



بررسی ترمیم نقص استخوان با استفاده از غشاء ژلاتین- کیتوسان و سلول های بنیادی مشتق از چربی در موش صحرایی (ارزیابی هیستومورفومتری و ایمونوهیستولوژیک)

غلامرضا کاکا^۱، مهر انگیز صدوقی^۲، سمیه صالحی شمیران^۲، سید همایون صدراپی^{۴*}، زهرا بوربور^۵

^۱ مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج).

^۲ گروه زیست شناسی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال.

^۳ گروه زیست شناسی تکوینی جانوری، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، تهران، ایران

^۴ مرکز تحقیقات علوم اعصاب و گروه علوم تشریح، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران، ایران

^۵ مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران، ایران

E-mail: sadraie@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۵/۲۰

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۳/۱۷

چکیده

(ADSCs) سلول های چند استعدادی هستند که قابلیت تمایز به سلول های استئوژنیک را دارند. از داربست های کیتوسان و ژلاتین که ساختاری زیست تخریب پذیر و زیست سازگار دارند جهت ترمیم بافت ها استفاده می شوند. در این بررسی ۶۰ سر موش صحرایی به طور تصادفی در پنج گروه قرار گرفتند. ۱- شاهد: هیچگونه درمانی دریافت نکردند ۲- شم: محیط کشت در محل نقص تزریق شد ۳- غشاء: از ژلاتین - کیتوسان در محل نقص استخوانی استفاده شد. ۴- سلول: پیوند سلول های ADSC در محل نقص انجام شد. ۵- سلول - غشاء: سلول به همراه غشاء ژلاتین - کیتوسان در محل نقص پیوند گردید. ارزیابی های ایمونوهیستوشیمی و هیستومورفومتری در گروه های مختلف مورد بررسی قرار گرفت. میانگین مساحت تراکولای استخوانی در گروه های غشاء، سلول و سلول - غشاء نسبت به گروه شاهد افزایش معنی داری را نشان داد. همچنین میانگین تعداد استئوسیت ها در ناحیه نقص استخوانی در گروه های سلول و سلول - غشاء نسبت به گروه شاهد کاهش معنی داری داشتند گرچه در گروه غشاء کاهش بصورت غیر معنی دار مشاهده گردید. به نظر می رسد که استفاده از داربست غشاء ژلاتین - کیتوسان همراه با پیوند سلول های ADSC جهت ترمیم نقص استخوانی موثر باشد.

کلیدواژه ها: سلول های ADSC، غشاء ژلاتین - کیتوسان، پیوند سلول، ترمیم استخوان، موش صحرایی

مقدمه

شکستگی می تواند سبب زمین گیر شدن بیمار و تحمیل هزینه های سنگین برای فرد و جامعه شود [5]. محققین همواره در صددند تا روش درمانی مناسبی برای تسریع جوش خوردن استخوان پیدا کنند. پیوند

یکی از عوارض شکستگی استخوان ها تاخیر و یا عدم جوش خوردن کامل آن می باشد. پوکی استخوان به دنبال افزایش سن و عدم جوش خوردن آن پس از

نگردید بلکه میزان معدنی شدن استخوان در این افراد افزایش قابل ملاحظه‌ای داشته است [21]. Kyunghlee و Lee و همکاران (2010) پس از پیوند hASCs (سلول بنیادی مشتق از چربی انسانی) جهت ترمیم نقص استخوان نشان دادند که ترشح عوامل مختلف استخوان‌ساز، از جمله فاکتور رشد کبدی و پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی فعال گردیده است. در مجموع یافته‌های آنها نشان داد که hASCs در بهبود ترمیم استخوان مفید بوده و می‌تواند روش سودمندی در درمان پوکی استخوان باشد [24].

تحقیق حقیقت و همکاران (۲۰۱۱) نیز نشان داد که استفاده از سلول‌های بنیادی مشتق از چربی برای درمان ضایعات استخوان مانیبول در سگ می‌تواند مفید واقع شود [19]. یافته‌های B. Niechoda و همکاران در سال ۲۰۰۰ نیز نشان داد که ترمیم نقص استخوان ران گوسفند با استفاده از سلول‌های مزانشیمی مشتق از چربی و سلول‌های مزانشیمی مشتق از مغز استخوان همراه با داربست هیدروکسی اپاتیت سبب افزایش سرعت ترمیم استخوان‌های تحت درمان گردیده است گرچه میزان ترمیم نقص استخوان در گروه درمان شده با سلول‌های ADSCs در مقایسه با گروه درمان شده با سلول‌های BMSCs افزایش قابل ملاحظه‌ای داشته است [4].

هدف از تحقیق حاضر بررسی ترمیم نقص جزئی استخوان توسط داربست سلول‌های بنیادی مشتق از چربی (ADSCs) همراه با غشاء ژلاتین-کیتوسان در موش صحرایی با استفاده از روش‌های هیستومورفومتريک و ایمونوهیستوشیمی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

- حیوان:

سلول‌های بنیادی تمایز یافته به سلول‌های استخوان‌ساز امیدهای زیادی را برای بازسازی ضایعات مذکور بوجود آورده است [6-18]. در موارد پیوند بافت استخوانی جهت ترمیم ضایعات استخوانی، تعداد اندک سلول‌های استخوان‌ساز از محدودیت‌های سرعت جوش خوردن است [32].

سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSCs) سلول‌های چند استعدادی است که می‌تواند تبدیل به سلول‌های استخوانی، غضروفی، فیبروبلاست، عضلانی و غیره شوند [7]. سلول‌های بنیادی را می‌توان از منابع مختلف از جمله مغز استخوان، [28] درم، [14] پالپ دندان، [17] سینوویوم، [15] و دندان شیری به دست آورد [29]. سلول‌های بنیادی بافت چربی دارای قدرت تمایزی به سمت سلول‌های مزودرمی مانند چربی، غضروفی، استخوانی و غیره می‌باشند [9-15]. سلول‌های بنیادی مشتق از چربی، از نظر فنوتیپ مشابه سلول‌های مزانشیم مغز استخوان می‌باشند [12]. اما مزایای منحصربه‌فرد آنها این است که این سلول‌ها را می‌توان براحتی از طریق عمل لیبوساکشن به دست آورد [16] ضمن آنکه تعداد سلول دریافت چربی به مراتب بیشتر از مغز استخوان بوده و این سلول‌ها سریع‌تر نیز تکثیر می‌یابند. [15-33]

امروزه در مهندسی بافت، داربست‌های زیست تخریب پذیر به عنوان بستری برای سلول‌های بنیادین ساخته می‌شود [18-20]. در مواردی که قسمت وسیعی از استخوان مثلا در تروماها از بین می‌رود از پیوند سلول‌های MSCs به تنهایی یا در ترکیب با مواد زیست تخریب‌پذیر استفاده می‌شود [11]. در مطالعه‌ای که بر روی بیماران دارای نقص استئوژنز انجام شد نشان داد که در بیمارانی که به آنها پیوند سلول‌های مزانشیمی زده شد نه تنها هیچ پاسخ ایمنی منفی ایجاد

دستگاه همزن مخلوط شد. سپس میزان 0/5 میلی لیتر اسید استیک خالص به آن اضافه و ژلاتین با نسبت ۱٪ وزنی به آن اضافه و به دمای جوش رسانده شد. محلول حاصل بوسیله ی اتوکلاو استریل گردید.

- استخراج سلول:

از حفره شکمی حیوان چربی برداشته شد و پس از خرد شدن، با 40λ کلاژناژ و ۲ میلی لیتر محیط کشت α MEM مخلوط گردید و به مدت ۳۰ تا ۱۵ دقیقه بوسیله دستگاه همزن به هم زده شد تا زمانی که یک محلول کاملاً شیری رنگ به دست آمد. محلول، از فیلتر مش ۷۰ میکرومتری عبور داده و به دنبال آن دو بار به مدت 4 دقیقه و با دور ۳۰۰۰، سانتریفیوژ شد محلول رویی، دور ریخته شد و ترکیب باقیمانده، با محیط کشت مخلوط گردید و در یک پلیت ریخته و سپس داخل انکوباتور قرار گرفت. به مدت 3 روز، محیط رویی توسط سمپلر کشیده شد و به آن محیط کشت جدید اضافه گردید. تا سلول‌ها به کف پلیت بچسبند. بعد از پاساژ دوم، سلول‌ها آماده پیوند شدند.

- مرحله کشت سلول ADSC بر روی غشاء کیتوسان ژلاتین:

پس از تهیه غشاء و قرار دادن قطعات 1×1 سانتی‌متر آن به مدت یک هفته در محیط کشت α MEM حاوی سرم، آن را به وسیله محلول PBS و الکل ۹۶ درصد شستشو داده و غشاءها در پلیت‌های شش‌خانه ای استریل در زیر هود قرار گرفته و به کف پلیت‌های آغشته به محلول ژلاتین استریل یک درصد منتقل گردیدند. سپس قطعات غشاء را به آرامی بر روی پلیت پهن نموده و کمی در داخل هود قرار داده تا خشک شوند. در این هنگام سلول‌های استرومایی را

در این پژوهش از ۶۰ سر موش صحرایی نر و بالغ با وزن حدود ۲۵۰-۲۰۰ گرم نژاد البینو- ویستار استفاده شد. خوراک دام موش‌ها بصورت حبه به همراه آب و بصورت آزاد در دسترس موش‌ها قرار گرفت. دمای حیوان‌خانه حدود 22 ± 2 و روشنایی آن به طور متناوب دوره روشنایی و تاریکی ۱۲ ساعته و در شرایط مطلوب و استاندارد حیوان‌خانه دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله نگهداری شدند. نگهداری حیوانات آزمایشگاهی مطابق با راهنمای انستیتوی ملی سلامت انجام شده است. حیوانات به طور تصادفی به پنج گروه تقسیم شدند. ۱- گروه شاهد (Control) شامل حیواناتی که بر روی استخوان فمور پای راستشان در ناحیه فوقانی ایفیز 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 درمحل نقص استخوان تزریق شد. ۳- گروه (ژلاتین - کیتوسان) که پس از ایجاد نقص استخوان فمور و گذشت ۳ روز پیوند غشاء ژلاتین-کیتوسان در محل آسیب انجام گردید ۴- گروه سلول (ADSCs) که ۷۲ ساعت بعد از ایجاد نقص استخوانی تعداد 150/000 سلول ADSCs بصورت غیراتولوگ و در محل آسیب تزریق شد ۵- گروه سلول - غشاء (ADGC) که نقص استخوانی در فمور ایجاد نموده و ۳ روز بعد 150/000 سلول بنیادی مشتق از چربی به همراه غشاء ژلاتین-کیتوسان در محل آسیب پیوند می‌گردد.

- روش تهیه غشاء:

ابتدا کیتوزان (Ch) با نسبت ۱٪ وزنی به محلول آب مقطر ۲ بار تقطیر که با درجه حرارت ۴۰ درجه سانتی‌گراد اضافه شد محلول حاصل بوسیله ی بوسیله

از کف پلیت به وسیله آنزیم تریپسین جدا کرده و بر روی غشاء ریخته و کمی محیط کشت حاوی محلول سرم گاوی به آن اضافه گردیدند. سپس پلیت‌ها در دستگاه انکوباتور قرار داده شدند. پس از دو روز غشاءها را در زیر میکروسکوپ مشاهده کرده تا از وجود سلول استرومایی اطمینان حاصل شود.

- ایجاد نقص استخوانی:

حیوانات به وسیله مخلوط کتامین هیدروکلرید (60 mg/kg) و زایلین هیدروکلرید (10 mg/kg) بیهوش شده و پس از آن، موی پای حیوان تراشیده شد 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 گردید. سپس برشی به طول دو سانتی متر در ناحیه خارجی پای راست حیوانات ایجاد و پس از کنار زدن عضلات و فاسیاهای استخوان فمور در معرض دید قرار گرفت، سپس سوراخی به قطر ۱ میلی‌متر به صورت دوطرفه (Transcortical) در ناحیه بالای اپی فیز دیستال استخوان فمور ایجاد گردید 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 نشان‌دار شده با (BrdU SIGMA, USA) (که ۷۲ ساعت قبل از پیوند در معرض BrdU با غلظت ۱/۵ میلی مولار قرار گرفته بودند) و در گروه شم فقط ۵۰ میکرو لیتر محیط کشت تزریق شد. در گروه غشاء که غشاء ژلاتین -

کیتوسان در محل نقص استخوانی پیوند زده شد و گروه سلول غشاء 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 هیستومورفومتریک و ایمونوهیستوشیمی بر روی آنها صورت گرفت.

- 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 (۰/۴ درصد) بر روی لام نئوبار ریخته و سلول‌های زنده و مرده توسط میکروسکوپ اینورت با بزرگنمایی ۴۰۰ بررسی و شمارش گردیدند و از آنجائی که سلول‌های مرده توسط تریپان بلو به رنگ آبی در می‌آیند و سلول‌های زنده شفاف می‌باشند، تعداد سلول‌های زنده و مرده شمارش شده و درصد آن‌ها محاسبه و ثبت گردیدند.

- مشخص نمودن استرومایی بودن سلول‌های ADSCs با استفاده از روش ایمونوسایتوشیمی:

برای تعیین درصد خلوص سلول‌های استرومایی، به دلیل وجود گلیکوپروتئین فیبرونکتین و CD44 در سلول‌های با منشأ مزانشیمی، سلول‌های ADSCs بر علیه این گلیکوپروتئین‌ها به روش ایمونوسایتوشیمی رنگ شدند [3]. بدین منظور ابتدا سلول‌های ADSCs

بزرگنمایی ۱۰۰ برابر تهیه و میزان ترابکولها و بافت همبندی عروقی در مساحتی برابر با ۵۰۰۰۰ میکرومتر مربع اندازه گیری و ثبت گردیدند.

- شمارش سلولی:

تعداد استئوسیت های موجود در تیغه های استخوانی در سطحی معادل ۵۰۰۰۰ میکرومتر مربع با بزرگنمایی ۴۰۰ برابر محاسبه و ثبت گردیدند.

تجزیه و تحلیل اطلاعات: ارزیابی آماری داده ها با استفاده از آزمون آماری ANOVA و آزمون تکمیلی Tukey Post Hock انجام شد. در انجام آزمونهای آماری از نرم افزار SPSS استفاده گردید. کلیه اطلاعات ارائه شده بر حسب $Mean \pm SEM$ می باشد. میزان $P < 0.05$ به عنوان درجه معنی داری در نظر گرفته شد.

نتایج

- زنده بودن سلولها

نتایج viability test نشان داد که تقریباً بیش از ۸۸ درصد سلولهای ADSCs پس از پاساژ چهارم زنده بودند.

- درصد سلولهای ADSCs با استفاده از روش ایمنوسیتوشیمی:

قبل از پیوند سلولهای ADSCs در صد سلولهای نشان دار شده با آنتی بادی های فیبرونکتین و CD44 بررسی و به ترتیب بیش از ۹۳ و ۹۵ درصد مشخص گردیدند (تصویر ۱).

- هیستومورفومتری بافت استخوان:

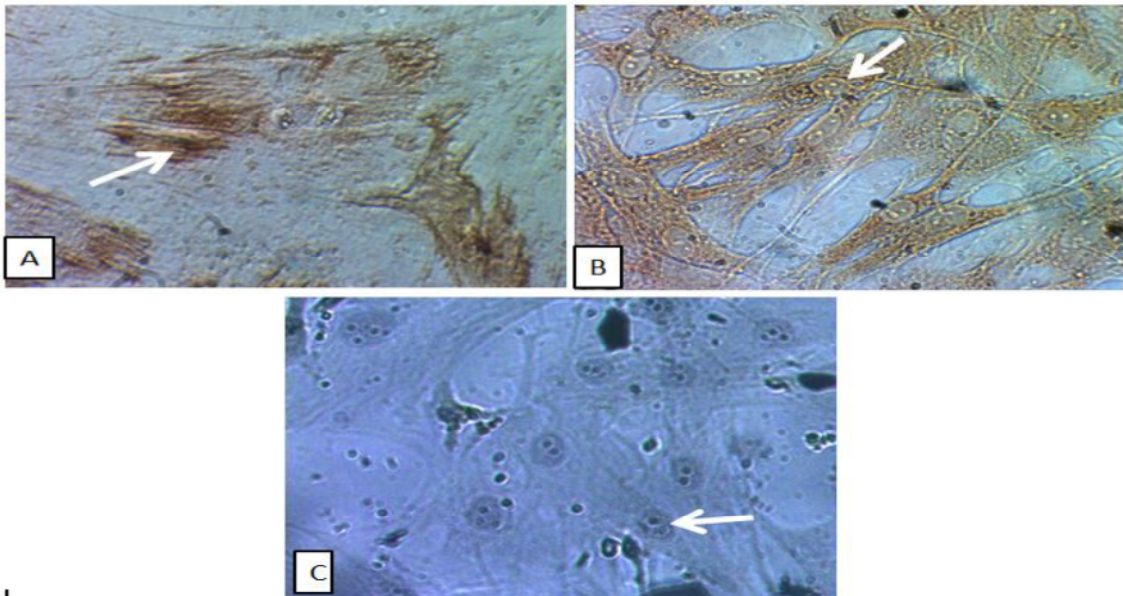
اندازه گیری مساحت ترابکولهای استخوان در ناحیه کال نشان داد که وسعت ناحیه ترمیم شده نسبت

موجود در پلیت توسط پارافرمالدهید ۴ درصد به مدت ۳۰ دقیقه فیکس شده، سپس شستشوی سلول ها با PBS سه بار و هر بار ۵ دقیقه انجام شد. نمونه ها در معرض محلول بلوک کننده (مخلوط سرم بز ۱۰ درصد و Triton X-100 درصد ۰/۳) به مدت یک ساعت قرار داده شد. پس از رقیق نمودن (۱:۱۰۰) آنتی بادی های اولیه CD44 و (AB-CAM) Fibronectin که هر دو از نوع موشی بودند، هر کدام را به طور مجزا بر روی سلولها ریخته و پلیت را در داخل ظرف مرطوب به مدت یک شب و در دمای $4^{\circ}C$ انکوبه شدند. پلیت ها پس از شستشو با PBS در معرض H_2O_2 ۱۰ درصد به مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفتند. سپس با PBS سه بار شستشو انجام شد و به مدت دو ساعت در دمای محیط در معرض آنتی بادی ثانویه ضد موشی Avidin (AB-CAM) Biotin (1:200) قرار گرفتند. سپس ده دقیقه تحت تأثیر محلول کروموژن DAB و در تاریکی قرار گرفتند و بعد از شستشو با PBS سلولها توسط میکروسکوپ Invert مورد بررسی قرار گرفتند.

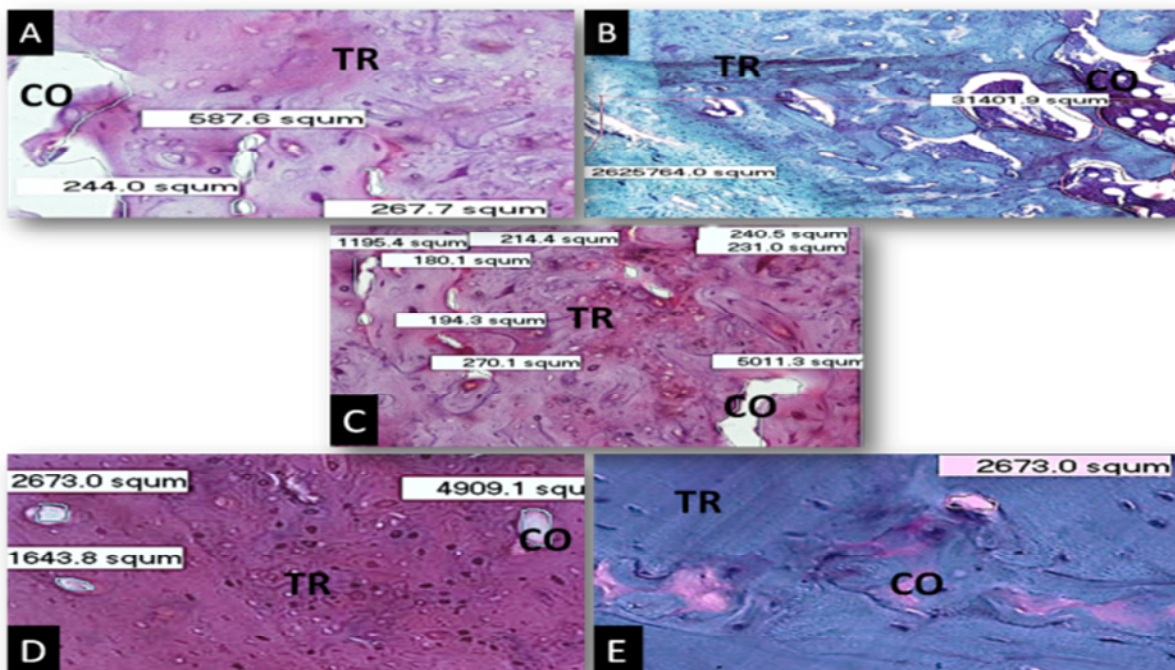
- مطالعه هیستومورفومتری:

جهت بررسی میزان ترابکولها موجود در محل کال استخوانی از مجموعه سخت افزاری (کامپیوتر و میکروسکوپ متصل به دوربین Tsview) و سیستم نرم افزاری 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 5 میکرونی از نمونه ها تهیه و با نسبت ۱ به ۴ تعداد ۷ مقطع از ناحیه کال تهیه و رنگ آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین انجام گردید جهت مطالعه هیستومورفومتری، از مقاطع بافتی، تصاویر با

به وسعت کل ناحیه کال استخوانی در گروه‌های شاهد (۰/۷۰ ± ۰/۰۲۳)، شم (۰/۶۹۹ ± ۰/۰۲۰)، غشاء (۰/۸۶ ± ۰/۰۱۱) بوده است. سلول (۰/۸۴ ± ۰/۰۱۷) و سلول -



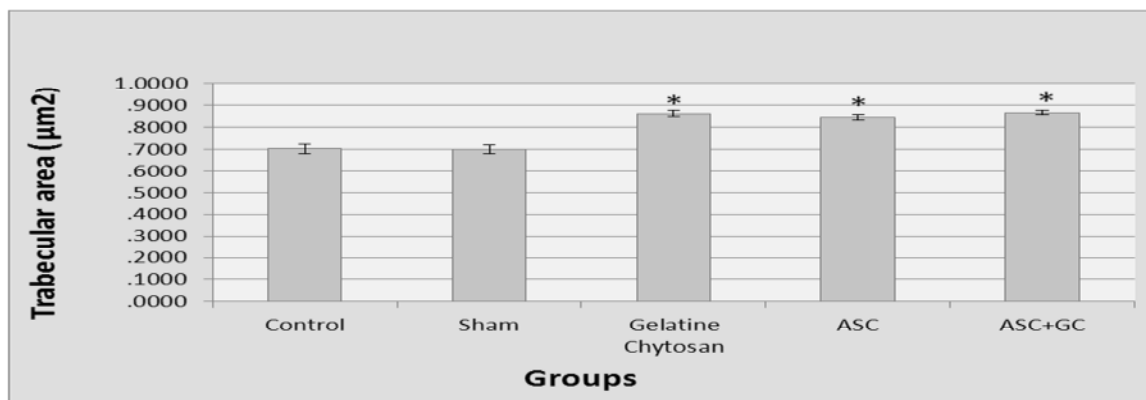
تصویر ۱: تصویر میکروسکوپی سلول‌های استرومایی پس از انجام ایمونوسیتوشیمی با بزرگنمایی ۴۰۰ برابر. تصویر (A)، (B)، (C) به ترتیب مربوط به آنتی بادی فیبرونکتین، CD44 و کنترل منفی سلول‌های ADSC ۲۴ ساعت پس از پاساژ چهارم است. سلول‌ها در تصاویر A و B به دلیل دارا بودن نشانگرهای فیبرونکتین و CD44 رنگ DAB گرفته و به رنگ قهوه‌ای دیده شوند.



تصویر ۲- تصاویر مقاطع بافت استخوانی منطقه ترمیم شده مربوط به گروه‌های شاهد (A)، شم (B)، غشاء (C)، سلول درمانی (D) و سلول - غشاء (E) در پایان هفته چهارم. تراکولار استخوان (TR)، فضاهای پیوندی عروقی (CO). (رنگ آمیزی، H&E بزرگ نمایی X ۱۰۰)

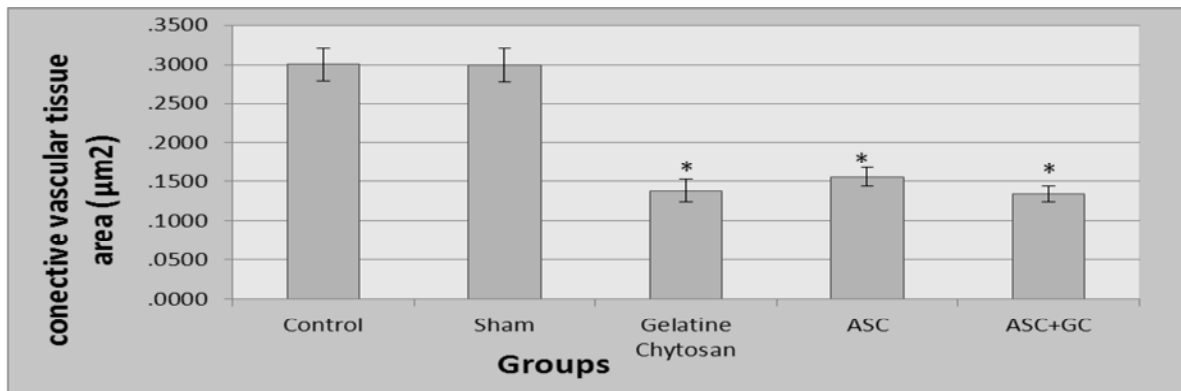
($0/14 \pm 0/017$)، سلول ($0/15 \pm 0/017$) و غشاء - سلول ($0/13 \pm 0/011$) بوده است. مقایسه این شاخص بین گروه‌های شاهد و شم هیچ اختلاف معناداری نشان نداد، در صورتی که این شاخص در هر سه گروه غشاء، سلول و سلول - غشاء نسبت به گروه شاهد کاهش معناداری را نشان داد (در هر سه $P < 0/001$). به همین ترتیب مشاهده گردید که میانگین نسبت بافت همبندی - عروقی به کل ناحیه کال در هر سه گروه غشاء، سلول و سلول - غشاء در مقایسه با گروه شم کاهش معناداری داشته است (در هر سه $P < 0/001$)، که نشان دهنده کاهش قابل توجه بافت همبندی - عروقی نسبت به کل ناحیه کال در هر سه گروه می‌باشد. در ادامه بررسی‌ها مشخص شد که میانگین نسبت بافت همبندی-عروقی به کل ناحیه کال در گروه‌های سلول، سلول - غشاء نسبت به گروه غشاء فاقد اختلاف معنادار بوده است. علاوه بر آن میانگین نسبت بافت همبندی-عروقی به کل ناحیه کال در گروه غشاء - سلول نسبت به گروه سلول تفاوت معنی‌داری ملاحظه نگردید (نمودار ۲).

مساحت تراپکولاهای استخوانی گروه شم در مقایسه با گروه شاهد تفاوت معناداری نشان نداد. ولی این مساحت در سه گروه غشاء، سلول و سلول - غشاء نسبت به گروه شاهد دارای افزایش معنادار بوده است (در هر سه گروه $P < 0/001$). که بیانگر افزایش قابل توجه میزان تراپکولاهای استخوانی نسبت به مساحت کل ناحیه کال در سه گروه غشاء، سلول و سلول - غشاء می‌باشد. میانگین مساحت تراپکولاهای استخوانی در سه گروه غشاء، سلول و سلول - غشاء نسبت به گروه شم افزایش معناداری نشان داده است ($P < 0/001$). همچنین مساحت تراپکولاهای استخوانی در گروه‌های سلول و سلول - غشاء نسبت به گروه غشاء اختلاف معناداری را نشان نداد. علاوه بر آن میزان تراپکولاهای استخوانی شکل گرفته در ناحیه کال در گروه سلول - غشاء نسبت به گروه سلول تفاوت معناداری نداشته است (نمودار ۱).
بررسی بافت همبندی - عروقی در ناحیه نقص استخوانی نشان داد که میانگین وسعت بافت همبندی-عروقی نسبت به وسعت کل ناحیه کال در گروه‌های شاهد ($0/02 \pm 0/03$)، شم ($0/02 \pm 0/03$)، غشاء



نمودار ۱- میانگین مساحت تراپکولاهای استخوان نسبت به مساحت کل ناحیه ترمیم شده در محل نقص بر حسب میکرومتر مربع در چهار هفته بعد از پیوند. میانگین مساحت تراپکولاهای استخوان نسبت به مساحت کل ناحیه ترمیم شده در محل نقص بر حسب میکرومتر مربع در چهار هفته بعد از پیوند. گروه شاهد و شم تفاوت معنی‌داری را با یکدیگر نشان نمی‌دهند.

* اختلاف معنی‌دار با گروه شاهد ($P < 0/05$)



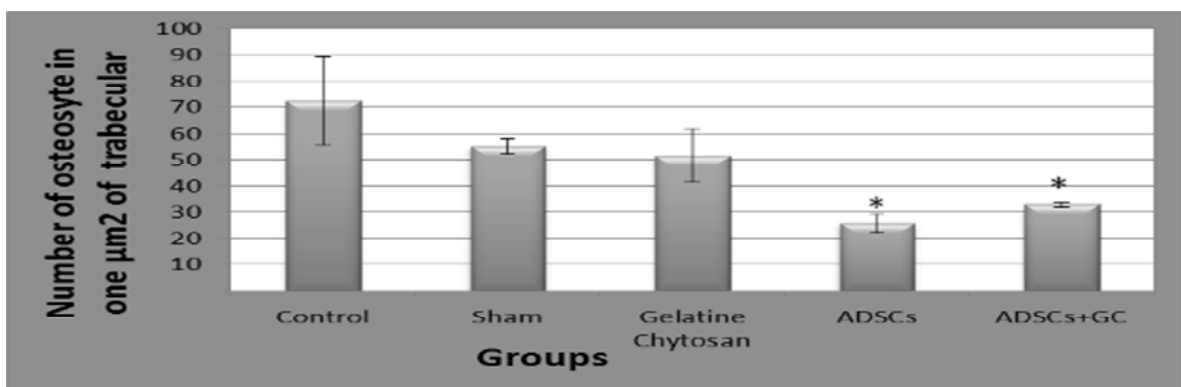
نمودار ۲- میانگین نسبت مساحت بافت همبندی- عروقی استخوان به مساحت کل ناحیه ترمیم شده در محل نقص بر حسب میکرومتر مربع در چهار هفته بعد از پیوند. این نسبت در گروه شاهد و شام اختلاف قابل توجهی نداشتند.

* اختلاف معنی دار با گروه شاهد ($P < 0/05$)

- تعداد استئوسیت‌ها:

معنادار و در گروه سلول و سلول - غشاء کاهش معنادار بوده است (در هر دو گروه $P < 0/001$)، ضمن اینکه میانگین تعداد استئوسیت‌ها در گروه غشاء، سلول و سلول - غشاء در مقایسه با گروه شام دارای اختلاف معنادار نبوده است. همچنین میانگین تعداد استئوسیت‌ها در گروه سلول و سلول - غشاء نسبت به گروه غشاء کاهش غیر معنی دار داشته اما میانگین تعداد استئوسیت‌ها در گروه سلول - غشاء در مقایسه با گروه سلول افزایش غیرمعنی دار نشان داده است (تصویر ۲) (نمودار ۳).

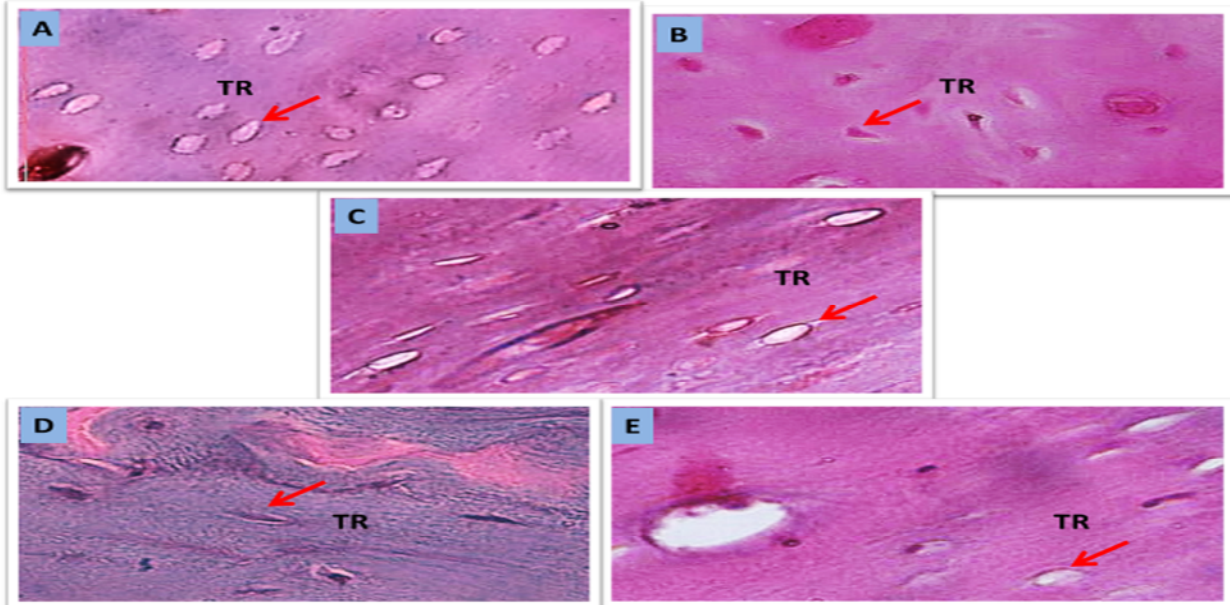
بررسی و شمارش تعداد استئوسیت‌ها در سطحی برابر ۵۰۰۰۰ میکرومتر مربع از تراپیکولاهای ناحیه نقص استخوانی با بزرگنمایی ۴۰۰ برابر در گروه‌های مختلف نشان داد که میانگین تعداد استئوسیت‌ها در گروه‌های شاهد ($16/82 \pm 7/22$)، شام ($2/9 \pm$)، غشاء ($51/62 \pm 10/25$)، سلول ($3/74 \pm$)، سلول - غشاء ($25/78 \pm 32/88$) بود. این نتایج نشان داد که میانگین تعداد استئوسیت‌ها در گروه‌های شام و غشاء نسبت به گروه شاهد کاهش غیر



نمودار ۳- تعداد استئوسیت‌ها در ۵۰۰۰۰ میکرومتر مربع از تراپیکولای استخوان در محل آسیب چهار هفته بعد از پیوند.

میانگین تعداد استئوسیت‌ها میان گروه‌های شاهد، شام و غشاء فاقد اختلاف معنی دار بود.

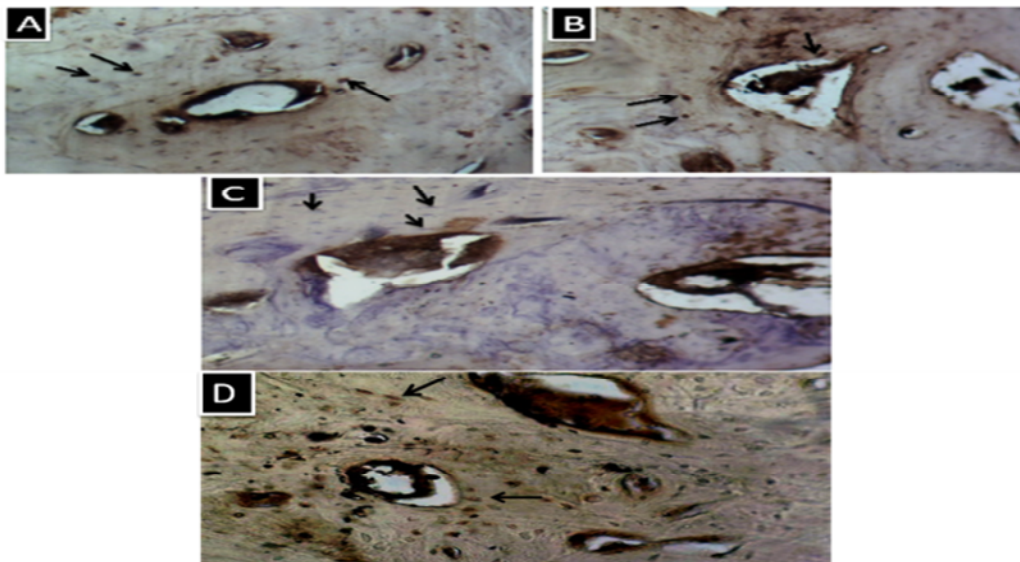
* اختلاف معنی دار با گروه شاهد ($P < 0/05$)



تصویر ۲- تصاویر ناحیه نقص استخوانی فمور که نشان دهنده تعداد و آرایش استئوسیت‌ها در گروه‌های مختلف می‌باشد. گروه شاهد (A)، گروه شم (B)، گروه غشاء (C)، گروه سلول (D) گروه سلول - غشاء (E). پیکان قرمز اشاره به سلول‌های استئوسیت بیانگر تراکم بالای استخوان می‌باشد. (رنگ آمیزی، H&E، بزرگ نمایی X ۴۰۰)

میکرومتر تهیه گردید و وجود سلول‌های نشاندار شده موجود در محل ترمیم استخوان با استفاده از روش ایمنو هیستوشیمی و بهره‌گیری از آنتی Brdu ردیابی و تایید گردیدند (تصویر ۳).

- ردیابی سلول‌های تزریق شده به روش ایمنوهیستوشیمی در پایان هفته چهارم از ناحیه نقص استخوانی از گروه‌های مختلف مقاطع پارافینی به ضخامت ۵



تصویر ۳- سلول‌های ردیابی شده ADSC چهار هفته بعد از پیوند سلول. پیوند غشاء (A)، پیوند سلول (B)، پیوند سلول - غشاء (D) و کنترل منفی (C) با بزرگنمایی ۱۰۰ برابر. پیکان سیاه اشاره به هسته سلول‌های نشاندار دارد که در A و B و D به رنگ قهوه‌ای دیده می‌شود اما در C رنگ نگرفته و به رنگ بنفش دیده می‌شود.

بحث

امروزه از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی و نیز داربست‌های زیست تخریب پذیر جهت ترمیم نقائص استخوانی استفاده می‌شود [10]. یافته‌های هیستومورفومتري این تحقیق چهار هفته بعد از پیوند بیانگر افزایش مساحت ترابکولاهای استخوانی و کاهش بافت همبندی-عروقی در گروه‌های پیوند سلول نسبت به گروه شاهد بوده است. تعداد استئوسیت‌ها در ناحیه ترمیم در گروه‌های پیوند سلول و سلول غشاء نسبت به گروه شاهد کاهش معنی‌داری نشان داد. در تحقیق حاضر به نظر می‌رسد که در گروه تجربی به دلیل کشت سلول‌ها در محیط طبیعی و مناسب ترمیم استخوانی بهتر انجام شده است اما در گروه شاهد به علت محیط اسیدی و کمبود اکسیژن سلول‌های اتوژنوس استخوانی به زمان بیشتری برای تکثیر و ترمیم نیاز داشتند و به همین دلیل نسبت گروه پیوند سلول از ترمیم ضعیف‌تری برخوردار بوده‌اند [3].

مشابه نتایج گروه سلول - غشاء ما یافته‌های Schliephake و همکاران (۲۰۰۹) می‌باشد زیرا ایشان نیز به منظور افزایش اثر بخشی سلول‌های بنیادی از داربست کلاژن برای تمایز و گسترش سلول‌های بنیادی استفاده نمودند که نتایج خوبی جهت تسریع رشد استخوان بدست آوردند [30]. تحقیقات دیگری نیز نشان داده‌اند که پس از ایجاد نقص استخوانی در بز و گوسفند و متعاقب آن پیوند سلول مزانشیمی، میزان ترمیم در استخوان‌های گروه تجربی به طور چشمگیری افزایش یافته بود [2].

نتایج ارزیابی هیستولوژیک نقص استخوان رادیال خرگوش در تحقیق Kim و همکاران نیز مشابه یافته‌های تحقیق حاضر می‌باشد زیرا ایشان نیز نشان

دادند که پیوند سلول‌های اتولوگ استئوبلاست، استخوان‌سازی را در ناحیه نقص استخوانی القاء و تحریک می‌کند [23]. به همین ترتیب B. Niechoda و همکاران در سال ۲۰۰۰ نشان دادند که ترمیم نقص استخوان ران گوسفند با استفاده از سلول‌های مزانشیمی مشتق از چربی و سلول‌های مزانشیمی مشتق از مغز استخوان همراه با داربست هیدروکسی اپاتیت سبب افزایش سرعت ترمیم استخوان‌های تحت درمان گشته است، گرچه میزان ترمیم نقص استخوان در گروه درمان شده با سلول‌های ADSCs در مقایسه با گروه درمان شده با سلول‌های BMSCs افزایش قابل ملاحظه ای داشته است [4].

همچنین همسو با یافته‌های ما مطالعه‌ی Liu B و همکاران (2009) می‌باشد که ایشان نیز برای ترمیم نقص استخوان جمجمه سگ از پیوند اتولوگ سلول ADSCs و داربست‌های مرجانی (scaffold Coral) استفاده نمودند. نتایج این تحقیق نشان داد که سلول اتولوگ ADSCs و داربست‌های مرجانی می‌توانند سبب ترمیم سریعتر نقص استخوان جمجمه در سگ شوند بطوریکه گروه تجربی دارای افزایش معنی‌دار نسبت به گروه شاهد بود [26]، که با یافته‌های هر سه گروه سلول، غشاء و سلول - غشاء تحقیق ما، خصوصا با گروه سلول - غشاء مطابقت دارد. مشابه نتایج تحقیق ما مطالعات دیگری دیده می‌شود از جمله تحقیق Kyunghye Lee و همکاران (2010) پس از پیوند hASCs (سلول بنیادی مشتق از چربی انسانی) است که جهت ترمیم نقص استخوان ملاحظه کردند که ترشح عوامل مختلف استخوان‌ساز، مانند فاکتور رشد کبدی و پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی فعال گردیده و hASCs در بهبود ترمیم استخوان نقش

داشته‌اند [8] که یافته‌های این تحقیق در زمینه سلول با نتایج ما همخوانی دارد گرچه در تحقیق ما در گروه سلول نسبت به گروه غشاء اختلاف معنی‌داری دیده نشد.

علیرغم اینکه اکثر نتایج بدست آمده از پیوند سلول‌های بنیادی نشان‌دهنده تسریع در روند ترمیم استخوان می‌باشد و بسیاری از این نتایج با یکدیگر و با یافته‌های تحقیق حاضر مشابهت دارند ولی در تعدادی از تحقیقات، نتایج متفاوت با یافته‌های ما نیز دیده می‌شوند. برای مثال نتایج Stockman و همکاران را میتوان ذکر نمود زیرا ایشان پس از پیوند اتولوگ سلول‌های استرومائی مغز استخوان همراه با داربست کلاژن در محل نقص استخوان جمجمه خوک، و بررسی‌های هیستولوژیک ایشان نشان داد که میزان کال استخوانی سی روز بعد از پیوند در گروه تجربی که پیوند سلول همراه با کلاژن دریافت کرده‌اند در مقایسه با گروه کنترل که در آنها تنها از کلاژن استفاده شده بود، افزایش معنی‌داری نداشت. [31]، که این یافته‌ها تا حدی متفاوت با نتایج هیستومورفومتری ما و تعداد زیادی از محققین می‌باشد [1.2.13.23.24.26.27.30]. چنین به نظر می‌رسد که پیوند سلول‌های بنیادی مشتق از چربی، در محل نقص استخوان سبب تمایز و تبدیل این سلول‌ها به استئوبلاست و تسریع روند استخوان‌سازی می‌شوند. در واقع، پیوند سلول‌های بنیادی مشتق از چربی به محل نقص استخوان، میزان روند استئوژنز را در استخوان بالا برده که نتیجه آن، افزایش سرعت تشکیل و تحکیم کال استخوانی می‌باشد. ترمیم نقص استخوان پس از پیوند سلول‌های ADSCs و تمایز به سلول‌های استخوانی، اجزای ضروری برای تشکیل استخوان را فراهم می‌آورد.

موثری را ایفا نموده است که می‌تواند روش سودمندی برای درمان پوکی استخوان به حساب آید [24]. همچنین تحقیق Abukawa و همکاران در سال 2004 بوده است که بر روی خوک انجام شده و پیوند اتولوگ از سلول‌های بنیادی مشتق از چربی در خوک که با D اسید L-لاکتیک گلیکولیک کشت داده و به فک پایین آسیب دیده منتقل گردیدند، بررسی محل نقص استخوانی نشان داد که بافت استخوانی تشکیل شده در محل آسیب در گروه درمانی نسبت به گروه شاهد افزایش قابل ملاحظه‌ای داشته است [1]. در تحقیق دیگری که در سال ۲۰۱۰ توسط Nather و همکاران او صورت گرفت از پیوند اتولوگ سلول‌های بنیادی مزانشیمی برای ترمیم آلوگرافت نقص استخوان فمور در خرگوش استفاده گردید و نتایج آن بهبود وضعیت ترمیم استخوان و افزایش سلول‌های استخوانی در ناحیه دیافیز فمور متعاقب پیوند آلوگرافت بوده است [27]. که تمامی نتایج این محققین در راستای یافته‌های تحقیق ما نیز می‌باشد.

همچنین نتایج مثبتی از پیوند سلول‌های بنیادی در ترمیم نقص استخوانی و با استفاده از داربست ساخته شده توسط Dupont گزارش شده است گرچه ایشان نتوانستند سلول‌های بنیادی پیوند زده شده را در محل ترمیم استخوان ردیابی و شناسایی کنند [13]. در تحقیق دیگری که Cao و همکاران بر روی مدل حیوانی بزهای استئوپروتیک انجام دادند و از پیوند اتولوگ سلول‌های MSCs برای درمان استئوپروز استفاده کردند. پس از بررسی‌های هیستومورفومتری استخوان‌های فمور این حیوانات بعد از شانزده هفته نشان دادند که تراکولاهای استخوانی و نیز تعداد تراکولوها در ناحیه نقص استخوانی در گروه‌های تجربی نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری

نتیجه‌گیری

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

تشکر و قدردانی

این مطالعه با پشتیبای مرکز تحقیقات ترومای دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج) انجام گردید، که بدین وسیله تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

- [6] Bruder SP, Kraus KH, Goldberg VM, Kadiyala S. 1998. The effect of implants loaded with autologous mesenchymal stem cells on the healing of canine segmental bone defects. *J Bone Joint Surg Am*; 80:985-996.
- [7] Bunnell BA, Flaatt M, Gagliardi C, Patel B, Ripoll C. 2008. Adipose-derived stem cells: Isolation, expansion and differentiation. *Methods*; 45:115-20.
- [8] Cao L, Liu, G. Gan, Y. Zhang, X. Tang, T. Dai, K. et al. (2012). The use of autologous enriched bone marrow MSCs to enhance osteoporotic bone defect repair in long-term estrogen deficient goats. *Biomaterials* 33 و 5076e5084.
- [9] Cheryl, T., Gomillion, Karen J.L. 2006, Stem cells and adipose tissue engineering. *Biomaterials*; 27: 6052-6063.
- [10] Choi JH, Gimble JM, Lee K, Marra KG, Rubin JP, Yoo JJ, et al. 2010. Adipose tissue engineering for soft tissue regeneration. *Tissue Eng Part B Rev*; 16 (4): 413-26.
- [11] Crha, M. Nečas, A. Srnec, R. Janovec, J. Stehlík, L. Raušer, P. et al. (2009). Mesenchymal Stem Cells in Bone Tissue Regeneration and Application to Bone Healing. *ACTA VET. BRNO*, 78: 635-642.
- [12] De Ugarte DA, Morizono K, Elbarbary A, Alfonso Z, Zuk PA, Zhu M, et al. 2003. Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. *Cells Tissues Organs*; 174(3): 101-9.
- [13] Dupont KM, Sharma K, Stevens HY, Boerckel JD, García AJ, Guldberg RE. 2010. Human stem cell delivery for treatment of large segmental bone defects. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Feb 23; 107 (8): 3305-10.
- [14] Elahi M, Kabirsoleimani M, Shiravi A. 2011. Investigate the possibility of using enzymes to extract mesenchymal stem cells from human adipose tissue. *J Med Res*; 4 (35): 200-80. [Persian]
- [15] Fan J, Varshney RR, Ren L, Cai D, Wang DA. 2009. Synovium-derived mesenchymal stem cells: A new cell source for musculoskeletal regeneration. *Tissue Eng Part B Rev*; 15:75-86. [PubMed]
- [1] Abukawa H, Shin M, Williams WB, Vacanti JP, Kaban LB, Troulis MJ. 2004. Reconstruction of mandibular defects with autologous tissue-engineered bone. *J Oral Maxillofac Surg*; 62:601-6. [PubMed]
- [2] Arthur, A. Zannettino, A AND Gronthos, S. 2009. The Therapeutic Applications of Multipotential Mesenchymal Stromal Stem Cells in Skeletal Tissue Repair. *J. Cell. Physiol.*, 218: 237-245.
- [3] Ashton BA, Allen RD, Howlett CR, Eaglesom CC, Hatton A, Owen M. 1980. Formation of bone and cartilage by marrow stromal cells in diffusion chambers in vivo. *Clin Orthop Relat Res*; (151):294-307.
- [4] B. Niechoda, Y. Yu and W.R. Walsh. 2000. Healing bone with adipose tissue derived stromal stem cells - the histomorphometry of the ovine defect model. Orthopaedic Research Laboratories, Prince of Wales Hospital, University of New South Wales, Sydney, Australia :
- [5] Brownlow HC, Simpson AH. 2000. Metabolic activity of a new atrophic nonunion model in rabbits. *J Orthop Res May*; 18(3):438-42.

- [16] Gimble JM, Katz AJ, Bunnell BA. 2007. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circ Res*; 100 (9):
- [17] Goldberg V.M. and Caplan A.I., 2004. *Orthopedic Tissue Engineering*, Marcel Dekker, New York, Chap. 1.
- [18] Habraken, W., J. G. C. Wolke, and J. A. Jansen, 2007. Ceramic composites as matrices and scaffolds for drug delivery in tissue engineering. *Advanced drug delivery reviews*, 59 (4): p. 234-248.
- [19] Haghghat A, Hekmatian E, Abdinian M, Sadeghkhan E. 2011. Radiographic Evaluation of Bone Formation and Density Changes after Mandibular Third Molar Extraction: A 6 Month Follow up. *Dent Res J*; 8: 1–5. [PMC free article] [PubMed]
- [20] Hollister, S. J. 2005. Porous scaffold design for tissue engineering. *Nature materials*, 4(7): p. 518-524.
- [21] Hong SR, Lee SJ, Shim JW, Choi YS, Lee YM, Song KW, et al. 2001. Study on gelatin-containing artificial skin IV: A comparative study on the effect of antibiotic and EGF on cell proliferation during epidermal healing. *Biomaterials* ; 22(20): 2777-83
- [22] Huang Y, Onyeri S, Siewe M, Moshfeghian A, Madihally SV. 2005. In vitro characterization of chitosan-gelatin scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials*; 26(36): 7616-27.
- [23] Kim KM, Evans GRD. 2005. Tissue Engineering: The Future of Stem Cells. In: Ashammakhi N, Reis RL, editors. *Topics in tissue engineering*.
- [24] Kyunghee Lee, Hyunsoo Kim, Jin-Man Kim, Jae-Ryong Kim, Keuk-Jun Kim, Yong-Jin, Se-Il Park, Jae-Ho Jeong, Young-mi Moon, Hyun-Sook Lim, Dong-Won Bae, Joseph Kwon, Chang-Yong Ko, Han-Sung Kim, Hong-In Shin, Daewon Jeong. (2011), Systemic transplantation of human adipose-derived stem cells stimulates bone repair by promoting osteoblast and osteoclast function, *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, J. Cell. Mol. Med. Vol 15, No 10, 2011
- [25] Liao D, Gong P, Li X, Tan Z, Yuan Q. 2010. Co-culture with Schwann cells is an effective way for adipose-derived stem cells neural transdifferentiation. *Arch Med Sci.*; 6 (2): 145-51.
- [26] Liu B¹, Cui L, Liu GP, Cao YL, Zhu JT, Cao Y. (2009), Tissue-engineering bone with ADSCs and coral scaffold for repairing of cranial bone defect in canine. *Zhonghua Zheng Xing Wai Ke Za Zhi*. 2009. May; 25(3):204-8.
- [27] Nather A, David V, Teng JW, Lee CW, Pereira BP. 2010. Effect of autologous mesenchymal stem cells on biological healing of allografts in critical-sized tibial defects simulated in adult rabbits. *Ann Acad Med Singapore*. Aug; 39(8):599-606.
- [28] Nichol JW, Khademhosseini A. 2009. *Modular Tissue Engineering: Engineering Biological Tissues from the Bottom Up*. *Soft Matter*; 5(7):13129.
- [29] Olszta, M. J., Olszta, M. J., Cheng, X., Jee, S. S., Kumar, R., Kim, Y. Y., Kaufman, M. J., Douglas, P., Gower, L. B., 2007. Bone structure and formation: A new perspective. *Materials Science and Engineering: R: Reports*, 58(3): p. 77-116.
- [30] Schliephake H, Zghoul N, Jager V, van Griensven M, Zeichen J, Gelinsky M, et al. 2009. Bone formation in trabecular bone cell seeded scaffolds used for reconstruction of the rat mandible. *Int J Oral Maxillofac Surg*; 38:166–72. [PubMed]
- [31] Stockmann, Ph. Park, J. Wilmowsky, v. Nkenke, C. Felszeghy, E. Friedrich, J. et al. 2012. 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*, 40; 310e320.
- [32] Wilson, ADH., Hart, A., Brannstrom, T., Wiberg, M., Terenghi, G., 2003, Primary sensory neuronal rescue with systemic acetyl-L-carnitine following peripheral axotomy, A dose-response analysis, *British Journal of Plastic Surgery*, 56:732-739.
- [33] Yoshimura H, Muneta T, Nimura A, Yokoyama A, Koga H, Sekiya I. 2007; Comparison of rat mesenchymal stem cells derived from bone marrow, synovium, periosteum, adipose tissue, and muscle. *Cell Tissue Res*. 327(3): 449-62.

