پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره شانزدهم شماره ۵۵ آذر و دی سال ۱۳۸۵ (۱۷-۸)

مطالعه فراساختمان سلول‌های درگیر در روند ترمیم ضایعات استخوانی به دنبال کاشت ترکیب اکتاکلسیم فسفات (OCP) وماتریکس ژلاتینه استخوان (BMG) در استخوان پاریتال موش صحرایی

فریدون سرگلزایی اول (Ph.D.)*+ **علیقلی سبحانی**(Ph.D.)**
محمد رضا عرب(Ph.D.)*** **غلامحسین سرگزی**(M.Sc.)****

چکیده

سابقه و هدف : این پژوهش به منظور مطالعه و شناسایی فراساختمان سلول‌هایی که ترمیم ضایعات ایجاد شده در استخوان آهیانه موش صحرایی را پس از کاشت ترکیب اکتاکلسیم فسفات و ژلاتین ماده‌ی زمینه‌ای استخوان برعهده دارند، طراحی و اجرا گردید.

مواد و روش‌ها : دراین پژوهش، از ۱۶ سرموش صحرایی بالغ‌نر از نژاد اسپراگ داولی استفاده‌گردید. سپس حیوانات به‌گونه تصادفی به دو گروه یکسان مورد و شاهد، تقسیم گشته و ضایعه‌ای به قطر پنج میلی متر برروی استخوان آهیانه هر کدام از آن‌ها ایجاد گردید. در گروه مورد پنج میلی گرم از ترکیب اکتاکلسیم فسفات/ داربست ژلاتینه استخوان (Octacalcium phosphate/Bone matrix gelatin) به نسبت یک به چهار در محل ضایعه کاشته و به وسیله پوشش مخصوص کنترل خونریزی (surgicel) پوشانده شد. در گروه شاهد هیچ ماده‌ای در محل ضایعه کاشته نشد و فقط توسط (surgicel) پوشانده شد. حیوانات در طی روزهای هفتم و چهاردهم پس از عمل، کشته شده و نمونه‌های لازم برداشت گردید. نمونه‌ها پس از عمل ثبوت به وسیله روش‌های معمول بافت شناسی، آماده و از آن‌ها برش‌های نیمه نازک و نازک تهیه گردید و پس از انجام رنگ‌آمیزی به وسیله ذره بین های نوری و الکترونی، مورد مطالعه قرار گرفت.

یافته‌ها : مطالعه فراساختمان سلول‌های مسؤول روند ترمیم ضایعه در گروه مورد، مقدار اندکی سلول‌های غضروفی نابالغ ترشح شده را در مرکز ضایعه در روز هفتم پس از کاشت نشان داد. در روز چهاردهم پس از کاشت، سلول‌های نابالغ استخوانی فعال در مجاورت و نزدیک به حاشیه ضایعه دیده شد که نشان‌دهنده پیشرفت روند استخوان‌سازی در این گروه می‌باشد.

استنتاج : در گروه مورد، ضایعه ایجاد شده از راه استخوان سازی درون غشایی ترمیم یافت.

واژه های کلیدی : استئوبلاست، کندروبلاست، اکتاکلسیم فسفات، ماتریکس ژلاتینه استخوان، استخوان پاریتال

* استادیار دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریحی
** دانشیار دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریحی
**** مربی دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، دانشکده پیراپزشکی، گروه هوشبری
+ ✉ زاهدان : میدان مشاهیر- دانشکده پزشکی- گروه علوم تشریحی
*** دانشیار دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریحی

تاریخ دریافت : ۸۴/۸/۱۴ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۸۴/۱۲/۱۴ تاریخ تصویب: ۸۵/۴/۲۷

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-03-28]

www.SID.ir

مقدمه

امروزه در جراحی‌های فک، صورت، دهان، برای ترمیم نقص‌ها و یا پر کردن ضایعات بزرگ استخوانی که به واسطه ضربه‌ها، نئوپلازی‌ها و یا عفونت‌ها ایجاد می‌شوند، از پیوندهای استخوانی درون زاد (Autogen) و یا طیف وسیعی از مواد مصنوعی جایگزین شونده‌ی پیوندهای استخوانی استفاده می‌شود(۵-۱). از آن‌جاکه استخوان‌ها، از نظر ظاهر مرئی و ذره‌بینی و سلول‌شناسی و نیز محتویات زیست- شیمیایی با یکدیگر تفاوت دارند، تکامل و ساخته شدن اولیه‌ی آن‌ها به دو روش درون غضروفی و درون غشایی انجام می‌گیرد(۶،۷). پیشرفت‌هایی که به تازگی در زمینه‌ی زیست شناسی سلول‌های استخوانی انجام گرفته، نشان می‌دهد که داربست خارج سلولی سلول‌های استخوانی، محتوی مواد القاءکننده و فعال کننده‌های رشدی می‌باشد، که عملکرد این سلول‌ها را درهنگام استخوان‌سازی و یا ترمیم ضایعات، تنظیم می‌نمایند(۹،۸).

باتوجه به محدودیت استفاده ازپیوندهای استخوانی، امروزه از موادی به عنوان جایگزین استفاده می‌شود که پس از کاشت در محل ضایعات استخوانی، باعث القاء تمایز سلول‌های مزانشیمی متمایز نشده موجود در محل ضایعه به سلول‌های غضروفی و یا سلول‌های استخوانی نابالغ و مآلاً ترمیم موفقیت‌آمیز نقایص می‌شوند(۵-۱). داربست استخوانی فاقد مواد معدنی (DBM)[Demineralized Matrix Bone]، ژلاتین ماده زمینه‌ای استخوان (BMG) [Bone Matrix Gelatin] و یا پروتئین القاکننده‌ی استخوان‌سازی (BMP)[Bone Morphogenic Protein] موجود در آنها، یکی از شایسته ترین این دسته از مواد می‌باشند که از یک قرن پیش به عنوان عامل هدایت کننده‌ی استخوان‌سازی مطرح گشته و ازکاربرد بالینی گسترده‌ای برخوردار شده‌اند(۳،۶،۱۰). از سوی دیگر ترکیبات گونه‌گون کلسیم فسفات، از چون اکتاکلسیم فسفات (OCP)، علاوه بر دارا بودن خاصیت هدایت استخوان‌سازی به عنوان حاملی برای انتقال عوامل استخوان‌ساز موجود در سایر مواد زنده مانند BMG نیز عمل می‌کنند (۱۱،۱۲،۱۳).

روند ترمیم ضایعات استخوانی در صورت استفاده از مواد جایگزین شونده‌ی پیوندهای استخوانی، علاوه بر این‌که به ماهیت ساختمانی و ویژگی‌های زیست شناختی استخوان میزبان بستگی دارد، به میزان قابل توجهی به نوع ماده کاشته شده درمحل ضایعه نیز وابسته است(۱۴). گفته شده است‌که داربست استخوانی فاقد مواد معدنی (DBM) ، با توجه به منشأ اولیه آن، پس از کاشت در محل ضایعات استخوانی از هر دو روش معمول استخوان‌سازی، آغاز به‌ترمیم ضایعه استخوانی می‌نماید. DBM تهیه شده از استخوان‌های دراز پس از کاشت در محل ضایعه استخوانی، باعث القاء تمایز سلول‌های مزانشیمی موجود در حاشیه ضایعه به سلول‌های غضروف‌ساز و در نهایت استخوان‌سازی درون غضروفی می‌گردد(۱۵). در صورتی که DBM تهیه شده از استخوان‌های پهن که دارای منشأ اولیه درون غشایی می‌باشد، پس از کاشت در محل ضایعه به گونه مستقیم باعث تکثیر و تمایز سلول‌های مزانشیمی متمایز نشده به سلول‌های استخوان‌ساز و در نهایت استخوان‌سازی درون غشایی می‌گردد(۱۶). از سوی دیگر گفته شده است که اکتاکلسیم فسفات (OCP) از نظر ویژگی‌های زیست شناختی همانند TGF_{β} عمل کرده و با توجه به ویژگی‌های ساختمانی و زیست- شناختی استخوان میزبان آغاز استخوان‌سازی و ترمیم ضایعه می‌کند(۱۷)؛ به گونه‌ای که اگر در محل ضایعه موجود در استخوان‌های دراز کاشته شود، سلول‌های مزانشیمی موجود در حاشیه ضایعه را به سلول غضروفی

Archive of SID

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-03-28]

www.SID.ir

نابالغ متمایز نموده و باعث ترمیم ضایعه از راه درون غضروفی می‌گردد و یا در صورت کاشت در محل ضایعه استخوان‌های پهن، سلول‌های مزانشیمی را مستقیماً به سلولی استخوانی نابالغ متمایز نموده و باعث استخوان‌سازی درون غشایی می‌شود(۱۸).

هدف از انجام این پژوهش، مطالعه و بررسی سلول‌های درگیر در روند استخوان‌سازی و نوع استخوان‌سازی انجام گرفته پس از کاشت ترکیب ژلاتین ماده زمینه‌ای استخوان و اکتاکلسیم فسفات (OCP/BMG) در محل ضایعات استخوان‌های پهن در موش صحرایی بود.

مواد و روش ها

الف- طرز تهیه مواد :

اکتاکلسیم فسفات (OCP) و ژلاتین ماده زمینه‌ای استخوان(BMG) مورد استفاده در این پژوهش به ترتیب طبق روش‌های لجروس[1] (۱۹۸۵) و اوریست[2] (۱۹۷۳) آماده گردید(۱۹،۲۰).

ب- حجم نمونه :

در این پژوهش، از شانزده سر موش صحرایی نر و بالغ (۶- ۵ هفته‌ای) با وزن متوسط ۱۲۰ گرم و از نژاد Sprague Dawley استفاده شد. حیوانات به‌گونه تصادفی به دو گروه مورد (۸ سر) و شاهد (۸ سر) تقسیم و در شرایط استاندارد از نظر میزان نور، دما، رطوبت و تغذیه مناسب نگهداری شدند.

ج- نحوه عمل جراحی و کاشت مواد :

حیوان‌ها با استفاده از تزریق درون صفاقی کتامین هیدروکلراید (۶۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلو گرم وزن) بی‌هوش شدند. ناحیه مورد نظر واقع در سطح فوقانی کالواریا تراشیده و به‌وسیله بتادین ضدعفونی شد. پوست همراه با بافت‌های زیرین به صورت دو برش (Flap) کنار زده شد و ضریح استخوان خراشیده و برداشت گردید. با استفاده از مته دندان‌پزشکی ضایعه‌ای به وسعت ۵ میلی‌متر به صورت تمام ضخامت بر روی استخوان آهیانه ایجاد گردید. در گروه مورد، محل ضایعه پس از شست و شو با سرم نمکی سرد، به وسیله ۵ میلی‌گرم از ترکیب OCP/BMG به نسبت ۱/۴ پر گردید. برای جلوگیری از جا به جایی ذرات کاشت شده از پوشش مخصوص کنترل خون ریزی (Surgicel) استفاده شد. سپس بافت همبند و پوست به وسیله نخ جراحی قابل جذب بخیه گردید. درگروه شاهد،ضایعه‌ی ایجاد شده فقط شست و شو داده شد و به‌وسیله surgicel پوشیده گردید.

د- نمونه‌برداری و تهیه بافت جهت مطالعه میکروسکوپ نوری :

برای مطالعه ذره بین نوری، در طی روزهای هفتم و چهاردهم پس از عمل (از هر گروه دو سر)، حیوان‌ها به وسیله تزریق مجدد کتامین هیدروکلراید بی‌هوش شدند. سپس به‌وسیله خون رسانی (Perfusion) از راه قلب، ماده تثبیت کننده (پارافرمالدئید ۴ درصد در فسفات بافر نمکی (PBS) pH= 7/4) وارد بدن حیوان شده و به صورت در جا (insitu) عمل ثبوت انجام گرفت. ناحیه مورد نظر همراه با اندکی از استخوان میزبان برداشت و برای ثبوت بیشتر به مدت ۲۴ساعت در تثبیت کننده فوق و در حرارت ۴ درجه سانتیگراد قرار داده شد. نمونه‌های برداشت شده توسط محلول اسید فرمیک ۱۰ درصد، اسیدسیتریک ۲/۹درصد و تری‌سدیم سیترات ۱/۸درصد و به مدت دو هفته و در حرارت محیط کلسیم‌گیری شدند(۱۷).طبق روش‌های معمول،آماده‌سازی بافتی انجام

1. Legeros
2. Urist

Archive of SID
www.SID.ir
[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-03-28]

و از قالب‌های به دست آمده مقاطع ۵ میکرونی تهیه گردید. مقاطع پس از رنگ‌آمیزی به وسیله H&E توسط ذره بین نوریOlympus مدل BX 41 مورد مطالعه و عکس‌برداری قرار گرفتند.

هـ- نمونه‌برداری و تهیه بافت برای مطالعه ذره بین الکترونی:

برای مطالعه ذره بین الکترونی ترانسمیشن (TEM)، در طی روزهای هفتم و چهاردهم پس از عمل (از هر گروه دو سر)، حیوان‌ها به وسیله تزریق دوباره کتامین هیدروکلراید بی‌هوش شدند. سپس به وسیله خون رسانی از راه قلب، ماده تثبیت کننده (پارافرمالدئید ۲ درصد و گلوتارآلدئید ۲ درصد در بافر کاکودیلیت ۰/۱ مولار، pH=7/4) وارد بدن حیوان شده و به صورت در جا (insitu) عمل ثبوت انجام گرفت. تکه‌ای از ناحیه مورد نظر همراه با اندکی از استخوان میزبان به اندازه ۳ میلی‌متر برداشت و برای ثبوت بهتر، به مدت ۲ساعت در تثبیت کننده فوق و در حرارت ۴ درجه سانتیگراد قرار داده شدند. نمونه‌های برداشت شده به مدت دو هفته و در دمای ۴ درجه سانتیگراد توسط محلول ۵ درصد EDTA در بافر کاکودیلیت ۰/۱ مولار، کلسیم‌گیری شدند. پس از شست وشو به‌وسیله بافر پیشگفت، نمونه‌ها با استفاده از محلول ۲درصد تتروکسید اسمیوم(OSO4) به مدت یک ساعت و در دمای ۴ درجه سانتیگراد ثبوت ثانویه شدند. پس از شست و شوی دوباره، با استفاده از درجات بالارونده الکل‌اتیلیک آبگیری و به‌وسیله EPON 812 قالب‌گیری شدند. از بلوک‌های به‌دست آمده پس از تراش خوردن، به وسیله دستگاه اولترامیکروتوم برش‌های نیمه نازک (Semithin) به ضخامت ۶۰۰-۴۰۰ نانومتر تهیه و با تولوئیدین بلو رنگ‌آمیزی گردیدند. پس از مطالعه مقاطع نیمه نازک و انتخاب جایگاه مناسب، نمونه‌ها دوباره تراش خورده وبرش‌های بسیار نازک(Ultrathin) به ضخامت ۷۰-۵۰ نانومتر تهیه و بر روی گریدهای مسی قرارداده شدند. مقاطع به دست آمده به وسیله اورانیل استات و سیترات سرب رنگ‌آمیزی گردید و با استفاده از ذره بین الکترونی ترانسمیشن مدل Hitachi H-700 مورد مطالعه و تصاویر ذره بین نوری لازم گرفته شد.

یافته ها

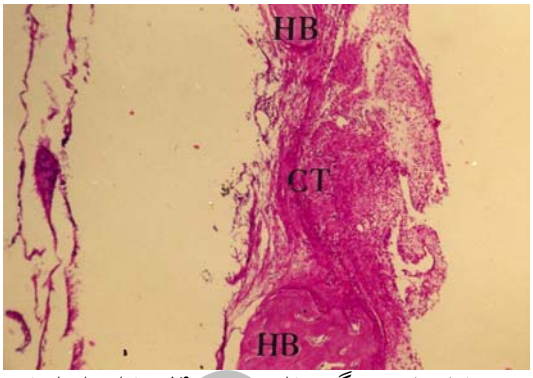
درگروه شاهد: در روزچهاردهم پس از عمل محل ضایعه به وسیله بافت همبند سست اشغال شده و تعداد معدودی سلولی استخوانی به صورت پراکنده در حاشیه ضایعه مشاهده گردید(تصویر شماره ۱).

درگروه مورد: روز هفتم پس ازعمل، مواد کاشته شده به وسیله بافت همبند غنی از سلول‌های دوکی و مدور تک هسته‌ای و به صورت پراکنده با سلول غول پیکر (giant) چند هسته‌ای در بر گرفته شده‌اند. شماری از این سلول‌ها که دارای ویژگی‌های سلول استخوانی نابالغ و یا سلول غضروفی نابالغ می‌باشند، به درون قطعات کاشته شده به‌ویژهBMG نفوذکردند. از این روز روند ترمیم ضایعه با ظهور مقادیر اندک بافت غضروفی آغاز گردید (تصویر شماره ۲). در تصاویر کوچک الکترونی، دسته‌ای از شبه سلول‌های استخوانی به اشکال گونه‌گون به همراه سلول‌های غول پیکر چندهسته‌ای که دارای هسته‌های متعدد و به اشکال و ابعاد گونه‌گون می‌باشند، در کنار قطعات ژلاتین ماده زمینه ای استخوان (BMG) مشاهده می‌شوند. شبه سلول‌های استخوانی که در نزدیکی قطعات BMG قرار دارند، در حال ترشح ماده زمینه‌ای می‌باشند که به صورت لایه نازکی بر روی قطعات BMG جمع شدند (تصویر شماره ۳). شبه سلول استخوانی فعال دارای شبکه اندوپلاسمی خشن وسیع و میتوکندری فراوان می‌باشد که نشان دهنده ساخت فعال ماده زمینه‌ای استخوان است (تصویر شماره ۴).

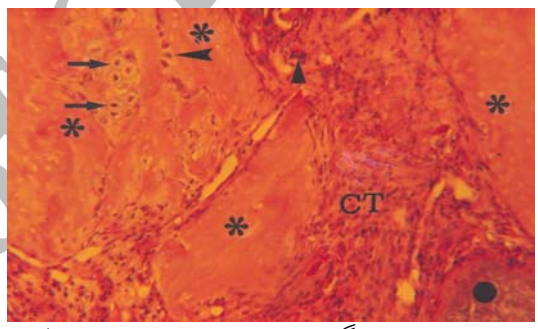
Archive of SID

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-03-28]

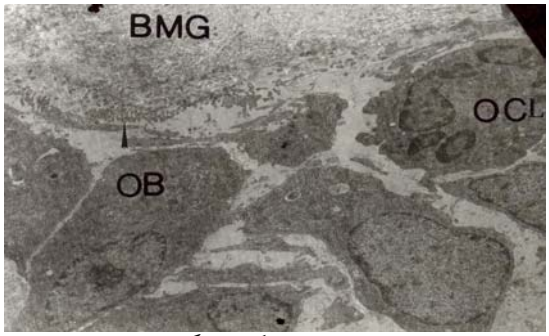
www.SID.ir



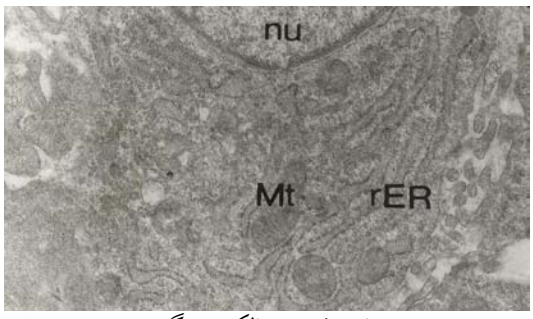
تصویر شماره ۱: نمونه گروه شاهد در روز ۱۴ – ضایعه ایجاد شده بوسیله بافت همبند (CT) اشغال گشته و هیچگونه استخوان سازی جدید در مجاورت استخوان میزبان(HB) مشاهده نمی شود. رنگ آمیزی H&E . بزرگ نمائی ۶۳×.



تصویر شماره ۲: نمونه گروه مورد در روز ۷- در ضخامت قطعات BMG (★) سلول‌های غضروفی (پیکان) مشاهده می‌شود. در درون بافت همبند (CT) سلول‌های تک هسته‌ای در اطراف مواد کاشت شده (●و★) مشاهده می‌شوند که تعدادی از آنها بدرون قطعات BMG (نوک پیکان بلند) نفوذکرده‌اند. رنگ آمیزی H&E. بزرگ- نمائی ۱۶۰×.



تصویر شماره ۳ : تصاویر ذره بینی الکترونی گروه مورد در روز ۷- شبه سلول‌های استخوانی (OB) وسلول غول پیکر چند هسته ای شبه سلول استخوان خوار(OCL) درمجاورت قطعات BMG مشاهده می‌شوند. داذبست ترشح شده (نوک پیکان) توسط شبه سلول‌های استخوانی بر روی قطعات BMG تجمع یافته اند. رنگ آمیزی اورانیل استات. بزرگ نمایی ۳۰۰۰×.



تصویر شماره ٤ : تصاویر ذره بینی الکترونی گروه مورد در روز ۷- نمائی از تصویر شماره ۳ با بزرگ نمائی بیش تر که ساختمان شبه سلول استخوانی را نشان می‌دهد. سیتوپلاسم سلول محتوی شبکه اندوپلاسمی خشن(rER)وسیع با میتوکندری‌های(Mt) متعددمی‌باشد که نشاندهنده شدت فعالیت این سلول است. رنگ آمیزی اورانیل استات. بزرگ نمایی ۱۲۰۰۰×.

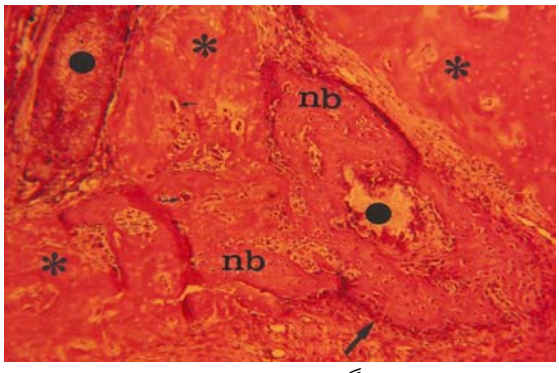
در این روز چهاردهم پس از عمل، استخوان سازی جدید،کاملاً آشکار می‌باشد که به‌صورت درجا و در بین مواد کاشته شده و نزدیک به حاشیه ضایعه انجام گرفت (تصویر شماره ۵). سلول های نابالغ استخوانی در ردیف‌های منظم بر روی تیغه‌های استخوانی جدید استقرار یافتند (تصویر شماره ۶). سلول‌های غول پیکر چندهسته‌ای که دارای خصوصیاتی شبیه به سلول استخوان خوار می‌باشند، به صورت پراکنده در درون بافت همبند و چسبیده به قطعات BMG (تصویر شماره ۷) و یا OCP (تصویر شماره ۸) قرارگرفته و در حال جذب و برداشت مواد کاشت شده می‌باشند. تصاویر ذره بینی الکترونی در این روز سلول‌های نابالغ استخوانی تیپیک را به صورت ردیفی بر روی حاشیه بافت استخوانی جدید نشان می‌دهد. این سلول‌ها مکعبی شکل بوده و دارای دستگاه گلژی وسیع، شبکه اندوپلاسمی خشن و گسترش یافته و شماری میتوکندری به صورت پراکنده می‌باشند، که نشان دهنده ساخت فعال ماده زمینه‌ای استخوان است (تصویرشماره ۹). در این روز در ضخامت داربست استخوانی جدیدکه پر از الیاف ضخیم کلاژن درجهات مختلف وکریستال‌های معدنی می‌باشد، سلول استخوانی تیپیک و کشیده دیده می‌شود. هسته

Archive of SID

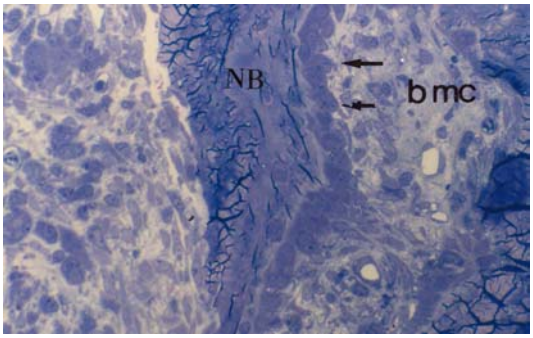
[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-03-28]

www.SID.ir

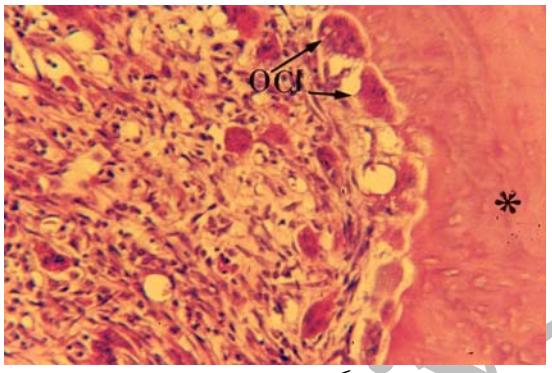
سلول در یک قطب آن واقع شده و در قطب دیگر سلول، سیتوپلاسم قرار دارد که محتوی شبکه اندوپلاسمی تحلیل رفته و تعدادی میتوکندری می‌باشد. به نظر می‌رسد که این سلول یک سلول استخوانی اولیه و یا مرحله نهایی یک سلول نابالغ باشد که در بین ماده زمینه‌ای خود ساخته محصور شده و فعالیت ترشحی آن کاهش یافته است (تصویر شماره۱۰). در تصاویر ذره بین الکترونی در این روز شبه سلول‌های استخوان خوار دیده می‌شود که دارای چندین هسته بوده و سیتوپلاسم آن‌ها محتوی شماری میتوکندری و واکوئل‌های فراوان و به اندازه‌های مختلف می‌باشد. این سلول‌ها از طرف ناحیه شفاف، به ماده کاشت شده چسبیده و کناره ناهموار (Ruffled border) آن‌ها به داخل حفرات جذب شده، نفوذ کرد (تصویر شماره ۱۱). شماری بیگانه خوار نیز در مجاورت ماده کاشته شده، دیده می‌شوند که در حال جذب نواحی آهکی نشده قطعات BMG می‌باشند. هسته بیگانه خوارها، بی‌شکل بوده و دارای زائده‌های کوتاهی است. سیتوپلاسم آنها به رنگ تیره بوده و محتوی تعداد معدودی واکوئل و لیزوزوم می‌باشد(تصویر شماره ۱۲).



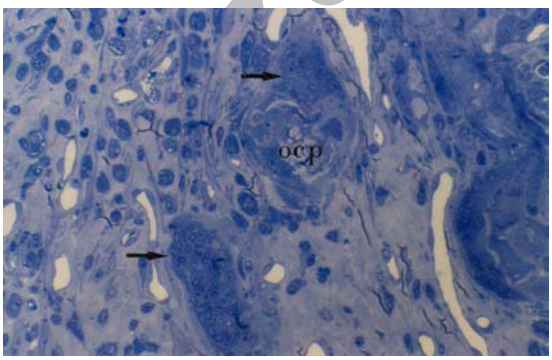
تصویر شماره ۵ : نمونه گروه مورد در روز ۱۴- استخوان سازی جدید در بین مواد کاشت شده (● و ★)قابل رویت است. استخوان جدید به وسیله سلول های نابالغ استخوان (پیکان بلند) به صورت ردیفی احاطه شده و جا به جا سلول غول پیکر چند هسته ای (پیکان کوچک) در بین مواد کاشت شده دیده می‌شود. رنگ آمیزی H&E . بزرگ نمایی ۱۰۰ × .



تصویر شماره ٦ : نمونه گروه مورد در روز ۱۴- سلول های نابالغ استخوان (پیکان) به‌صورت ردیفی و منظم درمجاورت و چسبیده به استخوان جدید (NB) استقرار یافته و حفره مغز استخوان (bmc) نیز شکل گرفته است. رنگ آمیزی تولوئیدین بلو. بزرگ نمایی۴۰۰× .



تصویر شماره ۷ : نمونه گروه مورد در روز ۱۴- سلول‌های غول پیکر چند هسته‌ای شبه استخوان خوار (OCL) که به وفور در بافت همبند و چسبیده به قطعه BMG (★) قرار داشته و در حال جذب آن می‌باشند. رنگ آمیزی H&E . بزرگ نمایی ۴۰۰ × .

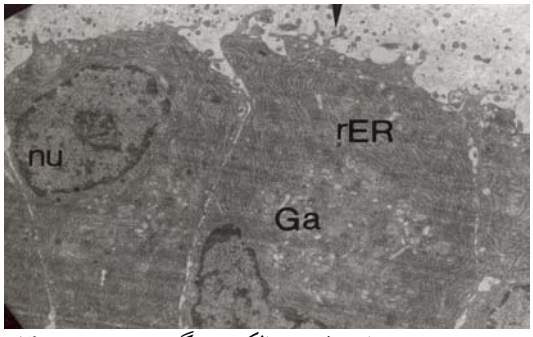


تصویر شماره ۸ : نمونه گروه مورد در روز ۱۴- سلول‌های غول پیکر چند هسته‌ای شبه استخوان خوار (پیکان) در درون بافت همبند و چسبیده به قطعه OCP مشاهده می شود که در حال جذب و برداشت OCP می‌باشد. رنگ آمیزی تولوئیدین بلو . بزرگ نمایی ۴۰۰ × .

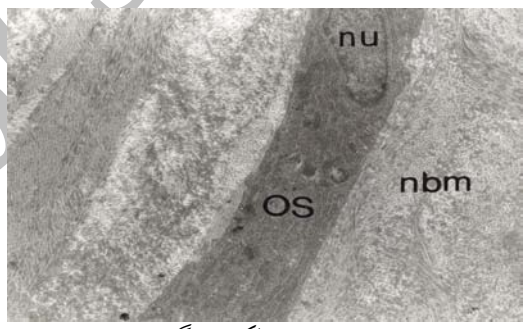
Archive of SID

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-03-28]

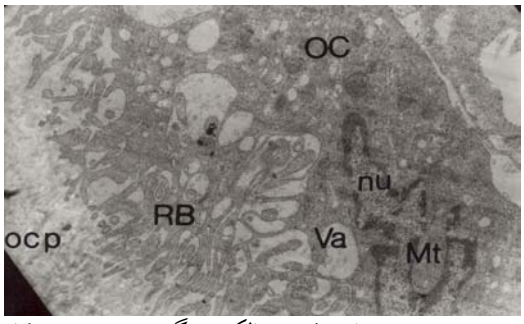
www.SID.ir



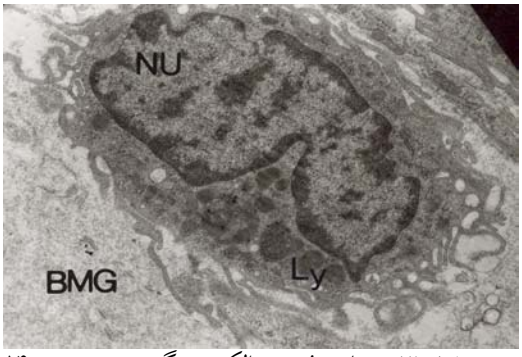
تصویر شماره ۹ : تصاویر ذره بین الکترونی گروه مورد در روز ۱۴- استخوان نابالغ مترشحه در مجاورت داربست جدید ساخته شده، نشان داده شده است. سلول و هسته آن(nu) به اشکال مختلف بوده و سیتوپلاسم آن محتوی شبکه اندوپلاسمی خشن و وسیع (rER) و دستگاه گلژی (GA) مشخصی است که به طور فعال در حال ترشح ماده زمینه ای استخوان (نوک پیکان) می‌باشد. رنگ آمیزی اورانیل استات. بزرگ نمایی ۴۴۰۰×.



تصویر شماره۱۰ : تصاویر ذره بین الکترونی گروه مورد در روز۱۴ – سلول استخوانی (OS) که به صورت کشیده در درون داربست استخوانی جدید(nbm) ساخته شده محصور شده است. هسته سلول (nu) دریک قطب آن قرارگرفته است. رنگ آمیزی اورانیل استات. بزرگ نمابی ۴۴۰۰×.



تصویر شماره ۱۱ : تصاویر ذره بین الکترونی گروه مورد در روز۱۴- شبه سلول استخوان خوار (OC) در مجاورت ماده کاشته شده مشاهده می‌شود. سیتوپلاسم سلول محتوی میتوکندری (Mt) و واکوئول های متعدد(Va) بوده و به وسیله کنار ناصاف(RB) درحال جذب OCP می‌باشد. رنگ آمیزی اورانیل استات. بزرگ نمایی ۷۰۰۰×.



تصویر شماره۱۲ : تصاویر ذره بین الکترونی گروه مورد در روز۱۴- سلول ماکروفاژ در حال جذب قطعات به جا مانده BMG مشاهده می‌شود. هسته سلول (NU) بی‌شکل و نامنظم بوده و سیتوپلاسم آن محتوی لیزوزوم (Ly) و واکوئول‌های فراوانی است. رنگ آمیزی اورانیل استات. بزرگ نمایی ۷۰۰۰×.

بحث

در این پژوهش روزهای هفتم و چهاردهم پس از کاشت برای بررسی چگونگی ترمیم ضایعه ایجاد شده و مطالعه سلول‌های درگیر در روند استخوان‌سازی انتخاب گردید. ملاک انتخاب روزهای هفتم و چهاردهم به این دلیل بود که روز هفتم بهترین زمان نمونه‌برداری برای مطالعه بافت غضروفی ایجاد شده، بدون حضور بافت استخوانی می‌باشد و امکان مطالعه سلول‌های غضروفی نابالغ را در صورت وجود در محل ضایعه، فراهم می‌نماید و روز چهاردهم بهترین زمان نمونه‌برداری برای بررسی روند ایجاد بافت استخوانی جدید در محل ضایعه و مطالعه سلول‌های استخوانی نابالغ می‌باشد(۱۵). بنابراین، دو مقطع زمانی، بهترین دوره برای مطالعه هر دو روش، معمول استخوان سازی در طی ترمیم ضایعات استخوانی است.

براساس یافته‌های حاصل از این پژوهش مشخص گردید که روند ترمیم ضایعه استخوانی ایجاد شده در استخوان آهیانه با ظهور مقادیر اندک بافت غضروفی آغاز گردید "بافت غضروفی همراه با سلول‌های غضروفی به طور محدود درقسمت‌های مرکزی ضایعه و در بین قطعات کاشت شده BMG در روز هفتم پس از

Archive of SID

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-03-28]

www.SID.ir

کاشت مشاهده گردید". بافت غضروفی ایجاد شده خیلی زود به‌وسیله سلول‌های استخوانی نابالغ و بافت استخوانی جدید جایگزین گردید؛ به طوری که در روز چهاردهم پس از کاشت، اثری از بافت غضروفی درمحل ضایعه دیده نشد و محل ضایعه عمدتا به وسیله بافت استخوانی جدید اشغال شد. در این رابطه و بر اساس نتایج ذره بین نوری و الکترونی می‌توان ادعا کرد که ترکیب OCP/BMG باعث القاء استخوان‌سازی جدید به روش درون غشایی می شود. گرچه روند ترمیم، با ظهور بافت غضروفی آغاز شد، اما حجم غضروف ساخته شده، اندک بوده و نمی‌تواند تاثیری در روند استخوان سازی داشته باشد. در این ارتباط گفته شد که مقدار اندکی بافت غضروفی ایجاد شده در نقایص ناحیه جمجمه‌ای، پیش از آن که تاثیری در روند استخوان‌سازی وایجاد بافت استخوانی‌جدید داشته باشد، به وسیله سلول‌های غول پیکر چند هسته‌ای جذب و برداشت می‌شود(۸). از سوی دیگر، در این پژوهش دیده نشد که بافت غضروفی در قسمت‌های مرکزی ضایعه باشد و بافت استخوانی جدید در ابتدا، بیشتر در موقعیت‌های محیطی و نزدیک به حاشیه ضایعه، القاء و ساخته شد که همخوان با نتایج حاصل از مطالعات ونگ[1] و همکارانش (۱۹۹۹) می‌باشد(۹،۸). در توجیه این مسأله گفته شد که در مراحل اولیه‌ی روند ترمیم در ضایعات ناحیه جمجمه‌ای، عروق خونی از حاشیه ضایعه، شروع به تهاجم به درون آن نموده و بنابراین نسبت به قسمت‌های مرکزی ضایعه از تغذیه خونی بیش‌تری برخوردار می‌باشند. از این‌رو در مکان‌هایی که غنی از عروق‌خونی و سرشار از اکسیژن هستند، اولویت با تمایز سلول‌های استخوان‌ساز بوده و در پی استخوان‌سازی درون غشایی می‌باشند و مکان‌هایی که با کمبود عروق خونی و میزان اکسیژن مواجه هستند، عمل غضروف سازی القاء می‌گردد(۲۲،۲۱). بنابراین با توجه به این که در این پژوهش، ضایعه درست بر روی محل عبور شریان شامه‌ای میانی ایجاد گردید، احتمالا تغذیه خونی مناسب و افزایش میزان اکسیژن در این ناحیه، به تمایز بیش تر سلول‌های استخوان‌ساز کمک نموده و باعث شد که در طی روند ترمیم بافت استخوانی جدید عمدتا در محیط ضایعه و به روش درون غشایی ساخته شود.

از سوی دیگر، یافته‌های حاصل از این پژوهش، نشان داد که سلول‌های غول پیکر چند هسته‌ای همزمان با ظهور سلول‌های درگیر در روند استخوان‌سازی، در درون ضایعه و چسبیده به مواد کاشته شده دیده می‌شوند. در این ارتباط یاماشیتا[2] و همکارانش (۱۹۹۴) این فرضیه را مطرح کردند که سلول‌های غول پیکر چند هسته‌ای که در ابتدا در درون ضایعه پدیدارمی‌شوند، آغاز به جذب ماده کاشته شـد. "BMG " نمـوده و پس از آن باعث فعال‌شدن روند تمایزسلول‌های استخوان‌ساز در محل ضایعه و استخوان‌سازی جدید می‌شوند(۲۲). از طرف دیگر مشاهده گردید که OCP کاشته شده نیز به وسیله سلول‌های غول پیکر چند هسته‌ای که دارای ویژگی‌هایی شبیه به سلول های استخوان خوار می‌باشند، در بر گرفته شده و ضمن کمک به القاء استخوان سازی، به تدریج توسط این سلول‌ها جذب و برداشت می‌شوند. پیشنهاد گردید قطعاتOCP موجود در درون بافت همبند، خیلی زودتر از قطعات محصور شده در ضخامت استخوان جدید ساخته شده، جذب و برداشت می‌شوند. باقی ماندن بیش‌تر قطعات OCP در ضخامت بافت استخوانی جدید می‌تواند ضمن جذب تدریجی، بافت استخوانی بیش‌تری را به وجود آورد (۲۴،۲۳).

نتایج حاصل ازمطالعه بافت شناسی و ذره بین الکترونی سلول‌های درگیر در روند استخوان‌سازی در این پژوهش نشان داد که ترمیم نقایص ایجاد شده در استخوان آهیانه، پس از استفاده از ترکیب OCP/BMG از راه استخوان‌سازی درون غشایی انجام می‌شود.

1. Wang

2. Yamashita

Archive of SID
www.SID.ir
[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-03-28]

فهرست منابع

1. Rosiris D, Marcos B, Abrao R, Maria A. Induction of osteogenesis by demineralized homologous and xenograft bone matrix. ***Acta Cirurgica Brasileira.*** 2003; 18(3): 178-182.
2. Nelson L, Matuda F, Macedo L, Gonzalez M.B. Bone defect regeneration with bioactive glass implantation in rat. ***J. Appl. Oral Sci.*** 2004; 12(2): 137-143.
3. Yamashita K, Tagaki T: Ultrastractural observation of calcification preceding new bone formation induced by demineralized bone matrix gelatin. ***Acta Anat.*** 1992; 143: 261-267.
4. Perssok PE, Sisask G,Nilsson O: Indomethacin inhibits bone formation in inductive allografts but not in autografts: Studies in rat. ***Acta Orthop.*** 2005; 76(4): 465-9.
5. Losee JE, Karmacharya J, Gannon FH, Slemp AE, Ong G. Reconstruction of the immature craniofacial skeleton with a carbonated calcium phosphate bone cement: interaction with bioresorbable mesh. ***J. Craniofac. Surg.*** 2003; 14(1): 117-124.
6. Vehof JW, Takita H, Kuboki Y, Spauwen PH, Jansen JA. Histological characterization of the early stages of bone morphogenetic protein-induced osteogenesis: ***J. Biomed. Mater. Res.*** 2002; 61(3): 440-449.
7. Reddi AH, Weintraub S, Muthumaran N: Biologic principles of bone induction. ***Orthop. Clin. North Am,*** 1987; 18: 207-212.
8. Wang J, glimcher MJ: Characterization of matrix-induced osteogenesis in rat calvarial bone defects: I. Differences in the cellular response to demineralized bone matrix implanted in calvarial defects and in subcutaneous sites. ***Calcif. Tissue Int,*** 1999; 65: 156-165.
9. Wang J, glimcher MJ: Characterization of matrix-induced osteogenesis in rat calvarial bone defects: II.Origins of bone forming cells. ***Calcif. Tissue Int,*** 1999; 65: 486-493.
10. Peterson B, Whang PG, Iglesias R, Wang JC. Osteoinductivity of commercially available demineralized bone matrix. Preparation in a spine fusion model. ***J. Bone Joint Surg. Am.*** 2004; 86(10): 2243-50.
11. Habibovic P, Van der valk CM, De groot K, Meijer G. Influence of octacalcium phosphate coating on osteoinductive properties of biomaterials. ***J. mater. Sci. Mater. Med.*** 2004; 15(4): 373-380.
12. Suzuki O, Kamakura S, Katagiri T, Nakamura M, Zhao B. Bone formation enhanced by implanted octacalcium phosphate involving conversion into ca-deficient hydroxyapatite. ***Biomaterials.*** 2006; 27(13): 2671-81

Archive of SID
[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-03-28]
www.SID.ir

13. Sargolzaei Aval F, Sobhani A, Arab MR, Sarani SA, et al: The efficacy of implant of octacalcium phosphate in combination with bone matrix gelatin on bone regeneration in skull defects in rat. ***Iran J. Med. Sci,*** 2004; 29(3): 124-129
14. Scott Ck, James A. H, The matrix of endochondral bone differs from the matrix of intramembranous bone. ***Calcif. Tissue Int,*** 1991; 49: 349-354.
15. Rabie A.b.M, Lie Ken Jie R.K.P: Integration of endochondral bone grafts in the presence of demineralized bon matrix (DBM). Int. ***J. Oral Maxillofac. Surg,*** 1996; 25: 311-318.
16. Scott Ck, James A. H: Intramembranous bone matrix is osteoinductive. ***Anat. Rec,*** 1994; 238: 23-30.
17. Suzuki O, Nakamura M, miyasakay, Kagayama M: Maclura pomifera agglutinin-binding glycoconjugate on converted apatite from synthetic octacalcium phosphate implanted into subperiosteal region of mouse calvaria. ***Bone and Mineral,*** 1993; 20: 151-166.
18. Sasano Y, Kamakura S, Nakamura M, Suzuki O: Subperiosteal implantation of octacalcium phosphate (OCP) stimulates both chondrogenesis and osteogenesis in the tibia, but only osteogenesis in the parietal bone of a rat. ***Anat. Rec,*** 1995; 242: 40-46.
19. Legeros RZ: Preparation of octacalcium phosphate (OCP): A direct fast method. ***Calcif. Tissue Int,*** 1985; 37: 194-197.
20. Urist MR, Iwata H: Bone morphogenesis in implants of insoluble bone gelatin. ***Proc. Natl. Acad. Sic. USA,*** 1973; 70: 3511-3515.
21. Okamoto Y, Horisaka Y, Yamashita K, Takagi T: Muscle tissue reaction to implantation of bone matrix gelatin. ***Clin. Orthop. Rel. Res,*** 1991; 263: 242-252.
22. Yamashita K, Kuwahara M, Ishizuki H. Effect of 1-hydroxyethane-1, 1-diphosphonic acid (HEDP) on new bone formation induced by bone matrix gelatin (BMG). ***Acta Histochem.*** (Jena), 1994; 96: 181-195.
23. Kawaguchi H, Ogata T, Shirakawa M, Okamoto H: Ultrastractural and ultracytochemical characteristics of multinucleated cells after hydroxyapatite implantation into rat periodontal tissue. ***J. Periodont. Res,*** 1992; 27: 48-54.
24. Kamakura S, Sasano Y, Ohki H, Nakamura M. Multinucleated giant cells recruited by implantation of octacalcium phosphate (OCP) in rat bone marrow share ultrastractural characteristics with osteoclasts. ***J. Of Electron Microscopy,*** 1997; 46(5): 397-403. ***Clinic. Orthop.*** 1998; 355: 66-72.

Archive of SID

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-03-28]

www.SID.ir