

## مطالعه فراساختمان سلولهای استئوبلاست در موش آزمایشگاهی کوچک با بیماری استئوپتروزیس

علیقلی سبحانی Ph.D.✱، احمد حسینی Ph.D.✱، مجتبی رضازاده Ph.D.✱، ایرج راگردی کاشانی M.Sc.✱

✱ دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریح

✱ دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریح

✱ دانشگاه تربیت مدرس، گروه علوم تشریح

✱ آدرس مکاتبه: تهران، صندوق پستی ۷۳۱۳-۱۴۱۵۵، دانشگاه علوم پزشکی تهران، گروه علوم تشریح

### چکیده

✱ **هدف:** بررسی فراساختمان (Ultrastructure) سلولهای استئوبلاست در بیماری استئوپتروزیس (Osteopetrosis) موش آزمایشگاهی

✱ **مواد و روشها:** در این مطالعه پنج سر موش Op/Op ارزیابی شد. حیوانات با دوز بالای کلروفوم کشته و استخوان ران آنها کلسیم برداری شد. نمونه‌ها پس از تثبیت اولیه و ثانویه در داخل Epon قالب‌گیری شده و با تیغ الماسی برش خیلی ظریف (Ultrathin Section) زده شدند. برشها بعد از رنگ آمیزی با لیدسیرات و اورانیل استات با میکروسکوپ الکترونی انتقالی (TEM: Transmission Electron Microscope) عکسبرداری شدند.

✱ **یافته‌ها:** در بررسی فرا ساختمانی، سیتوپلاسم سلولها استئوبلاست در گروه آزمایشی نسبت به گروه شاهد (Cont) کاهش میتوکندری و شبکه اندوپلاسمیک رتیкулوم نشان می‌داد، در حالی که میزان واکوئل‌های سیتوپلاسمی و ریبوزومهای آزاد افزایش یافته بود. غشای هسته در گروه آزمایشی بی‌نظم شده و دانسیته کروماتین در هسته افزایش یافته و ضخامت استنوئید در گروه آزمایشی نسبت به گروه شاهد بالا بود.

✱ **نتیجه‌گیری:** با توجه به نتایج بالا به نظر می‌رسد که فعالیت سلولهای استئوبلاست در اثر فیدبک منفی حیاتی (Negative biofeed-back) ناشی از کم کاری سلولهای استئوکلاست محدود شده و سلولها کارکرد طبیعی ندارند که این حالت از کمبود (Macrophage-Colony Stimulating Factor) M-CSF ناشی می‌شود. از آنجایی که این بیماری اثرهای مخربی بر استخوانها، کم خونی، عفونتهای مزمن عمومی و غیره در انسان از خود نشان می‌دهد؛ بنابراین مطالعات عمیق‌تر در این مورد ضروری به نظر می‌رسد.

**کل واژگان:** استئوبلاست، استئوپتروزیس، فراساختمان، موش Op/Op

درجه حرارت معتدل (حدود ۲۲ سانتی گراد) و رطوبت مناسب (۵۰ درصد) کنترل شده توسط سیستم تهویه مطبوع نگهداری شدند.

### \* روش کار TEM

ابتدا حیواناتی ۴۰ روزه با دوز بالای کلروفورم کشته و استخوانهای ران آنها بیرون آورده شد.

### \* تثبیت اولیه<sup>۲</sup>

نمونه‌های زیر (به ابعاد تقریبی نیم میلی‌متر) کلسیم‌برداری، در داخل ویالهای ۴ میلی‌لیتری حاوی گلوتارالدهید با غلظت ۲/۵ درصد به مدت ۴ ساعت در ۴ سانتی‌گراد قرار داده شدند. بعد آنها را بیرون آورده و در فسفات بافر ۰/۱ مولار با pH=۷/۴ در ۴ نوبت نیم ساعته در ۴ سانتی‌گراد شستشو داده شدند (۲۱).

### \* کلسیم‌برداری

برای کلسیم‌برداری از محلول نیم مولار EDTA<sup>۱</sup> استفاده شد. نمونه‌های به دست آمده (استخوان ران) از حیواناتی گروه آزمایشی (Op/Op) و شاهد در داخل EDTA قرار داده شد و به وسیله Magent نمونه‌ها چرخانده شدند (حدود یک هفته).

### \* تثبیت ثانویه<sup>۳</sup>

یک آمپول حاوی اسیموم تتراکسید در داخل ۲۵ میلی‌لیتر آب مقطر ریخته و به مدت سه روز در داخل یخچال (در فضای تاریک) نگهداری شد. برای تثبیت ثانویه، اسیموم تتراکسید ۱۰ برابر رقیق شده و ۴ میلی‌لیتر از آن به بطری حاوی نمونه، اضافه شده و روی دستگاه چرخاننده قرار گرفت. در طول مدت تثبیت ثانویه (یک ساعت) درجه حرارت حدود ۴ سانتی‌گراد بود تا نمونه‌ها رنگ قهوه‌ای به خود گرفتند. نمونه‌ها با فسفات بافر (pH=۷/۴) شستشو و آبگیری شد (از الکل ۲۵ تا ۱۰۰ درصد).

برای نفوذ کامل Epon در نمونه‌ها مراحل زیر صورت گرفت:

- ۱- استفاده از Buthyl glycidyl ether (Qy-1) به نسبت ۱ به ۲ به مدت ۱۰ دقیقه، دوبار تعویض
- ۲- استفاده از Epon و (Qy-1) به نسبت ۱ به ۱ به مدت ۱۰ دقیقه
- ۳- استفاده از Epon و (Qy-1) به نسبت ۱ به ۲ به مدت ۱۰ دقیقه

### \* قالب‌گیری<sup>۴</sup>

با استفاده Epon عمل قالب‌گیری را انجام و نمونه‌ها به مدت ۳ شبانه روز در ۴۰ سانتی‌گراد انکوبه شد تا کاملاً خشک شود. بلوکهای تهیه شده ابتدا پردازش<sup>۵</sup> و سپس با استفاده از تیغه شیشه‌ای برشهای نیمه

## مقدمه

استئوپتروزیس یک بیماری متابولیک ارثی استخوانی است که برای اولین بار در سال ۱۹۰۴ توسط Albers-Schonberg شناسایی شد. این بیماری هم در انسان (۱، ۲، ۳) و هم در حیوان (۴، ۵) دیده شده است. اغلب مطالعات آناتومیک در این بیماری به ارزیابی تغییرات اسکلتی (۶، ۷، ۸) بافت‌شناسی (۹) و بررسی فراساختمان سلولهای استئوکلاست پرداخته است (۹).

Felix معتقد است که بیماری ناشی از عملکرد ضعیف سلولهای استئوکلاست است (۱۰). Seifert ادعا دارد که عدم کارایی سلولهای استئوکلاست موجب نقص در دیگر سلولهای استخوانی از جمله استئوبلاستها می‌شود (۱۱). Fredric مشخص‌ترین اختلال فراساختمانی این بیماری را مشاهده نشدن حاشیه چین‌دار (Ruffled border) در استئوکلاستها می‌داند. ایشان معتقد است که غشای سلولهای استئوکلاست در این بیماری صاف بوده و هیچ‌گونه فعالیتی را نشان نمی‌دهد. اما تعداد هسته، موقعیت استقرار هسته و نمود آن طبیعی به نظر می‌رسد (۳).

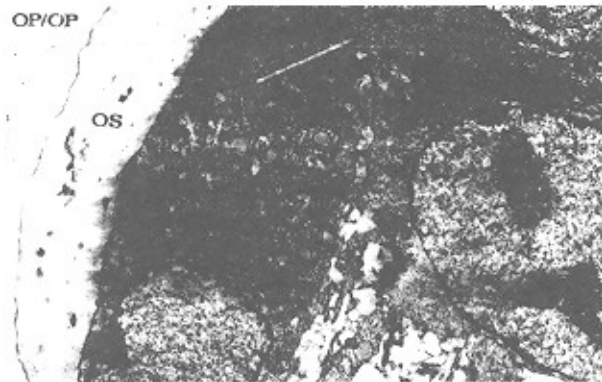
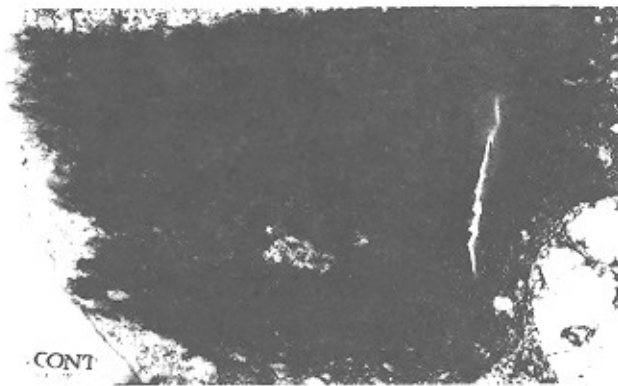
بعضی از محققین نیز معتقدند که این بیماری ناشی از کاهش تعداد کل استئوکلاستها است و دلیل آن را نیز نقص در سلولهای ریشه‌ای خون<sup>۱</sup> ذکر کرده‌اند که در چنین حالتی پیوند مغز استخوان<sup>۲</sup> می‌تواند شتاببخش باشد (۱۲). اما چه ارتباطی بین ضعف عملکرد یا کاهش تعداد استئوکلاستها و M-CSF می‌تواند وجود داشته باشد، دقیقاً معلوم نیست. Marks در یک مطالعه فراساختمانی روی سلولهای استئوبلاست خرگوش بیان داشت که تعداد سلولهای استئوبلاست در زمان تولد هم از نظر تعداد و هم از نظر عملکرد طبیعی به نظر می‌رسد؛ اما بعد از دو هفته تعداد استئوبلاستها کاهش یافته و فراساختمان آن دچار تغییرات استحالهای می‌شود و تولید ماتریکس استخوانی نیز دچار نقصان می‌شود (۱۳). مطالعات Marks در این رابطه نشان می‌دهد که میزان استئوکالین، استئوپونین و فعالیت آلکالین فسفاتازی در استخوانهای رت با بیماری Op/Op از ۱۰ تا ۱۰۰ برابر افزایش می‌یابد (۱۴). گزارشهای دیگری نیز نشان دهنده کاهش عملکرد و آسیب در فراساختمان استئوبلاستها است (۱۵، ۱۶). به هر حال به نظر می‌رسد که کاهش تعداد استئوبلاستها (۱۱) یا پایین آمدن ظرفیت عملکردی آنها (۱۷) ممکن است ناشی از کاهش جذب استخوان توسط استئوکلاستها باشد (فرآیند فیدبک منفی).

این بررسی با توجه به محدود بودن مطالعات روی سلولهای استئوبلاست در این بیماری و در ادامه مطالعات Gross Anatomy، میکروسکوپ الکترونی اسکن، بافت‌شناسی و نحوه جوانه زدن دندانها (۱۸، ۱۹، ۲۰) به ارزیابی فراساختمان سلولهای استئوبلاست در موش کوچک آزمایشگاهی با استفاده از TEM پرداخته است. همچنین انباشته شدن ماتریکس استخوانی نیز یکی از عوارض ناشناخته بیماری است که در این مطالعه مورد توجه قرار گرفته است.

## مواد و روشها

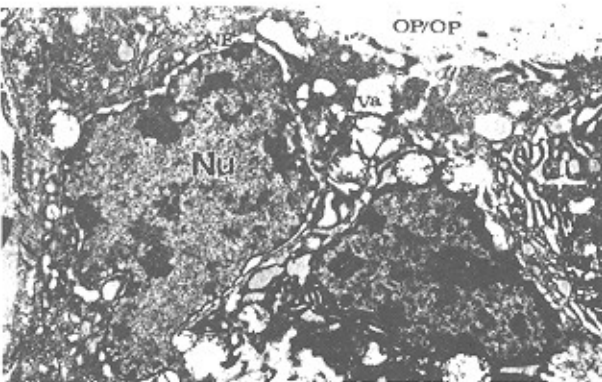
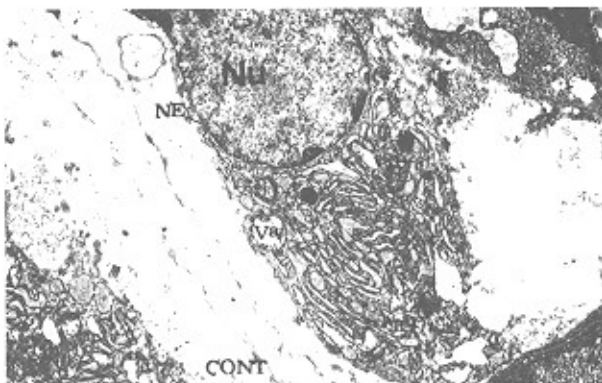
پنج سر موش Op/Op و پنج سر موش شاهد در این مطالعه بررسی شدند. موشها در دسته‌های جداگانه و در شرایط فیزیکی استاندارد با

1. Hamatopitic stem cells
2. Bone marrow transplantation
3. Prefixation
4. Ethylen Diamin Tetra Acetic Acid
5. Postfixation
6. Embedding
7. Trimming



شکل ۱: میکروگراف TEM سلولهای استنوبلاست و ماتریکس استخوانی گروه شاهد و Op/Op NU هسته سلول، MT میتوکندری، ER اندوپلاسمیک رتیкулوم، OS استخوان، بزرگنمایی ۳۰۰۰x

۱۹۹



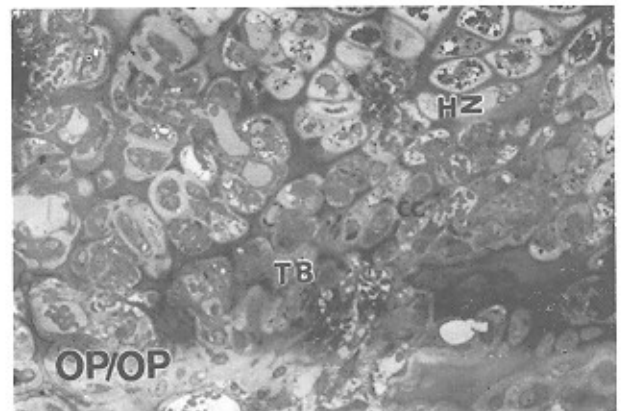
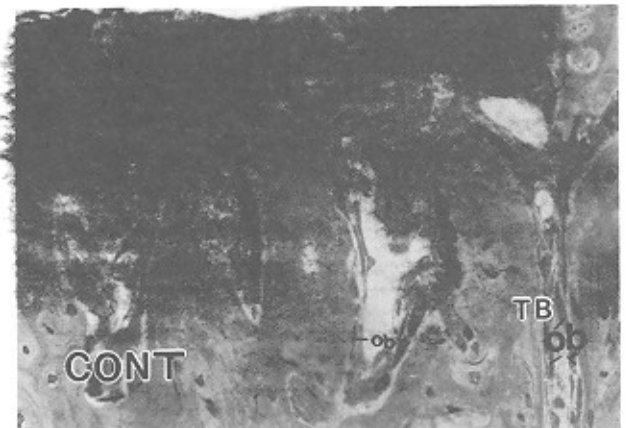
شکل ۳: میکروگراف TEM از سلولهای استنوبلاست در گروه شاهد و Op/Op NU هسته سلول، NE غشای هسته، Va واکوئل، بزرگنمایی ۳۰۰۰x

طرف یک میکرونی زده شد. برشها ابتدا با تولوئیدن بلو رنگ آمیزی و زیر میکروسکوپ نوری مطالعه شدند. بعد از مشخص شدن محل دقیق ارزیابی بلوکها با استفاده از تیغه الماسی برشهای خیلی ظریف (۷۰-۴۰ نانومتر) زده شدند. نمونه‌های رنگ آمیزی شده با استفاده از دستگاه TEM عکسبرداری (Hitachi, 800 Japan) و مطالعه شد.

### یافته‌ها

#### \* بررسی میکروسکوپ نوری

در رنگ آمیزی تولوئیدین بلو که با برش نیمه نازک از گروه آزمایشی و شاهد (Cont: Control) تهیه شد، غضروف کلسیفه شده (CC: Calcified Cartilage) در گروه Op/Op در مقایسه با گروه شاهد ضخامت بیشتری داشت. رشد استخوان در گروه Op/Op و نظم و شکل سلولهای استنوبلاست طبیعی نبود (شکل ۱).



شکل ۱: میکروگراف نوری از برش طولی ابرفین فوقانی ران در گروه شاهد و Op/Op TB تریبهای استخوان، ob استنوبلاست، HZ ناحیه غضروفی هیپوستوفی شده، بزرگنمایی ۳۵۰x

#### \* بررسی TEM

میتوپلاسم سلولهای استنوبلاست در گروه آزمایشی (Op/Op) نسبت به گروه شاهد کاهش میتوکندری (MT: Mitochondria) و اندوپلاسمیک رتیкулوم (ER: Endoplasmic Reticulum) را نشان داد (شکل ۲). غشای سلولهای استنوبلاست در گروه (Op/Op) در مقایسه با گروه شاهد بی نظم شده و میزان دانسیته کروماتین در هسته سلول در نمونه‌های مورد مطالعه افزایش نشان داد (شکل ۳).

مطالعه مشاهده شد که میزان رتیکولوم اندوپلاسمیک و میتوکندری در سیتوپلاسم سلولهای استئوبلاست گروه Op/Op کاهش یافته و غشای هسته بی‌نظم گشته و دانسیته کروماتین نیز افزایش می‌یابد. همچنین حجم واکوئل‌های سیتوپلاسم افزایش یافته و از میزان ریبوزوم آزاد کاسته می‌شود. اغلب این یافته‌ها با نظریه Marks همخوانی دارد، اما ایشان در رابطه با ریبوزومهای آزاد گزارشی ارائه نکرده است. ضخامت استئوئید در گروه Op/Op نسبت به گروه شاهد در این مطالعه بیشتر بود، با توجه به اینکه Marks و همکاران او مدعی هستند که ساخت و ساز محتویات ماتریکس استخوانی حداقل در مراحل اولیه زندگی پس از تولد بالا می‌رود (۱۴) و از طرف دیگر Reitter مدعی است که جذب استخوان در گونه‌های متفاوت حیوانهای جهش یافته کاهش می‌یابد (۲۸) یا حتی در مواردی به صفر می‌رسد (۲۹). به نظر می‌رسد علت اصلی افزایش ضخامت استئوئید یا به دلیل کاهش فعالیت استئوکلاست‌ها یا افزایش فعالیت استئوبلاست‌ها است که این مسئله به طور دقیق معلوم نیست. در این رابطه Niida و همکارانش اخیراً فعالیت جذب استخوانی توسط استئوکلاست‌ها را با تجویز Tartrate-resistant acid phosphatase گزارش نموده‌اند (۳۰). در هر حال مطالعات محققین و نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که شکل‌گیری این ناهنجاری استخوانی در بیماران استئوپتروزیس می‌تواند در اثر تجمع مادهٔ خارج سلولی باشد که توسط استئوکلاست‌ها برداشته نمی‌شود.

حال با توجه به اینکه مبتلایان به بیماری استئوپتروزیس دچار ناهنجاریهای متعددی نظیر شکستگی استخوانها، آنمی، عفونت‌های مزمن، کوری، کاهش شنوایی و غیره می‌شوند (۳۱، ۳۲، ۳۳)؛ پیشنهاد می‌شود برای پی بردن به علت دقیق این بیماری، مطالعات هیستوبیوشیمی و زیست مولکولی در این رابطه صورت پذیرد، زیرا با پی بردن به علت دقیق عارضه می‌توان با توجه به نیاز بیمار با پیوند مغز استخوان، تجویز M-CSF یا دیگر داروها از روند بیماری جلوگیری یا آن را درمان نمود.

حجم واکوئل‌های سیتوپلاسمی در سلولهای استئوبلاست گروه Op/Op نسبت به گروه شاهد بالاتر به نظر می‌رسد (شکل ۳). میزان ریبوزومهای آزاد در سیتوپلاسم استئوبلاست در گروه Op/Op نسبت به گروه شاهد کاهش نشان می‌داد (۲، ۳). همچنین در گروه Op/Op استئوئید (OS) نسبت به گروه شاهد از ضخامت بیشتری برخوردار بود (شکل ۲).

## بحث

تغییرات هیستولوژی و فراساختمانی سلولهای استئوکلاست در بیماری استئوپتروزیس در حیوانهای مختلف و حتی در نژادهای مختلف یک گونه از دامنهٔ وسیعی برخوردار بوده است (۵، ۲۲، ۲۳). چراکه اعتقاد بر این است که در بیماری استئوپتروزیس، M-CSF دچار نقصان شده (۲۴) و این امر سبب فقدان (۲۵) یا تضعیف عملکرد سلولهای استئوکلاست می‌شود (۲۶). با توجه به اینکه این بیماری منجر به افزایش دانسیته استخوانی می‌شود (۱)، در این مطالعه فراساختمان سلولهای استئوبلاست با استفاده از TEM ارزیابی شد. برای تعیین محل دقیق سلولهای مورد مطالعه از نمونه‌های میکروسکوپ نوری استفاده شد. مطالعه لامهای بافت شناسی نشان داد که غضروف کلسیفیه شده در صفحه رشد استخوانهای بلند (محل جابگزین شدن سلولهای کندروسیت با استئوبلاست‌ها) از ضخامت بالایی برخوردار است. این عارضه با نمونه‌های حاصل از بیماری آکندروپلازی مقایسه شد که در آنها نیز کوتاهی قد به دلیل عدم رشد طبیعی صفحهٔ رشد در استخوانهای بلند است (۸). اما در بیماری آکندروپلازی آکاهش استئوکلاست یا ضعف عملکرد سلولهای استئوبلاست گزارش نشده است.

Seirfert معتقد است که در بیماری استئوپتروزیس، سلولهای استئوبلاست در واحد سطح کاهش می‌یابد (۱۱). Marks به کاهش فعالیت سلولهای استئوبلاست در این بیماری تأکید دارد (۲۷). در این

## References

1. Albers Schonberg H: Roentgenbilder enter seltenen knochener- Krunkung. Munchen Med Wochensher. 1904; 51: 365-370
2. Cielisk MJ, Marks SC Jr: Bone metabolism in the osteopetrotic rat mutation microphthalmic blan. Bone 1995; 16(5): 567-574
3. Fredric S, Melvin JG, Marijke EH, Armen H, Tashjian Jr, Dian BP, John EK: Human Osteopetrosis. J Bone Join Surg 1980; 348-399
4. Akira Yamasaki HK, Nose M, Niida Sh, Ohgame Y, Abe M, Kumegawa M, Suda T: Congenital osteoclast deficiency in osteopetrotic (Op/Op) Mice is cured by injection of macrophage Colony-Stimulation Factor. J Exp Med 1991; 173: 269-272
5. Marks FS, Marks SC Jr: Morphological evidence of  
1. Osteoid  
2. Achondroplasia dwarfism  
reduced bone resorption in the osteosclerotic (oc) mouse. Am J Anat 1985; 174: 41-47
6. Mintz SM, Martone CH, Anavi Y: Avoiding problems in patients with craniotubular bone disorders. J Am Dent Assoc 1993; 124: 116-118
7. Loutit SF, Nisbet NW: Resorption of bone. Lancer 1997; 2: 26-28
8. Johnson DR, Higgins PO, Macdrew TJ: The effect of disorders of cartilage formation and bone resorption on bone shape: A study with chondrodystrophic and osteopetrotic mouse mutants. J Anat 1991; 176: 81-88
9. Don W, Faw Ceet: A textbook of Histology. By chapman and hall, 12th ed, 1993, pp 182-184
10. Felix R, Ceccini MG, Fleisch H: Macrophage Colony Stimulating Factor restores in vivo bone resorption in the Op/Op osteopetrotic mouse.

Embryology 1990; 127: 2592-2594

11. Seifert MF, Propff SN, Marks SC Jr: Skeletal biology in the toothless (osteopetrotic) rat. *Am J Anat* 1988; 183: 158-165
12. Marks SC Jr: Congenital osteopetrotic mutations as probes of the origin, structure and mutation of osteoclasts. *Clin Orthop* 1984; 189: 239-263
13. Marks SC Jr, Seifert MF, Fox RR: The osteopetrotic rabbit-general and skeletal features of a new outbred stock. *Bone* 1986; 7: 300-307
14. Marks SC Jr, Mackowiak S, Sholoub V, Lian JB, Stein GS: Proliferation and differentiation of osteoblast in osteopetrotic rats: Modification in expression of genes encoding cell growth and extracellular matrix protein. *Connect Tissue Res* 1989; 21: 107-116
15. Propff SN, Marks SC Jr: The relationship of abnormalities in dental and skeletal development in the osteopetrotic. *J Oral Patol Med* 1990; 19: 5-11
16. Marks SC, Mackay CA, Seifert MF: The osteopetrotic rabbit skeletal cutology and ultrastructure. *Am J Anat* 1987; 178: 300-307
17. Rodan GA, Martin TJ: Role of osteoblasts in hormonal control of bone resorption-A hypothesis. *Calcif. Tissue Int* 1981; 33: 349-354

۱۸. سبحانی علیقلی، حسینی احمد، افشار حسین، یاماشیتا کیکوجی: تغییرات مورفولوژیک جمجمه و نحوه رویش دندان در osteopetrotic Op/Op mouse. مجله دندانپزشکی ۱۳۷۵، شماره ۲۵، صفحه ۳۷-۲۵

۱۹. سبحانی علیقلی، یاماشیتا کیکوجی، رضازاده مجتبی، حسینی احمد، الطریحی تقی: تغییرات مورفولوژیک استخوانبندی موش osteopetrotic Op/Op. پژوهش در پزشکی ۱۳۷۵، شماره ۲، صفحه ۴۳-۳۱

۲۰. سبحانی علیقلی، حسینی احمد، رضازاده مجتبی: مطالعه هیستولوژیک صفحه رشد استخوانی در موش آزمایشگاهی osteopetrotic Op/Op. پژوهش در پزشکی زیر چاپ

21. Saul Wischnizer: Introduction to electron Microscopy. 1981, pp 250-255

22. Marks CR, Seifert MF, Marks SC: Osteoclast population in congenital osteopetrosis: Additional evidence of heterogeneity. *Metab Bone Dis Rel Res* 1984; 5: 259-264

23. Miller SC, Marks SC: Osteoclast kinetics in osteopetrotic (ia) rats cured by spleen cell transfers from normal littermates. *Calcif Tissue Int* 1982; 34: 422-427

24. Wiktor Jedrzejak W, Bartocci A, Ferrante AW,

Ahmad Ansari A, Sell KW, Pollard JW, Staley ER: Total macrophage-deficient osteopetrotic (Op/Op) mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 4826-4832

25. Tanaka S, Takahashi N, Udagawa N, Tamura T, Aksutas T, Stanley ER, Kurokawa T, Suda T: Macrophage colony stimulation factor is indispensable for both proliferation and differentiation of osteoclast progenitors. *J Clin Invest* 1993; 91: 257-263

26. Takahashi N, Udagawa N, Akatsu H, Tanaka H, Isogai Y, Suda T: Deficiency of osteoclasts in osteopetrotic mice is due to a defect in the local microenvironment provided by osteoblastic cells. *Endocrinology* 1991; 128(4): 1792-1796

27. Marks SC: Tooth eruption depends on bone resorption: Experimental evidence from osteopetrotic (ia) rats. *Metab Bone Dis Rel Res* 1988; 3: 107-115

28. Reitter TN, Devore-Carter D, Popoff SN, Marks SC: Bone resorption in osteopetrotic mice is reduced in vitro. *Life Sci* 1989; 45: 263-269

29. Raisz LG, Simmons HA, Hansen CT: Studies on congenital osteopetrosis in *tl* and *ia* rats using culture. *Metab. Bone Dis Rel Res* 1981; 3: 117-121

30. Niida S, Kaku M, Amano H, Yoshida H, Kataoka H, Nishikawa S, Tanne K, Maeda N, Kodama N: Vascular endothelial growth factor can substitute for macrophage colony-stimulating factor in the support of osteoclastic bone resorption. *J Exp Med* 1999; 190(2): 293-298

31. Nishioji K, Okanaoue T, Mori T, Sakamoto S, Itoh Y: Experimental liver injury induced by propionibacterium acnes and lipopolysaccharide in macrophage colony stimulating factor deficient osteopetrotic (Op/Op) mice. *Dig Dis Sci* 1999 oct; 44(10): 1975-1984

32. Shimada-Hiratsuka M, Naito M, Kaizu C, Shuying J, Hasegawa G, Shultz LD: Defective macrophage recruitment and clearance of apoptotic cells in the uterus of osteopetrotic mutant mice lacking macrophage colony-stimulating factor (M-CSF). *J submicrosc Cytol Pathol* 2000; 32(2): 297-307

33. Aharinejad S, Grosschmidt K, Franz P, Streicher J, Nourani F, Mackay CA, Firbas W, Plenk H, Mark SC: Auditory ossicle abnormalities and hearing loss in the toothless (osteopetrotic) mutation in the rat and their improvement after treatment with colony-stimulating factor-1. *J Bone Miner Res* 1999; 14(3): 415-423

