گروه غشا دارای افزایش معنی‌داری بوده است. از سویی دیگر، این نسبت در گروه سلول- غشاء نسبت به گروه غشا دارای افزایش معنی‌دار و چشمگیری بوده است ($p < 0/001$). در نهایت میانگین نسبت بافت همبندی - عروقی به کل ناحیه اندازه‌گیری شده در گروه سلول- غشا نسبت به گروه سلول دارای افزایش چشمگیر و معنی‌دار ($p < 0/001$) بوده است (نمودار ۳).

در بررسی دیگر بر روی ناحیه ایجاد نقص، مشخص شد میانگین نسبت بافت همبندی - عروقی به کل ناحیه اندازه‌گیری شده در گروه‌های شاهد ($0/29 \pm 0/021$)، شم ($0/29 \pm 0/020$)، غشا ($0/13 \pm 0/014$)، سلول ($0/18 \pm 0/016$) و سلول-غشا ($0/29 \pm 0/012$) بود. این میانگین نسبت در گروه‌های شم و سلول - غشا نسبت به شاهد دارای تفاوت غیرمعنی‌دار بود. در صورتی‌که این میانگین در گروه‌های غشا و سلول نسبت به گروه شاهد دارای کاهش چشمگیر و معنی‌داری بود ($p < 0/001$). میانگین نسبت بافت همبندی- عروقی به کل ناحیه اندازه‌گیری شده در گروه‌های غشا و سلول نسبت به گروه شم دارای کاهش

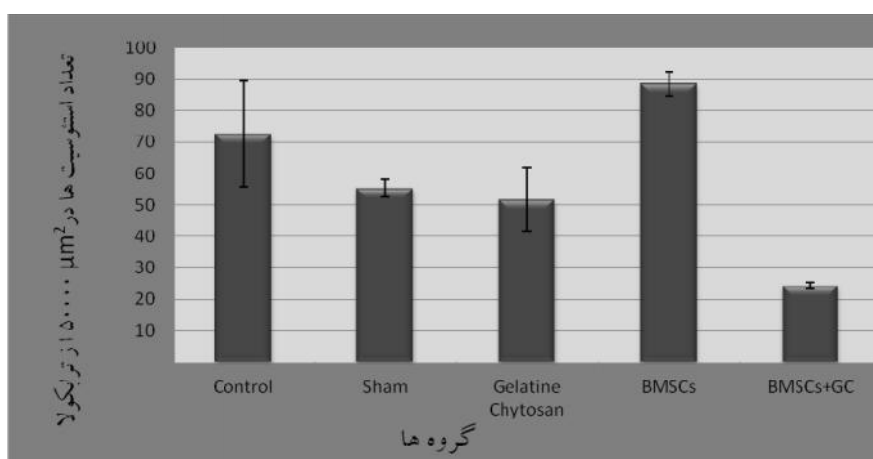


نمودار ۳: میانگین نسبت مساحت بافت همبندی- عروقی استخوان به کل ناحیه ترمیم شده در محل نقص بر حسب میکرومتر مربع در چهار هفته بعد از جراحی. این نسبت در گروه شاهد و شم اختلاف چندانی نداشتند. * تفاوت معنی دار با گروه شاهد ($p < 0.05$)

داشته است ($p < 0.001$). از سوی دیگر میانگین تعداد استئوسیتها در گروه غشا نسبت به گروه شم دارای کاهش غیرمعنی دار بوده است حال آنکه میانگین تعداد استئوسیتها در گروه سلول نسبت به گروه شم افزایش معنی دار ($p < 0.01$) و در گروه سلول- غشا نسبت به گروه شم کاهش معنی دار ($p < 0.001$) داشته است. علاوه بر این میانگین تعداد استئوسیتها در گروه غشا در مقایسه با گروه سلول دارای کاهش غیر معنی دار و گروه غشا نسبت به گروه سلول- غشا افزایش غیر معنی دار داشته است. میانگین تعداد استئوسیتها در گروه سلول در مقایسه با گروه سلول- غشا به شدت افزایش نشان داده است ($p < 0.001$) (نمودار ۴).

تعداد استئوسیتها

بررسی و شمارش تعداد استئوسیتها در سطحی برابر ۵۰۰۰۰ میکرومتر مربع از تراپکولاهای ناحیه نقص استخوانی با بزرگنمایی ۴۰۰ برابر در گروههای مختلف نشان داد که میانگین تعداد استئوسیتها در گروههای شاهد ($16/82 \pm 7/47$)، شم ($2/87 \pm 55/24$)، غشا ($51/62 \pm 10/24$)، سلول ($3/74 \pm 88/53$) و سلول- غشا ($24/36 \pm 0/98$) بود. میانگین تعداد استئوسیتها در گروههای شم، غشا و سلول نسبت به گروه شاهد اختلاف معنی داری نداشت به این ترتیب که در گروههای شم و غشا کاهش غیر معنی دار و در گروه سلول افزایش غیر معنی دار مشاهده گردید در حالی که میانگین تعداد استئوسیتها در گروه سلول- غشا نسبت به گروه شاهد کاهش معنی داری

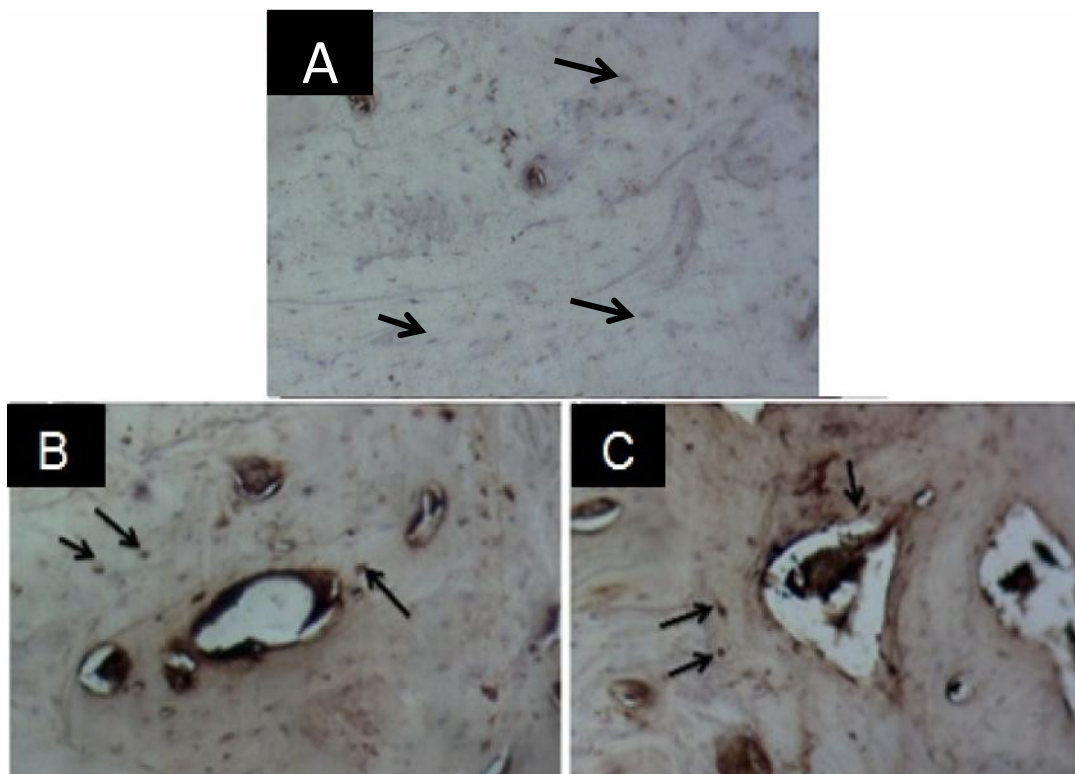


نمودار ۴: تعداد استئوسیتها در ۵۰۰۰۰ میکرومتر مربع از تراپکولای استخوان در محل آسیب چهار هفته بعد از پیوند. * اختلاف معنی دار با گروه شاهد ($p < 0.05$)

نتایج ایمونوهیستوشیمی

در پایان آزمایش وجود سلول‌های نشاندار شده در محل ترمیم استخوان در هر دو گروه سلول - غشا و سلول با استفاده از روش

ایمونوهیستوشیمی تایید شد (شکل ۲).



شکل ۲: سلول‌های ردیابی شده BMSC چهار هفته بعد از پیوند سلول و سلول - غشا. کنترل منفی (A)، سلول - غشا (B) و سلول (C). پیکان به هسته سلول‌های نشاندار اشاره دارد که در B و C به رنگ قهوه‌ای دیده می‌شوند ولی در A رنگ نگرفته و به رنگ بنفش دیده می‌شوند (بزرگنمایی ۱۰۰×)

غشا نسبت به گروه شاهد بوده است. تعداد استئوسیت‌ها در ناحیه ترمیم در گروه پیوند سلول - غشا نسبت به گروه شاهد کاهش معنی‌داری نشان داد.

مشابه نتایج گروه سلول و گروه غشا تحقیق ما، یافته‌های Kon و همکاران (۱۹) بر روی استخوان حیوانات مدل بزرگ است. ایشان استخوان‌های آسیب دیده که بر روی آن‌ها پیوند سلول و یا سلول به همراه داربست انجام شده بود را با استخوان‌های شاهد که سالم بودند، مورد ارزیابی و مقایسه قرار دادند. در بز سی و دو هفته بعد از پیوند سلول، استخوان‌های تجربی همانند استخوان‌های شاهد بودند و تقریباً به‌طور کامل ترمیم شده بودند. در گوسفند نیز هشت هفته بعد از پیوند چنین نتیجه‌ای به‌دست آمد (۲۰).

بحث

در مواردی مثل شکستگی‌هایی که در آن جوش خوردگی و ترمیم ضایعه با دشواری همراه است و یا در بیماری‌هایی مانند سرطان، عفونت، استئوپروز، استئوآرتریت و غیره فرآیندها و مکانیزم‌هایی که برای بازسازی محل آسیب باید طی شده و وارد عمل شوند اغلب با دشواری رو به رو می‌شوند (۱۷). امروزه سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان و نیز داربست‌های زیست تخریب پذیر جهت ترمیم نقائص استخوانی استفاده ای گسترده دارد (۱۸). یافته‌های هیستومورفومتری این تحقیق چهار هفته بعد از پیوند بیانگر افزایش مساحت تراپکولاهای استخوانی و کاهش بافت همبندی - عروقی در گروه‌های پیوند سلول و پیوند

پریوست و آندوست فعال و ضخیم بوده و ناحیه ترمیم از یک شبکه رگی غنی برخوردار بوده است. در اندام کنترل و در ناحیه نقص استخوانی مقدار زیادی بافت همبند سست و میزان کمی الیاف کلاژن و شبکه مویرگی مشاهده شد. میزان تراکولاهای شکل گرفته در ناحیه کال در اندام تجربی بیشتر از گروه کنترل بود. بیست روز بعد از پیوند در اندام تجربی، تراکولاهای استخوانی جدید در محل نقص به وسیله بافت همبند فیبروزه احاطه شده و در اطراف تراکولاهای بافت همبند متراکم نیز مشاهده شد. در اندام کنترل میزان تراکولاهای استخوانی در محل نقص کمتر بوده و میزان استخوان متراکم، تعداد استئوبلاست‌ها و شبکه مویرگی وسعت کمتری داشتند. پس از ۴۰ روز در اطراف کال، جهت گیری تراکولاهای به صورت موازی در آمده و بافت آن ناحیه به استخوان کورتیکال تغییر شکل داده است (۲۲).

تحقیق ما نشان داد که تعداد استئوسیت‌ها در تراکولای استخوان در گروه‌های پیوند سلول به طور برجسته افزایش یافته در حالی که در گروه شاهد تعداد استئوسیت‌ها به میزان کمتری دیده می‌شد. همچنین در گروه سلول- غشا کاهش تعداد استئوسیت‌ها نسبت به گروه‌های سلول و غشا مشاهده شد. نتایج همچنین نشان داد که در گروه‌های پیوند سلول و پیوند غشا، تراکولاهای استخوانی متراکم بوده و به وسیله بافت همبند فیبروزه احاطه شده اند. علت این امر می‌تواند وجود فاکتورهای دیگری که در تمایز سلول‌های استرومایی مغز استخوان به سلول‌های استئوبلاست و استئوسیت نقش داشته و به عنوان پروتئین‌های موجود در مسیر سیگنال دهی Wnt است، باشد. پروتئین ROR2 یک گیرنده (Reseptor) تیروزین کینازی Orphan است که به عنوان رسپتور همراه (Co-receptor) عمل می‌کند و در هر دو مسیر سیگنال دهی اصلی و فرعی وجود دارد و بیان آن در سلول‌های MSC در حال تمایز، افزایش و در سلول‌های تمایز یافته به استئوسیت کاهش می‌یابد. ROR2 در تمایز سلول‌های MSC به استئوبلاست‌ها و در طول روند استئوژنز دخالت می‌کند (۲۳). علاوه بر آن Liu و همکاران (۲۴) نیز نشان دادند که ROR2 دودمان استئوبلاستیک را از سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسان (human Mesenchymal Stem Cell) (hMSC) به راه می‌اندازد. در همین راستا، در تحقیق دیگری که توسط Nather و همکاران (۲۵) او صورت گرفت از پیوند اتولوگ سلول‌های بنیادی مزانشیمی برای ترمیم آلوگرافت نقص استخوان ران در خرگوش استفاده شد و نتایج آن بهبود وضعیت ترمیم استخوان و افزایش سلول‌های استخوانی در ناحیه دیافیز ران متعاقب پیوند آلوگرافت بوده است. که نتایج این محققین در راستای یافته‌های تحقیق ما می‌باشد.

در بررسی نتایج ما، میانگین درصد وسعت تیغه‌های استخوانی شکل گرفته در محل نقص استخوانی در گروه‌های سلول و غشا، دارای افزایش معنی‌داری نسبت به گروه شاهد بوده است. در تحقیق Cao (۲۱)، بررسی هیستولوژی و مورفومتری حاصل از پیوند سلول اتولوگ در ناحیه آسیب استخوانی در بز ۱۶ هفته بعد از پیوند، نشان داد که نسبت حجم استخوان تراکولای موجود در محل آسیب به حجم کل بافت استخوان در گروه پیوند سلول نسبت به گروه‌های داربست و شاهد افزایش معنی‌داری پیدا کرده بود. بررسی هیستولوژی آنان هم نشان داد که در گروه سلول بازسازی به خوبی صورت گرفته اما در گروه شاهد ترمیم نقص استخوان با کندی انجام شده و ناحیه ترمیم از بافت فیبروزه پر شده بود و در گروه داربست در مرکز نقص استخوان بافت فیبروزی به همراه مقداری استخوان پراکنده مشاهده شد که نشان دهنده تشکیل استخوان به میزان حداقل بود. همچنین مطالعه هیستومورفومتری این گروه نشان داد که میانگین درصد تیغه‌های استخوانی، ضخامت تیغه‌ها و نیز تعداد تراکولاهای ناحیه آسیب استخوان نسبت به گروه کنترل، افزایش معنی‌داری داشته است و لذا نتایج تحقیقات Cao همسو با نتایج تحقیقات ما می‌باشد. اگرچه در تحقیقات ما نتیجه عملکرد داربست در بازسازی استخوان، مغایر با نتیجه گزارش شده از سوی ایشان می‌باشد.

یافته‌های هیستولوژیک تحقیق ما نشان داد که در گروه‌های سلول و غشا به دلیل افزایش میزان وسعت تراکولاهای استخوانی و کاهش مساحت بافت همبندی عروقی، بافت ترمیمی محل آسیب تقریباً با بافت اطراف که آسیب ندیده بودند یکنواخت و یک‌پارچه شده و فضای خالی چندانی بین آن‌ها نبود که حاکی از روند استئوژنز سریعتر و افزایش روند بازسازی (Remodeling) استخوان در محل ترمیم می‌باشد چنین تصور می‌شود که تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سلول‌های استئوبلاست به وسیله یک سری فرآیندهای سیگنال دهی مانند اینتگرین و پروتئین‌های شکل دهنده استخوان (BMP) در یک واکنش متقابل انجام می‌شود. بعضی مطالعات نشان می‌دهند که سلول‌های BMSC می‌توانند طیف وسیعی از سیتوکین‌ها را ترشح کنند (۱۱). فاکتورهای رونویسی Osterix, Runx-2، تمایز استئوبلاستیک و شکل‌گیری استخوان را کنترل می‌نمایند. در همین راستا و هم‌سو با نتایج تحقیقات ما، تحقیقات Niedhviadzki و همکاران (۲۲) است که مطالعات هیستولوژیک آن‌ها، ده، بیست و چهل روز بعد از پیوند غیر اتولوگ سلول‌های استرومایی به محل نقص استخوان رادبال خرگوش بود و نشان داد که ده روز بعد از پیوند سلول‌های استرومایی، استئوبلاست‌ها همراه با الیاف کلاژن افزایش یافته،

publications.1999; 5-9.

4. Ankeny D, McTigue D, Jakeman LB. Bone marrow transplants provide tissue protection and directional guidance for axons after contusive spinal cord injury in rats. *Exp Neurol*. 2004; 190(1): 17-31.

5. Nichol JW, Khademhosseini A. Modular tissue engineering: Engineering biological tissues from the bottom up. *soft matter*. 2009; 5(7): 131-29.

6. Ding D-C, Shyu W-C, Lin S-Z. Mesenchymal stem cells. *Cell Transplant*. 2011; 20(1): 5-14.

7. Elahi M, Kabirsoleimani M, Shiravi A. [Investigate the possibility of using enzymes to extract mesenchymal stem cells from human adipose tissue]. *J Med Res*. 2011; 4(35): 200-80.

8. Goldberg VM, Caplan AI. Chap1. *Marcel Dekker. Orthopedic tissue engineering*. New York: 2004; 600-602.

9. Fan J, Varshney RR, Ren L, Cai D, et al. Part B: Synovium-derived mesenchymal stem cells; A new cell source for musculoskeletal regeneration. *Tissue Eng*. 2009; 15(1): 75-86.

10. Olszta MJ, Cheng X, Jee S, Kumar R, et al. Bone structure and formation: A new perspective. *Materials Science and Engineering*. 2007; 58(3): 77-116.

11. Liu Y, Rubin B, Bodine PV, Billiard J. Wnt5a induces homodimerization and activation of ROR2 receptor tyrosinekinase. *J Cell Biochem*. 2008; 105(2): 497-502.

12. Hollister S. Porous scaffold design for tissue engineering. *Nature materials*. 2005; 4(7): 518-524.

13. Habraken WJC, Wolke JA, Jansen. Ceramic composites as matrices and scaffolds for drug delivery in tissue engineering. *Advanced drug delivery reviews*. 2007; 59(4): 234-248.

14. Yuji Yin F, Junfeng C, Fujiang Z. Preparation and characterization of macroporous chitosan-gelatin/tricalcium phosphate composite scaffolds for bone tissue engineering: Research Institute of Polymeric Materials, Tianjin University, Tianjin, People's Republic of China. 2003; 79: 46-53.

15. Caplan AI, Dennis JE. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J Cell Biochem*. 2006; 198(5): 176-184.

16. Stockmann P, Park J, Wilmowsky V, Nkenke C, et al. Guided bone regeneration in pig calvarial bone defects using autologous mesenchymal stem/progenitor cells: A comparison of different tissue sources. *Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery*. 2012; 40: 310-320.

17. Bergfeld M, Scott A, DeClerck, Yves A. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells and the tumor microenvironment. *Cancer Metastasis*. 2010; 29(2): 249-261.

18. Choi JH, Gimble JM, Lee K, Marra KG, et al. Adipose tissue engineering for soft tissue regeneration. *Tissue Eng Part B*. 2010; 16(4): 413-26.

19. Kon E, Muraglia A, Corsi A, Bianco P, et al.

در تعدادی از تحقیقات، نتایج متفاوت با یافته‌های ما نیز دیده می‌شوند. به‌طور مثال Meinel و همکاران (۲۶) بعد از پیوند سلول‌ها (۵ هفته) به‌همراه داربست شبه تراپکولایی در نقص جمجمه موش کوچک آزمایشگاهی نشان دادند که پس از پیوند سلول همراه با داربست، میزان تراپکولاهای استخوانی در این گروه در مقایسه با گروه‌های داربست و شاهد بیشتر بوده است. در مثالی دیگر، نتایج Stockman و همکاران (۱۶) را می‌توان ذکر نمود زیرا ایشان پس از پیوند اتولوگ سلول‌های استرومایی مغز استخوان همراه با داربست کلاژن در محل نقص استخوان جمجمه خوک، و بررسی‌های هیستولوژیک نشان دادند که میزان کال استخوانی سی روز بعد از پیوند در گروه تجربی که پیوند سلول همراه با کلاژن دریافت کرده اند در مقایسه با گروه شاهد که در آن‌ها تنها از کلاژن استفاده شده بود، افزایش معنی‌داری نداشت که این یافته‌ها تا حدی متفاوت با نتایج هیستومورفومتری ما است.

تزریق سلول‌های استرومایی به محل آسیب استخوانی، ظرفیت استئوژنیک آن‌ها را بالا می‌برد که حاصل آن افزایش سرعت تشکیل کال استخوانی می‌باشد. تصور بر آن است که پیوند سلول‌های استئوبلاست، تولید غضروف و کال استخوانی را از طریق استخوان سازی داخل غضروفی تحریک می‌کند (۲۷).

نتیجه گیری

نتایج هیستومورفومتری و ایمونوهیستوشیمی تحقیق حاضر نشان داد که روند ترمیم استخوان در محل نقص جزئی استخوان ران در موش صحرایی، با استفاده از پیوند غشا ژلاتین - کیتوسان و سلول‌های بنیادی مغز استخوان سبب افزایش سرعت ترمیم و بازسازی استخوان ران می‌شود.

تشکر و قدردانی

این مطالعه با پشتیبانی مرکز تحقیقات ترومای دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله (عج) انجام شد، که بدین وسیله تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

1. Rojhan MS. [Basic histology]. Tehran University of Medical Sciences: Chehrpublications. 2003; 119-129.
2. Kvyvra J. Translated by Montazeri M. Basic histology. Tehran University of Medical Sciences: Arjomand publications. 2008; 175-180.
3. Shirzadi M. [Orthopedics and related fractures]. Tehran University of Medical Sciences: Aseman

- Autologous bone marrow stromal cells loaded onto porous hydroxyapatite ceramic accelerate bone repair in critical-size defects of sheep long bones. *J Biomed Mater Res.* 2000; 49(3): 328–337.
20. Arthur A, Zannettino A, Gronthos S. The therapeutic applications of multipotential mesenchymalStromal stem cells in skeletal tissue repair. *J. Cell. Physiol.* 2009; 218(2): 237–245.
21. Cao L, Liu G, Gan Y, Zhang X, et al. The use of autologous enriched bone marrow MSCs to enhance osteoporoticbone defect repair in long-term estrogen deficient goats. *Biomaterials.* 2012; 33(20): 60-68.
22. Niedhviędzki T, Dabrowski Z, Miszta H, Pawlikowski M. Bone healing after bone marrow stromal cell transplantation to the bone defect. *Biomaterials.* 1993; 51(14): 115-121.
23. Schofer M, Veltum A, Theisen Ch, Chen F, et al. Autologous mesenchymal stem cells loaded in Gelfoam for structural bone allograft healing in rabbits. *J Biomed Mater.* 2011; 62: 24-34.
24. Liu G, Zhao L, Zhang W. Cui L, et al. Repair of goat tibial defects with bone marrow stromal cells and beta-tricalcium phosphate. *J Mater Sci Mater Med.* 2008; 24(19): 2367–2376.
25. Nather A, David V, Teng JW, Lee CW, et al. Effect of autologous mesenchymal stem cells on biological healing of allografts in critical-sized tibial defects simulated in adult rabbits. *Ann Acad Med Singapore.* 2010; 39(8): 599-606.
26. Meinel L, Fajardod R, Hofmanna S, Langerc R. et al. Silk implants for the healing of critical size bone defects *Bone.* 2005; 37(5): 688–698.
27. Young RG, Butler DL, Weber W. Use of mesenchymal stem cells in a collagen matrix for Achilles tendon repair. *J Orthop Res.* 1998; 16(4): 406–413.

Study of the Repair of Bone Defect using Chitosan - Gelatin Membrane and Bone Marrow Stromal Cells in Male Albino Wistar Adult Rat (A Histomorphometric and Immunohistochemical Evaluation)

Ajoudani A, MSc¹, Sadoughi M, Ph.D², Sadraie SH, Ph.D^{3*}, Kaka Gh, Ph.D⁴

1. Student of Department of Biology, Student of Biological Sciences, Azad University, Tehran, Iran.
2. Department of Biology, Azad University, Tehran, Iran.
3. Neurosciences Research center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
4. Department of Anatomy, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

* Email corresponding author: h_sadraie@yahoo.com

Received: 4 May. 2015

Accepted: 15 Aug. 2015

Abstract

Aim: This study aimed to evaluate the histomorphometric and immunohistochemical parameters of the repair of femoral bone defect using bone marrow stromal cells on gelatin – chitosan membrane in adult Albino Wistar rats.

Materials and Methods: In this experimental study, sixty male Albino wistar adult rats were equally divided into five groups as follows: Control group that received no treatment after bone defect. Sham group that after bone defect, the culture medium was injected locally at the site of defect. Gelatin-chitosan group that membrane was used into bone defect. Cell group that nonautolog BMSCs were injected locally into defect. Cell-GC group that cell transplantation with chitosan - gelatin membrane were used into the bone defect.

Results: The mean area of trabeculae in groups of membranes and cells significantly increased when compared to the control group. The mean number of osteocytes and cells in the bone defect in cell group significantly increased when compared to the control group. No significant difference were found in chitosan - gelatin and sham groups compared to control group but the mean number of osteocytes significantly decreased in BMSCs with gelatin-chitosan scaffold group compared to control group ($P < 0.001$)

Conclusion: BMSC transplantation and gelatin-chitosan scaffold are effective in repair of bone defect. However, the use of BMSCs with gelatin-chitosan scaffold is not effective in repair of femoral bone defect.

Key words: BMSCs, Cell transplantation, Gelatin-Chitosan scaffold, Bone Repair, Rat