التجدد العظمي الموجه: تأثير عامل النمو المستخلص من الصفيحات الدموية على انقسام الخلايا المولدة للعظم

غسان جميل وزير*

الملخص

هدفنا من بحثنا هذا معرفة الدور الذي يؤديه عامل النمو المستخلص من الصفيحات الدموية البشرية PDGF في تحفيز الخلايا العظمية على الانقسام والتكاثر مقارنة بالسيروم كونه مادة بروتينية تحتوي العديد من عوامل النمو. نفذ البحث على الخلايا العظمية من العظم القحفي للفأر الأبيض (الهامستر السوري). مستخدمين ال MTT كريقة للبحث مع t student للتحليل الإحصائي. وقد كانت مجموعات البحث ثلاثاً: مجموعة شاهدة ومجموعة السيروم ومجموعة PDGF

أظهرت نتائج الاختبار أن السيروم حقق تحفيزاً مضطرداً للخلايا العظمية على النمو والانقسام فزاد عدد الخلايا عند استخدام تركيزات السيروم المختلفة بعد مرور (24) ساعة من لحظة المعالجة مقارنة بالمجموعة الشاهدة. واستمرت الزيادة بالارتفاع مع ازدياد الزمن وكانت هذه الزيادة أكبر بعد مرور 48 ساعة من لحظة المعالجة. وقد كانت النتائج جميعاً مهمة ودالة إحصائياً ($p<0.05$).

أما النتائج التي حصلنا عليها في مجموعة الPDGF فقد أظهرت أن الدور التحفيزي الذي تقوم به هذه المادة للخلايا العظمية على التكاثر والانقسام كان ضعيفاً بعد مرور 24 ساعة من لحظة معالجة الخلايا بالمقارنة مع المجموعة الشاهدة. حيث قلت الزيادة في عدد الخلايا كلما ارتفع تركيز الPDGF. وأدَّى أثراً سلبياً تجلى في إنقاص عدد الخلايا بدلاً من زيادتها عند تركيز 10 نانوغرام مل.

* أستاذ– قسم تعويض الأسنان– كلية طب الاسنان– جامعة دمشق.

إلا أنّه بعد مضي 48 ساعة فإنَّ الزيادة الضئيلة التي حدثت عادت لتتناقص وتصبح أقل ضآلة. أما تركيز 10 نانوغرام مل فقد عاد بعد 48 ساعة ليعطي زيادة قليلة في عدد الخلايا مقدارها 3,53%. وبالتحليل الإحصائي للنتائج تبين أنها جميعاً غير دالة إحصائياً ($p<0.05$) على ضوء ما تقدم نستطيع القول: إنَّ السيروم شكل مادة فعالة في تحفيز الخلايا العظمية على الانقسام والتكاثر في حين أخفق عامل النمو PDGF في أداء هذا الدور وظل ضعيف الأثر بشكل ملفت.

أجري البحث في معهد علوم الخلايا و الجزيئات الخلوية– كلية الملكة ماري للطب وطب الأسنان– جامعة لندن.

الكلمات المفتاحية:

التجدد العظمي الموجه Guided Bone Regeneration.

عامل النمو المستخلص من الصفيحات الدموية للإنسان PDGF.

الخلايا العظمية Osteoblasts.

السيروم Serum.

Guided bone Regeneration :the Effect of PDGF on the Proliferation of Osteoblasts

Ghassan Wazir*

Abstract

The purpose of this study was to investigate the effect of PDGF (Platelet-Derived Growth Factor) on the proliferation of osteoblasts cells compared with Serum .

Rat calvarium primary cells, PDGF-AB, serum, trypsin, MEM Alpha Medium, antibiotic, antifungal, cell culture flasks, MTT powder, acidified isopropanol, microscope, incubator, vortex, 96 wells plates, ELISA reader, MTT assay. T test

3 groups were included: Control, Serum with different concentrations (5%,10%,20%) and PDGF with different concentrations(0.05ng/ml, o.1ng/ml,1ng/ml,10ng/ml)

serum with it's different concentrations had strong effect and stimulated the proliferation of osteoblast cells. They were increased by (25.78% - 98.56%) after 24 hours of treatment and by (38.58% - 132.47%) after 48 hours of treatment. Statistically all results were significant ($p<0.05$) .

However, PDGF-AB had little or no effect on the proliferation of osteoblasts. They were increased by (9.16% in 0.05ng/ml,4.87% in 0.01ng/ml,and 3.34% in 1ng/ml) but were decreased by 7.44% in 10ng/ml concentration samples after 24 hours of treatment. Then after 48 hours of treatment osteoblasts were decreased by 0.32% in 0.05ng/ml and increased by 0.96% in 0.1ng/ml, 6.43% in 1ng/ml and 3.53% in 10ng/ml concentration samples. Statistically all results were non significant ($p>00.5$)

serum with it's different concentrations had strong effect and stimulated significantly the proliferation of osteoblast cells .However the growth factor PDGF-AB was incompetent or had little non significant effect on the proliferation of osteoblasts cells.

* Prof. Dept. of prosthodontics-Faculty of Dentistry -Damascus University.

مقدمة : Introduction

يعدُّ التجدد العظمي الموجه وسيلة علاجية حديثة تحاول تنمية النسيج العظمي وحثه على التجدد والتشكل (التوالد) لتعويض الخسارة التي أصيب بها نتيجة امتصاصه بفعل أمراض الأنسجة الداعمة حول السنية أو بفعل الامتصاص اللاحق بعد القلع. ولتحقيق ذلك تستخدم الأغشية المسامية التي تشكل الهيكل الهندسي للبنى العظمية لإعادة توليد العظم بفعالية (1) أو الطعوم العظمية الذاتية مترافقة مع الأغشية الحاجزة ذات التركيبات المختلفة (2).

ولزيادة فعالية المعالجة بدأ التفكير بإضافة عوامل النمو(growth factors) إلى الأغشية المسامية المستخدمة (membranes) أو الأغشية الحاجزة المرافقة للطعوم العظمية.

وقد ذكرت بعض الدراسات أن عوامل النمو وفي مقدمتها عامل النمو المستخلص من الصفيحات الدموية للإنسان Platelet-Derived Growth Factor (PDGF) تؤدي دوراً هاماً في إعادة توليد العظم (Bone Augmentation) عن طريق تحفيز الخلايا المولدة للعظم (osteoblasts) لزيادة فعاليتها في الانقسام وتشكيل العظم (3-4-5-6-7-8-9-10-11-12-13-14)

إلا أن دراسات أخرى ذكرت أن هذا الدور لل (PDGF) في تحفيز الخلايا المولدة للعظم على الانقسام والتكاثر لبناء عظم جديد هو غير واضح. إذ إنّه حسب رأيهم يسبب زيادة في عدد الخلايا في البداية ثم يعود هذا العدد للانخفاض بعد أربع و عشرين ساعة (15)،أو أنه يعطي زيادة سريعة في عدد الخلايا العظمية ولكن هذه الزيادة مؤقتة (16) أو أنه كان ضعيف الأثر بشكل ملفت (17).

ولتعزيز هذا الدور التحفيزي للخلايا العظمية ليصبح فاعلاً بقوة، قام العديد من الباحثين بمشاركة ال (PDGF) مع عوامل نمو أخرى سواء كان ذلك في مناطق التراجع العظمي حول السني أو حول الزرعات أو في مناطق الأسناخ الدرد(18-19-20-21-22).

ولم تخل دراسات أخرى من الإشارة إلى الأثر السلبي لعامل النمو (PDGF) حيث يثبط الحركة العشوائية للخلايا العظمية (Chemotactic effects) (23). أو أنه بدا عاجزاً عندما استخدم كمحفز وحيد للانقسام (24)،أو أنه لم يعط أثراً يذكر بالمقارنة مع الحموض الأمينية المستخلصة من إنسان سليم حيث زادت هذه الحموض الانقسام والتمايز والهجرة للخلايا العظمية ولم يعط ال (PDGF) هذا الأثر(25).

الهدف من البحث: Aim of the study

دراسة تأثير عامل النمو المستخلص من الصفيحات الدموية (PDGF) في الانقسام التكاثري (Prolifiration) للخلايا العظمية المزروعة مخبرياً، مقارنة مع السيروم (مصل الدم) بوصفه مادة بروتينية تحتوي على العديد من عوامل النمو.

مواد البحث وطرائقه: Materials and Methods

مواد البحث:

1- خلايا عظمية من نوع Calvarium أخذناها من الفأر الأبيض (الهامستر السوري) ثم زرعناها في مزارع خلوية مخبرية.

2- سائل ميديوم تعيش فيه الخلايا من نوع: (MEM Alpha Medium)، مكون من ريبونيوكليوساييد + دي اوكسي ريبونيوكليوساييد (Ribonucleosides + Deoxyribonucleosides) في عبوات سعتها نصف ليتر، صنع شركة جيبكو (Gibco).مخصص للاستخدام المخبري تحفظ في درجة حرارة 4 مئوية.

3- سيروم (Serum) عبوات نصف ليتر صنع شركة فيرست لينك البريطانية مخصصة للاستخدام المخبري. تحفظ في درجة حرارة 20 مئوية تحت الصفر.

4- PDGF-AB .(عامل النمو المستخلص من الصفيحات الدموية البشرية) مخصص للاستخدام المخبري. يحفظ في درجة حرارة 20 الى 70 مئوية تحت الصفر.

5- مضاد حيوي (Antibiotic) هو مزيج من البنسللين و

الستريبتومايسين. مخصص للاستخدام المخبري وهو في عبوات (50) مـل، من صنع شـركة جيبكـو (Gibco). تركيبـه:(Pinicillin 5000 un/ml P.G.Sodium+5000mg/ml Streptomycin sulfate in 0.85% .(Solin

6- مضاد فطري: (Amphotercin-b 250 mg/ ml) . مخصص للاستخدام المخبري وهو في عبوات (50) مـل، مـن صـنع شـركة انفيتـروجين .(Invetrogen)

7- تريبـسين (200mg/l versen(ADTA) +500mg/l Trypsin 1/250) من إنتـاج شـركة كانبريكس(Canbrex).

8- محلول ال (MTT) تركيز 0.5 ملغ من مسحوق ال MTT في المللي ليتر الواحد من محلول ال PBS . وتركيب هـذا المـسحوق هـو : 3-(4,5-dimethylthiazpl-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)

9- محلول الايزوبروبونال الحمـضي (20 مـل Isoproponal + 25 مايكرو ليتراً من حمض كلور الماء المركز.

10- جهاز رجاج آلي (vortex)

11- مجهر ضوئي نوع Wilovert

12- زجاجة خاصة لعد الخلايا مقـسمة إلى مربعات مجهرية

13- عدادة يدوية لعد الخلايا

14- شرائح اختبار كل واحدة منها مكونة من 96 حجيـرة اختبـار(96 wells plates) لها غطاء جيد الإغلاق

15- جهاز قـارئ للألـوان (ELISA Enzyme Linked (reader Immuno Sorbent Assay يجـري قراءة للبواتق الحاوية على 96 حجيرة اختبار.

16- حاضنة كهربائية نـوع Galaxy S تؤمن درجة حرارة ثابتة مقدارها 37 درجة مئوية في وسط هوائي يحتـوي على 5% من غـاز ثـاني أوكـسيد الكربون CO2 على مدار الساعة.

17- بواتق خاصة بزرع الخلايا.

طرائق البحث: Methods

1- اختبار ال MTT (MTT assay)

تقوم هذه الطريقة في البحث على مبـدأ تلـوين مـادة mitochondria للخلايـا

الموجودة في حجرات الاختبار ثم إدخالها في الجهاز القارئ للألوان فيقوم بالقراءة وإعطاء قيمة رقمية . كلما زاد عدد الخلايا في حجيرة الاختبار ازدادت الكثافة اللونية من ثَمَّ زادت القيمة العددية المعطاة.

وقد أجرينا هذا الاختبار بعد مرور 24 ثم 48 ساعة من لحظة معالجة الخلايا بمادتي البحث (PDGF) و (Serum).

2- اختبار (T test) لتحليل النتائج إحصائياً.

مجموعات البحث:

المجموعة الشاهدة: عولجت الخلايا فيها بمقدار 1% من السيروم إذْ يعدُّ هذا التركيز من السيروم حيادياً لا يؤدي دوراً في تنمية الخلايا وإنّما يبقيها حية فقط .وخلت تماماً من ال PDGF

مجموعة السيروم: عولجت الخلايا فيها بتركيزات السيروم الآتية: (5%، 10%، 20%).

مجموعة PDGF: عولجت الخلايا فيها بتركيزات ال PDGF (0,05 نانوغرام مل، 0,1 نانوغرام مل، 1 نانوغرام مل، 10 نانوغرام مل) وقد جهزت التركيزات كلها ضمن سائل الميديوم الحاوي المضاد الحيوي والفطري. أضفنا إلى مجموعات ال PDGF مقدار 1% من السيروم أسوة بالمجموعة الشاهدة.

طريقة العمل:

أجري البحث في معهد علوم الخلايا و الجزيئات الخلوية– كلية الملكة ماري للطب وطب الأسنان– جامعة لندن.

Institute of Cell and Molecular Science Barts and the London, Queen Mary's School of Medicine and Dentistry

ولقد مر البحث بالمراحل الآتية:

زرع الخلايا: Tissue Culture

استخلصنا الخلايا العظمية من العظم القحفي للفأر الأبيض (الهامستر السوري) حديث الولادة بعمر يوم واحد حسب أرنت و هندرسون Arnett and Henderson (26) وفق المراحل الآتية:

1- جمعنا 40-50 فأراً حديث الولادة بعمر يوم واحد من 6 أمهات وبعد قتلهم مخبرياً بكسر العنق جمعت

رؤوسهم في سائل وسيط تحت درجة حرارة صفر مئوية.

2- أمسكنا الرأس بملقط وأجرينا شقاً بالمقص فوق الأنف على طول الخط المتوسط لعظم القحف ثم كشفنا العظم بواسطة ملقط آخر.

3- باستخدام المقص قمنا بقص العظم القحفي ابتداء من العظم الصدغي مروراً بالعظم القفوي انتهاء بالعظم الجبهي، عزلناه بعدها عن الأنسجة الرخوة الملتصقة به وحفظناه في سائل ملحي (PBS) تحت درجة حرارة صفر مئوية، ريثما جمعنا كمية العظم المطلوبة.

4- بعد جمع كمية العظم كلها قمنا بتقطيعها إلى قطع صغيرة بالمقص ثم غسلناها بالسائل الملحي لإزالة أي أثر للدم والأنسجة الرخوة العالقة.

5- وضعنا الكتلة العظمية الناتجة ضمن 4 مل من سائل الكولاجيناز (Solution Collagenase) بدرجة حرارة 37 مئوية وأجرينا تحريكاً مستمراً مدة 10 دقائق باستخدام جهاز تحريك مغناطيسي (magnetic stirring) إذ يؤدي ذلك إلى تحرير الخلايا من النسيج العظمي فتسبح ضمن سائل الكولاجيناز.

6- بعد ذلك تركنا القطع العظمية ترسو في القعر ثم سحبنا سائل الكولاجيناز الحاوي على الدفعة الأولى من الخلايا. أضفناه إلى 4 مل من السيروم بدرجة حرارة صفر مئوية.

7- أعدنا المرحلة السابقة مرة واحدة مدة 10 دقائق (الدفعة الثانية) ثم ثلاث مرات مدة 20 دقيقة (الدفعات الثالثة والرابعة والخامسة) .ووضعنا كل دفعة في أنبوب تثفيل مستقل مع السيروم.

8- ثفلنا الأنابيب بسرعة 1500 دورة في الدقيقة مدة 5 دقائق. سحبنا السائل بواسطة الماصة الآلية وأضفنا بدلاً منها 10 مل من سائل الميديوم المغذي إلى كل أنبوب،

وبعد رج الأنبوب وإعادة نشر الخلايا بشكل متجانس ضمن السائل وضعنا كل دفعة في بوتقة زرع مستقلة.

9- بعد مرور 48 ساعة سحبنا السوائل المغذية وأجرينا غسلاً للخلايا بالمحلول الملحي المعقم ثم أضفنا سوائل مغذية جديدة.

10- بعد مرور 48 ساعة أخرى دمجنا الدفعات الثالثة والرابعة والخامسة كونها خلايا عظمية صرفية واستبعدنا الدفعتين الأولى والثانية حيث شوهدت بعض الخلايا الليفية مع الخلايا العظمية وزرعناها في بواتق (flasks) زرع خلايا جديدة في ظروف عقامة كاملة. وأضفنا إلى الخلايا 10 مل من سائل الميديوم مضافاً إليه السيروم بنسبة 10%، والمضاد الحيوي والفطري، ثم وضعنا هذه البواتق على مدار الساعة في حاضنة بدرجة حرارة 37 مئوية. وكنا نجري تبديلاً لهذا السائل المغذي كل ثلاثة أيام مع مراقبة يومية لنمو الخلايا وتكاثرها، وفي كل مرة امتلأ فيها قعر البوتقة بالخلايا كنا نجمع هذه الخلايا ونعيد توزيعها في ثلاث بواتق فارغة معقمة جديدة، وهكذا إلى أن حصلنا على العدد الكافي من الخلايا العظمية لاجراء التجارب عليها. وطريقة جمع الخلايا وتوزيعها في البواتق تمت على النحو الآتي:

1- نسحب سائل الميديوم المغذي بواسطة ماصة سوائل آلية.

2- نغسل البوتقة ب 5 مل من المحلول الملحي PBS لإزالة آثار السائل المغذي ونعيد سحب المحلول الملحي المضاف بالماصة الآلية.

3- نضيف 1.5 مل من التربسين ونتأكد من أن هذا السائل قد لامس كل الخلايا ثم نضع البوتقة في الحاضنة مدة 1-2 دقيقة، نخرجها بعد ذلك فنلاحظ تحت المجهر الضوئي أن الخلايا التي كانت ملتصقة على قعر البوتقة قد انفكت وسبحت في سائل التربسين.

4- نأخذ هذا السائل المليء بالخلايا السابحة بواسطة ماصة يدوية معقمة ونوزع الكمية في البواتق الفارغة الجديدة بالتساوي أي 0.5 مل في كل بوتقة ثم نضيف 10 مل من السائل المغذي ليغمر الخلايا ونضعها من جديد في الحاضنة حيث تعود للتكاثر و الانقسام. وقد أجرينا كل المراحل السابقة في ظروف عقامة كاملة.

طريقة توزيع الخلايا ومعالجتها في حجرات الاختبار

جمع الخلايا:

بعد تنمية الخلايا في بواتق الزرع وتوافر العدد المطلوب منها لإجراء التجربة قمنا بجمعها حسب البنود الثلاثة الأولى من الفقرة السابقة، ووضعناها في أنبوب تثفيل مدبب القعر ثم أضفنا 4 مل من سائل الميديوم المغذي فوقها . وضعنا الأنبوب في المثفلة بعد تحديد سرعة دورانها ب 1500 دورة في الدقيقة وبزمن قدره 5 دقائق ودرجة حرارة 4 مئوية. بعد انتهاء التثفيل تجمعت الخلايا في قعر الأنبوب على شكل كتلة ترى بالعين المجردة. سحبنا السائل من الأنبوب بالماصة الآلية ثم أضفنا 1 مل من سائل الميديوم ووضعنا الأنبوب فوق رجاج آلي (vortex) لإعادة نشر الخلايا ضمن السائل بشكل متجانس.

عد الخلايا:

أنجزنا عملية العد بواسطة زجاجة مخصصة لهذا الغرض مقسمة إلى 16 مربعاً مجهرياً. نضع فوقها 25 مايكرو ليتراً من السائل الحاوي على الخلايا ونقوم بعملية العد باستخدام عدادة يدوية فنحصل بالنتيجة على المتوسط الحسابي لعدد الخلايا في المربع الواحد، نضرب هذا العدد بالرقم 10000 فنحصل على العدد الكلي للخلايا في (1مل) من السائل. في تجربتنا كان عدد الخلايا المطلوب هو 100000 في (1مل) من السائل أي 10000 خلية في (100) مايكروليتر من السائل وهو الحجم الذي وضعناه في كل حجيرة اختبار.

توزيع الخلايا:

استخدمنا شريحتي اختبار تحوي الواحدة منها على 96 حجيرة اختبار. وضعنا في كل حجيرة 100 مايكرو ليتر من السائل الحاوي على الخلايا أي بمعدل 10000 خلية. ووضعناها في الحاضنة مدة 24 ساعة تعود خلالها الخلايا للالتصاق على قعر الحجيرة.

نكون بذلك قد وزعنا الخلايا في حجرات الاختبار وأصبحت جاهزة لإجراء التجارب عليها.

معالجة الخلايا:

جهزنا التركيزات المختلفة لمادتي البحث ضمن سائل الميديوم المستخدم ووضعنا كل تركيز في أنبوب اختبار معقم مستقل وسجلنا عليه اسم المادة والتركيز. قمنا بعد ذلك بسحب السائل المغذي للخلايا من حجيرات الاختبار جميعاً في الشريحتين، ثم أضفنا (150) مايكروليتراً إلى كل حجيرة اختبار من المادة والتركيز المقرر للمعالجة لكل مجموعة ثم أعدنا الشريحتين إلى الحاضنة بعد ترقيم إحداهما بالرقم -1- والأخرى بالرقم -2- .

تنفيذ اختبار ال MTT

أنجزنا الاختبار على مرحلتين: الأولى بعد 24 ساعة من المعالجة المطبقة على الخلايا وشملت شريحة الاختبار رقم 1 . والثانية بعد 48 ساعة وشملت الشريحة رقم 2 . ونُفِّذَ الاختبار وفق ما يأتي:

- ☒ سحبنا سائل المعالجة الغامر للخلايا من كل الحجيرات.
- ☒ غسلنا حجيرات الاختبار كلها بمحلول ال PBS و أعدنا سحبه.
- ☒ أضفنا محلول ال MTT بتركيز 0,5 ملغ مل بمقدار 100 مايكروليتر إلى كلِّ حجيرة اختبار ثم غلفنا الشريحة كاملة بورق القصدير لعزل الحجيرات عن الضوء، وأعدنا وضعها في الحاضنة مدة ساعتين.
- ☒ سحبنا محلول MTT بعدها وأضفنا مكانه 100 مايكروليتر من محلول أيزوبروبونال الحمضي في كل حجيرة اختبار. أعدنا بعدها الشريحة إلى الحاضنة مدة ساعة

واحدة بعد تغليفها بورق القصديرمن جديد.

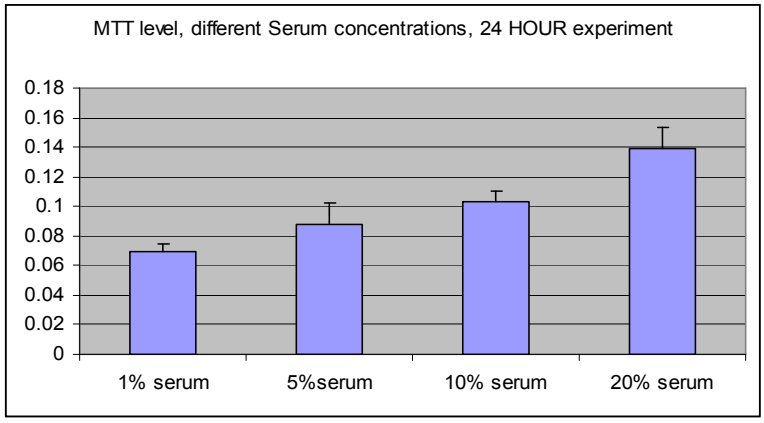
- أخيراً أخرجنا الشريحة من الحاضنة وأزلنا ورق القصدير ثم رفعنا الغطاء وأدخلنا الشريحة إلى جهاز قراءة الألوان ELISA حيث حصلنا على النتائج بعد مرور 24 ساعة. في اليوم التالي أعدنا العمل ذاته على الشريحة رقم 2 فحصلنا على النتائج بعد مرور 48 ساعة على معالجة الخلايا.

النتائج Results:

في المجموعة الأولى (مجموعة السيروم):

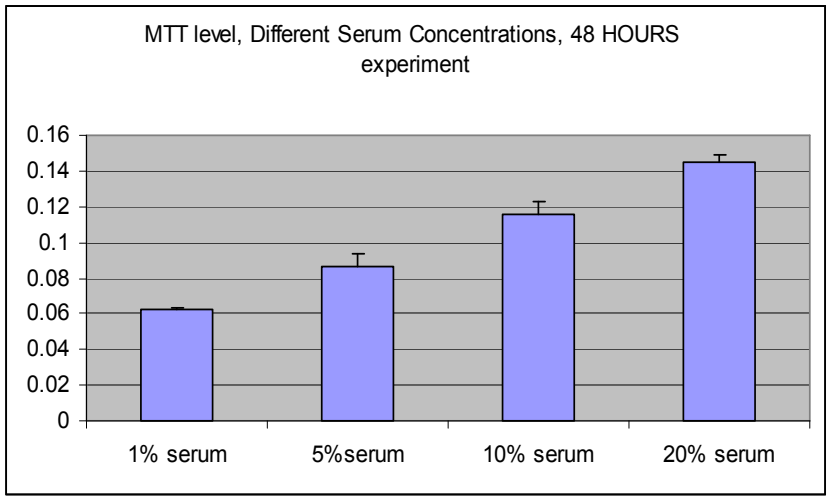
زاد عدد الخلايا عند استخدام تركيزات السيروم المختلفة بعد مرور (24) ساعة من لحظة المعالجة حيث كانت الزيادة بنسبة 25,78 % في تركيز 5% وبنسبة 47,56 % في تركيز 10% وبنسبة 98,56% في تركيز 20% مقارنة بالمجموعة الشاهدة (ذات التركيز 1% سيروم) وقد كانت النتائج في مجموعات السيروم جميعاً مهمة ودالة إحصائياً ($p<0.05$). الشكل (1):

الشكل (1) : نتائج اختبار تأثيرالتركيزات المختلفة للسيروم في نمو الخلايا العظمية بعد مرور 24 ساعة من لحظة المعالجة.



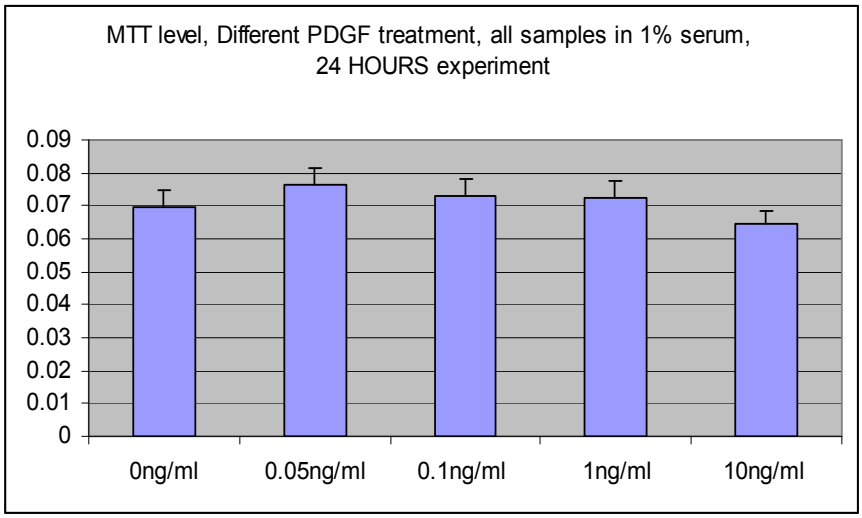
وكانت هذه الزيادة أكبر بعد مرور 48 ساعة من لحظة المعالجة حيث بلغت نسبة 38,58 % عند تركيز 5% ونسبة 86,17 % عند تركيز 10% ونسبة 132,47% عند تركيز 20%. ولقد كانت النتائج جميعاً مهمة ودالة إحصائياً ($p<0.05$). الشكل رقم (2):

الشكل (2): نتائج اختبار تأثير التركيزات المختلفة للسيروم في نمو الخلايا العظمية بعد مرور 48 ساعة من لحظة المعالجة.



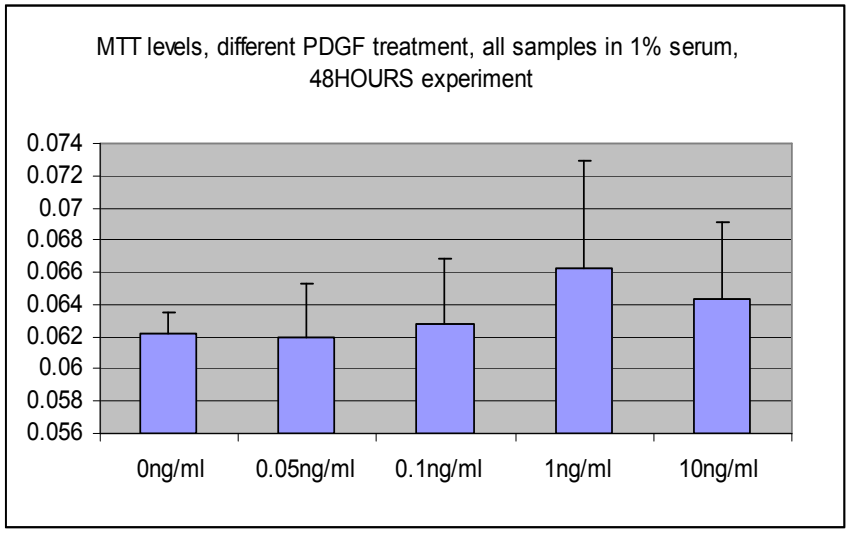
في المجموعة الثانية (مجموعة PDGF): بعد مرور 24 ساعة من لحظة معالجة الخلايا بالتركيزات المختلفة لـل PDGF حدثت زيادة في عدد الخلايا نسبتها 9.16% عند تركيز 0.05 نانوغرام مل، و4,87 % عند تركيز 0.1 نانوغرام مل، و3,43 % عند تركيز 1 نانوغرام مل. في حين حدث نقص في عدد الخلايا نسبته 7,44 % عند تركيز 10 نانوغرام مل، ذلك بالمقارنة مع المجموعة الشاهدة. وقد كانت النتائج كلها غير مهمة إحصائياً ($p>0.05$) الشكل (3):

الشكل (3): نتائج اختبار تأثير التركيزات المختلفة لل PDGF في نمو الخلايا العظمية بعد مرور 24 ساعة من لحظة المعالجة.



أما بعد مرور 48 ساعة فقد انخفض عدد الخلايا عند تركيز 0.05 نانوغرام مل بنسبة 0,32%. في حين حدثت زيادة في عدد الخلايا مقدارها 0,96 % عند تركيز 0.1 نانوغرام مل، و6,43% عند تركيز 1 نانوغرام مل، و 3,53% عند تركيز 10 نانوغرام مل. وقد كانت النتائج كلها غير دالة إحصائياً ($p>0.05$). الشكل 4.

الشكل (4) : نتائج اختبار تأثير التركيزات المختلفة لل PDGF على نمو الخلايا العظمية بعد مرور 48 ساعة من لحظة المعالجة.



المناقشة: Discussion

هدفنا من بحثنا هذا معرفة الدور الذي يؤديه عامل النمو المستخلص من الصفيحات الدموية البشرية في تحفيز الخلايا العظمية على الانقسام والتكاثر بعدما بدأت بعض الدراسات تقترح استخدامه مع أغشية الهيدروكسي أباتايت بهدف إعادة توليد العظم (Bone augmentation) في المناطق التي تعرض فيها للامتصاص والاضمحلال. وللوقوف على حقيقة هذا الدور قارناه بالسيروم كونه مادة بروتينية تحتوي على العديد من عوامل النمو.

استخلصنا الخلايا العظمية من العظم القحفي للفأر الأبيض (الهامستر السوري) حديث الولادة بعمر يوم واحد وزرعناها في بواتق زرع خلايا ونميناها إلى أن حصلنا على العدد المطلوب منها. قمنا بعد ذلك بتوزيع الخلايا في حجرات الاختبار بأعداد متساوية ضمن مجموعات البحث الثلاث: الشاهدة ومجموعة السيروم ومجموعة عامل النمو المستخلص من الصفيحات الدموية

(PDGF) ثم عالجنا الخلايا ضمن كل مجموعة بالتركيزات المختلفة من المادة المدروسة.

في مجموعة السيروم عولجت الخلايا بتركيزات السيروم الآتية: (5%، 10%،20%).

أما مجموعة PDGF فقد عولجت الخلايا فيها بتركيزات (0,05 نانوغرام مل، 0,1 نانوغرام مل، 1 نانوغرام مل، 10 نانوغرام مل) وقارنا النتائج بالمجموعة الشاهدة.

أظهرت نتائج الاختبار أن السيروم حقق تحفيزاً مضطرداً للخلايا العظمية على النمو والانقسام فزاد عدد الخلايا عند استخدام تركيزات السيروم المختلفة بعد مرور (24) ساعة من لحظة المعالجة بنسبة 25,78 % في تركيز 5 % وبنسبة 47,56 % في تركيز 10 % وبنسبة 98,56 % في تركيز 20 % مقارنة بالمجموعة الشاهدة. واستمرت الزيادة بالارتفاع مع ازدياد الزمن وكانت هذه الزيادة أكبر بعد مرور 48 ساعة من لحظة المعالجة حيث بلغت نسبة 38,58 % عند تركيز 5% ونسبة 86,17 % عند تركيز 10% ونسبة 132,47% عند تركيز 20% . وقد كانت النتائج جميعا مهمة ودالة إحصائياً ($p<0.05$).

أما النتائج التي حصلنا عليها في مجموعة ال PDGF فقد أظهرت أن الدور التحفيزي الذي تقوم به هذه المادة للخلايا العظمية على التكاثر والانقسام كان ضعيفاً بعد مرور 24 ساعة من لحظة معالجة الخلايا إذ حدثت زيادة قليلة في عدد الخلايا نسبتها 9.16% عند تركيز 0.05 نانوغرام مل، و4,87 % عند تركيز 0.1 نانوغرام مل، و3,43% عند تركيز1 نانوغرام مل. في حين حدث نقص في عدد الخلايا نسبته 7,44% عند تركيز 10 نانوغرام مل، ذلك بالمقارنة مع المجموعة الشاهدة. أي أن التناسب كان عكسيا حيث قلت الزيادة في عدد الخلايا كلما ارتفع تركيز الPDGF . وأدّى أثراً سلبياً تجلى في إنقاص عدد الخلايا بدلاً من زيادتها عند تركيز 10 نانوغرام مل.

إلا إنّه بعد مضي 48 ساعة تلاشت الزيادة التي حدثت عند تركيز 0.05 نانوغرام مل وانقلبت إلى نقص ضئيل بنسبة 0,32 % . أما التركيزات الأخرى فقد أعطت زيادة في عدد الخلايا مقدارها 0,96 % عند تركيز 0.1 نانوغرام مل، و 6,43% عند تركيز 1 نانوغرام مل وهذه الزيادة هي أقل من تلك التي حدثت في ال 24 ساعة الأولى أي أن الزيادة الضئيلة التي حدثت عادت لتتناقص وتصبح أقل ضآلة. أما تركيز 10 نانوغرام مل فقد عاد بعد 48 ساعة ليعطي زيادة قليلة في عدد الخلايا مقدارها 3,53% بعدما كان أعطى نقصاً في عددها في ال 24 ساعة الأولى. وبالتحليل الإحصائي للنتائج تبين أنها جميعا غير مهمة وغير دالة إحصائياً($p<0.05$). وقد تطابقت نتائجنا مع نتائج كل من (15-16-17-23-24-25) في حين اختلفت مع (3-4-5-6-7-8-9-10-11-12-13-14) .

الاستنتاجات و التوصيات:

على ضوء ما تقدم نستطيع القول: إنَّ السيروم شكل مادة فعالة في تحفيز الخلايا العظمية على الانقسام والتكاثر، في حين أخفق عامل النمو PDGF في أداء هذا الدور وظل ضعيف الأثر بشكل ملفت . من هنا نوصي بمشاركة عامل النمو موضوع بحثنا مع عوامل نمو أخرى عند استخدامه بهدف تحفيز الخلايا العظمية على الانقسام والتكاثر في سياق المعالجة بالتجدد العظمي الموجه.

Refrances

1-ImSY,ChoSH,Hwang JH, Lee SJGrowth factor releasing porous poly (epsilon-caprolactone)-chitosan matrices for enhanced bone regenerative therapy.
2003 Jan;26(1):76-82Arch Pharm Res.
2-Daniel Buser, Karl Dula Hans Peter Hirt, Robert K.Schink
Lateral Ridge Augmentation Using Autografts and Barrier Membranes
J. Oral Maxillofacial Surgeory.54:420-432.1996
3-Batman J,Intini G,Margarone J,Goodloe S,Bush P,Lynch SE,Dziak R Platelet-derived growth factor enhancement of two alloplastic bone matrices. J.Periodotology; 2005 Nov;76(11):1833-41
4-Gruber R, VargaF, FischerMB,WatzekG
Platelets stimulate proliferation of bone cells: involvement of platelet-derived growth factor, microparticles and membranes.
2002 Oct;13(5):529-35 lin Oral Implants Res.
5-Mehrotra M, Krane SM, Walters K,Pilbeam C.
Differential regulation of platelet-derived growth factor stimulated migration and proliferation in osteoblastic cells . J Cell Biochem. 2004 Nov 1;93(4):741-52
6-Moham S, Bavlink DJ Bone growth factor Clin Orthop Relat Res1991 Feb;(263):30-48
7-Mott DA, Mailhot J, Cuenin MF,Sharawy M, Borke J
Enhancement of osteoblast proliferation in vitro by selective enrichment of demineralized freeze-dried bone allograft with specific growth factors.
J Oral Implantology ; 2002;28(2):57-66.
8-Myron Nevins + et al Platelet-Derived Growth Factors Stimulates Bone Fill and Rate of Attachment Level Grain: Results of a large Multicenter Randomized Controlled Trial
J.Periodontal . December 2005: 2205-2215

9-Park YJ, LeeYM, Lee JY, Seol YJ, Chung CP, Lee SJ.
Controlled release of platelet-derived growth factor-BB from chondroitin sulfate-chitosan sponge for guided bone regeneration
2000 Jul 3;67(2-3):385-94. J Control Release.
10- Torricelli P,Fini M,Giavaresi G,Giardino R,Gundi S,Nicolini A,Carpi A.
L-arginine and L-lysine stimulation on cultured human osteoblasts. . Biomed Pharmacother 2002 Dec;56(10):492-7
11-Wang W,Zhuang H,Levitz CL,Fan H,Seldes RM,Taherani AD,Brighton CT.
The increased level of PDGF-A contributes to the increased proliferation induced by mechanical stimulation in osteoblastic cells. . Biochem Mol Biol Int 1997 Oct;43(2):339-46
12- Yang D, Jin D, ,Chen J,Jing Z,Wu D.
Modulation of transforming growth factor beta to platelet-derived growth factor receptor-alpha of human osteoblasts
Chin Med J(Engl); 2000 Jul;113(7):621-4.
13-Yoon Jeong Park,Yong Moo Lee,Ju Yeon Lee,Yang Jo Seol,Chong Pyoung,Chung and Seung Jin Lee
Controlled release of Platelet-derived growth factor-BB from chondroitin sulfate-chitosan sponge for guided bone regeneration.
J.of controlled release vol.67,issues2-3,3July2002,Pages385-394
14-Zhu Z,Lee CS,Tejeda KM,Giannobile WV.
Gene transfer and expression of platelet-derived growth factors modulate periodontal cellular activity. J.Dent res. 2001 Mar;80(3):892-7
15-.Yang D,Chen J,Jing Z,Jin D.
Platelet-derived growth factor (PDGF)-AA: a self-imposed cytokine in the proliferation of human fetal osteoblasts.
Cytokine 2000 Aug;12(8):1271-4

16-Okazaki R,Ikeda K,Sakamoto A,Nakano T,Morimo K,Kikuchi K,Urakawa K,
Ogata F,Matsumoto T.
Transcriptional activation of c-fos and c-jun protooncogenes by serum growth factors in osteoblast-like MC3T3-E1 cells.
1992 Oct;7(10):1149-55. J Bone Miner Res.
17- Tian W,Wang D,Oiao L,Chen W
[Effects of two growth factors combination on the proliferation and differentiation of human osteoblast-like cells]
1999 Feb;17(1):78-81. Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi.
18- Kim HD, Valintini RF
Human osteoblast response in vitro to platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta delivered from controlled-release polymer rods.
. Biomaterials .1997 Sep;18(17):1175-84
19-Pfeilschifter J,Oeschner M,Naumann A,Gronwald RG,Minne HW,Ziegler R.
Stimulation of bone matrix apposition in vitro by local growth factors: a comparison between insulin-like growth factor I, platelet-derived growth factor, and transforming growth factor beta.
. Endocrinology 1990 Jul;127(1):69-75.
20-Schilephake H.
Bone growth factors in maxillofacial skeletal reconstruction.
. Int J Oral Maxillofac Surg 2002 Oct,31(5):469-84
21-Tian W,Gao X,Wang D,Chen W.
The effects of combined use of multiple growth factors on proliferation and differentiation of human osteoblast-like cells
Hua Xi Yi Ke Da Xue Xue Bao1999 Sep;30(3):271-3.
22-Yeh YL,Kang YM,Chaibi MS,Xie JF,Graves DT.
IL-1 and transforming growth factor-beta inhibit platelet-derived growth factor-AA binding to osteoblastic cells by reducing platelet-derived growth factor-alpha receptor expression.
J Immunol 1993 Jun 15;150(12):5625-32.

23-Linda M
Growth factor stimulation of bone healing. Effects on osteoblasts, osteomies, and implants fixation.
Acta Orthop.Scand Suppl.1998 Oct;283:2-37.
24-Chaudhary LR, HofmeisterAM, Hrushka KA. Differential growth factor control of bone formation through osteoprogenitor differentiation.
Bone -2004 Mar;34(3):402-11
25- Torricelli P,Fini M,Giavaresi G,Giardino R.
Human osteopenic bone-derived osteoblasts: essential amino acids treatment effects.
Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol 2003 Feb;31(1):35-46.
26- Arnett TR,Henderson : Methods in Bone Biology. Published by Chapman & hall- London:Isbn 0-412-75770-2.(25-26).

تاريخ ورود البحث إلى مجلة جامعة دمشق: 2006/8/10.
تاريخ قبوله للنشر:2007/3/13.