

## ارزیابی هیستومورفومتریک و ایمونوهیستوشیمی حاصل از پیوند سلول در ترمیم نقص استخوان موش صحرائی

رقیه رضایی<sup>۱</sup>، سید همایون صدرايي\*<sup>۲</sup>، غلامرضا کاکا<sup>۳</sup>، محمود مفید<sup>۴</sup>، ذبیح‌الله حسن‌زاده<sup>۵</sup>

تاریخ دریافت 1393/02/03 تاریخ پذیرش 1393/04/07

### چکیده

**پیش‌زمینه و هدف:** سلول‌های استرومائی مغز استخوان (BMSCs) سلول‌های بنیادی چند استعدادی هستند و قابلیت تمایز به سلول‌های استخوان‌ساز (osteogenic) را دارند. هدف از این تحقیق بررسی پیوند این سلول‌ها جهت ترمیم نقص استخوان در موش صحرائی می‌باشد.

**مواد و روش‌ها:** در این بررسی ۲۸ سر موش صحرائی نر بالغ در چهار گروه مساوی قرار گرفتند. گروه ۱ شاهد (control) که بعد از ایجاد نقص استخوانی هیچ‌گونه درمانی دریافت نکردند. گروه ۲ شم (Sham) که بعد از ایجاد نقص استخوان، محیط کشت در محل آسیب تزریق شد. گروه ۳ (گروهی که پیوند سلول‌ها به‌صورت غیر اتولوگ در محل آسیب انجام شد). گروه ۴ (گروهی که پیوند این سلول‌ها به‌صورت اتولوگ در محل آسیب پیوند گردید). ارزیابی‌های هیستومورفومتری استخوان و شمارش سلولی در تمام گروه‌ها انجام شد.

**یافته‌ها:** هیچ‌گونه اختلاف معنی‌داری میان گروه‌های شاهد و شم از نظر بررسی‌های هیستومورفومتری و شمارش سلولی مقاطع استخوانی نشان نداد. میانگین مساحت تراکولای استخوانی در گروه پیوند سلولی غیر اتولوگ و اتولوگ نسبت به گروه شاهد افزایش معنی‌دار نشان داد ( $P < 0.05$ ). همچنین میانگین تعداد استئوسیت‌ها در گروه‌های پیوند سلولی غیر اتولوگ و اتولوگ افزایش معنی‌دار نسبت به گروه شاهد نشان داد ( $P < 0.01$ ).

**نتیجه‌گیری:** به نظر می‌رسد که پیوند هر دو صورت اتولوگ و غیر اتولوگ سلول‌های BMSCs بتواند در ترمیم نقص استخوانی مؤثر باشد.

**کلمات کلیدی:** سلول‌های استرومائی مغز استخوان، پیوند سلول، ترمیم استخوان، موش صحرائی

مجله پزشکی ارومیه، دوره بیست و پنجم، شماره پنجم، ص ۴۲۴-۴۱۴، مرداد ۱۳۹۳

آدرس مکاتبه: تهران، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله (عج)، تلفن: ۰۹۱۲۷۲۴۱۱۷۰

Email: h\_sadraie@yahoo.com

### مقدمه

مناسب برای این منظور باشند (۲). سلول‌های BMSCs چند استعدادی و تمایز نیافته هستند که در مغز استخوان وجود دارند اما مشابه آن‌ها در بافت‌هایی نظیر خون، جفت، پالپ دندان و بافت چربی نیز دیده می‌شود (۳). تحقیق بالینی نشان داده است که استفاده از پیوند سلول‌های BMSCs سبب تحریک رشد استخوان پس از شکستگی گردیده است (۴). در موارد آسیب قسمت وسیع استخوان در اثر تروما یا برای جلوگیری از جابه‌جائی مهره‌ای، پیوند

روش‌های متعددی برای ترمیم سریع نقایص استخوانی پیشنهاد شده که یکی از این روش‌ها سلول درمانی می‌باشد. برای به دست آوردن نتیجه مطلوب حاصل از پیوند سلول، سلول‌ها باید دارای قابلیت دسترسی آسان، رشد سریع در محیط کشت، خاصیت ایمونولوژی خنثی و یا هماهنگ با بافت گیرنده، قدرت بقای طولانی و سازگاری در بافت میزبان (۱) باشند. به نظر می‌رسد سلول‌های استرومائی مغز استخوان (BMSCs) گزینه‌ای

<sup>۱</sup> پژوهشگر مرکز تحقیقات تروما دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله (عج)

<sup>۲</sup> دانشیار مرکز تحقیقات تروما دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله (عج)

<sup>۳</sup> دانشیار مرکز تحقیقات علوم اعصاب دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله (عج)

<sup>۴</sup> مربی گروه آناتومی دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله (عج)

<sup>۵</sup> دانشیار مرکز تحقیقات تروما دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله (عج)

گروه پیوند اتولوگ (Auto) مانند گروه قبل بوده و فقط پیوند اتولوگ BMSC انجام شد.

#### تهیه سلول‌های BMSCs

حیوانات به‌وسیله مخلوط کتامین هیدروکلرید (60 mg/kg) و زایلین هیدروکلرید (10 mg/kg) بی‌هوش شده سپس از مغز استخوان ران موش‌ها با کمک سرنگ حاوی ۱ میلی‌لیتر محیط کشت (Alpha MEM: GIBCO BRL, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) با pH=۷/۲ و سرم جنین گاوی ۱۰ درصد (Fetal bovine serum (FBS) (GIBCO) و یک سرسوزن 18 G آسپیره شده و به درون پلیت ۲۵ سی‌سی منتقل گردید و در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵CO<sub>2</sub> درصد در شرایط مرطوب نگهداری شد. بعد از ۲۴ ساعت محیط کشت پلیت حاوی سلول‌ها تعویض گردید. پس از آن تعویض محیط هر ۲ تا ۳ روز انجام شد. سلول‌ها روزانه از نظر مورفولوژی و شرایط عمومی توسط میکروسکپ Invert بررسی گردیدند. سپس سلول‌های چسبیده به کف فلاسک بعد از رسیدن به جمعیت بیش از ۸۰ درصد به کمک محلول Trypsin/EDTA Company, (SIGMA-Aldrich Ayrshire, UK) از کف فلاسک جدا نموده و سپس پاساژ داده شدند و این کار حداقل برای ۴ پاساژ ادامه یافت. در این مرحله تأیید ماهیت استرومایی و بنیادی بودن سلول‌ها با روش ایمونوسیتوشیمی به ترتیب با استفاده از آنتی‌بادی علیه فیبرونکتین و CD44 تعیین گردید.

#### ایجاد نقص استخوانی:

به‌منظور 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 سانتی‌متر 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 به‌وسیله نخ ۴ صفر قابل‌جذب دوخته شد و مراقبت‌های پس از عمل جراحی از حیوانات به عمل آمد. پس از گذشت ۷۲ ساعت از جراحی ناحیه مربوطه 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 میلی‌مولار قرار گرفته بودند) و در گروه شم فقط ۵۰

سلول‌های MSCs به تنهایی یا همراه با مواد زیستی (۵) برای درمان نقص استخوان در مدل حیوانی انجام می‌شود. سلول‌های MSCs همچنین در فیوژن مهره‌ای و در شکستگی‌های با عارضه جوش نخوردن و نیز در زمان کاشت پروتز و پیوند استخوان سبب تسریع استخوان‌سازی شده است (۶) با توجه به دسترسی آسان به سلول‌های MSCs، پیوند اتولوگ آن‌ها امکان‌پذیر بوده و استفاده از این سلول‌ها مسائل اخلاقی تهیه سلول‌های بنیادی عصبی و جنینی را به دنبال نخواهد داشت. از جمله مزایای پیوند اتولوگ سلول‌های BMSCs این است که سلول‌ها از خود موجود گرفته می‌شود و مشکلات رد پیوند را به دنبال نداشته و روند تمایز آن‌ها و ترمیم استخوان کمتر با مشکل مواجه می‌شود.

در تحقیقی که از پیوند غیر اتولوگ سلول‌های BMSCs برای درمان استئوژنز ناقص (Osteogenesis Imperfecta) در استخوان فمور رت استفاده شده بود نتایج مثبتی از تمایز سلول‌های BMSCs به استئوبلاست‌ها و شرکت آن‌ها در ترمیم ضایعه استخوانی مشاهده گردید (۳). نتایج مثبتی از پیوند اتولوگ سلول‌های بنیادین همراه با ژل فوم و نیز تزریق سلول‌های اتولوگ به‌صورت سیستمیک برای ترمیم استخوان در خرگوش گزارش شده، به‌طوری‌که پیوند این سلول‌ها علاوه بر تسریع روند ترمیم استخوان، آنژیوژنیز را هم تحریک کرده‌اند (۷،۸). هدف از انجام این تحقیق بررسی هیستومورفومتری محل ترمیم نقص استخوانی با استفاده از پیوند اتولوگ سلول‌های BMSCs در rat (موش صحرایی) می‌باشد.

#### مواد و روش‌ها

##### حیوان:

در این تحقیق از ۲۸ سر موش صحرایی نر بالغ نژاد آلبینو-ویستار با وزن حدود ۲۵۰±۲۰۰ گرم استفاده شد. غذا و آب به‌صورت آزاد در دسترس آن‌ها قرار گرفت. دمای حیوان خانه ۲۲±۲ و روشنایی و تاریکی به‌طور متناوب ۱۲ ساعته و در حیوان خانه دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله (عج) نگهداری شدند. حیوانات به‌طور تصادفی به چهار گروه مساوی تقسیم شدند.

گروه شاهد (Control) شامل حیواناتی که بر روی استخوان فمور پای راستشان در ناحیه قسمت فوقانی اپی فیز دیستال سوراخی به‌صورت دوطرفه ایجاد (آسیب) و هیچ درمانی دریافت نکردند. گروه شم (Sham) که ۷۲ ساعت بعد از ایجاد آسیب، در محل نقص استخوانی، میزان ۵۰ میکرو لیتر محیط کشت تزریق شد. گروه سوم یا گروه پیوند غیر اتولوگ (None Auto) که ۷۲ ساعت بعد از ایجاد آسیب، تعداد یک‌صد و پنجاه‌هزار سلول BMSC غیر اتولوگ در محل آسیب تزریق شد. گروه چهارم یا

میکرو لیتر محیط کشت تزریق شد. سپس عضلات و پوست مجدداً با نخ ۴ صفر قابل جذب دوخته شد.

نمونه برداری بافتی از حیوانات:

موش‌ها ۲۸ روز بعد از جراحی دوم با استفاده از دوز بالای کلروفورم کشته شده و پس از برداشتن استخوان مورد ارزیابی‌های هیستومورفومتری قرار گرفتند.

بررسی و شمارش سلول‌های زنده (*Viability test*):

برای مشخص کردن سلول‌های زنده به نسبت مساوی حجمی از سوسپانسیون سلولی و تریپان بلو (۰/۴ درصد) بر روی لام نتوبار ریخته و سلول‌های زنده و مرده توسط میکروسکوپ اینورت با بزرگنمایی ۴۰۰ شمارش شده بررسی گردیدند و از آنجائی که سلول‌های مرده توسط تریپان بلو به رنگ آبی درمیایند و سلول‌های زنده شفاف می‌باشند، تعداد سلول‌های زنده و مرده شمارش شده و درصد آن‌ها محاسبه و ثبت گردیدند.

مشخص نمودن استرومائی بودن سلول‌های *BMSCs* با استفاده از روش ایمونوسیتوشیمی:

برای تعیین درصد خلوص سلول‌های استرومائی، به دلیل وجود گلیکوپروتئین فیبرونکتین و CD44 در سلول‌های منشأ مزانشیمی، سلول‌های *BMSCs* بر علیه این گلیکوپروتئین‌ها به روش ایمونوسیتوشیمی رنگ شدند (۹-۱۲). بدین منظور ابتدا سلول‌های *BMSCs* موجود در پلیت توسط پارافرمالدئید ۴ درصد به مدت ۳۰ دقیقه فیکس شده، سپس شستشوی سلول‌ها با PBS سه بار و هر بار ۵ دقیقه انجام شد. نمونه‌ها در معرض محلول بلوک کننده (مخلوط سرم بز ۱۰ درصد و Triton X-100 ۰/۳ درصد) به مدت یک ساعت قرار داده شد. پس از رقیق نمودن (۱:۱۰۰) آنتی‌بادی‌های اولیه CD44 و Fibronectin (AB-CAM) که هر دو از نوع موشی بودند، هرکدام را به‌طور مجزا بر روی سلول‌ها ریخته و پلیت را در داخل ظرف مرطوب به مدت یک‌شب و در دمای ۴°C انکوبه شدند. پلیت‌ها پس از شستشو با PBS در معرض H2O2 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 آنتی‌بادی ثانویه ضد موشی (۱:۲۰۰) Biotin, Avidin (AB-CAM) قرار گرفتند. سپس ۱۰ دقیقه تحت تأثیر محلول کروموزن 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 تراکم موجود در محل کال استخوانی از مجموعه سخت‌افزاری (کامپیوتر و میکروسکوپ متصل به دوربین Tsview) و سیستم نرم‌افزاری Motic استفاده شد. بدین ترتیب که از هر نمونه استخوان پس از کلسیم زدایی با اسید فرمیک ۱۰ درصد و فیکسسیون و پردازش بافتی، مقاطع طولی سریالی ۵ میکرونی از نمونه‌ها تهیه و با نسبت ۱ به ۴ تعداد ۷ مقطع از ناحیه کال تهیه و رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین انجام گردید جهت مطالعه هیستومورفومتری، از مقاطع بافتی، تصاویر با بزرگ‌نمایی ۱۰۰ برابر تهیه و میزان تراکم‌ها و بافت همبندی عروقی در مساحتی برابر با ۰/۵۱۶ میلی‌متر مربع اندازه‌گیری و ثبت گردیدند.

شمارش سلولی:

تعداد استئوسیت‌های موجود در تیغه‌های استخوانی در سطحی معادل ۰/۰۳۲ میلی‌متر مربع با بزرگ‌نمایی ۴۰۰ برابر شمارش شده و در نهایت تعداد استئوسیت‌ها در مقیاس یک میلی‌متر مربع محاسبه و ثبت گردیدند.

بررسی ایمونوهیستوشیمی:

بدین منظور مقاطع بافتی را پس از پارافین زدایی توسط گزبل و آبدی با استفاده از درجات نزولی الکل، توسط هماتوکسیلین رنگ‌آمیزی نموده و سپس شمارش سلول‌ها در ۲۰ میدان میکروسکوپی به‌طور تصادفی انجام و درصد سلول‌های نشان‌دار با Brdu مشخص گردیدند.

تجزیه و تحلیل اطلاعات:

ارزیابی آماری داده‌ها با بکارگیری نرم‌افزار SPSS و استفاده از آزمون‌های یک‌طرفه ANOVA و تکمیلی Post Hock Tukey انجام شد. کلیه اطلاعات ارائه شده بر حسب Mean ± SEM بوده و P<0.05 نیز معنی‌دار محسوب شد.

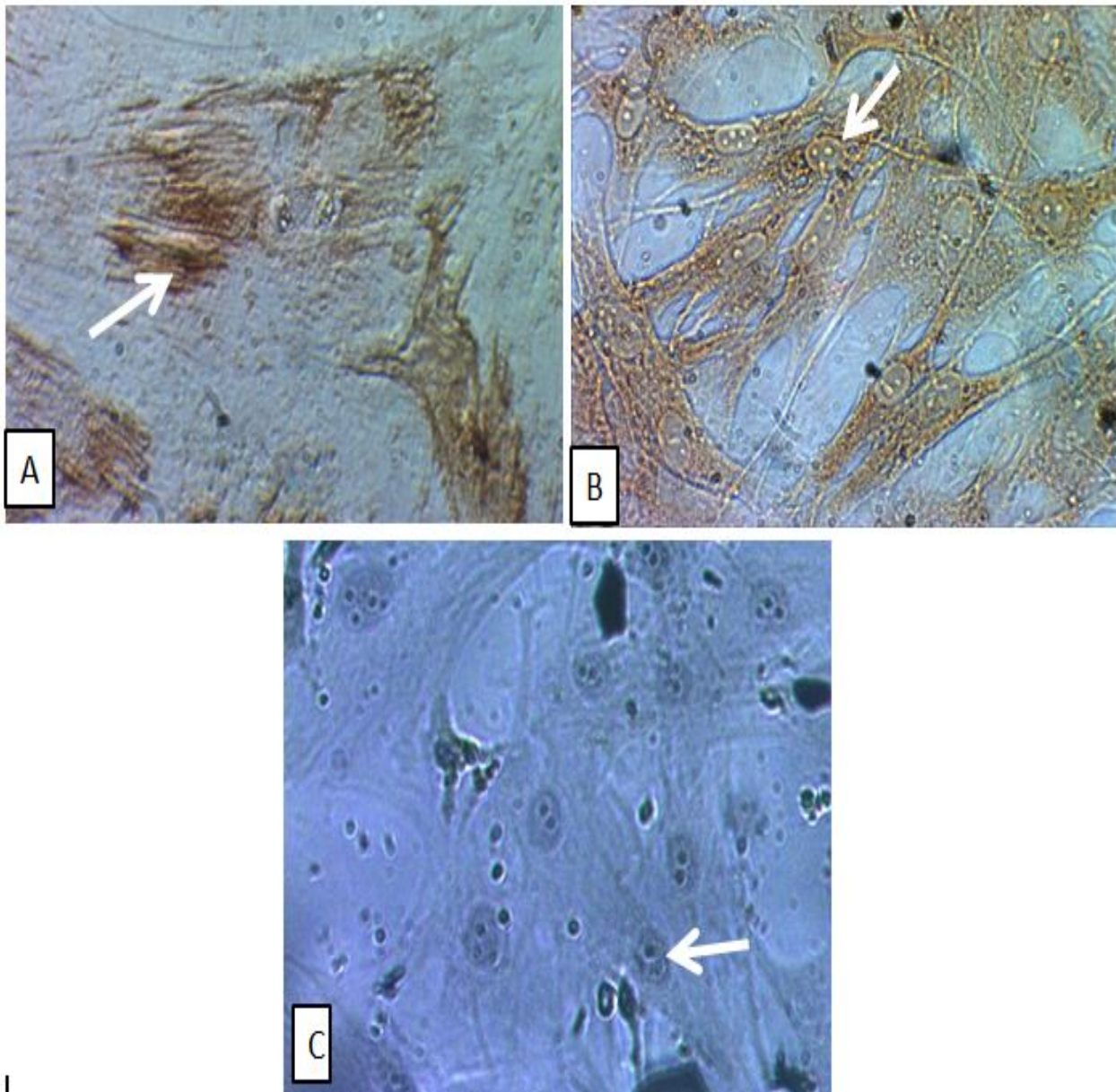
## نتایج

- زنده بودن سلول‌ها

نتایج *viability test* نشان داد که تقریباً بیش از ۹۰ درصد سلول‌های *BMSCs* پس از پاساژ چهارم زنده بودند.

- درصد سلول‌های *BMSCs* با استفاده از روش ایمونوسیتوشیمی

قبل از پیوند سلول‌های *BMSCs* در صد سلول‌های نشان‌دار شده با آنتی‌بادی‌های فیبرونکتین و CD44 بررسی و به ترتیب بیش از ۹۲ و ۹۵ درصد مشخص گردید (تصویر ۱).

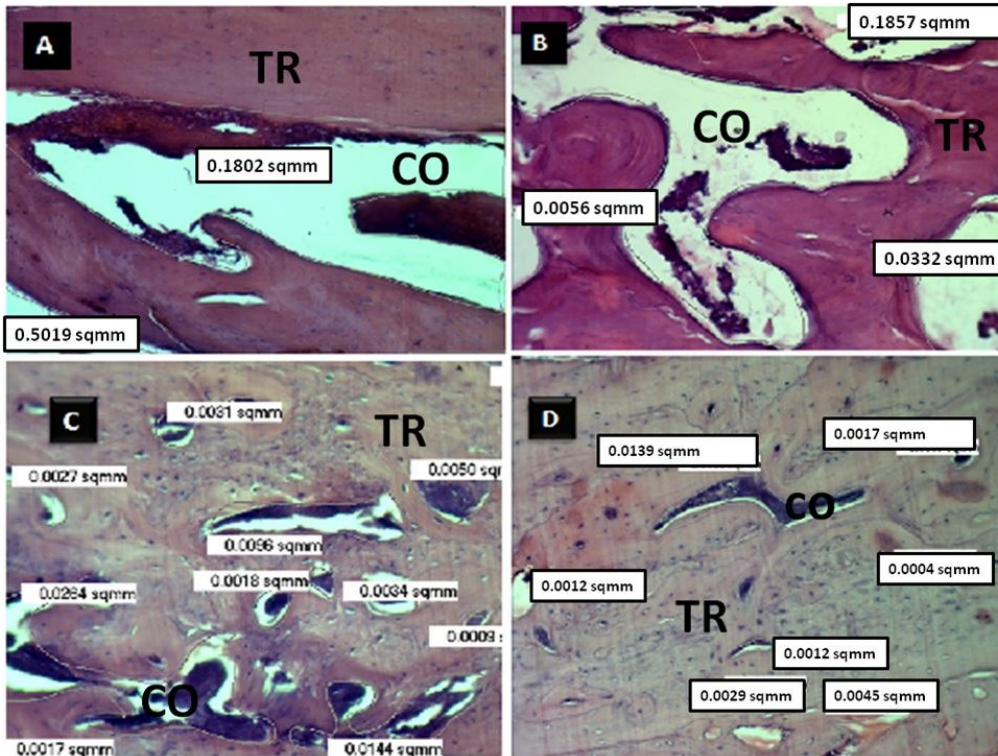


**تصویر (۱):** تصویر میکروسکوپی سلول‌های استرومایی پس از انجام ایمونوسیتوشیمی با بزرگنمایی ۴۰۰ برابر. تصاویر (A)، (B)، (C) به ترتیب مربوط به آنتی‌بادی فیبرونکتین، CD44 و کنترل منفی سلول‌های BMSC ۲۴ ساعت بعد از پاساژ چهارم است. سلول‌ها در A و B به دلیل دارا بودن مارکرهای فیبرونکتین و CD44 رنگ DAB را گرفته و به رنگ قهوه‌ای دیده می‌شوند.

میانگین مساحت تراکولای استخوانی در گروه‌های پیوند سلول‌های غیر اتولوگ ( $0/01 \pm 0/37$ ) و پیوند سلول‌های اتولوگ ( $0/01 \pm 0/39$ ) نسبت به گروه شاهد افزایش معنی‌داری داشته‌اند ( $P=0/002$ ) (تصویر ۲) (نمودار ۱).

- هیستومورفومتری بافت استخوان

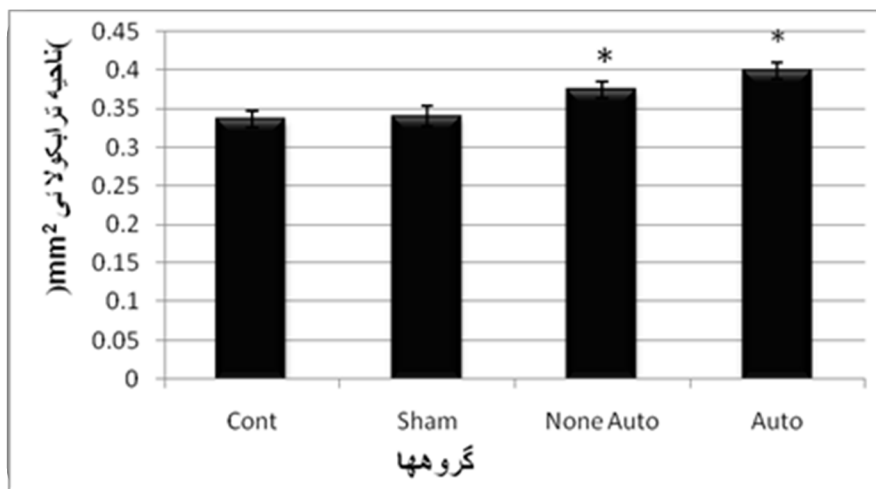
بررسی هیستومورفومتری مقاطع بافتی محل نقص استخوانی در گروه‌های مختلف نشان داد که میانگین مساحت تراکولای استخوانی در گروه‌های شاهد،  $0/09 \pm 0/33$  و شم،  $0/13 \pm 0/34$  بوده که هیچ‌گونه اختلاف معنی‌داری نداشته‌اند. درحالی‌که



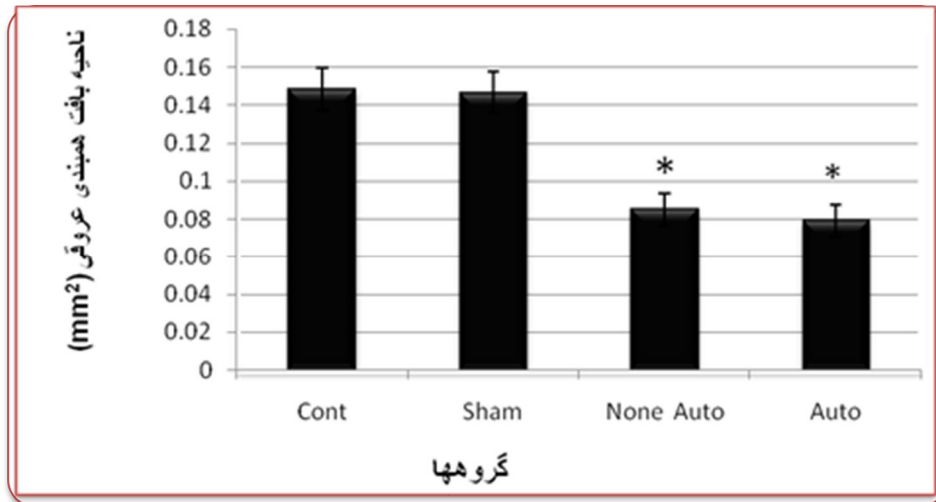
**تصویر (۲):** تصاویر میکروسکوپی بافت استخوانی منطقه ترمیم‌شده مربوط به گروه‌های شاهد (A)، شم (B)، غیر اتولوگ (C) و اتولوگ (D) در پایان هفته چهارم. تراپکولار استخوان (TR)، فضاهای پیوندی عروقی (CO). (رنگ‌آمیزی H&E، بزرگ‌نمایی ۱۰۰X)

از سوی دیگر میانگین وسعت بافت همبندی عروقی در گروه‌های شاهد،  $0.11 \pm 0.14$  و شم،  $0.11 \pm 0.14$  بوده که هیچ اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نداشتند درحالی‌که میانگین وسعت بافت همبندی عروقی در گروه‌های پیوند سلول غیر اتولوگ نسبت به گروه شاهد کاهش معنی‌داری را نشان دادند ( $P < 0.001$ ) (تصویر ۲) (نمودار ۲).

از سوی دیگر میانگین وسعت بافت همبندی عروقی در گروه‌های شاهد،  $0.11 \pm 0.14$  و شم،  $0.11 \pm 0.14$  بوده که هیچ اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نداشتند درحالی‌که میانگین وسعت بافت همبندی عروقی در گروه‌های پیوند سلول غیر اتولوگ نسبت به گروه شاهد کاهش معنی‌داری را نشان دادند ( $P < 0.001$ ) (تصویر ۲) (نمودار ۲).



**نمودار (۱):** میانگین مساحت تراپکولاری استخوانی در ناحیه نقص در چهار گروه برحسب میلی‌متر مربع در چهار هفته بعد از پیوند سلول \* تفاوت معنی‌دار با گروه شاهد و شم.

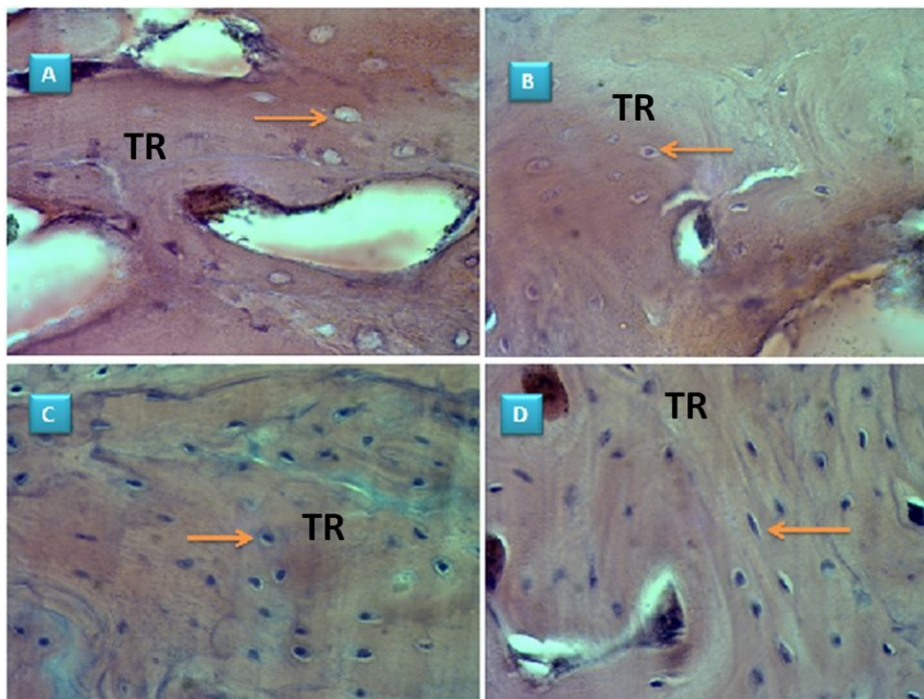


**نمودار (۲):** وسعت بافت همبندی عروقی را برحسب میلی‌متر مربع در چهار گروه در چهار هفته بعد از پیوند سلول نشان می‌دهد. \* کاهش معنی‌داری نسبت به گروه شاهد و شم.

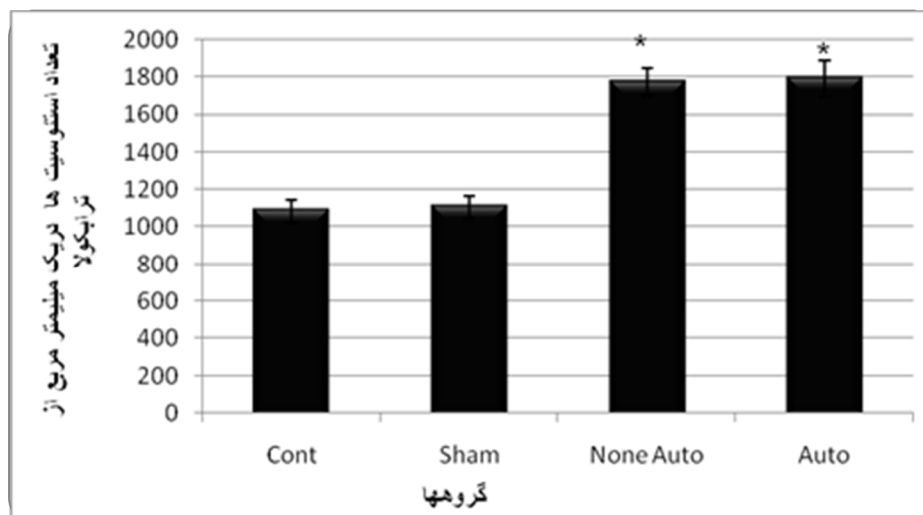
درحالی‌که میانگین تعداد استئوسیت‌ها در گروه‌های سلول درمانی غیر اتولوگ ( $1770 \pm 74$ ) و سلول درمانی اتولوگ ( $1970 \pm 94$ ) نسبت به گروه شاهد ( $1790 \pm 94$ ) افزایش معنی‌داری داشتند (در هر دو گروه  $p < 0.001$ ) (تصویر ۳)، (نمودار ۳).

تعداد/استئوسیت‌ها:

میانگین تعداد استئوسیت‌ها در یک میلی‌متر مربع از تراکولای ناحیه کال استخوان در گروه‌های شاهد ( $1084 \pm 63$ ) و شم ( $1104 \pm 57$ ) اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نشان ندادند.



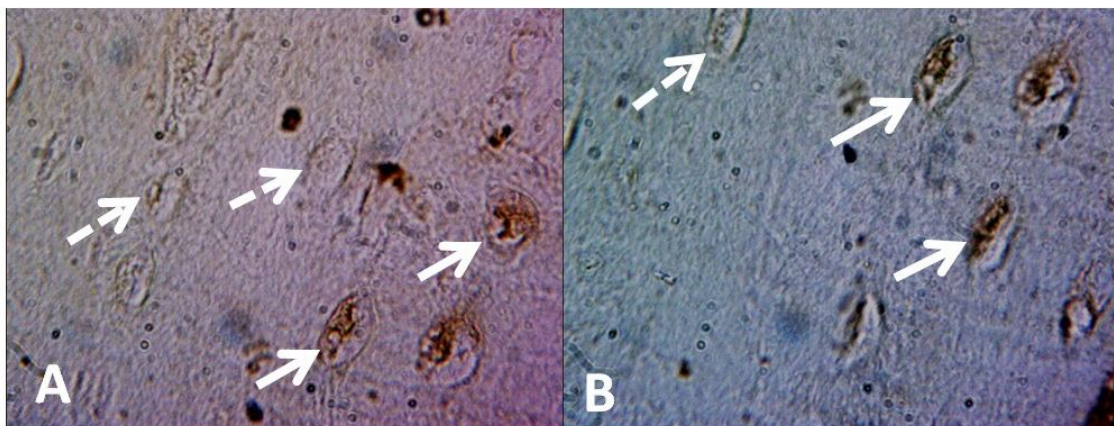
**تصویر (۳):** تصاویر میکروسکوپی بافت استخوانی جدید در ناحیه نقص استخوان فمور در گروه‌های مختلف. گروه شاهد (A)، گروه شم (B)، گروه غیر اتولوگ (C)، گروه اتولوگ (D). پیکان زرد اشاره به سلول‌های استئوسیت بیانگر تراکولای استخوان می‌باشد. (رنگ‌آمیزی H&E، بزرگ‌نمایی  $400 \times$ )



**نمودار (۳):** تعداد استئوسیت‌ها در یک میلی متر مربع از تراکولای استخوان اسفنجی در محل آسیب چهار هفته بعد از پیوند. \* اختلاف معنی‌دار با گروه شاهد و شم.

فوق به دلیل داشتن رنگ قهوه‌ای قابل‌ردیابی بودند و هسته سلول‌های استئوسیت‌های غیر نشان‌دار تحت تأثیر رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین که برای تعیین در صد سلول‌ها به‌کاربرده شده بود، به رنگ بنفش دیده شدند. (تصویر ۴)

ردیابی سلول‌ها با استفاده از روش ایمونوهیستوشیمی: بررسی ایمونوهیستوشیمی سلول‌های BMSCs در هنگام شمارش سلول‌های استئوسیت در ناحیه کال استخوانی نشان داد، در گروه‌های پیوند سلول، سلول‌هایی که قبلاً توسط Brdu نشان‌دار شده‌اند در بافت استخوانی جدید استقرار یافته و سلول‌های



**تصویر (۴):** تصاویر میکروسکوپی سلول‌های نشان‌دار در ناحیه کال استخوانی در مقاطع بافتی مربوط به پیوند سلولی غیر اتولوگ (A) و اتولوگ (B) (بزرگ‌نمایی  $\times 1000$ ) پیکان ممتد اشاره به سلول‌های نشان‌دار داشته و پیکان منقطع مربوط به سلول‌های غیرنشان‌دار با Brdu است.

ناحیه ترمیم در گروه‌های پیوند سلول نسبت به گروه شاهد افزایش معنی‌داری نشان داد. در تحقیق حاضر در گروه تجربی شکل‌گیری استخوان به دلیل کشت سلول‌ها در محیط طبیعی و مناسب افزایش یافته است اما در گروه شاهد به علت محیط اسیدی همراه با کمبود اکسیژن (به دلیل نقص‌های رگی که در هنگام ایجاد نقص در گروه شاهد به وجود آمده است) تکثیر سلول‌ها به زمان بیشتر نیاز داشت (۱۳). در تحقیق Stockman و همکاران نتایج

## بحث

درصد خلوص سلول‌های استرومائی BMSCs به علت وجود گلیکوپروتئین فیبرونکتین و CD44 به روش ایمونوسایتوشیمی مشخص شدند (۹-۱۲). یافته‌های هیستومورفومتري این تحقیق چهار هفته بعد از پیوند بیانگر افزایش مساحت تراکولای استخوانی و بنابراین کاهش بافت همبندی عروقی گروه‌های پیوند سلولی نسبت به شاهد بود، همچنین میانگین تعداد استئوسیت‌ها در

شرایط موجود حدود ۱۵ روز می‌باشد بنابراین به نظر می‌رسد زمان ده روز مورد استفاده در مطالعه Niedhviadzki برای شروع ترمیم و ایجاد کال استخوانی اولیه زمان کمی می‌باشد از آنجائی که فرایند ترمیم استخوان بعد از شکستگی یا بروز نقص یک فرایند زمان‌بر و مشخص است که توسط فاکتورهای رشد موضعی و سیستمیک مشتمل بر دو فرایند آنژیوژنز و استئوژنز صورت می‌پذیرد، بررسی روند ترمیم حداقل زمان لازم دو هفته می‌باشد (۲۱). لذا در مطالعه حاضر زمان یک ماه برای بررسی میزان ترمیم استخوان در نظر گرفته شد.

تصور بر آن است که پیوند سلول‌های استئوبلاست تولید غضروف و کال استخوانی و همچنین القاء ریز محیط مناسب را از طریق استخوان‌سازی داخل غضروفی تحریک می‌کند (۲۲). در واقع پیوند سلول‌های استرومائی به محل نقص استخوان روند استئوژنز را بیشتر تحریک نموده و نتیجه آن افزایش سرعت تشکیل استخوان جدید است. حاصل پیوند این سلول‌ها در محل نقص استخوان تبدیل و تمایز آن‌ها به استئوبلاست و تسریع روند استخوان‌سازی بوده است.

نتیجه‌گیری: نتایج هیستومورفومتری و ایمونوهیستوشیمی تحقیق حاضر نشان داد که روند ترمیم استخوان با نقص جزئی استخوانی در موش صحرائی، با استفاده از پیوند اتولوگ و غیر اتولوگ سلول‌های استرومائی مغز استخوان BMSCs تسریع گردیده است.

### تشکر و قدردانی

این تحقیق با مساعدت مرکز تحقیقات ترومای دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله (عج) انجام گردید که بدین‌وسیله تشکر و قدردانی می‌شود.

### محدودیت‌های تحقیق

به علت جثه کوچک حیوان و امکان صدمه به استخوان پای حیوان، در نوع آسیب ایجادشده محدودیت وجود داشت که در صورت استفاده از نمونه‌های بزرگ‌تر این مشکل رفع می‌شد. همچنین در صورت مطالعه مستقیم بر روی نمونه‌های انسانی و بررسی کیفیت و کمیت روند ترمیم، نتایج مطالعه به‌صورت کاربردی مورد استفاده قرار می‌گرفت.

هیستومورفومتری حاصل از پیوند سلول‌های استرومائی در نقص جمجمه خوک ۳۰ روز بعد از ایجاد نقص نشان داده‌شده که گروه شاهد و تجربی از نظر حجم استخوان ترمیم‌شده به حجم کل نقص اختلاف معنی‌داری نداشتند که این یافته با نتایج هیستومورفومتری مطالعه ما هم‌خوانی نداشت (۱۴). نتایج تحقیق ما نشان داد که مساحت تراپکولای استخوانی در گروه‌های پیوند سلول‌های غیر اتولوگ و پیوند سلول‌های اتولوگ نسبت به گروه شاهد افزایش معنی‌داری داشته‌اند. همسو با نتایج تحقیق ما تحقیقات دیگری نیز می‌باشد که نشان دادند که با ایجاد نقص در استخوان بز و گوسفند و سلول درمانی، پس از ۳۲ و ۸ هفته، میزان بهبودی در استخوان‌های حیوانات تحت آزمایش به‌طور چشمگیری افزایش یافته بود به‌طوری‌که مقاومت استخوان در این گروه در مقایسه با مقاومت استخوان در گروه کنترل افزایش داشته است (۱۵، ۱۶). به همین ترتیب در مطالعه مورفومتری تحقیق Cao و همکاران آمده است که پیوند سلول اتولوگ در ترمیم نقص استخوان بز ۱۶ هفته بعد از پیوند نتایج مثبتی به‌صورت افزایش معنی‌دار حجم استخوان تراپکولار نسبت به حجم کل بافت استخوان در گروه پیوند سلول در مقایسه با گروه شاهد نشان داده است. همچنین بررسی هیستولوژی مطالعه ایشان در گروه سلول درمانی در مقایسه با شاهد که بافت فیبروزه محل ترمیم را پر کرده بود، ترمیم سریع‌تری را نشان داده است (۱۷). در مطالعه ما نیز نتایج مشابهی به دست آمد که نشان‌دهنده ترمیم سریع‌تر استخوان با استفاده از سلول‌های استرومائی مغز استخوان می‌باشد. چنین تصور می‌شود که تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سلول‌های استئوبلاست طی یک سری فرایند سیگنال دهی بین اینترگرین و پروتئین‌های شکل‌دهنده استخوان (BMP) طیف وسیعی از سیتوکین‌ها را ترشح می‌کنند (۱۸، ۱۹).

از سوی دیگر در تحقیق مشابه دیگری که توسط Niedhviadzki و همکاران انجام شد، مطالعه هیستولوژیک بین ۱۰ تا ۴۰ روز بعد از پیوند سلول‌های غیر اتولوگ BMSCs به محل نقص استخوان اندام جلویی خرگوش نشان داد که تشکیل تراپکولایها، استخوان متراکم، تعداد استئوبلاست‌ها و شبکه عروقی در ناحیه کال در اندام تجربی در مقایسه با اندام شاهد از سرعت بیشتری برخوردار بود (۲۰). باید توجه داشت که حداقل زمان لازم برای شروع آسیب در استخوان و ایجاد کال استخوانی بسته به

### References:

- Jorgensen C. Mesenchymal stem cells in arthritis: role of bone marrow microenvironment. *Arthritis Res Ther* 2010;12(4):135.
- Tohill M, Mantovani C, Wiberg M, Terenghi G. Rat bone marrow mesenchymal stem cells express glial markers and stimulate nerve regeneration. *Neurosci Lett* 2004; 362 (3): 200-3.



3. Valtieri M, Sorrentino A. The Mesenchymal Stromal Cell Contribution to Homeostasis. *J Cell Physiol* 2008;217(2):296-300.
4. Salasznyk RM, Williams WA, Boskey A, Batorsky A and Plopper GE. Adhesion to vitronectin and collagen I promotes osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *J Biomed Biotechnol* 2004;2004(1):24-34.
5. Crha M ,Nečas A,Srnec R ,Janovec J ,Stehlik L ,Raušer P ,et al. Mesenchymal Stem Cells in Bone Tissue Regeneration and Application to Bone Healing. *Acta Veterinaria Brno* 2009; 78:78(4) 635-42.
6. Lamourym FM ,Croitoru-Lamoury J ,Brew BJ .Undifferentiated mouse mesenchymal stem cells spontaneously express neural and stem cell markers Oct-4 and Rex-1. *Cytherapy* 2006;8(3):228-42.
7. Lee JY, Choi MH, Shin EY, Kang YK. Autologous mesenchymal stem cells loaded in Gelfoam for structural bone allograft healing in rabbits. *Cell Tissue Bank* 2011;12(4):299-309.
8. Nather A, David V, Teng JW, Lee CW, Pereira BP. Effect of autologous mesenchymal stem cells on biological healing of allografts in critical-sized tibial defects simulated in adult rabbits. *Ann Acad Med Singapore*. 2010;39(8):599-606.
9. Arthur A, Zannettino A, Gronthos S. The Therapeutic Applications of Multipotential MesenchymalStromal Stem Cells in Skeletal Tissue Repair. *J Cell Physiol* 2009;218(2):237-45.
10. Zhao L, Duan W. Human bone marrow stem cells exhibit neural phenotypes and ameliorate neurological deficits after grafting into the ischemic brain of rats. *Exp Neurol* 2002;174(1):11-20.
11. Azizi SA, Stokes D, Augelli BJ, Digirolamo C, Prockop DJ. Engraftment and migration of human bone marrow stromal cells implanted in the brains of albino rats-similarities to astrocyte grafts. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 31;95(7):3908-13 .
12. Bossolasco P, Cova L, Calzarossa C, Rimoldi SG, Borsotti C. Neuro-glial differentiation of human bone marrow stem cells in vitro. *Exp Neurol* 2005; 193 (2): 312-25.
13. Ashton BA, Allen RD, Howlett CR, Eaglesom CC, Hatton 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.
14. Stockmann P, 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- A comparison of different tissue sources. *J Craniomaxillofac Surg* 2012;40(4):310-20.
15. Liu G, Zhao L, Zhang W, Cui L, Liu W,Cao Y. Repair of goat tibial defects with bone marrow stromal cells and beta-tricalcium phosphate. *J Mater Sci Mater Med* 2008;19(6):2367-76.
16. Kon E, Muraglia A, Corsi A, Bianco P, Marcacci M, Martin I. et al. Autologous bone marrow stromal cells loaded onto porous hydroxyapatite ceramic accelerate bone repair in critical-size defects of sheep long bones. *J Biomed Mater Res* 2000;49(3):328-37.
17. Gao J, Dennis JE, Muzic RF, Lundberg M, Caplan AI. The dynamic in vivo distribution of bone marrow-derived mesenchymal stem cells after infusion. *Cells Tissues Organs* 2001; 169(1):12-20.
18. Bergfeld SA, Declerck YA. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells and the tumor microenvironment. *Cancer Metastasis Rev* 2010;29(2):249-61.
19. Liu Y1, Dulchavsky DS, Gao X, Kwon D, Chopp M, Dulchavsky S, et al. Wound repair by bone marrow stromal cells through growth factor production. *J Surg Res* 2006;136(2):336-41.

20. Niedhviędzki T, Dabrowski Z, Miszta H, Pawlikowski M. Bone healing after bone marrow stromal cell transplantation to the bone defect. *Biomaterials* 1993, 14 (2); 115-21.
21. Mori M, Sadahira Y, Kawasaki S, Hayashi T, Awai M. Formation of capillary networks from bone marrow cultured in collagen gel. *Cell Struct Funct* 1989;14(4):393-8.
22. 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 Res* 1998;16(4):406-13.

## HISTOMORPHOMETRIC AND IMMUNOHISTOCHEMICAL EVALUATION OF CELL TRANSPLANTATION ON THE REPAIR OF BONE DEFECTS IN RAT

Roqieh Rezaei<sup>1</sup>, Seyed Homayoon. Sadraie<sup>2\*</sup>, Gholamreza Kaka<sup>3</sup>, Mahmoud Mofid<sup>4</sup>, Zabihullah Hassanzadeh<sup>5</sup>

Received: 23 Apr, 2014; Accepted: 28 Jun, 2014

### Abstract

**Background & Aims:** Bone marrow stromal cells (BMSCs) are multipotent stem cells that can proliferate and differentiate into osteogenic cells. This study aimed to investigate the effects of BMSCs transplantation for the repair of bone defects in rat.

**Materials & Methods:** In this study twenty-eight male adult rats were equally divided into 4 groups. Group 1 (control group) received no treatment after bone defect; after bone defect the culture medium was injected at the site of bone defect for group 2 (sham group); group 3 was non-autologous cell transplantation group and group 4 was autologous cell transplantation group. Bone histomorphometric evaluations and cell counting were performed in all groups.

**Results:** No significant differences were found between the control group and Sham according to histomorphometric study. The mean trabecular surface was significantly increased in autologous and non-autologous groups compared to the control group. In addition, mean number of osteocytes was increased in autologous and non-autologous groups when compared to the control group.

**Conclusion:** It seems that both autologous and non-autologous BMSCs transplantation appears to be effective in the repair of bone defect.

**Key words:** BMSCs, Cell transplantation, Bone repair, Rat

**Address:** Trauma Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran  
Tel: +989127241170

**E.mail:** h\_sadraie@yahoo.com

SOURCE: URMIA MED J 2014; 25(5): 424 ISSN: 1027-3727

<sup>1</sup> Researcher of Trauma Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

<sup>2</sup> Associate Professor, Trauma Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran  
(Corresponding Author)

<sup>3</sup> Associate Professor of Neuroscience Research Center of Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

<sup>4</sup> Instructor, Department of Anatomy, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

<sup>5</sup> Associate Professor, Department of Orthopaedics, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran