بررسی ترمیم نقص جزیی استخوان ران توسط سلول‌های استرومایی مغز استخوان و غشای ژلاتین– کیتوسان در موش صحرایی

آسا اجودانی(MSc) [1]- دکتر مهرانگیز صدوقی(PhD) [1] *دکتر سید همایون صدرایی(PhD) [2] دکتر غلامرضا کاکا (PhD) [2]

*نویسنده مسئول: مرکز تحقیقات علوم اعصاب و گروه علوم تشریح، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله (عج)، تهران، ایران

پست الکترونیک: h_sadraie@yahoo.com

تاریخ دریافت مقاله:۹۳/۱۱/۰۷ تاریخ ارسال۹۴/۰۲/۲۲ تاریخ پذیرش: ۹۴/۰۴/۰۷

چکیده

مقدمه: سلول‌های استرومایی مغز استخوان (BMSCs) سلول‌های بنیادی چندتوانی هستند که توان تمایز به سلول‌های اوستئوژنی را دارند. امروزه از داربست‌های زیست تخریب‌پذیر به عنوان روش درمانی جدید برای جایگزینی و بستر بافت از دست رفته استفاده می‌شود.

هدف: بررسی ترمیم نقص جزیی استخوان ران توسط سلول‌های استرومایی مغز استخوان همراه با شفاء ژلاتین- کیتوسان در موش صحرایی.

مواد و روش‌ها: در این بررسی تجربی ۶۰ سر موش صحرایی نر بالغ نژاد آلبینو ویستار در پنج گروه مساوی به طور تصادفی قرار داشتند: ۱- گروه شاهد که بعد از ایجاد نقص استخوانی هیچگونه درمانی دریافت نکردند. ۲- گروه شم (Sham) که در آنها پس از ایجاد نقص، محیط کشت در محل آسیب تزریق شد. ۳- گروه شفاء که در آنها از ترکیب ژلاتین – کیتوسان در محل آسیب استخوانی استفاده شد. ٤- گروه سلول که پیوند سلول های BMSC در محل آسیب شدند. ٥- گروه سلول- شفاء که در آنها پیوند سلول بر شفاء ژلاتین – کیتوسان در محل نقص استخوان انجام شد. چهار هفته پس از ایجاد نقص استخوان ران موش‌ها، ارزیابی رادیولوژی و پیومکانیک بر روی آنها انجام و گروه‌های گوناگون سنجیده شد.

نتایج: ارزیابی رادیوگرافی استخوان‌های ران موش‌ها نشان داد میزان رادیو اوپاسیته در گروه شاهد نسبت به گروه شم تفاوت معنی‌داری ندارد ولی در گروه‌های سلول و شفاء نسبت به گروه شاهد افزایش غیر معنی داردداشت. از سوی دیگر، میزان رادیواوپاسیته در گروه سلول- شفاء نسبت به گروه شاهد کاهش غیرمعنی‌دار نشان داد. نتایج آزمون پیومکانیک استخوان‌ها نشان داد میانگین مقاومت استخوان در گروه سلول نسبت به گروه شاهد افزایش معنی‌دار، در گروه شفاء نسبت به شاهد افزایش غیر معنی‌دار و در گروه سلول- شفاء نسبت به گروه شاهد کاهش غیرمعنی‌دار دارد.

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد پیوند شفاء ژلاتین- کیتوسان می‌تواند مختصری به ترمیم نقص استخوانی کمک کند. گرچه بکارگیری سلول استرومایی مغز استخوان به همراه شفاء کمک چندانی به ترمیم نقص جزیی استخوان ننموده و پیوند سلول به‌تنهایی نتیجه بهتری داشته است.

کلید واژه‌ها: استخوان/ پیوند سلول/ ژلاتین/ مژانشیمی استرومایی سلول‌ها/ موش‌های صحرایی

مجله دانشگاه علوم پزشکی گیلان، دوره بیست و چهارم شماره ۹۶، صفحات: ۷۸ ۶۸

مقدمه

یکی از کاستی‌ها و دشواری‌های پیش روی علم پزشکی، ترمیم شکستگی‌های دیرجوش استخوان و جبران نقائص استخوانی است. با وجود درمان‌های مختلف مانند فیکساسیون داخلی و خارجی و پیوند بافت استخوان برای درمان شکستگی‌ها، هنوز ترمیم بافت‌های استخوانی در شکستگی‌های گسترده دشوار بوده و مدت قابل ملاحظه‌ای طول می‌کشد. از درمانی‌های ترمیم و بهبود نقص استخوانی و شکستگی‌ها بکارگیری سیمان استخوانی، پیوند سلول‌های بنیادی، استفاده از پروتئین‌های شکل دهنده استخوان و کاربرد مواد زیست تخریب‌پذیر است (٤-۱).

سلول‌های بنیادی توان تمایز به انواع دیگری از سلول‌ها و بازسازی بافت‌های را دارند (۵). از ویژگی‌های این سلول‌ها دستیابی آسان، توان تکثیر سریع در محیط کشت، قدرت زندگی طولانی و رد نشدن پیوند در میزبان است. سلول‌های استرومایی مغز استخوان (BMSCs) همه این صفت‌ها را دارند(۱و٤). امروزه یکی از راهبردهای مرسوم در مهندسی بافت، ساخت داربست‌های زیست تخریب‌پذیر به عنوان بستری برای سلول‌های بنیادی است (۷). در مهندسی بافت، داربست سلولی به عنوان ساختاری سه‌بعدی، افزایش بقای سلول و ایجاد چسبندگی مکانیکی نخستین را ایجاد و به گردهم آمدن سلولی و شکل‌گیری ساختار بافتی کمک کرده و می‌تواند بافت طبیعی و کاملی ایجاد کند (۸). این داربست‌ها

۱. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، تهران، ایران

۲. مرکز تحقیقات علوم اعصاب و گروه علوم تشریح، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران، ایران

به تشکیل استخوان و رشد سلول‌های استخوانی کمک می‌کند. این غشاءها به محلّی برای استقرار سلول‌ها تبدیل می‌شوند. در پژوهش Caplen و همکاران، پیوند MSC کشت شده بر ژل کلاژن در خرگوش‌های دچار ضایعه استخوانی و غضروفی، سبب تشکیل دوباره استخوان و غضروف در ناحیه آسیب دیده شد گرچه بافت تشکیل شده در محل از نظر ویژگی‌های مکانیکی با بافت طبیعی به‌طور چشمگیر متفاوت بود و بافت طی ٢٤ هفته از بین رفت (٩).

یوجی یین و همکاران در سال ٢٠٠٣ غشای ژلاتین- کیتوسان و بتاتری کلسیم فسفات با روش Freez – Drying تولید کرده و آثار پوستی آن را بر خرگوش بررسی کردند. ایشان نشان دادند که این غشاء می‌تواند به عنوان غشاءی مناسب در مهندسی بافت استخوانی بکار رود. (٨). Stockman و همکاران با ایجاد نقص تک‌لایه‌ای در لایه قشری جمجمه خوک، پیوند اتولوگ سلول‌های استرومایی مغز استخوان را همراه با داربست کلاژن انجام دادند. نتایج رادیوگرافی سی روز پس از پیوند، تفاوت چندانی بین گروه کنترل و گروه تجربی نشان نداد. هرچند یافته‌های ایشان نشان داد که در روزهای شصت و نود، سرعت و میزان معدنی شدن استخوان در گروه پیوند BMSCs در مقایسه با گروه کنترل به‌طور معنی‌داری افزایش یافته‌است(١٠). در مطالعه‌ی Cao و همکاران پس از پیوند سلول‌های BMSC با استفاده از داربست تری کلسیم فسفات (TCP) و به‌صورت اتولوگ در بز مدل استئوپروتیک دارای نقص استخوانی در کندیل استخوان فمور، ارزیابی رادیوگرافی پس از شانزده هفته نشان داد رادیواپاسیته(Radio opacity) در گروهی که در ناحیه نقص، هیچ پیوندی صورت نگرفته بود، به کمینه رسیده و در گروهی که پیوند داربست TCP در ناحیه آسیب انجام شده‌بود، ترمیم قابل ملاحظه‌ای در محل آسیب دیده نشد. در گروه پیوند سلول بنیادی با داربست TCP تشکیل استخوان قابل توجه بوده و درصد استخوان جدید در گروه سلول نسبت به گروه‌های دیگر افزایش چشمگیری نشان داد(١١). Niedhviedzki و همکاران نقص ١٠ میلی‌متری در شفت استخوان رادیال اندام فوقانی خرگوش ایجاد کردند و پس از بررسی استرومایی بودن سلول‌ها، پیوند سلولی را به‌صورت غیر اتولوگ انجام دادند. رادیوگرافی استخوان‌ها بیست روز پس از پیوند سلول در گروه تجربی حاکی از ایجاد کال استخوانی کم‌وبیش نیرومند بود. همچنین، در روز چهلم و در پی تشکیل کال استخوانی در محل آسیب، گروه تجربی نسبت به گروه شاهد افزایش معنی‌دار نشان داد(١٢). Meinel و همکاران با ایجاد نقص استخوانی در جمجمه موش کوچک آزمایشگاهی از داربستی استفاده کردند که شبیه ساختار ترابکولای استخوانی بود. پس از پنج هفته، آنالیز تصاویر X-ray موش‌ها سطوح بالایی از معدنی شدن در محل آسیب در گروه‌های درمانی با سلول همراه با داربست نشان داد، گرچه در گروه‌های داربست و کنترل که بر آن درمانی نشده‌بود میزان معدنی شدن استخوان‌ها نیز کمتر بود(١٣). در پژوهش دیگری توسط Shih و همکاران در سال ٢٠٠٥، پیوند اتولوگ سلول‌های استرومایی مغز استخوان بر ناحیه دیستال استخوان استئوپروتیک شده فمور سگ انجام شد. نتایج تست بیومکانیک استخوان‌های فمور، شش ماه پس از پیوند نشان داد که مقاومت استخوان در گروه پیوند اتولوگ سلول‌های استرومایی مغز استخوان مشابه گروه پیوند اتوگرافت استخوان است امّا در مقایسه با گروه‌های آلوگرافت استخوان، ماتریکس استخوانی کمی کلسیم زدایی شده Partially demineralized (bone matrix) (به اختصار PDBM) و درمان نشدن افزایش معنی‌دار داشت (١٤). یافته‌های هیستولوژی تحقیق Niedhviedzki و همکاران نشان داد که ده، بیست و چهل روز پس از پیوند سلول‌های استرومایی در اندام تجربی، استئوبلاست‌ها همراه با الیاف کلاژن افزایش یافته و ناحیه ترمیم از یک شبکه رگی غنی برخوردار شده‌است(١٢). با توجه به این که هر دو عامل سلول‌های بنیادی و داربست‌های زیست تخریب‌پذیر می‌تواند در ترمیم نقص استخوانی موثر باشند این تحقیق به بررسی ترمیم نقص جزیی استخوان ران توسط سلول‌های استرومایی مغز استخوان (BMSCs) و غشاءِ ژلاتین- کیتوسان با استفاده از روش‌های رادیولوژی و بیومکانیک در موش صحرایی بالغ پرداخته است.

مواد و روش‌ها

حیوانات

۶۰ سر موش صحرایی نر بالغ نژاد آلبینو ویستار با وزن حدود ۲۵۰-۲۰۰ گرم انتخاب شدند. خوراک دام موش‌ها به صورت حبه به همراه آب و به صورت آزاد در دسترس آنها قرار گرفت. دمای حیوانخانه در حدود ۲±۲۲ درجه سانتی‌گراد و روشنایی آن به‌طور متناوب دوره روشنایی و تاریکی ۱۲ ساعته در شرایط دلخواه و استاندارد حیوانخانه دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله(عج) تعیین شد. حیوانات به‌طور تصادفی به پنج گروه تقسیم شدند. گروه شاهد جانورانی بودند که بر روی استخوان فمور پای راستشان در ناحیه قسمت فوقانی اپی فیز دیستال سوراخی به صورت دو طرفه ایجاد شده بود و هیچ درمانی دریافت نکرده بودند. در گروه شم، ۷۲ ساعت پس از ایجاد آسیب مشابه گروه کنترل، ۵۰ میکرولیتر محیط کشت به محل نقص تزریق شد. در گروه سلول ۷۲ ساعت پس از ایجاد آسیب، یکصد وپنجاه هزار سلول BMSCs به‌صورت غیر اتولوگ در محل آسیب تزریق شد. در گروه غشاء، نقص در استخوان فمور ایجاد شد و سه روز پس از آن غشاءِ ژلاتین- کیتوسان در محل آسیب بکار رفت. در گروه آخر که گروه سلول و غشاء هستند، سه روز پس از ایجاد نقص استخوان یکصدوپنجاه هزار سلول BMSCs به‌صورت غیر اتولوگ به محل آسیب پیوند زده شد.

ایجاد نقص جزیی در استخوان ران

موش‌ها با ترکیبی از کتامین به مقدار، ۹۰ mg/Kg و زایلیزین به مقدار ۱۰ mg/Kg به‌صورت داخل صفاقی بیهوش کامل شدند، سپس، موی پای حیوان تراشیده و پوست خلفی خارجی ران، با بتادین و الکل استریل شد. پس از تراشیدن موی ناحیه میانی سطح خارجی ران با بتادین شستشو شد و با روشی کاملاً استریل برشی به طول دو سانتی‌متر در ناحیه فوق در پای راست حیوانات ایجادشد و پس از کنار زدن ماهیچه‌های سطحی و فاسیاهای عمقی، استخوان ران در معرض دید قرار گرفت. سپس، با مته‌ای به قطر ۱میلی‌متر، سوراخی به صورت دو طرفه (Transcortical) در ناحیه دیستال دیافیز استخوان فمور ایجاد شد. در پایان جراحی، عضلات با نخ بخیه جذب شدنی و پوست با نخ سیلک ٤ صفر دوخته شده و پس از جراحی نگهداری از حیوانات صورت گرفت. پس از ۷۲ ساعت، ناحیه عمل دوباره باز شد و در گروه‌های سلول درمانی، ۵۰ میکرولیتر محیط کشت حاوی صد و پنجاه هزار سلول و در گروه شم، تنها ۵۰ میکرولیتر محیط کشت تزریق شد و سپس عضلات و پوست دوخته شدند و در گروه غشاء پیوند غشاءِ ژلاتین- کیتوسان در محل آسیب انجام شد.

استخراج و کشت سلول‌های بنیادین مغز استخوان (BMSCs) چون در این تحقیق پیوند غیراتولوگ سلول‌های بنیادین مغز استخوان بکار رفت، جراحی حیوانات در سه مرحله انجام شد. در مرحله اول سلول‌های مغز استخوان بدین ترتیب آماده شدند که به صورت تصادفی تعدادی از موش‌ها با مخلوط کتامین (۵۰ mg/kg) و زایلزین (۱۰ mg/kg) بیهوش شدند. سپس، استخوان ران چپ و راست با جراحی در معرض دید قرار گرفته و با قیچی استخوان بر، استخوان را بریده سپس با سرنگ ۵ میلی‌لیتری حاوی ۱ میلی لیتر محیط Alpha-MEM و سرم جنین گاوی FBS ۱۰٪ و با یک سر سوزن ۱۸ G مغز استخوان را از هر دو انتهای پروگزیمال و دیستال استخوان آسپیره کرده و محتوای سرنگ را به درون یک فلاسک ۲۵سی‌سی تخلیه و در انکوباتور با pH=۷/۲، دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵٪ CO2 و در محیط مرطوب انکوباتور به مدت ۲٤ ساعت نگهداری کرده، سپس محیط کشت جایگزین شد. هنگام تعویض محیط، سلول‌ها با 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 ٪ کف فلاسک ادامه یافت. سلول‌ها، روزانه از نظر مورفولوژی و شرایط عمومی با میکروسکوپ inverted بررسی شدند. در مرحله دوم با جراحی بر گروه‌های کنترل، شم، سلول درمانی، غشاء درمانی و سلول- غشاء درمانی، نقص در ران پای راست حیوان با مته‌ای به قطر ۱/۵ میلی‌متر و در شرایط استریل ایجاد و سپس محل زخم بخیه زده شد. در پایان و در مرحله سوم با باز کردن مجدد محل جراحی دوم پس از هفتاد و دو ساعت در گروه‌های درمانی مختلف مداخله درمانی انجام شد.

تهیه غشاء ژلاتین- کیتوسان

برای ساختن غشاء ژلاتین- کیتوسان ابتدا کیتوسان (Ch) را با نسبت ۱٪ وزنی به آب مقطر دو بار تقطیر و با درجه حرارت ۴۰ درجه سانتی‌گراد افزوده و درحالی که با همزن با یکدیگر مخلوط می‌شدند، ۰/۵ میلی‌لیتر اسیداستیک خالص و ژلاتین به نسبت ۱٪ وزنی به آن افزوده و به دمای جوش رسانده و محلول بدست آمده در اتوکلاو استریل شد.

نمونه‌برداری استخوان‌ها

۲۸ روز پس از جراحی دوباره، موش‌ها با استفاده از دوز بالای کلروفورم کشته شده و پس از برداشتن استخوان ران موش‌ها، ارزیابی رادیولوژی و بیومکانیک بر استخوان‌ها انجام شد.

بررسی و شمارش سلول‌های زنده (Viability test) برای بررسی سلول‌های زنده حجمی مساوی از سوسپانسیون سلول‌ها و تریپان‌بلو بکار رفت. چون تریپان بلو سلول‌های مرده را به رنگ آبی در می‌آورد و سلول‌های زنده رنگ تریپان بلو را به خود نمی‌گیرند و شفافند، تعداد و درصد مرگ‌ومیر سلولی با لام نئوبار و میکروسکوپ اینورت با بزرگنمایی ۴۰۰ برابر شمارش و ثبت شد.

ایمونوسایتوشیمی سلول‌های BMSCs

نخست سلول‌های BMSCs با پارافرمالدئید ۴٪ به‌مدت ۳۰ دقیقه بر لام، ثابت و سپس شستشوی آنها با محلول PBS سه مرتبه به مدت ۵ دقیقه انجام شد. نمونه‌ها در معرض مخلوط سرم ۱۰٪ بز و Triton X-100 ۰/۳درصد به مدت یک ساعت قرار داده شدند پس از رقیق کردن (۱:۱۰۰) پادتن‌های اولیه CD44، CD45 و Fibronectin (Abcam) که هر سه از نوع موشی بودند هر کدام به‌طور مجزا بر روی سلول‌ها ریخته شد، نمونه‌ها برای پیشگیری از خشک شدن آنتی‌بادی داخل بشقاب پتری مرطوب به مدت یک شب در درجه حرارت ۴۰ درجه سانتیگراد انکوبه شدند. لام‌ها پس از شستشو با PBS، در معرض محلول تازه ۱۰٪ H2O2، به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شدند. پس از آن دوباره شستشوی لام‌ها با PBS سه مرتبه انجام شد. سپس، در دمای اتاق و در معرض آنتی‌بادی ثانویه ضد موشی (۱:۲۰۰) آویدین و بیوتین به مدت دو ساعت و پس ۱۰ از آن دقیقه در محیط تاریک تحت تاثیر محلول کروموژن (DAB و رنگ قهوه‌ای به خود می‌گیرند)، قرار داده‌شد. به دنبال آن، شستشو با PBS انجام شد و نمونه‌ها با میکروسکوپ اینورت بررسی شدند.

ارزیابی رادیوگرافی استخوان‌ها

چهار هفته پس از پیوند سلول‌ها، بررسی رادیوگرافی نمونه‌های استخوان فمور پای راست حیوانات با دستگاه Senix H.F Senographe 600T با دوز اشعه KV ۲۲ و ۹ mas در دو نمای قدامی- خلفی (AP) و طرفی (Lat) بر کلیشه‌های ماموگرافی انجام شد. هر یک از رادیوگرافی‌ها با کد نهان توسط متخصصان ارتوپدی و رادیولوژی از نظر دانسیته و کال استخوانی به روش اصلاح شده Madsen و همکاران (۱۵) ارزیابی و نمره‌دهی صفر تا پنج شد(جدول ۱).

جدول ۱. درجه بندی کال استخوانی در نمای X-Ray با استفاده از روش اصلاح شده Madsen و همکاران

درجه	میزان کال استخوانی
صفر	فاقد کال
یک	کال خیلی ضعیف
دو	کال ضعیف
سه	کال نرمال
چهار	کال خوب
پنج	کال خیلی خوب

آزمون بیومکانیک استخوان‌ها

مقاومت مکانیکی استخوان‌ها، با آزمون خمشی سه نقطه فشار (Tripoint Bending test) با دستگاه Zwick ساخت آلمان بررسی شد برای این آزمون، استخوان فمور از دو انتها بر پایه‌های نگهدارنده قرار داده شد و نیروی عمود بر محور طولی استخوان با عمل کننده سیستم و در راستای قدامی - خلفی بر وسط استخوان وارد شد. سرعت حرکت عمل کننده سیستم ۵ میلی‌متر در دقیقه بود و فشار وارده تا هنگام شکستن استخوان ادامه یافت. با ترسیم منحنی، بیشینه مقاومت مکانیکی استخوان (Fmax) بر حسب نیوتن محاسبه گردید.

تجزیه و تحلیل آماری

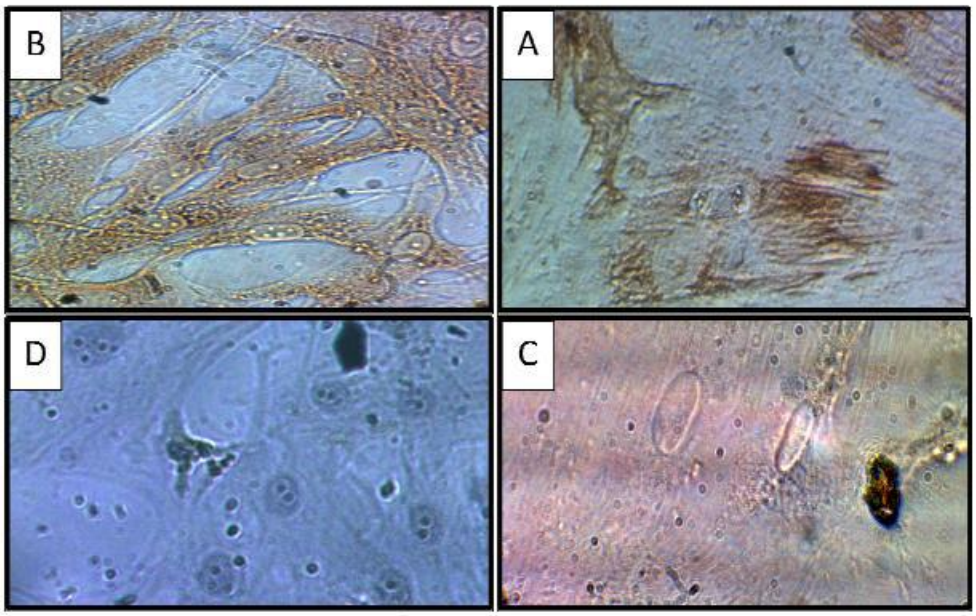
ارزیابی آماری داده‌ها با آزمون آماری ANOVA و آزمون تکمیلی Tukey Post Hock و نرم‌افزار SPSS انجام شد همه داده‌ها برحسب Mean ± SEM با میزان $P<0/05$ به‌عنوان درجه معنی‌داری در نظر گرفته شد.

نتایج

میزان زنده بودن سلول‌ها با رنگ‌آمیزی تریپان‌بلو بر viability test درصد سلول‌های BMSCs در انتهای مراحل کشت پس از پاساژ چهارم و پر شدن بیش از ۸۰ ٪ کف ظرف، این میزان به بیش از ۹۱٪ رسید.

تعیین میزان خلوص BMSCs به روش ایمونوسیتوشیمی:

۳/۰۰ ± ۹۲/۷۵ درصد سلول‌ها با آنتی‌فیبرونکتین و ٤/٦٦ ± ۹٤/۳ درصد سلول‌ها با آنتی CD44 واکنش نشان دادند. در این مرحله آنتی بادی CD45 که ویژه سلول‌های خون‌ساز است تنها در ۲/۱۸ ± ٤/٥ درصد سلول‌ها بیان شد(شکل ۱).

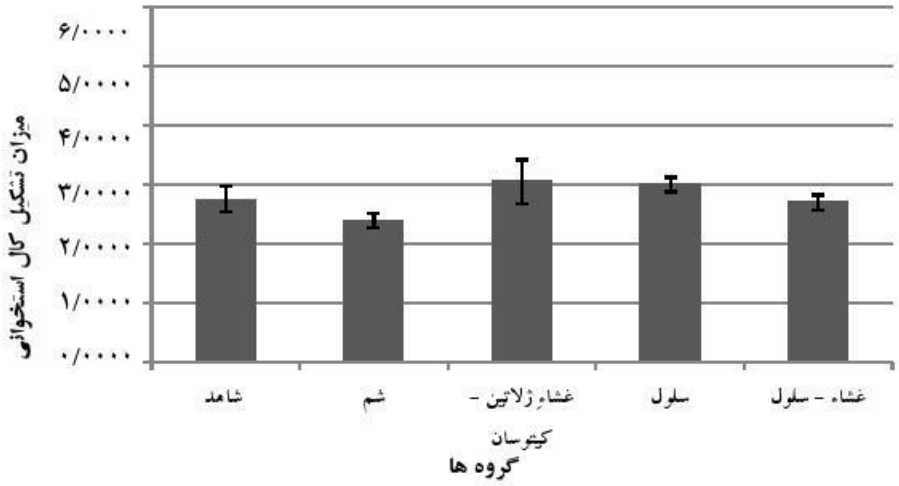


شکل۱- تصاویر میکروسکوپی سلول های استرومایی پس از انجام ایمونوسایتوشیمی با بزرگنمایی ٤۰۰ برابر .

تصاویر (A)، (B)، (C) و (D) به ترتیب مربوط به آنتی CD44، آنتی بادی فیبرونکتین، آنتی CD45 و کنترل منفی سلول های BMSC ۲٤ ساعت پس از پاساژ چهار است. A و B به دلیل دارا بودن مارکرهای CD44 و فیبرونکتین به رنگ قهوه‌ای دیده می‌شوند

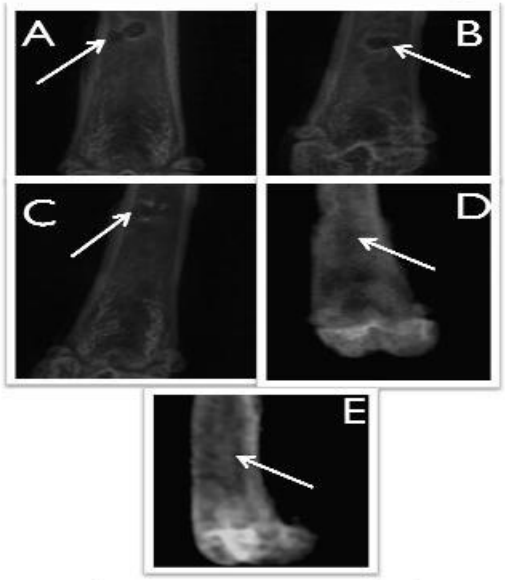
ارزیابی رادیوگراف (X-Ray):

نتایج بررسی‌های رادیوگرافی استخوان‌ها پس از چهار هفته نشان داد که دو گروه شاهد و شم از نظر میانگین کال استخوانی(میزان رادیواوپاسیتی) اختلاف معنی‌داری ندارند. اگرچه میانگین کال استخوانی در گروه سلول (۳/۰۰±۰/۱۲) و گروه غشاء (۳/۰٥±۰/۳٦) نسبت به گروه‌های شاهد(۲/۷٥±۰/۲۱٤) و شم (۲/۳۹۲±۰/۱۳۰) افزایش یافته بود ولی میانگین میزان تشکیل کال استخوانی در محل آسیب در گروه سلول و گروه غشاء و نیز گروه سلول- غشاء (۲/۷±۰/۱۲۲) نسبت به گروه‌های شاهد و شم اختلاف معنی‌داری نشان ندادند. هر چند این غیرمعنی‌داری در دو گروه سلول و غشاء نسبت به گروه شاهد افزایش غیرمعنی‌دار و در گروه سلول- غشاء نسبت به گروه شاهد کاهش غیرمعنی‌دار نشان داد. افزون بر آن اختلاف معنی‌داری در میزان رادیواوپاسیته بین سه گروه سلول، غشاء و سلول- غشاء دیده نشده گرچه این میزان در گروه غشاء نسبت به گروه سلول افزایش غیرمعنی‌دار و در گروه سلول - غشاء نسبت به گروه سلول کاهش غیرمعنی‌داری داشت. (نمودار۱، شکل۲وشکل ۳)



نمودار ۱. مقایسه میانگین میزان تشکیل کال استخوانی (رادیوایاسیتی) در گروه‌های مختلف چهار هفته پس از پیوند.

تصاویر حاصل از تشکیل کال در محل آسیب در گروه‌های شاهد، شم، سلول، غشاء و سلول غشاء نشان می‌دهد که میانگین میزان و وسعت کال استخوانی فمور مربوط به شاهد و شم در چهار هفته پس از پیوند ناچیز بوده و بسیار شبیه به هم بودند. همچنین تشکیل کال در محل آسیب مربوط به پیوند در گروه‌های سلول و غشاء نسبت به گروه شاهد بیشتر و به وضوح قابل مشاهده است.



شکل ۲. تصاویر رادیوگرافی با نمای قدامی – خلفی (Ant-Post) از محل تشکیل کال استخوانی در گروههای مختلف.

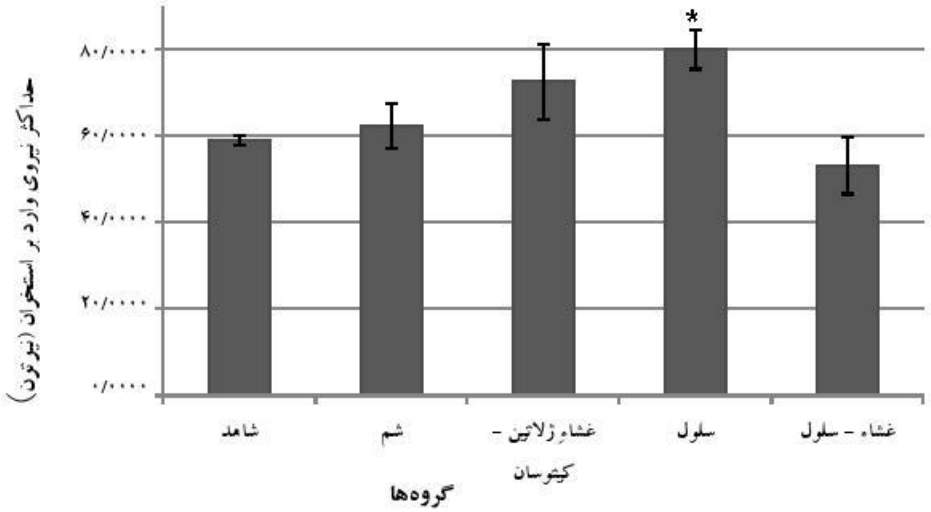
تصاویر رادیوگرافی با نمای قدامی – خلفی(Ant-Post) از محل تشکیل کال استخوانی در گروه های مختلف: شاهد(A)، شم(B)، پیوند سلول(C)، پیوند غشاء (D) و پیوند سلول غشاء (E) (فلش ها محل کال استخوانی را نشان می دهد). میزان کال استخوانی در گروه های سلول (C) و غشاء(D) نسبت به گروه های شاهد (A) و شم (B) افزایش قابل ملاحظه ای پیدا کرده است.

نتایج تست بیومکانیک استخوان‌ها

نتایج تست بیومکانیک استخوان‌های فمور چهار هفته پس از ایجاد نقص استخوانی در گروه‌های مختلف نشان داد که میانگین حداکثر نیروی وارده بر استخوان (F max) برای چیرگی بر مقاومت استخوان در گروه شم(۵/۰۶ ± ۶۲/۳٤) نسبت به گروه شاهد(۱/۱٤± ۵۹/۰۱) افزایش داشته‌است گرچه این افزایش معنی‌دار نبود. همچنین، در گروه پیوند غشاء ژلاتین-کیتوسان (۸/۸۱ ± ۷۲/۵۷) نسبت به دو گروه شاهد و گروه شم افزایش غیرمعنی‌دار، گروه پیوند سلول-غشاء (٦/٥٦± ۵۳/۲۲) در مقایسه با دو گروه شاهد و شم،

کاهش غیرمعنی‌دار و گروه پیوند سلول (٤/٤٥ ± ٧٩/٩٨) در مقایسه با گروه شاهد، افزایش معنی‌دار (P<٠/٠٥) و در مقایسه با گروه شم افزایش غیرمعنی‌دار داشتند. از سوی دیگر میانگین F max در دو گروه سلول و سلول- غشاء نسبت به گروه غشاء غیرمعنی‌دار ولی در گروه سلول افزایش غیرمعنی‌دار نسبت به گروه غشاء و در گروه سلول- غشاء کاهش غیرمعنی‌دار نسبت به گروه غشاء داشت. در نهایت، میانگین F max در گروه سلول- غشاء نسبت به گروه سلول کاهش معنی‌دار داشته است(P<٠/٠٠١)

شکل ۳- تصاویر رادیوگرافی با نمای جانبی(Lat) از محل تشکیل کال استخوانی در گروه های مختلف: شاهد(A)، شم(B)، پیوند سلول(C)، پیوند غشاء (D) و پیوند سلول غشاء (E) (فلش ها محل کال استخوانی را نشان می دهد). همان طور که در تصاویر دیده می شود، میزان کال استخوانی در گروه های سلول (C) و غشاء(D) نسبت به گروه های شاهد (A) و شم (B) افزایش قابل توجهی پیدا کرده‌است.



نمودار۲. میانگین Fmax گروه‌های مختلف چهار هفته پس از پیوند سلول در گروه‌های مختلف
* افزایش معنی‌دارنسبت به گروه شاهد (P<٠/٠٥)

بحث و نتیجه‌گیری

در مواردی مثل شکستگی‌هایی که در آن جوش‌خوردگی و ترمیم ضایعه استخوانی به دشواری صورت می‌گیرد یا در بیماری‌هایی مانند بدخیمی‌ها، عفونت، استئوپروز، استئوآرتریت و غیره ممکن است فرایندها و مکانیزم‌هایی که برای بازسازی محل آسیب باید طی شده و وارد عمل شوند با دشواری روبرو شود (۱۶). لذا به نظر می‌رسد پیوند سلول‌های استرومایی که به آسانی در دسترس بوده و گردآوری و کشت آنها آسان است در درمان شکستگی‌هایی که با مشکل جوش نخوردن یا دیرکرد در آن روبرو هستند موثر باشد زیرا این سلول‌ها توان فراوانی در تمایز داشته و سرعت تکثیر بالایی دارند. (۱۶) در این تحقیق سلول‌های بنیادین استخراج شده از استخوان ران موش‌ها، در محیط کشت تکثیر داده شد و با پیوند آنها در محل نقص استخوانی روند ترمیم استخوان آسیب دیده بررسی شد. نتایج بررسی رادیوگرافی استخوان‌ها در تحقیق ما نشان داد که چهار هفته پس از پیوند سلول و غشاء میانگین کال استخوانی در گروه سلول و گروه غشاء نسبت به گروه‌های شاهد و شم افزایش غیرمعنی‌دار داشته‌است. یافته‌های ما تا حد زیادی با نتایج Cao و همکاران (۱۱) همخوانی دارد زیرا ایشان در بررسی رادیوگرافی استخوان های قمور شانزده هفته پس از پیوند اتولوگ سلول‌های MSCs در درمان استئوپروز نشان دادند که میزان ترمیم در گروه پیوند سلول در مقایسه با گروه شاهد به‌طور معنی‌دار افزایش داشته‌است. همچنین، همسو با نتایج رادیوگرافی ما یافته‌های Niedhviedzki و همکاران (۱۲) است که ایشان نیز نشان دادند که بیست و چهل روز پس از پیوند غیر اتولوگ سلول‌های BMSCs در گروه تجربی، کال استخوانی کم‌وبیش نیرومندی در محل نقص استخوانی تشکیل شده به‌طوری‌که افزایش معنی‌داری بین گروه تجربی با گروه شاهد نشان داد (۱۷).

در بررسی نتایج حاصل از آزمون رادیوگرافی و مشاهده میزان کال برجود آمده در تحقیق ما نشان داده شد که میانگین میزان کال استخوانی در گروه سلول- غشاء نسبت به گروه‌های شاهد، سلول و غشاء کاهش غیرمعنی‌دار داشته‌است. این یافته‌ها مغایر نتایج Meinel و همکاران است زیرا ایشان پس از ایجاد نقص در جمجمه موش‌ها و استفاده از داربستی شبیه ساختار ترابکولار استخوانی در محل نقص استخوان و انجام X-ray پنج هفته پس از پیوند نشان دادند که میزان دانسیته کال استخوانی در گروه سلول درمانی همراه با داربست در مقایسه با گروه‌های داربست به‌تنهایی و شاهد افزایش یافته‌است(۱۳). نتایج ارزیابی رادیوگرافی بدست آمده از تحقیق ایشان با یافته‌های رادیوگرافی ما در گروه‌های سلول- غشاء همخوانی ندارد. به نظر می‌رسد حضور غشای ژلاتین- کیتوسان همراه با سلول به راهبندی در رشد طبیعی سلول‌ها برجود آورده و تشکیل کال استخوانی در روند ترمیم استخوان را به تعویق می‌اندازد.

از سوی دیگر در بررسی‌های حاصل از آزمون بیومکانیک پژوهش ما نشان داده شد که میانگین بیشینه نیروی وارده بر استخوان در گروه پیوند سلول در مقایسه با گروه شاهد افزایش معنی‌دار و نسبت به گروه شم افزایش غیرمعنی‌دار داشته است. همچنین، مقاومت استخوان در گروه پیوند سلول از سایر گروه‌ها بیشتر برد. یافته‌های Shih و همکاران در سال ۲۰۰۵ که در آن پیوند اتولوگ سلول‌های استرومایی مغز استخوان در ناحیه دیستال استخوان استئوپروتیک فمور سگ همسو با نتایج ما انجام شد. آزمون بیومکانیک استخوان‌های فمور شش ماه پس از پیوند نشان داد مقاومت استخوان در گروه پیوند اتولوگ سلول‌های استرومایی مغز استخوان مشابه گروه پیوند اتوگرافت استخوان است گرچه در سنجش با گروه‌های آلوگرافت استخوان، Partially PDBM (demineralized bone matrix) و بدون درمان افزایش معنی‌دار داشته‌است (۱۴). میانگین حداکثر نیروی وارده بر استخوان (Fmax) در آزمون بیومکانیک استخوان اولنار خرگوش‌ها در گروه پیوند مغز استخوان در مقایسه با گروه شاهد افزایش معنی‌دار داشت (۱۸) که با یافته‌های این پژوهشگران همخوانی دارد.

گمان می‌رود افزون بر سلول‌های پیوند زده شده، سلول‌های اندوژن محل آسیب نیز برای ترمیم استخوان وارد عمل شده و با تولید فاکتورهای خانواده TGF-β، فعالیت استخوان‌سازی را در محل آسیب تقویت می‌کنند. سلول‌های استرومایی مغز استخوان پیوندی، سلول‌های اندوژن همان ناحیه را از راه

واکنش‌های سلولی با ماتریکس، تحریک کرده وآنها را در فرایند ترمیم وارد می‌کنند. افزون بر آن، این سلول‌ها فاکتورهای رشد و دیگر فاکتورهایی که عمل رونویسی ژن‌های ویژه را بر عهده دارند تولید کرده و نیز تعداد زیادی از سیتوکین‌هایی را تراوش می‌کنند که نقش اساسی در ترمیم استخوان دارند (۱۹).

فرایند ترمیم استخوان فرایند پیچیده کنترل شده‌ای با فاکتورهای رشد موضعی و سیستمی است. دو فرایند برجسته در درمان شکستگی آنژیوژنز و استئوژنز هستند. پژوهش‌ها نشان داده‌اند که در کشت بافت‌های گوناگون، هر دو فرایند به‌طور هم‌زمان وارد عمل می‌شوند (۲۰). تزریق سلول‌های استرومایی به محل نقص استخوانی، ظرفیت استئوژنی آن‌ها را بالا می‌برد که حاصل آن افزایش سرعت تشکیل کال استخوانی است. گمان می‌رود پیوند سلول‌های استئوبلاست، تولید غضروف و کال استخوانی را از راه استخوان‌سازی داخل غضروفی برمی‌انگیزد(۲۱). گمان می‌رود هنگامی که سلول‌های پیوند شده به‌تنهایی در محیط طبیعی قرار بگیرند رشد و تشکیل بافت استخوانی جدید بخوبی اتفاق می‌افتد امّا هنگامی که سلول همراه با غشای پیوند زده شود دیرکرد چشمگیری در ترمیم استخوان رخ خواهد داد که علّت آن تکثیر نامناسب سلول‌های استرومایی مغز استخوان در مجاورت داربست ژلاتین- کیتوسان باشد بدین‌ترتیب پیوند سلول به‌تنهایی نتیجه بهتری در ترمیم نواقص استخوانی دارد.

به نظر می‌رسد که پیوند غشای ژلاتین-کیتوسان می‌تواند تا اندازه‌ای به ترمیم نقص استخوانی کمک کند، گرچه استفاده از سلول استرومایی مغز استخوان به همراه غشاء نتوانست کمک چندانی به ترمیم نقص جزیی استخوان نماید در حالی که پیوند سلول به‌تنهایی نتیجه بهتری در ترمیم نواقص استخوانی داشته است.

تشکر و قدردانی: این مطالعه با پشتیبانی مرکز تحقیقات ترومای دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله(عج) انجام گردیده شد که بدین‌وسیله سپاسداری می‌شود.

نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تضاد منافعی ندارند.

منابع

1. Rojhan MS .Basic Histology. Tehran; Chehr publications ,2003; 119-129. [Text in persian]
2. Kvyyra J. Basic Histology. City Water publications 1992; 432- 433.
3. Shirzadi M. Orthopedics and Related Fractures. Tehran; Aseman publications ,1998: 5-9. [Text in persian]
4.Ankeny DP, McTigue DM, 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. Ashton BA, Allen TD, Howlett CR, Eaglesom CC, Hattori A, Owen M. Formation of Bone and Cartilage by Marrow Stromal Cells in Diffusion Chambers in vivo. Clin Orthop Relat Res 1980; 151: 294-307.
6.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.
7.Stampsilvia S. Kraus Nutrition and Diet Therapy. Feeding World publications 2006; 24-48.
8.Yuji Yin, Fen Ye, Junfeng Cui, Fujiang Zhang, Xiulan Li, Kangde Yao. Preparation and Characterization of Macroporous Chitosan–Gelatin/Tricalcium Phosphate Composite Scaffolds for Bone Tissue Engineering. Journal of Biomedical Materials Research Part A 2003; 67(3): 844-855
9. Caplan AI, Dennis JE. Mesenchymal Stem Cells as Trophic Mediators. J Cell Biochem 2006; 98 :1076-1084.
10.Stockmann Ph, Park J ,Wilmowsky v, Nkenke C, Felszeghy E, Friedrich J, et al. Guided Bone Regeneration in Pig Calvarial Bone Defects using Autologous Mesenchymal Stem/Progenitor Cells. Comparison of Different Tissue Sources. Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery 2012; 40: 310-320.
11. Ca L, Liu G, Gan Y, Zhang X,Tang T,Dai K, et al. The Use of Autologous Enriched Bone Marrow MSCs to Enhance Osteoporotic Bone Defect Repair in Long-term Estrogen Deficient Goats. Biomaterials 2012; 33:1058-1066
12. Niedhviedzki T, Dabrowski Z, Miszta H, Pawlikowskiti M. Bone Healing after Bone Marrow Stromal Cell Transplantation to the Bone Defect. Biomaterials 1993 ;14:15-121.
13. Meinel L, Fajardod R, Hofmanna S, Langerc R, Chene J, Snyderd B, et al. Silk Implants for the Healing of Critical Size Bone in Defects .Bone 2005; 37: 688-698.

14. Shih HN ,Sung TH, Chang YC. Restoration of Bone Defect and Enhancement of Bone Ingrowth using Partially Demineralized Bone Matrix and Marrow Stromal Cells. Journal of Orthopaedic Research 2005; 23: 1293-1299.
15. Madsen JE, Hukkhanen M. Fracture Healing and Callus Innervations after Peripheral Nervive Resection in Rats. Clinical Orthopaedics and Related Research 1996 ;353: 230-40.
16. Arthur A, Zannettino A, Gronthos S .The Therapeutic Applications of Multipotential Mesenchymal Stromal Stem Cells in Skeletal Tissue Repair. J. Cell. Physiology 2009 ; 218: 237-245.
17. Berry JP. Electrostatically Produced Structures and Methods of Manufacturing. US Patent 4965110 1990 ;53:302-326.
18.Jafaremami M , Orian A, Meymandi parizi A ,Saeidi nasab B. Study of Bone Marrow Effects on the Union of the Fracture and Comparison with Bone Graft in Rabbits. Symposium Surgery, Anesthesia and Radiology of Iran – Ahvaz Veterinary, 2002. [Text in persian]
19. Brodke D, Pedrozo HA, Kapur TA, Attawia M, Kraus KH, Holy CE,et al. Bone Grafts Prepared with Selective Cell Retention Technology Heal Canine Segmental Defects as Effectively as Autograft. J Orthop Res 2006; 24:857-866.
20. Mori M, Sadahira Y, Kawasaki S, Hayashi T , Awai M. Formation of Capillary Networks from Bone Marrow Cultured in Collagen Gel, Cell Structure. Funct 1998; 14: 293-4
21. Young RG, Butler DL, Weber W. Use of Mesenchymal Stem Cells in a Collagen Matrix for Achilles Tendon Repair. J Orthop Res 1998; 16 : 406-413.

Study of the Bone Defect Repair Using Bone Marrow Stromal Cells and Gelatin-Chitosan Membrane in Rat

Ajoudani A (MSc)[1] Sadoughi M (Ph.D)[1] *Sadraie S H (PhD)[2] Kaka Gh(Ph.D)[2]

***Corresponding Address:** Neurosciences Research center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Email: h_sadraie@yahoo.com

Received: 27/Jan/2015 Revised: 12/May/2015 Accepted: 28/Jun/2015

Abstract

Introduction: Bone marrow stromal cells (BMSCs) are multipotent stem cells that can differentiate into osteogenic cells. Today, biocompatible scaffold has emerged as a novel treatment for replacement of lost bone tissue.

Objective: This study evaluated the repairment of bone defect using bone marrow stromal cells and gelatin-chitosan membrane in rats.

Materials and Methods: In this experimental study, sixty male adult Albino Wistar rats were equally divided into five groups as follows: Group 1 (control group) received no treatment after bone defect. Group 2 (sham group) after bone defect, the culture medium was injected at the site of bone defect. Group 3 (gelatin-chitosan group), with gelatin-chitosan membrane used into bone defect. Group 4 with BMSCs transplanted into bone defect and Group 5 with cell transplantation with chitosan - gelatin membrance used into bone defect.

Results: No significant difference was found between the controls and Sham group, according to radiopacity test but radiograph bone opacity increased in chitosan - gelatin and cell groups, compared to control group but the differences were not significant. On the other hand, in cell-GC group compared to control group, radiopacity decreased but was not significant. Our biomechanical results showed the mean of F max was significantly increased in cell group compared to control group, and in Gelatin-Chitosan group compared to control group was increased but the difference was not significant and in cell-GC group compared to control group it was decreased but the difference was not significant, either.

Conclusion: It seems that gelatin-chitosan membrane transplantation can partly be useful for repairing of bone defect. Although the use of bone marrow stromal cells with the membrane could help a little to repair of bone defects, cell transplantation alone is better for repairing the bone defects.

Conflict of interest: non declared

Key words: Bone\ Cell Transplans\ Gelatin\ Mesenchymal Stromal Cells\ Rats

_____Journal of Guilan University of Medical Sciences, No: 96, Pages: 68-78

Please cite this article as: Ajoudani A, Sadoughi M, Sadraie S H, Kaka Gh. Study of the Bone Defect Repair Using Bone Marrow Stromal Cells and Gelatin-Chitosan Membrane in Rat. J of Guilan University of Med Sci 2015; 24 (96): 68-78. [Text in Persian]

1. Department of Biology, Student of Biological Sciences, Azad University, Tehran, Iran.

2. Neurosciences Research center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran