مطالعه استخوانسازی وکلسیفیکاسیون هتروتروپیک در محل کشت ژلاتین ماتریکس استخوان داخل غشایی

فردین فتحی .M.Sc☆♦، احمد حسینی .Ph.D★، مجتبی رضازاده .Ph.D☆،
مرضیه پناهی .M.Sc☆، تقی الطریحی .Ph.D☆

☆ دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریح

★ دانشگاه شهید بهشتی، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریح

♦آدرس مکاتبه: تهران، صندوق پستی ۴۴۷-۱۶۳۱۵، جهاد دانشگاهی علوم پزشکی ایران

چکیده

* **هدف:** بررسی توان القائی و طول عمر قطعات Bone Matirx Gelatin (BMG) استخوانهای داخل غشایی و کلسیفیکاسیون هتروتروپیک در محل کشت آنها.

* **مواد و روشها:** دراین تحقیق از ۱۰۰ سر موش صحرایی نر ۱ تا ۲ ماهه، نژاد Sprague Dawely استفاده شد. ابتدا استخوانهای پیشانی ۶۰ سر موش صحرایی جدا شدند و با استفاده از روش Urist و همکارانش، BMG از آنها تهیه شد. پس از آن ۲ میلی گرم از BMG در عضلات راست شکمی سمت راست و چپ ۴۰ سر موش صحرایی کشت داده شد. عضلات سمت راست به عنوان گروه آزمایش و عضلات سمت چپ به عنوان گروه شاهد انتخاب شدند. مقداری از BMG که در گروه شاهد کشت داده شد به منظور حذف خاصیت القائی آن به مدت نیم ساعت در معرض حرارت °۸۰ سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس در روزهای ۷، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵ و ۳۵، بررسیهای بافت‌شناسی با استفاده از میکروسکوپهای نوری و الکترونی و به کمک رنگ‌آمیزیهای عمومی و اختصاصی انجام شد.

* **یافته‌ها:** ۱) کلسیفیکاسیون هتروتروپیک در محل کشت ژلاتین ماتریکس استخوانهای داخل غشایی دیده می‌شود. ۲) اکثر قطعات BMG استخوانهای داخل غشایی در محل کشت یکپارچگی خود را تا روز سی و پنجم حفظ می‌کنند. ۳) توان القائی ماتریکس استخوانهای داخل غشایی ضعیف است.

* **نتیجه‌گیری:** ۱) احتمالاً عواملی که کلسیفیکاسیون هتروتروپیک را در محل کشت ژلاتین ماتریکس استخوانهای داخل غشایی و داخل غضروفی کنترل می‌کنند مشابه هستند. ۲) احتمالاً عواملی که سبب افزایش طول عمر BMG استخوانهای داخل غشایی و گرافت استخوانهای داخل غشایی درمحل کشت و محل پیوند می‌شوند یکسان هستند. ۳) در مقایسه با مطالعاتی که قبلاً در زمینه ماتریکس استخوانهای داخل غضروفی انجام شده است توان القایی ماتریکس استخوانهای داخل غشایی ضعیفتر است.

* **گل واژگان:** کلسیفیکاسیون هتروتروپیک، استخوانسازی داخل غشایی، ژلاتین ماتریکس استخوان، پیوند استخوانهای داخل غشایی

مقدمه

استفاده از اتوگرافتهای متشکل از استخوان کورتیکال، اسفنجی یا هر دوی اینها برای ترمیم نقایص استخوانی، تقریباً در ۸۰ درصد تا ۹۰ درصد بیماران موفقیت‌آمیز بوده است اما تهیه اتوگرافت، نیاز به یک عمل جراحی اضافی (معمولاً در ناحیه ستیغ خاصره) دارد. علائمی همچون درد، افزایش حساسیت و بی‌حسی در ناحیه گلوتئال ۶ تا ۲۰ درصد از بیماران وجود داشته و در ۳ تا ۹ درصد از بیماران نیز، عوارض بیشتری در محل تهیه اتوگرافت ایجاد می‌شود.

گاهی به جای اتوگرافت از آلوگرافت استفاده می‌شود که در این حالت نیز پتانسیل استئوژنیک کمتر، سرعت باز جذب بیشتر و عروق‌زایی مجدد کمتر در یک آلوگرافت در مقایسه با اتوگرافت، کارایی آلوگرافتها را محدود می‌کند. در هنگام استفاده از آلوگرافت، نگرانی انتقال عفونت نیز وجود دارد. با توجه به مشکلات مذکور که در هنگام استفاده از گرافتها در درمان نقایص استخوانی وجود دارد، در سالهای اخیر پژوهش به منظور یافتن یک جانشین مناسب برای گرافتها، منجر به انجام تحقیقات زیادی در زمینه پروتئینهای درگیر در پدیده القای استخوانی به صورت *in vivo* شده است (۲،۱). این پروتئینها که یکی از اجزاء ماتریکس آلی استخوان محسوب می‌شوند، BMP[1] نام دارند.

پروتئینهای BMP برای اولین بار توسط Urist، نامگذاری شدند و به‌واسطه توانائی‌شان در القای تشکیل غضروف و استخوان از سلولهای مزودرمی غیراسکلتی، کشف شده‌اند و در حال حاضر به عنوان عوامل درمانی جهت ترمیم شکستگیها، نقایص پری اردونتال، القای رشد استخوان در اطراف ایمپلانت‌ها و پروتزها مورد توجه بسیاری از محققین قرار گرفته‌اند (۳).

یکی از روشهای به کارگیری و بررسی خاصیت القایی استخوان استفاده از BMG است. BMG عمدتاً چهارچوب کلاژنی ماتریکس آلی استخوان است که آرایش طبیعی فیبرهای کلاژن در آن از دست رفته و همراه با این بافت کلاژنی پروتئینهای BMP وجود دارند. سایر مواد موجود در ماتریکس استخوان از جمله مواد معدنی و تصفیه مواد آلی در هنگام تهیه BMG از استخوان استخراج می‌شوند.

معمولاً حجمهای بزرگی از استخوان برای ترمیم نقایص جمجمه‌ای صورتی[2] لازم است. مشاهدات بالینی نشان می‌دهد که در ناحیه کرانیوفاسیال گرافت استخوانی داخل غشایی نسبت به گرافت استخوانی داخل غضروفی، باز جذب کمتری را تحمل می‌کند (۴).

Peer مشاهده کرد که گرافتهای داخل غشایی برخلاف گرافتهای استخوانی داخل غضروفی، قادرند حجمشان را در بافت نرم حفظ کنند (۵).

Smith و Abramson نشان دادند که گرافت استخوان داخل غشایی نسبت به گرافت استخوان داخل غضروفی در خرگوش، باز جذب کمتری را تحمل می‌کند (۶).

James و Linton با مطالعه بر روی خرگوش و میمون، یافته‌های محققین قبلی را تأیید کردند و علت احتمالی از دست رفتن کمتر حجم گرافتهای داخل غشایی را، عروق‌زایی سریع ذکر کردند (۴).

Hardesty و Marsh گزارش کردند که اختلافات موجود بین گرافتهای داخل غشایی و داخل غضروفی به منشأ جنینی استخوان مربوط نبوده و احتمالاً به معماری سه بعدی خاص استخوانهای داخل غشایی وابسته است (۷). از طرفی Glowacki اظهار نمود که تکنیکهای مورد استفاده در مطالعه Marsh و Hardesty نمی‌تواند از فرضیه آنها حمایت کند و از جمله تکنیکهای ضروری برای اثبات این فرضیه را تحلیل مورفومتریک مستقیم ترکیب و ساختمان بخشهای کورتیکال و اسفنجی استخوان در گرافتهای داخل غشایی و داخل غضروفی ذکر کرد (۸).

از طرف دیگر Oklund و Prolo (۹) و Bruchardt و همکارانش (۱۰) با مطالعه گرافتهای استخوانی، خاصیت القایی استخوان داخل غشایی را ضعیف گزارش کردند.

در کشت حاصل از استخوان داخل غضروفی، قبل از اینکه تشکیل استخوان در محل کشت القا شود یک نوع کلسیفیکاسیون ویژه در روزهای ۵ و ۷ بعد از کشت در اطراف اکثر قطعات BMG مشاهده می‌شود. این نواحی کلسیفیه هتروتروپیک، همیشه با محلهای فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز منطبق نیست. فرض بر این است که این نوع کلسیفیکاسیون بدون هیچ واسطه سلولی صورت می‌گیرد، بنابراین Yamashita و Takagi برای افتراق آن از کلسیفیکاسیونی که در محل تشکیل استخوان تازه رخ می دهد، آن را رسوب مواد معدنی بدون واسطه سلول AMD[3] نامگذاری کردند. AMD ابتدا به صورت رسوبات کلسیفیه کروی شکل کوچکی است که به‌تدریج رشد کرده و به هم متصل می‌شوند.

رسوبات کلسیفیه در ناحیه BMG شامل هیدروکسی آپاتیت، کربنات آپاتیت و اجزاء مختلف تشکیل دهنده فسفات کلسیم است که با گذشت زمان، دو ترکیب اول در محیط غالب می‌شود (۱۱).

این نوع کلسیفیکاسیون تا به حال در محل کشت BMG استخوانهای داخل غشایی گزارش نشده است. همان‌طوری‌که ملاحظه می‌شود، با مرور منابع و مطالعات انجام شده در زمینه استخوانهای داخل غشایی و داخل غضروفی، می‌توان سئوالات زیر را طرح کرد.

۱) با توجه به اینکه طول عمر گرافتهای داخل غشایی درمحل گرافت و داخل بافتهای نرم بیشتر از گرافتهای داخل غضروفی گزارش شده است، آیا تفاوتی بین خاصیت القایی و طول عمر BMG استخوانهای داخل غشایی در این تحقیق با نتایج مطالعات قبلی انجام شده در زمینهٔ استخوانهای داخل غضروفی، در محل کشت وجود دارد یا خیر؟ طرح این سئوال از آن جهت حائز اهمیت است که BMG یک بافت استخوانی مرده فاقد سلول است که معماری سه بعدی اولیه‌اش در طی روند تهیه آن از استخوانها به هم می‌خورد.

۲) آیا کلسیفیکاسیونی که تا به حال در محل کشت BMG

1. Bone Morphogenic Protein
2. Craniofacial
3. Acellular Mineral Deposition

استخوانهای داخل غضروفی مشاهده شده در محل کشت BMG استخوانهای داخل غشایی هم وجود دارد یا خیر؟

تحقیق حاضر برای جواب دادن به سئوالات فوق طرح‌ریزی و انجام شد و از میکروسکوپهای نوری و الکترونی و رنگ‌آمیزیهای عمومی واختصاصی برای انجام مشاهدات لازم، استفاده شد.

مواد و روشها

در این تحقیق از ۱۰۰ سر موش صحرایی (RAT) نر، ۱ تا ۲ ماهه، نژاد Sprague Dawley استفاده شد. به این ترتیب که استخوانهای پیشانی ۶۰ سر موش را جداکرده و با استفاده از روش Urist و همکارانش (۱۲) از آنها BMG تهیه شد. ۲ میلی‌گرم BMG در عضلات راست شکمی سمت راست و چپ ۴۰ سر موش صحرایی کشت داده شد. عضلات سمت راست و چپ به‌ترتیب به عنوان گروه آزمایش و شاهد انتخاب شدند. مقداری از BMG که در گروه شاهد کشت داده شد برای حذف خاصیت القایی آن، به مدت نیم ساعت در معرض حرارت ۸۰ سانتی‌گراد قرار گرفت.

جهت تهیه BMG مطابق روش Urist، پس از آنکه استخوانهای مورد نظر جداشدند بلافاصله به منظور جلوگیری از انعقاد پروتئینهای BMP در ساختمان آنها، به داخل نیتروژن مایع منتقل شدند. سپس استخوانها را از نیتروژن مایع خارج ساخته، بعد از جداکردن بافت نرم و پریوست از آنها، به قطعات ۲ تا ۳ میلی‌متری تقسیم شدند. از محلول کلروفرم ـ متانول به نسبت ۱:۱ در دمای ۲۵ سانتی‌گراد و به مدت ۲۴ ساعت برای استخراج لیپیدها، آنزیمهای آندروژن یا مهار این آنزیمها و از محلول اسید کلریدریک ۰/۶ نرمال به مدت ۲۴ ساعت برای دمینرالیزه کردن قطعات استخوانی و استخراج پروتئینهای محلول در اسید استفاده شد. سپس از محلول کلرید کلسیم ۲ مولار به مدت ۲۴ ساعت جهت استخراج پلی‌ساکاریدهای پروتئینی با وزن مولکولی پائین و از محلول ۰/۵ مولار EDTA به مدت ۴ ساعت جهت استخراج کلسیم آزاد و فسفوپروتئینها استفاده شد. پس از آن قطعات استخوانی به منظور چروکاندن کلاژن موجود در ساختمان آنها، به مدت ۲۴ ساعت در محلول کلریدلیتیوم ۸ مولار قرار داده شد. در نهایت از آب ۵۵ درجه برای جداکردن ذرات قابل حل در آب BMG استفاده شد. دمای محلولها در مراحل دوم تا پنجم ۲ سانتی‌گراد بود.

با توجه به اینکه اندازه ذرات BMG در محل کشت یک عامل اساسی در القای استخوانسازی هتروتروپیک محسوب می‌شود؛ لذا برای تهیه ذرات با اندازه مناسب ابتدا قطعات BMG را لیوفیلیز کرده و پس از خردکردن آنها به قطعات کوچکتر در نیتروژن مایع، به کمک الکهای استاندارد ذراتی با اندازه ۷۴ تا ۵۰۰ میکرون جداسازی شده و در دمای ۷۰- سانتی‌گراد تا زمان کشت، نگهداری شدند. پس از تهیه ذرات با اندازه مناسب از BMG، ۲ میلی‌گرم از آن داخل عضلهٔ راست شکمی هریک از موشها کشت داده شد.

در هر دو گروه در روزهای ۷، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵ و ۳۵ بعد از عمل، از محل کشت نمونه‌برداری شده و در هر روز به ازای هر گروه ۴ نمونه با میکروسکوپ نوری مطالعه شدند. از تثبیت کننده‌های فرمالین و سوسا[1] برای ثابت کردن نمونه‌ها و از رنگ‌آمیزیهای H&E، آلسیان بلو، تولوئیدین بلو و آلیزارین‌رداس برای مطالعه تغییرات بافتی در محل کشت استفاده شد. همچنین در روز ۲۵ بعد از عمل، دو تا از نمونه‌های گروه کنترل به کمک محلولهای گلوتارآلدئید ۲/۵ درصد و تتراکسیداسمیوم ۱ درصد به‌عنوان فیکساسیون اولیه و ثانویه، تثبیت شده و پس از انجام مراحل آماده‌سازی و رنگ‌آمیزی، با میکروسکوپ ترانس‌میشن مشاهده شدند.

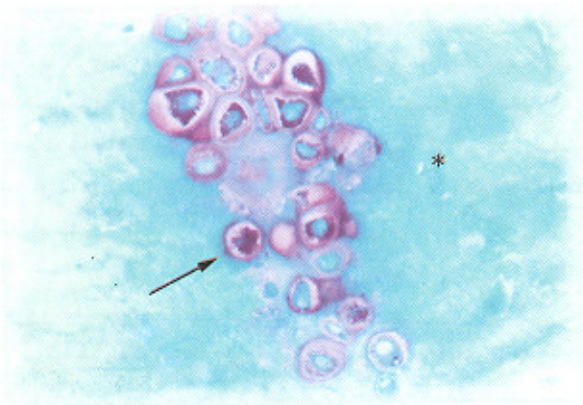
یافته‌ها

* روز هفتم

در هر دو گروه آزمایش و شاهد قطعات BMG در رنگ‌آمیزی H&E به رنگ صورتی در لابلای بافت سلولی گرانوله قابل مشاهده بود که این بافت عمدتاً حاوی فیبروبلاستها و سلولهای آماسی مزمن از جمله لنفوسیتها، ماکروفاژها و گاهی سلولهای غول‌پیکر است. یکپارچگی در کلیه قطعات حفظ شده و فقط حاشیه آنها مقداری نامنظم بود. در مقاطع تهیه شده به‌صورت سریال در رنگ‌آمیزیهای عمومی و اختصاصی هیچ‌گونه اثری از سلولهای غضروفی و استخوانی و کلسیفیکاسیون هتروتروپیک در اطراف قطعات BMG مشاهده نشد.

* روز دهم

در گروه آزمایش فقط در مقاطعی که تراکم قطعات BMG در آنها بیشتر بود، گروههای چند سلولی از کندروبلاستها در حاشیهٔ قطعات مشاهده شد (شکل ۱).



شکل ۱: روز دهم: گروهی از سلولهای غضروفی هیپرتروفی شده (↑) در لابه‌لای قطعات BMG (*) دیده می‌شود (رنگ‌آمیزی تولوئیدین بلو، بزرگنمایی ۲۴۰×).

در رنگ‌آمیزی آلیزارین‌رداس، کلسیفیکاسیون هتروتروپیک در حاشیه قطعات BMG دیده شد (شکل ۲). این مقاطع از مجاور مقاطعی که

1. Susa

واجد سلولهای غضروفی بودند، تهیه شدند. در گروه آزمایش در هیچ‌کدام از مقاطع سلولهای استخوانی مشاهده نشد. در گروه شاهد هیچ‌گونه اثری از سلولهای غضروفی یا استخوانی و کلسیفیکاسیون هتروتروپیک دیده نشد. در هر دو گروه در حاشیه قطعات BMG، نامنظمی‌های بسیاری دیده شد ولی یکپارچگی در قطعات تقریباً به‌طور کامل حفظ شده بود (شکل ۱).

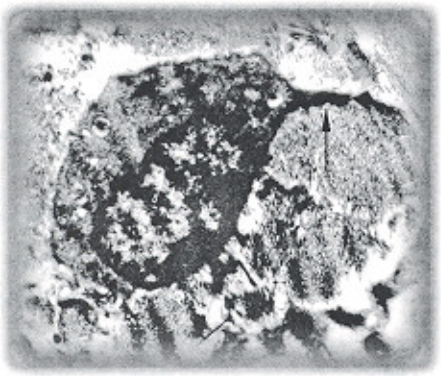
شکل ۲: روز دهم: کلسیفیکاسیون هتروتروپیک به‌صورت نوادی قرمز رنگ در حاشیه قطعات BMG به‌خوبی قابل مشاهده است (رنگ‌آمیزی آلیزارین رداس، بزرگنمایی ۲۳۰×).

* روز پانزدهم

در گروه آزمایش سلولهای غضروفی زیادی در حاشیهٔ قطعات BMG مشاهده می‌شوند. این سلولها هیپروتروفی شده و ماتریکس آنها کلسیفیه شده است. در رنگ‌آمیزی آلیزارین رداس، کلسیفیکاسیون حاشیه قطعات BMG و غضروف به‌وضوح مشاهده می‌شود. سلولهای استخوانی در این روز در لابه‌لای بافت استئوئیدی تازه ترشح شده، دیده می‌شوند. در گروه شاهد هیچ‌گونه اثری از سلولهای غضروفی و استخوانی و کلسیفیکاسیون دیده نمی‌شود. در هر گروه بر تعداد شکافها و حفرات در ضخامت قطعات BMG افزوده شده و این نامنظمی‌ها در گروه آزمایش بیشتر از شاهد است و به نظر می‌رسد که گسیختگی در قطعات کوچک بیشتر است.

* روز بیستم

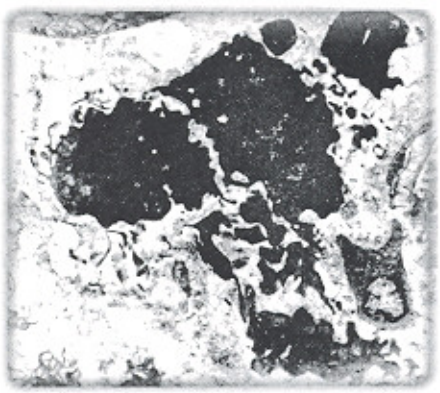
بر تراکم بافت استخوانی هتروتروپیک و محلهای تشکیل آن افزوده شده و تراکم بافت غضروفی شدیداً کاهش یافته است. سلولهای غضروفی تخریب شده و ماتریکس آنها کلسیفیه شده است (شکل ۳). در رنگ‌آمیزی آلیزارین رداس، کلسیفیکاسیون زیادی در حاشیه قطعات BMG مشاهده می‌شود. در گروه شاهد اثری از سلولهای غضروفی و استخوانی و کلسیفیکاسیون هتروتروپیک دیده نمی‌شود. بر گسیختگی قطعات BMG افزوده شده و یکپارچگی قطعات در گروه شاهد بیشتر به نظر می‌رسد.



شکل ۳: نمایی از کلسیفیکاسیون بافت غضروفی در روز بیستم: سلولهای غضروفی هیپرتروفی شده و در حال تخریب بوضوح مشاهده می‌شود و ادغام لاکوناها به همدیگر برای ایجاد فضاهای بزرگتر در چند جا به چشم می‌خورد (رنگ‌آمیزی H & E ۲۳۰×).

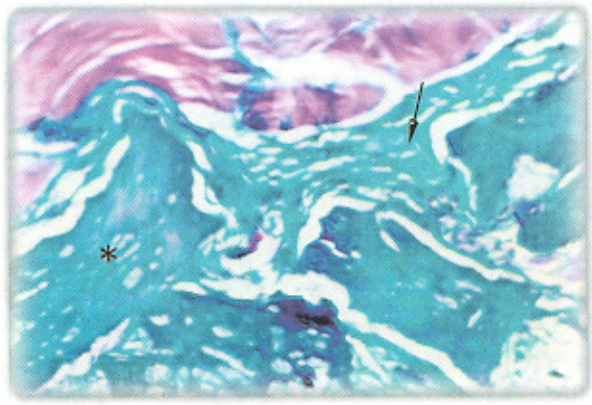
* روز بیست و پنجم

در گروه آزمایش بر شدت نامنظمی و گسیختگی در قطعات BMG افزوده شده و یکپارچگی در قطعات کوچک از بین رفته است اما کاهش تراکم قطعات در محل کشت، خیلی محسوس نیست. در این روز در هیچ‌کدام از مقاطع، اثری از سلولهای غضروفی دیده نشد. به‌نظر می‌رسد که بافت استخوانی از حالت پراکندگی خارج شده و برای تشکیل یک مدل استخوانی، متمرکز شده است. این مدل استخوانی شبیه به یک مقطع عرضی از یک استخوان بلند حاوی مغز استخوان است؛ این در حالی است که BMG مورد استفاده در این تحقیق از استخوان پهن تهیه شده است. در میکروگرافهای الکترونی بدست آمده از بخشی از استخوان هتروتروپیک تازه تشکیل شده که فعالیت استئوبلاستیک واضحی در حاشیه آن وجود دارد، استئوبلاستهای فعالی را می‌توان مشاهده کرد که دارای هسته گرد، بزرگ و یوکروماتین هستند.



شکل ۴: میکروگراف الکترونی روز بیست‌وپنجم: یک سلول استئوبلاست که توسط ترشحات استئوییدی احاطه شده و یکی از زوائد آن (↑) در بالای تصویر به‌خوبی مشاهده می‌شود (بزرگنمایی ۶۶۰۰×).

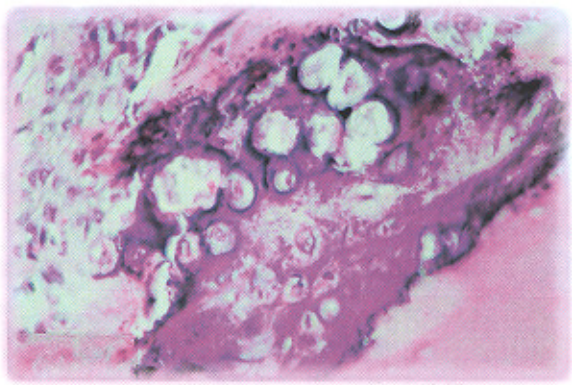
در ماتریکس آلی اطراف آنها[1] علائم کلسیفیکاسیون دیده نشد و در لایه‌لای ماتریکس آلی، زوائد سلولی استئوبلاستها قابل مشاهده بود (شکل ۴) در میکروگرافهای تهیه شده از ناحیه مغز استخوان سلولهای مربوط به بافت خونساز را می‌توان مشاهده کرد که اکثر آنها دارای هسته یوکروماتین هستند (شکل ۵). در گروه شاهد اثری از سلولهای غضروفی و استخوانی و کلسیفیکاسیون هتروتروپیک دیده نشد.



شکل ۵: میکروگراف الکترونی روز بیست‌وپنجم: سلولهای مختلف مغز استخوان با هسته‌های یوکروماتین دیده می‌شوند (بزرگنمایی ۵۰۰۰×).

* روز سی وپنجم

در گروه کنترل بقایای قطعات BMG در رنگ‌آمیزیهای مختلف دیده می‌شود. اگرچه اندازه قطعات کوچکتر شده و حاوی شیارها و حفرات بیشتری نسبت به روزهای قبل در ضخامت خود هستند؛ اما اکثر قطعات هنوز یکپارچگی خود را از دست نداده‌اند (شکل ۶). حتی در مقایسه با روز هفتم، می‌توان گفت که نزدیک به هفتاد درصد قطعات، هنوز هم در محل کشت باقی مانده‌اند.



شکل ۶: نمایی از بقایای قطعات BMG در محل کشت در روز سی‌وپنجم: در نیمه بالایی شکل چند قطعه BMG (*) دیده می‌شود که هنوز یکپارچگی خود را در محل کشت حفظ کرده‌اند. قطعات بوسیله یک کپسول کلاژنی (↑) از بافت عضلانی اطراف جدا شده‌اند.

تراکم بافت استخوانی نسبت به روز بیست و پنجم، تفاوت محسوسی نداشته و مغزاستخوان، بیشتر حاوی سلولهای چربی است. در گروه شاهد اثری از سلولهای غضروفی و استخوانی دیده نشد و به‌نظر می‌رسد که یکپارچگی در قطعات BMG نسبت به گروه کنترل بیشتر حفظ شده است.

بحث

در این تحقیق سه یافته قابل توجه وجود دارد. یکی از این یافته‌ها، تأخیر در زمان تشکیل غضروف و استخوان در محل کشت نسبت به مطالعاتی است که تاکنون در زمینه ماتریکس استخوانهای داخل غضروفی انجام گرفته است در تمامی این مطالعات از جمله مطالعه‌ای که اخیراً توسط خانم پناهی و همکارانش (در این تحقیق جهت انجام یک مقایسه منطقی بین یافته‌های این تحقیق با تحقیق ایشان، کلیه عوامل مؤثر در تحقیق از جمله سن، نژاد، گونهٔ حیوان و مواد و روشهای انجام تحقیق مانند روش تهیه BMG، کشت BMG و ... همانند تحقیق ایشان انتخاب شد) انجام شده است؛ غضروف از روز سوم یا پنجم و استخوان از روز هفتم در محل کشت مشاهده شده است (۱۳) در حالی که در این تحقیق و تحقیق دیگری که اخیراً توسط نگارنده و همکارانش انجام شده است (۱۴) غضروف در روز دهم و استخوان از روز پانزدهم به بعد در محل کشت مشاهده شدند. Elizabeth و همکارانش (۱۵) گزارش کردند که افزایش پروتئینهای BMP در محل کشت، زمان القای استخوانسازی را به جلو می‌اندازد به عبارت دیگر هر چه میزان پروتئینهای BMP که عامل بروز خاصیت القایی استخوان هستند در محل کشت کمتر باشد استخوانسازی هتروتروپیک در محل کشت دیرتر القا می‌شود. بنابراین با توجه به اینکه القای استخوانسازی هتروتروپیک در محل کشت BMG استخوانهای داخل غشایی در این مطالعه در مقایسه با کلیه مطالعات انجام شده در زمینه BMG استخوانهای داخل غضروفی، ۵ تا ۱۰ روز دیرتر صورت می‌گیرد. این نتیجه مهم می‌تواند بیانگر ضعف خاصیت القایی ماتریکس استخوانهای داخل غشایی باشد.

یکی دیگر از یافته‌های این تحقیق، مدت زمانی است که قطعات BMG می‌توانند در محل کشت، حجم و یکپارچگی خود را حفظ کنند. گزارش شده است که در محل کشت ECBMG، حدود ۷۰ درصد قطعات BMG تا روز سی‌ام بعد از کشت از بین می‌رود (۱۶). مطالعهٔ انجام شده توسط خانم پناهی نیز این مطلب را تأیید می‌کند. دراین مطالعه، در تمام نمونه‌ها اکثر قطعات BMG، یکپارچگی و حجم خود را حفظ کرده و حتی در روز سی‌وپنجم به نظر می رسد که حدود ۷۰ درصد قطعات کشت، باقی مانده‌اند. این مطلب از آن جهت اهمیت دارد که در طی مطالعاتی که به منظور مقایسه گرافتهای داخل غشایی و داخل غضروفی صورت گرفته است، به‌طور مکرر گزارش شده که گرافتهای داخل غشایی قادرند حجم بیشتری را از خود حفظ کنند. به عبارت دیگر؛ مدت زمان طولانی‌تری در داخل بافتهای نرم یا محل گرافت باقی می‌مانند. Hardesty و Marsh در سال ۱۹۹۰ اختلافات موجود بین

1. Osteoid

گرافتهای داخل غشایی و داخل غضروفی را به معماری سه بعدی خاص استخوانهای داخل غشایی نسبت دادند. در حالی‌که Glowacki تکنیکهای مورد استفاده در مطالعه آنها را برای حمایت از فرضیه‌شان کافی ندانست و از جمله تکنیکهای ضروری جهت اثبات این فرضیه را تحلیل مورفومتریک مستقیم ساختمان بخشهای مختلف استخوانهای داخل غشایی و داخل غضروفی ذکر کرد (۸،۹،۱۰). Zins و Linton علت احتمالی از دست رفتن کمتر حجم گرافتهای داخل غشایی را عروق‌زایی سریع آنها، بیان کردند. اما از آنجایی که قطعات BMG، یک بافت حاوی سلولهای مرده و اغلب فاقد سلول است و معماری سه بعدی قطعات استخوانی در جریان تهیه BMG، به هم می‌خورد، این عامل نمی‌تواند نقش مؤثری داشته باشد.

بنابراین با توجه به نتایج بدست آمده، شاید بتوان گفت که تفاوت موجود بین گرافتهای داخل غشایی و داخل غضروفی و نیز قطعات ECBMG و IMBMG از نظر مدت زمان بقای آنها در محل گرافت یا محل کشت، مربوط به عاملی است که در گرافتهای استخوانی و در BMG مشترک است. از یک سو به دلیل استفاده از BMG در این مطالعه، خاصیت القایی ماتریکس استخوانهای داخل غشایی ضعیف مشاهده شده است. همچنین Bruchardt در سال ۱۹۷۸ و Oklund در سال ۱۹۸۴، خاصیت القایی گرافتهای داخل غشایی را ضعیف گزارش کردند و از سوی دیگر، Nillson و همکارانش در سال ۱۹۹۰ نشان دادند که میزان استخوانسازی هتروتروپیک می‌تواند در میزان بازجذب قطعات BMG مؤثر باشد (۱۷). به عبارت دیگر، مهار استخوانسازی هتروتروپیک در محل کشت باعث کاهش میزان بازجذب قطعات BMG در محل کشت می‌شود. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که عامل افزایش طول عمر قطعات BMG و حتی گرافتهای داخل غشایی نسبت به استخوان داخل غضروفی، ضعف خاصیت القایی ماتریکس استخوانهای داخل غشایی است که باعث کاهش میزان استخوانسازی هتروتروپیک در محل کشت و به تبع آن، کاهش میزان باز جذب قطعات BMG می‌شود. یافتهٔ دیگر این تحقیق که این فرضیه را نیز تأیید می‌نماید، این است که در گروه شاهد که BMG فاقد خاصیت القایی است، میزان باز جذب قطعات BMG کمتر از گروه کنترل است.

یکی از مسائلی که در طی مطالعات انجام شده در زمینه کشت ECBMG، توجه برخی از محققین را به خود جلب کرده است؛ کلسیفیکاسیونی است که در محل کشت ECBMG در اطراف قطعات کشت داده شده، از روز هفتم و گاهی پنجم به بعد مشاهده می‌شود. با توجه به این نظریه که این نوع کلسیفیکاسیون بدون واسطه سلولی استئوبلاستها و ماتریکس وزیکولها صورت می‌گیرد، Takagi و Yamashita برای افتراق آن از کلسیفیکاسیونی که در محل تشکیل استخوان تازه رخ می‌دهد، آن را رسوب مواد معدنی بدون واسطه یا AMD نامگذاری کردند. آنها اظهار داشتند که کلسیم و فسفاتی که در ترکیبات AMD وجود دارد احتمالاً از عروق خونی تأمین شده و از طریق مکانیسم هسته‌سازی غیریکنواخت در حاشیه بعضی از قطعات BMG رسوب می‌کنند. غلظت مواد معدنی در ناحیه BMG احتمالاً بستگی به معماری BMG دارد تا اینکه وابسته به ساختمان استخوان باشد (۱۰). Linden نیز گزارش کرد که AMD یک پیش شرط مهم برای القای استخوانسازی محسوب می‌شود. باور بر این است که AMD به صورت رسوبات کلسیم و فسفات بر روی بعضی از قطعات BMG شروع می‌شود؛ بنابراین ممکن است BMG علاوه بر آنکه به‌عنوان حامل BMP عمل کرده و آن را به‌تدریج به بافت اطراف می‌دهد، به عنوان یک محل ذخیره برای مواد معدنی نیز عمل نماید که این مواد برای تشکیل استخوان ضروری هستند (۱۸).

در این مطالعه نیز در روزهای ۳، ۷، ۱۰، ۱۵ این نوع کلسیفیکاسیون با استفاده از رنگ‌آمیزی آلیزارین‌رداس بررسی شد. مقاطع از کلیه نمونه‌ها به‌طور سریال تهیه و مطالعه شد. مشاهدات انجام شده نشان داد که در روزهای ۳ و ۷ هیچ‌گونه کلسیفیکاسیونی در حاشیه قطعات BMG وجود ندارد؛ اما در روز دهم قابل مشاهده بوده و تا روزهای پانزدهم و بیستم بر میزان آن افزوده می‌شود. نکته قابل توجه این است که شروع کلسیفیکاسیون در روز دهم همزمان با مشاهده بافت غضروفی در محل کشت است. مهمتر اینکه کلسیفیکاسیون فقط در مجاور مقاطعی دیده می‌شود که در آنها سلولهای غضروفی وجود دارند. لذا با توجه به نتایج مطالعه حاضر، این احتمال وجود دارد که کلسیفیکاسیون در اطراف قطعات BMG به نحوی با تشکیل غضروف مرتبط باشد. به عبارت دیگر؛ ممکن است برخلاف آنچه Takagi و Yamashita گزارش کرده‌اند کلسیفیکاسیون وابسته به سلولها (سلولهای غضروفی) و ماتریکس وزیکولهای مترشحه از آنها باشد.

همچنین در این تحقیق در روز بیست و پنجم نتایج بدست آمده از بررسیهای میکروسکوپ الکترونی از جمله وجود استئوبلاستهای فعال در حاشیه بافت استخوانی تازه تشکیل شده و سلولهای مغز استخوان در مرکز بافت استخوانی هتروتروپیک نتایج میکروسکوپ نوری را تأیید می‌کند. علت انتخاب روز بیست و پنجم برای انجام بررسیهای میکروسکوپ الکترونی، افزایش تراکم استخوان هتروتروپیک در محل کشت و تشکیل مغز استخوان خونساز در این روز است.

تقدیر و تشکر

این طرح بخشی از طرح تحقیقاتی شمارهٔ ۱-۱۰۰ مصوب جهاد دانشگاهی دانشگاه علوم پزشکی ایران است. بدینوسیله نویسندگان مراتب تقدیر خود را از کلیه پرسنل محترم این مرکز ابراز می‌دارند.

References

1. Damien CJ, Parsons JR: Bone graft and bone graft substitutes: a reveiw of current technology and application. J Appl Biomech 1991; 2: 187-208

2. Goldberg VM, Stevenson S: Biology of autograft and

allografts in bone and cartilage allografts. Biol Clin Appl 1991; 3-12
3. Thomas AL, Mohan S: Growth factors for Bone Growth and Repair: IGF TGFB and BMP. Bone 1996; 19(1): 1S-12S
4. James EZ, Linton AW: Membranous versus endochondral bone. Plast Recon Surg 1983; 778-785
5. Peer L: Transplantation of Tissues, Williams and Wilkins. Baltimore 1995; 1: 18L
6. Smith ID, Abramson M: Membranous versus Endochondral bone grafts. Arch Otolaryngol 1974; 99: 203-209
7. Hardesty RA, Marsh JL: Craniofacial onlay bone Grafting: A prospective evaluation of graft morphology orientation and embryonic origin. Plastic and Recon Surg 1990; 85(1): 5-14
8. Glowacki J: Discussion of craniofacial onlay bone grafting. Plast Recon Surg 1990; 85(1): 15-21
9. Oklund SA, Prolo DJ: Quantitative comparisons of healing in cranial fresh autografts. Frozen autografts and proccessed autografts and allografts in canine skull defects. Clin Orthop 1986; 205: 269-275
10. Bruchard H, Glowezewski CF: Freeze dried allogenic segmental cortical-bone grafts in dogs. J Bone Surg 1978; 60(A): 1082-1090
11. Yamashita K, Takagi T: Calcification preceding newbone formation Induced by demineralized bone matrixgelatin. Arch Histo Cytol 1992; 55: 31-43
12. Urist MR, Iwata H: Bone morphogenesis in implants of insoluble bone gelatin. Proc Nat Acad Sci USA 1973; 70(12): 3511-3515
۱۳- پناهی مرضیه: کشت ژلاتین ماتریکس استخوان در عضله راست شکمی موش صحرایی. پایان نامه دوره کارشناسی ارشد بافت شناسی، تهران، دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس، ۱۳۷۵، صفحه ۹۹
۱۴- فتحی فردین، حسینی احمد، رضازاده مجتبی، پناهی مرضیه، الطریحی تقی: القای استخوانسازی داخل غضروفی توسط کشت ژلاتین ماتریکس استخوان داخل غشایی در عضلهٔ راست شکمی موش صحرایی. مجلهٔ پزشکی کوثر ۱۳۷۸، شمارهٔ ۴(۲)، صفحات ۱۱۶-۱۰۷
15. Elizabeth A, Vicki R: Recombinant human bone morphogenetic protein induces bone formation. Proc Nat Acad Sci USA 1990; 87: 2220-2224
16. Urist MR: Fundamental and clinical bone physiology. J B Lippincott company. East Washington Square, Philadelphia, 1981, pp 83-108
17. Nilsson OS, Persson PE: Heterotropic new bone formation causes resorption of the inductive bone matrix. Clin Ortho and Relat Research 1990; 2: 250-258
18. Linden GJ: Bone Induction in implants of decalcified bone and dentine. J Anat 1975; 119:359-367