

ارزیابی تأثیر سلول‌های بنیادی مشتق از اسپیره مغز استخوان در مراحل ابتدایی ترمیم جراحات زردپی خم کننده عمقی بندهای انگشت در خرگوش: مطالعه بیومکانیکی و ایمونوهیستوشیمی

دکتر سارا جوانمردی^۱، دکتر فرشید صرافزاده رضایی^۲، دکتر نوروز دلیرز^۳، دکتر رحیم حب نقی^۴

تاریخ دریافت: 90/07/27 تاریخ پذیرش: 90/08/29

چکیده

پیش زمینه و هدف: جراحات زردپی جز رایج‌ترین جراحات بدن می‌باشند. زردپی التیام یافته برای بدست آوردن قدرت کششی کافی به منظور تحمل بارهای فیزیولوژیکی نیاز به تثبیت به مدت چند هفته دارد. مهندسی بافت با سلول درمانی موجب ترمیم بافت‌های مریض و آسیب دیده می‌شود. هدف از مطالعه حاضر بررسی اثر تزریقی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان به صورت داخل زردپی بر سرعت و وسعت ترمیم در مراحل ابتدایی ترمیم جراحات زردپی خم کننده عمقی بندهای انگشت بعد از التیام اولیه در خرگوش می‌باشد.

مواد و روش کار: ۲۷ قطعه خرگوش سفید نیوزلندی بالغ با وزن ۱/۸ تا ۲/۵ کیلوگرم مورد استفاده قرار گرفتند. ۲۰ قطعه از خرگوش‌ها به عنوان حیوانات آزمایشی و هفت قطعه باقیمانده به عنوان منبع تهیه سلول‌های بنیادی مزانشیمی الوژن مشتق از مغز استخوان (bMSCs) مورد استفاده قرار گرفتند. تحت بیپوشی عمومی، عمل تنوتومی تجربی در قسمت میانی زردپی خم کننده عمقی بند انگشتان انجام گرفت. زردپی قطع شده بلافاصله با استفاده از الگوی حلقه بسته شده بخیه شد. در گروه کنترل هیچ گونه درمانی صورت نگرفت در گروه درمان، سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان داخل زردپی در محل ضایعه زردپی و اطراف ضایعه تزریق شد. اندام‌های حرکتی جراحی شده به مدت دو هفته بعد از عمل گچ گرفته شدند. در هفته سوم بعد از جراحی نمونه‌های زردپی برای ارزیابی‌های بیومکانیکی و ایمونوهیستوشیمی اخذ گردیدند.

یافته‌ها: یافته‌های بیومکانیکی نشان داد که فراسنج‌های بیومکانیکی در گروه درمان شده با سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان در هفته سوم نسبت به گروه کنترل افزایش داشت ($P < 0.05$) یافته‌های ایمونوهیستوشیمی افزایش میزان تولید رشته‌های کلاژن نوع ۱ متراکم‌تر و منظم‌تری را در گروه درمان شده با سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از اسپیره مغز استخوان نسبت به گروه کنترل نشان داد.

نتیجه گیری: کاربرد داخل زردپی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان باعث بهبود معنی‌دار مشخصات بیومکانیکی و ایمونوهیستولوژیکی در مراحل اولیه التیام زردپی شد. دوره اولیه التیام زردپی جزء مراحل حیاتی در ترمیم زردپی می‌باشد.

کلید واژگان: سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان، زردپی خم کننده عمقی بند انگشتان، خرگوش، بیومکانیک، ایمونوهیستوشیمی

مجله پزشکی ارومیه، دوره بیست و دوم، شماره ششم، ص ۵۲۹-۵۲۱، بهمن و اسفند ۱۳۹۰

آدرس مکاتبه: ارومیه درمانگاه تخصصی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه - بخش علوم درمانگاهی، تلفن: ۰۹۱۴۱۴۱۱۴۱۸

Email: f.sarrafzadeh@urmia.ac.ir

مقدمه

عمل می‌نماید. یکی از وظایف زردپی انتقال نیروی ناشی از انقباض عضلات به استخوان‌ها می‌باشد (۱-۳). وارد آمدن آسیب به این ساختار منجر به توقف انتقال نیرو و فقدان انجام فعالیت

زردپی یک نوار سفت و سخت فیبروزی از بافت هم‌بند است که به عنوان ساختار واسطه اتصال دهنده عضله به استخوان

^۱ دانشجوی دوره تخصصی جراحی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه

^۲ دانشیار بخش جراحی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه (نویسنده مسئول)

^۳ استادیار بخش میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه

^۴ دانشیار بخش پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه

فیزیکی می‌گردد. جراحات زردپی به دلیل کار زیاد در ورزشکاران، حیوانات نژادهای ورزشی و باربر، از جراحات رایج اندام‌های حرکتی در طب انسانی و دامی می‌باشند. جراحات زردپی می‌تواند به اشکال گوناگون از التهاب زردپی تا پارگی‌های ناقص زردپی، پارگی‌های کامل زردپی بدون ایجاد نقیصه و پارگی‌های کامل زردپی با ایجاد نقیصه و فاصله بین دو انتهای زردپی قطع شده مطرح باشند. بروز این جراحات علاوه بر صرف هزینه بالا برای حفظ سلامتی بیمار باعث ابتلای فردی نیز می‌شود که باعث کاهش یا فقدان کارایی فردی می‌گردد (۴). درمان موفق جراحات این ساختار تحت تأثیر فاکتورهایی از جمله آهسته و بطئی بودن ذاتی روند التیام زردپی، عدم کسب مجدد قدرت کششی و ارتجاعی در حد زردپی سالم و میزان شیوع و عود مجدد بالای جراحات زردپی التیام یافته، با مشکلات و موانعی همراه است (۵).

روش‌های گوناگونی برای رفع این معضلات مطرح می‌باشند، که با وجود نقاط قوت و ضعف به فراوانی مورد بحث و بررسی محققان می‌باشند. اقدامات جراحی، دارو درمانی و بهره‌گیری از روش‌های توان بخشی از این دست اقدامات هستند. علی‌رغم بهبود فن‌های جراحی و پیشرفت رژیم‌های درمانی بعد از عمل، پارگی محل ترمیم یافته و ایجاد چسبندگی‌های محدود کننده در ناحیه، از عواقب ناخواسته جراحی می‌باشند (۷،۶). بافت زردپی آسیب دیده برای التیام خود نیاز به هشت هفته تثبیت دارد تا قدرت کششی کافی به دست آورد (۹،۸). متأسفانه تثبیت طولانی مدت اندام یا مفصل ممکن است باعث اتروفی عضلانی و غضروف مفصلی، استیوآرتریز، نکروز پوستی، چسبندگی‌های ناحیه زردپی - جلد و ترومبولیت شود. برای تسریع روند التیام زردپی روش‌های جدیدی نیاز است (۱۱،۱۰). شیوه نوین درمان شامل استفاده از سلول‌های تمایز نیافته‌ای - تحت عنوان سلول‌های بنیادی - است که قدرت تجدید خود را از طریق تقسیم و همانند سازی دارا بوده و قادر به تمایز به رده‌های خاص سلولی می‌باشند (۱۲). منابع متعدد برای دستیابی به این سلول‌ها وجود دارد، اغلب سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان منبع ایده‌آلی برای این سلول‌ها می‌باشند (۱۴،۱۳). سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از اسپیره مغز استخوان وقتی به بافت همبندی التیامی انتقال می‌یابند به سلول‌های فیبروبلاستی شکل تمایز پیدا می‌کنند (۱۶-۱۴). نقش دقیق سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان قرار داده شده در زردپی در التیام آن نامعلوم است. تمایز این سلول‌ها به تنوسیت‌ها در بافت زردپی التیامی و شرکت در پروسه التیام از طریق تولید و تبدیل کلژن یکی از احتمال‌ها است. احتمال بعدی نقش سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان در التیام زردپی از طریق عمل کردن به صورت

پمپ‌های فاکتور رشد است (۱۵،۱۴،۸). در مطالعه حاضر اثر تزریقی سلول‌های بنیادی مزانشیمی الوژن مشتق از اسپیره مغز استخوان داخل زردپی بر سرعت و وسعت ترمیم در مراحل ابتدایی ترمیم جراحات زردپی خم کننده عمقی بندهای انگشت بعد از التیام اولیه در خرگوش مورد بررسی قرار می‌گیرد.

این واقعیت که سلول‌های بنیادی مزانشیمی از رد پیوند آلوژنیک در انسان و حیوانات جلوگیری می‌کنند با مطالعات کشت توأم در آزمایشگاه نیز تایید شده است (۱۹،۱۸،۱۷،۱۵). البته سلول‌های آلوژن پیش‌تر نیز کاربرد موفقیت آمیزی در مهندسی بافت داشته‌اند (۲۱،۲۰،۱۳،۸). مطالعات متعدد روی التیام زردپی نشان داده است که تثبیت اولیه کوتاه مدت زردپی برای التیام آن ضروری بوده و باعث تسریع روند التیام بافت زردپی می‌شود (۱۱،۱۰،۸) بدین منظور در مطالعه حاضر اندام‌های حرکتی جراحی شده در گروه‌های کنترل و درمان به مدت دو هفته بعد از عمل گچ‌گیری شدند.

مواد و روش کار

حیوانات:

در این بررسی تعداد ۲۷ قطعه خرگوش سفید نیوزیلندی با وزن تقریبی ۱/۹ تا ۲/۵ کیلوگرم مورد استفاده قرار گرفتند. شیوه مراقبت از حیوانات و روش اجرایی طرح توسط کمیته علمی نگهداری از حیوانات دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه مورد تایید قرار گرفتند. هفت قطعه از خرگوش‌ها به عنوان منبع تهیه سلول‌های بنیادی الوژن مشتق از اسپیره مغز استخوان (bMSCs) مورد استفاده قرار گرفتند. ۲۰ قطعه از خرگوش‌ها در دو گروه مساوی کنترل و درمان برای ارزیابی بیومکانیک (به منظور تعیین حداکثر نیروی قابل تحمل توسط زردپی میزان نیرو در نقطه تسلیم و میزان سفتی) و ارزیابی ایمونوهیستوشیمی برای تعیین نوع و میزان کلژن تولید شده تحت عمل جراحی قرار گرفتند.

روش اخذ و کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از

اسپیره مغز استخوان:

بعد از القاء بیهوشی با استفاده از ۳۵ میلی گرم به ازی هر کیلوگرم وزن حیوان عضلانی کتامین، (Ketamine 5%, Alphasan Woerden, Holland) ۵ میلی گرم به ازی هر کیلوگرم وزن حیوان عضلانی زایلازین (Xylazine 2%, Alphasan, Woerden, Holland) و یک میلی گرم به ازی هر کیلوگرم وزن حیوان عضلانی آسه پرومازین (Acepromazine 2%, Hooogostraten, Belgium) تحت شرایط آسپتیک اقدام به اسپیره نمودن نمونه مغز استخوان از ناحیه ستیغ استخوان خاصره شد (۲۲،۲۰،۸). نمونه حاصل از اسپیره مغز

می‌شدند. در این پنج قطعه علاوه بر برداشت نمونه از پای عمل شده از پای سالم نیز به عنوان کنترل خودی نمونه برداری می‌شد. نمونه‌ها در داخل گاز استریل که آغشته به محلول نرمال سالین بود قرار گرفته و به همراه زردپی مربوط به پای مقابل در داخل ورقه آلومینیومی (فویل) قرار داده شده به فریزر -20°C درجه سانتی‌گراد منتقل می‌شدند تا در فرصت مناسب تحت آزمایشات بیومکانیکی قرار گیرند (۲۰). در روز ارزیابی بیومکانیکی نمونه‌ها در دمای محیط آزمایشگاه قرار داده می‌شدند تا به مرور از حالت انجماد خارج شده و برای تست کشش آماده گردند. برای انجام ارزیابی بیومکانیک ابتدا برای جلوگیری از لیز خوردن زرد پی درون فک‌های دستگاه کشش، نمونه زردپی از هر دو انتها درون کاغذ سمباده قرار می‌گرفت و به دستگاه کشش هانسفیلد مدل H10KS وصل می‌شد. برای انجام آزمایش از سرعت ثابت پنج سانتی‌متر در دقیقه استفاده می‌شد. دستگاه مورد استفاده، برای آنالیز داده‌های حاصل از تست کشش به رایانه متصل بوده و هم‌زمان با انجام تست کشش، منحنی نیرو-تغییر طول توسط دستگاه کشش رسم و برای آنالیز به رایانه منتقل می‌گردید.

متعاقب بررسی منحنی‌های حاصل از تست کشش، فراسنج‌های بیومکانیکی همچون حداکثر نیروی قابل تحمل توسط زردپی بر حسب نیوتن، میزان نیرو در نقطه تسلیم بر حسب نیوتن و میزان سفتی بافت بر حسب نیوتن بر میلی‌متر در بین گروه درمان شده با سلول‌های بنیادی مشتق از آسپیره مغز استخوان و گروه کنترل در هفته سوم بعد از عمل مورد بررسی و مقایسه قرار گرفتند. با افزایش میزان نیروی کششی به تدریج پاره شدن تارهای کلاژن آغاز می‌شود که نقطه شروع این حالت نقطه تسلیم (میزان نیرو در نقطه تسلیم) می‌باشد. حداکثر قدرت کشش (حداکثر نیروی قابل تحمل توسط زردپی) به نیرویی اطلاق می‌شود که زردپی بدون پاره شدن کامل قادر به تحمل آن باشد. برای بدست آوردن میزان سفتی بافت، شیب منحنی نیرو - تغییر طول در منطقه خطی (تانژانت زاویه منحنی نیرو - تغییر طول در منطقه خطی) مورد محاسبه قرار می‌گرفت.

زردپی‌های ده قطعه خرگوش باقی مانده در گروه درمان و کنترل جهت مطالعات ایمونوهیستوشیمی مورد استفاده قرار می‌گرفتند. بدین منظور نمونه‌های زردپی درون فرمالین 10% قرار گرفته و ثابت شدند. سپس به روش استاندارد پارافینه شدند، بلوک‌های پارافین حاوی نمونه زردپی جهت برش به قطر $5\mu\text{m}$ مورد استفاده قرار گرفتند. جهت رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی ابتدا نمونه‌های برش یافته با استفاده از زایلن و الکل و آب به روش متداول آنگیری شدند. سپس نمونه‌ها به مدت نیم ساعت با 0.1mg.ml^{-1} هیالورونیداز (شرکت سیگما-آمریکا) انکوبه شدند

استخوان با 1000 IU هپارین به ازی هر میلی لیتر نمونه مخلوط شد. سپس جداسازی سلول‌های هسته دار به روش شناورسازی بر اساس غلظت روی فایکول انجام گردید. سلول‌های جدا شده، با محیط کشت حاوی DMEM DMEM، شرکت سیگما-آمریکا، 15% سرم جنین گاو (Gibco, FBS, 1 IU.ml^{-1} ، پنی سیلین) نصر فریمان-ایران و 100 mg.ml^{-1} استرپتومایسین (نصر فریمان - ایران) مخلوط و سانتی‌فیوژ گردیدند. شمارش سلول‌های هسته دار با استفاده از لایم نوبار انجام گرفت. سلول‌های هسته دار با غلظت 5 میلیون به ازی فلاسک T75 منتقل و در انکوباتور 37°C با غلظت 5% درصد، CO_2 انکوبه شدند. متعاقباً به فاصله هر دو روز یک‌بار محیط کشت با همان نوع محیط کشت تعویض می‌گردید. در روز پنجم، اقدام به جدا نمودن و حذف سلول‌های غیر چسبیده و کشت مجدد سلول‌های چسبیده می‌شد. زمانی که 75% درصد تا 80% درصد فلاسک با سلول پر می‌شد (تقریباً روز چهاردهم)، با استفاده از تریپسین سلول‌های چسبیده به کف فلاسک جداسازی شده و کشت مجدد آن‌ها انجام می‌گرفت. نهایتاً از سلول‌های پاساژ دوم در این مرحله برای انتقال به جراحات تجربی ایجاد شده در زردپی‌های خم کننده عمقی بندهای انگشت اندام‌های مورد مطالعه استفاده گردید (۱۳، ۱۴، ۲۱) (تصویر شماره ۱).

روش جراحی

بعد از القاء بیهوشی به روش معمول تحت شرایط آسپتیک عمل جراحی تنوتومی کامل تجربی بر روی زردپی خم کننده عمقی بندهای انگشتان انجام شد (۲۲). در مرحله بعد زردپی بریده شده، با الگوی حلقه بسته شده و نخ نایلون $3-0$ بخیه شد. در حیوانات مدل در گروه درمان سلول‌های بنیادی مشتق از آسپیره مغز استخوان به تعداد $3-2$ میلیون سلول در محل ضایعه به صورت داخل زردپی و همچنین اطراف ضایعه تزریق گردید. بخیه پوست به روش معمول انجام شد. در حیوانات گروه کنترل عمل جراحی تنوتومی کامل تجربی بر روی زردپی خم کننده عمقی بندهای انگشتان دقیقاً مشابه حیوانات گروه درمان انجام و پوست به همان روش بخیه گردید با این اختلاف که در خرگوش‌های این گروه، به همان حجم نرمال سالین در محل ضایعه به صورت داخل زردپی و همچنین اطراف ضایعه تزریق گردید. اندام‌های حرکتی در حیوانات جراحی شده در هر دو گروه (درمان و کنترل) به مدت دو هفته گچ گرفته شدند.

نمونه برداری برای انجام مطالعات بیومکانیکی و ایمونوهیستوشیمی:

در هفته سوم بعد از عمل، پنج قطعه خرگوش از گروه درمان و پنج قطعه از گروه کنترل برای آزمایشات بیومکانیک انتخاب

هفته سوم بعد از عمل مورد بررسی و مقایسه قرار گرفتند. افزایش مقادیر فرانسج‌های بیومکانیکی فوق‌الذکر در گروه‌های درمان در مقایسه با گروه‌های کنترل منتج به کاهش مقادیر نسبت‌های مقادیر مزبور در گروه درمان گردید (جدول شماره یک). کاهش نسبت حداکثر نیروی قابل تحمل و میزان نیرو در نقطه تسلیم زردپی‌های گروه درمان در مقایسه با گروه کنترل از نظر آماری معنی‌دار بود. ($P < 0.05$)

ارزیابی ایمنووهیستوشیمی

میزان تولید کلاژن نوع ۱ در گروه درمان شده با سلول‌های بنیادی مشتق از اسپیره مغز استخوان نسبت به گروه کنترل افزایش داشته است. در محل ضایعه در گروه درمان شده با سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از اسپیره مغز استخوان رشته‌های کلاژن نوع ۱ متراکم‌تر و منظم‌تری نسبت به گروه کنترل مشاهده شدند. در محل ترمیم در گروه درمان و کنترل کلاژن نوع ۳ دیده شد که رفته رفته در محل‌های بالاتر و پایین‌تر محل ضایعه از تراکم آن‌ها کاسته می‌شد. میزان کلاژن نوع ۳ در گروه کنترل نسبت به گروه درمان بیشتر بود. (تصویر شماره دو و سه).

ارزیابی بیومکانیک

نتایج ارزیابی بیومکانیک در جدول شماره یک خلاصه شده است. نسبت مقادیر بدست آمده از هر یک از فرانسج‌های بیومکانیکی شامل حداکثر نیروی قابل تحمل توسط زردپی بر حسب نیوتن، میزان نیرو در نقطه تسلیم بر حسب نیوتن و میزان سفتی بافت بر حسب نیوتن بر میلی‌متر در بین گروه درمان شده با سلول‌های بنیادی مشتق از اسپیره مغز استخوان و گروه کنترل در هفته سوم بعد از عمل مورد بررسی و مقایسه قرار گرفتند. افزایش مقادیر فرانسج‌های بیومکانیکی فوق‌الذکر در گروه‌های درمان در مقایسه با گروه‌های کنترل منتج به کاهش مقادیر نسبت‌های مقادیر مزبور در گروه درمان گردید (جدول شماره یک). کاهش نسبت حداکثر نیروی قابل تحمل و میزان نیرو در نقطه تسلیم زردپی‌های گروه درمان در مقایسه با گروه کنترل از نظر آماری معنی‌دار بود. (تصویر شماره ۴) □ ($P < 0.05$).

جدول شماره (۱): نتایج ارزیابی بیومکانیک (*انحراف معیار ± میانگین)

حداکثر نیروی قابل تحمل (نیوتن)	میزان نیرو در نقطه تسلیم (نیوتن)	میزان سفتی بافت (نیوتن بر میلی‌متر)
گروه کنترل (۵ قطعه) $8/28 \pm 4/45^a$	$8/91 \pm 5/06^b$	$1/19 \pm 0/43$
گروه درمان (۵ قطعه) $2/91 \pm 1/08^a$	$3/39 \pm 0/99^b$	$0/82 \pm 0/21$

* ارقام مندرج در جدول نشان‌دهنده نسبت مقادیر بدست آمده از هر یک از فرانسج‌های بیومکانیکی از اندام حرکتی کنترل خودی بر اندام حرکتی درمان می‌باشند.

حروف مشترک در هر ستون، دارای اختلاف آماری معنی‌دار می‌باشند. ($p = 0.029$)^b، ($p = 0.009$)^a.

آنتی بادی اولیه منوکلونال موش بر علیه کلاژن‌های نوع ۱ و ۳ به نسبت ۱/۴۰۰ رقیق شده به نمونه‌ها اضافه و نمونه‌ها به مدت یک ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. در مرحله بعدی نمونه‌ها با بافر نمکی فسفات (PBS) شستشو داده شدند. سپس آنتی بادی ثانویه کنژوگه شده با هورس ردش پراکسیداز (HRP) داکو-دانمارک) اضافه شده و به مدت نیم ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند و بعد از شستشو با بافر نمکی فسفات (PBS) به مدت ده دقیقه در معرف کروموژن قرار گرفتند (داکو-دانمارک) برای رنگ آمیزی زمینه نمونه‌ها با همتاکسیلین رنگ آمیزی شده و زیر میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفتند (۲۵،۲۴،۲۳،۸).

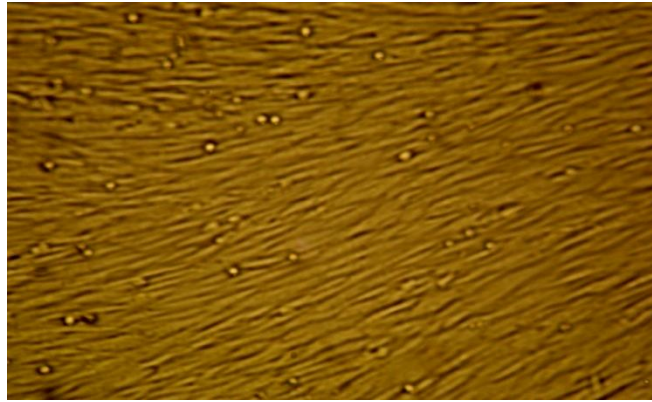
آنالیز آماری:

داده‌ها در نرم افزار آماری PASW18 وارد و مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. برای تعیین تأثیر سلول‌های بنیادی مشتق از اسپیره مغز استخوان در ترمیم جراحات زردپی خم کننده عمقی بندهای انگشت در خرگوش در هر یک از دو گروه مورد نظر (کنترل و درمان هفته سوم) نسبت مقادیر بدست آمده از هر یک از پارامترهای تحت بررسی از اندام حرکتی کنترل بر اندام حرکتی درمان تعیین شد و از آزمون تجزیه واریانس و در ادامه از آزمون Tukey برای مقایسه عملکرد گروه‌ها استفاده شد. در تمام آنالیزها مقادیر $P < 0.05$ به عنوان سطح اختلاف آماری معنی‌دار انتخاب شدند.

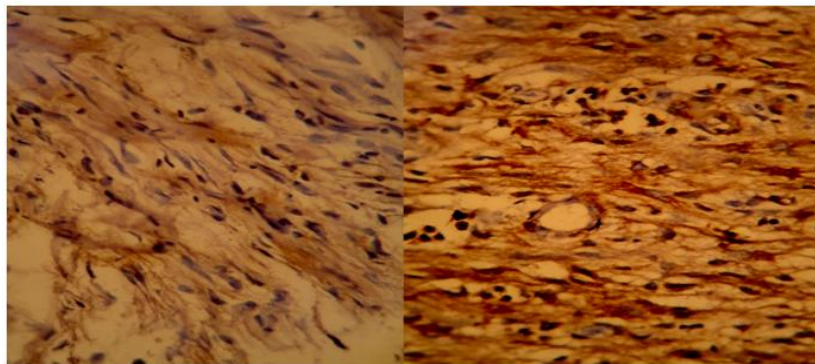
یافته‌ها

ارزیابی بیومکانیک

نتایج ارزیابی بیومکانیک در جدول شماره یک خلاصه شده است. نسبت مقادیر بدست آمده از هر یک از فرانسج‌های بیومکانیکی شامل حداکثر نیروی قابل تحمل توسط زردپی بر حسب نیوتن، میزان نیرو در نقطه تسلیم بر حسب نیوتن و میزان سفتی بافت بر حسب نیوتن بر میلی‌متر در بین گروه درمان شده با سلول‌های بنیادی مشتق از اسپیره مغز استخوان و گروه کنترل در

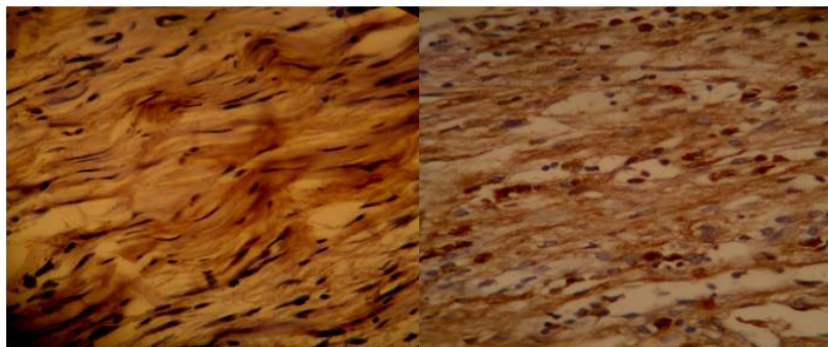


تصویر (۱): سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از آسپیره مغز استخوان خرگوش که دوکی شکل و شبه فیبروبلاست می‌باشند. بزرگنمایی $100\times$



تصویر (۲): کلاژن نوع ۱ گروه درمان (الف) گروه کنترل (ب) بزرگنمایی $400\times$

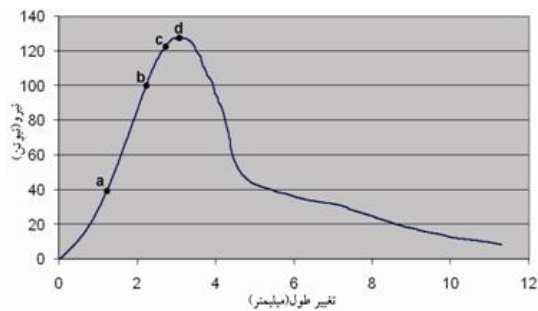
در محل ضایعه در گروه درمان شده با سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از آسپیره مغز استخوان رشته‌های کلاژن نوع ۱ زی‌ادتر و متراکم‌تر و سازمان یافته تری نسبت به گروه کنترل (که سلول‌های بنیادی مشتق از آسپیره مغز استخوان دریافت نکرده‌اند) مشاهده می‌شود.



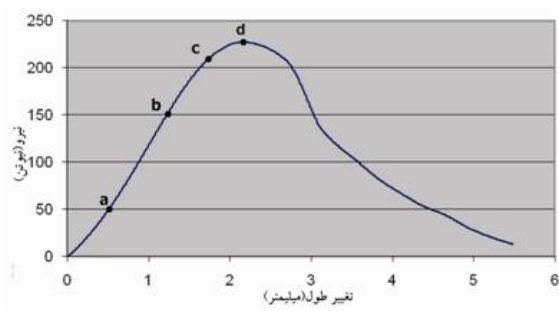
تصویر (۳): کلاژن نوع ۳ گروه درمان (الف) و گروه کنترل (ب) بزرگنمایی $400\times$

در محل ترمیم در هر دو گروه درمان و کنترل کلاژن نوع ۳ دیده می‌شود. میزان کلاژن نوع ۳ در گروه کنترل نسبت به گروه درمان بالاتر

است



ب



الف

تصویر (۴): منحنی نیرو - تغییر طول.

a-b: ناحیه خطی، سفتی بافت؛ برابر شیب منحنی نیرو - تغییر طول در منطقه خطی

c: میزان نیرو در نقطه تسلیم؛ نقطه شروع پاره شدن تدریجی تارهای کلاژن

d: حداکثر قدرت کشش؛ حداکثر نیروی قابل تحمل توسط زردپی میزان

الف گروه آزمون میزان نیرو در نقطه تسلیم و حداکثر نیروی قابل تحمل توسط زردپی بیشتر از گروه کنترل می‌باشد. ب گروه کنترل

فرضیه را قبول ندارند. ویدیک طی دو مطالعه به مدت ۴۰ هفته، تمرین روی ماشین دو بر روی تاندون‌های درشت نیی خلفی، نازک نیی و زردپی‌های اشیل خرگوش انجام داد. افزایش ۱۰٪ سفتی در زردپی درشت نیی خلفی و اشیل را گزارش کرد. اما هیچ اختلافی در میزان کلاژن در مقایسه با زردپی‌های تمرین ندیده پیدا نکرد؛ لذا چنین نتیجه‌گیری کرد که اختلاف در میزان قدرت کششی بایستی ناشی از تغییرات کیفی مثل بلوغ و نوع کلاژن باشد تا تغییرات کمی در میزان کلاژن (۲۹،۲۸). میزان نیروهای بیومکانیکی در بافت التیامی زردپی علاوه بر وجود رشته‌های کلاژن، ارتباط مستقیمی به ماده زمینه‌ای موجود در بافت دارد. (۳۴،۳۳،۳۲،۳۱،۳۰،۲۷،۲۶،۲۲).

کلاژن نوع ۳ در بافت زردپی سریعاً توسط فیبروبلاست‌ها پیش از تشکیل رشته‌های کلاژن نوع ۱ در مراحل ابتدایی التیام زردپی به وجود می‌آید و در مرحله اولیه التیام تاندون میزان آن غالب است اما در تاندون بالغ در سطح پایین قرار دارد (۳۵،۲۶). کلاژن نوع ۱ رشته‌های ضخیم‌تر نسبت به کلاژن نوع ۳ بوده و باعث قوی‌تر شدن زردپی و زیاد شدن قدرت کششی آن شده و برای التیام بافت زردپی مطلوب می‌باشد و ۹۵ درصد کل کلاژن‌های زردپی نرمال را شامل می‌شود (۲۷،۵،۴). آرایش مناسب رشته‌های کلاژن در طول ماتریکس خارج سلولی باعث استحکام بیشتر زردپی در برابر نیروهای وارد بر آن می‌شود (۳۶). در مطالعه حاضر رشته‌های کلاژن نوع ۱ منظم و متراکم در گروه درمان نسبت به گروه کنترل بیشتر بوده نشان‌دهنده تبدیل سریع رشته‌های کلاژن نوع ۳ به کلاژن نوع ۱ و تأثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق

بحث

نتایج حاصل از این بررسی نشان می‌دهد که سلول‌های بنیادی مشتق از اسپیره مغز استخوان تزریق شده به صورت داخل زردپی در محل ضایعه و اطراف آن در مراحل ابتدایی روند التیام جراحات زردپی متعاقب ترمیم اولیه شرکت کرده و باعث تسریع روند التیام زردپی شده است. مطالعه حاضر با تکیه بر نتایج بررسی‌های قبلی که حاکی از تأثیر مثبت استفاده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از اسپیره مغز استخوان (bMSCs) تزریق شده به صورت داخل زردپی در تسریع روند التیام در پارگی‌های زردپی انجام گرفته است (۱۶-۱۴).

به طور کلی التیام بافت زردپی نسبت به سایر بافت‌های همبندی با سرعت کمتری انجام می‌گیرد. خصوصیات ساختاری و مکانیکی زردپی التیام یافته نسبت به زردپی نرمال پایین‌تر است و با گذشت زمان، حتی بعد از سپری شدن مدت زمان طولانی هم به سطح نرمال اول قبل از آسیب بر نمی‌گردد. حفظ قدرت کششی از اهداف اصلی التیام بافت زردپی می‌باشد. مطالعات مختلف انجام شده روی زردپی حیوانات نشان داده است که زردپی آسیب دیده هرگز خصوصیات بیومکانیکی و ساختاری نرمال خودش را بدست نمی‌آورد (۲۷،۲۶،۲۰،۱).

کلاژن فراوان‌ترین پروتئین موجود در زردپی است که خصوصیات بیومکانیکی زردپی وابسته به آن است؛ لذا از نظر تئوری شاید فرض بر این باشد که تغییر خصوصیات بیومکانیکی زردپی وابسته به تغییر تراکم کلاژن می‌باشد که به صورت درصد وزن خشک محاسبه می‌شود. در حالی که اکثر مطالعات موجود این

در نقطه تسلیم و میزان سفتی بافت شده است. در یک تحقیق مشابه دیگر، افزایش میزان رشته‌های کلاژن نوع ۱ و افزایش نظم، تراکم و آرایش بافتی آن در مراحل ابتدایی التیام زردپی در ارزیابی ایمنوهیستوشیمی مخصوصاً بهبود خصوصیات بیومکانیکی در گروه درمان نسبت به گروه کنترل بیانگر این مطلب است که سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از آسپیره مغز استخوان (bMSCs) تزریق شده در زردپی به درون بافت التیامی وارد شده‌اند (۲۰).

با در نظر داشتن این مطلب که هدف نهایی از التیام زردپی حفظ قدرت کششی آن می‌باشد و ناتوانی زردپی التیام یافته در برگشت زود هنگام به فعالیت نرمال موجب علاوه بر کاهش یا فقدان کارایی فردی موجب صرف هزینه بالا برای حفظ سلامتی بیمار نیز می‌شود (۸،۴).

نتیجه گیری

شیوه های درمانی که باعث تسریع روند التیام زردپی شده و منجر به کسب قدرت کششی در حداقل زمان بعد از آسیب زردپی گردد و حیوان هر چه سریع‌تر سر پا شده و به فعالیت طبیعی خود برگردد از اهمیت خاصی برخوردار می‌باشند. یافته‌های مطالعه اخیر از نظر بالینی دارای اهمیت می‌باشد زیرا افزایش قدرت کششی و تولید کلاژن‌های نوع ۱ با تراکم و نظم بالا در مراحل ابتدایی التیام بافت زردپی در گروه درمان شده با (bMSCs) مشاهده شد لذا استفاده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از آسپیره مغز استخوان در جراحی‌های زردپی توصیه می‌شود.

تقدیر و تشکر

از همکاری صمیمانه جناب آقای دکتر باقری ریاست محترم دانشکده مواد دانشگاه صنعتی شریف در انجام ارزیابی بیومکانیک سپاس‌گذاری می‌نمایم.

از آسپیره مغز استخوان (bMSCs) در تسریع روند التیام بافت زردپی می‌باشد؛ و کاملاً مطابق با نتایج حاصل از مطالعات گذشته می‌باشد که متعاقب تزریق (bMSCs) داخل زردپی، در هفته سوم بعد از عمل جراحی افزایش تولید کلاژن نوع ۱ با تراکم و نظم بهتر در مرحله ابتدایی ترمیم زردپی مشاهده کردند (۲۶،۲۱،۱۳،۸،۵). بهبود خصوصیات بیومکانیکی در گروه درمان این تحقیق نشان می‌دهد که تزریق (bMSCs) داخل زردپی در محل ضایعه و اطراف آن تأثیر مثبت در روند التیام بافت زردپی در راستای بهبود خصوصیات بیومکانیکی آن دارد که مطابق با یافته‌های حاصل از مطالعات گذشته می‌باشد که نشان داده‌اند تزریق داخل زردپی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از آسپیره مغز استخوان (bMSCs) باعث بهبود خصوصیات بیومکانیکی در هفته سوم بعد از عمل جراحی زردپی شده است (۲۷،۲۲،۲۰،۸). عدم وجود اختلاف معنی‌دار در میزان سفتی بافت در این مطالعه می‌تواند ناشی از اختلافات فنی در نحوه نگهداری نمونه‌ها تا زمان انجام آزمایشات بیومکانیکی نظیر کاهش میزان آب نمونه‌ها و در نتیجه افزایش کاذب میزان سفتی بافت زردپی و وجود اختلاف در روش کار، انجام آزمایشات کشش (پرکاندیشینگ) و نحوه اتصال نمونه‌ها به دستگاه و میزان لیز خوردن نمونه‌ها حین انجام تست‌های کشش باشد. در این ارتباط وجود اختلاف‌های آناتومیک نیز می‌تواند مورد توجه قرار بگیرند از آن جمله می‌توان به میزان طول اولیه نمونه - حد فاصل بین دوگیره دستگاه کشش - و همچنین سطح مقطع زردپی اشاره نمود که مطابق با یافته‌های سایرین می‌باشد (۳۶،۳۳،۳۱). وجود رشته‌های کلاژن نوع ۱ با تراکم و آرایش بافتی منظم‌تر در محل ترمیم در مراحل ابتدایی التیام زردپی توجیه بهبود خصوصیات بیومکانیکی در گروه درمان نسبت به گروه کنترل می‌باشد که کلاژن نوع ۱ تولید شده با آرایش منظم باعث افزایش استحکام بافت زردپی شده در نتیجه باعث افزایش حداکثر نیروی قابل تحمل توسط زردپی، میزان نیرو

healing adult rabbit medial collateral ligament. Connect Tissue Res 1992; 27:251-63.

4. James EC, Kurt DH. Animal models of tendon and ligament injuries for tissue engineering applications. J Biol 2004; 25:1715-22.

5. Dahlgren LA, Mohammed HO, Nixon AJ. Temporal expression of growth factor and matrix molecules in healing tendon lesion. J Orthop Res 2005; 23:84

References:

1. Tony WL, Luis C, Louis JS. Biomechanics of tendon injury and repair. J Biol 2004; 37:865-77.
2. Frank C, Woo SL, Amiel D, Harwood F, Gomb M, Akeson W. Medial collateral ligament healing. A multidisciplinary assessment. Am J Sports Med 1983; 11:379-89
3. Frank C, MC Donald D, Bray D, Bray R, Rangayyan R, Chimich D et al. Collagen fibril diameters in the

6. Deqing H, Gary B, Baby CH. Tendon tissue engineering and gene transfer: the future of surgical treatment. *J Hand Surg* 2006; 5:693-701.
7. Smith P, Jones M, Grobelaar A. Two stage grafting of flexure tendons: results after mobilization by controlled early active movement. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg* 2004; 38:220-7.
8. Chong A, Abel DL, James HP, Lim YT, Lee EH, Ben HL. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells influence early tendon-healing in a rabbit Achilles tendon model. *J Bone Joint Surg Am* 2007; 89:74-81.
9. Orhan K, Ozturan A, Guven, Cam K. The effect of extracorporeal shock waves on a rat model of injury to tendo Achillis: a histological and biomechanical study. *J Bone Joint Surg Br* 2004; 86-B: 613-8.
10. Carden DG, Noble J, Chalmers J. Rupture of the calcaneal tendon: the early and late management. *J Bone Joint Surg Br* 1987; 69-B: 416-2.
11. Booth FW. Physiologic and biochemical effects of immobilization on muscle. *Clin Orthop* 1987; 219:15-20.
12. Butler DL, Goldstein SA, Guilak F. Functional tissue engineering: the role of biomechanics. *J Biomech Eng* 2000; 122:270-5.
13. Harris MT, Butler DL, Boivin GP, Florer JB, Schantz EJ, Wenstrup RJ. Mesenchymal stem cells used for rabbit tendon repair can form ectopic bone and express alkaline phosphates activity in constructs. *J Orthop Res* 2004; 22:998-1003.
14. Tuan RS, Boland G, Tuli R. Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering. *Arthritis Res Ther* 2002; 5 (1):32-45.
15. Nobuyoshi W, Savio L-Y W, Christus P, Celechovsky C, Tkai S. Fate of donor bone marrow stem cells in medial collateral ligaments after simulated autologous transplantation. *Microsc Res Tech* 2002; 58:39-44.
16. Kadiyala S, Young RG, Thiede MA, Bruder SP. Culture expanded canine mesenchymal stem cells possess osteochondrogenic potential in vivo and in vitro. *Cell Transplant* 1997; 6: 125-34.
17. Ryan JM, Barry FP, Murphy JM, Mahon BP. Mesenchymal stem cells avoid allogenic rejection. *J Inflamm* 2005; 2(8): 1-11.
18. Krampera M, Glennie S, Dyson J, Scott D, Laylor R, Simpson E et al. Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of native and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. *Blood* 2003; 101: 3722-9.
19. Tse WT, Pendleton JD, Beyer WN, Egalka MC, Guinan EC. Suppression of allogenic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implication in transplantation. *Transplantation* 2003; 75:389-97.
20. Young RG, Butler DL, Weber W, Caplan AI, Gordon SL, Fink DJ. Use of mesenchymal stem cells in a collagen matrix for Achilles tendon repair. *J Orthop Research* 1998; 4:406-13.
21. Awad HA, Boivin GP, Dressler MA, Smith NL, Young RG, Butler DL. Repair of patellar tendon injuries using a cell-collagen composite. *J Orthop Res* 2003; 21: 420-31.
22. Flecknell PA. Anesthesia in: manual of rabbit medicine and surgery. 1st Ed. Gloucester (UK): British Small Animal Veterinary Association Publishing; 2000. P. 106.
23. Toumpoulis IK, Oxford JT, Cowan DB, Anagnostopoulos CE, Rokkas CK, Chamogeorgakis TP et al. Differential expression of collagen type V and XI α -1 in human ascending thoracic aortic aneurysms. *J Ann Thorac Surg* 2009;88:506-14
24. Boss PK, Kops N, Verhaar JA, Osch V. Cellular origin of neocartilage formed at wound edges of articular cartilage in a tissue culture experiment. *osteoarth. Cartil* 2008; 16:204-11.
25. Nobuyoshi W, Savio L-YW, Christus P, Celechovsky C, Tkai S. Fate of donor bone marrow stem cells in medial collateral ligaments after simulated autologous transplantation. *Microsc Res Tech* 2002; 58:39-44.
26. Chan PB, Sai F, Qin L, Lee KM, Rolf CG, Chan KM. Effect of fibroblast growth factor (bFGF) on early

- stages of tendon healing. *J Acta Orthop Scand* 2000; 71:513-18.
27. Kashiwagi K, Mushizuki Y, Yasunaga Y, Ishida O, Deie M, Ochi M. Effects of transforming growth factor- β 1 on the early stages of healing of the Achilles tendon in a rat model. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg* 2004; 38: 193-7.
28. Viidik S. The effect of training on the tensile strength of isolated rabbit tendons. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg* 1967; 1:141-7.
29. Viidik S. Tensile strength properties of Achilles tendon systems in trained and untrained rabbits. *Acta Orthop Scand* 1969; 40: 261-72.
30. Ravary B, Pourcelot P, Bortolussi C, Konieczka S, Crevier-Denoix N. Strain and force transducers used in human and veterinary tendon and ligament biomechanical studies. *Clin Biomech* 2004; 19:433-47.
31. Buchanan C, Marsh LR. Effects of exercise on the biomechanical, biochemical and structural properties of tendons. *Comp Biochem Physiol Part A Mol Integr Physiol* 2002; 133:1101-7.
32. Orslund C. BMP treatment for improving tendon repair. Studies on rat and rabbit Achilles tendons. *Acta Orthop Scand* 2003; 308(74): 1-30.
33. Sarrafzadeh Rezaei F, Oryan A, Dehghani S. The effect of electrical stimulation in repair of complete and partial rupture of tendon: A biomechanical study. *J Shaheed Beheshti Univ Med Sci* 1999; 23(3): 169-75. (Persian)
34. Chan BP, Qin L, Rolf C, Chan KM. Pyridinoline in relation to ultimate stress of the patellar tendon during healing: An animal study. *J Orthop Res* 1998; 16:597-603.
35. Gartner LP, Hiatt JL. Color text book of histology. Philadelphia: W.B. Saunders Co; 1997. P: 58-66, 92-5, 106-7.
36. Lin TW, Cardenas L, Suslowky LJ. Biomechanics of tendon injury and repair. *J Biomech* 2004; 37:865-77