

A Novel Model of Inducing Chronic Osteomyelitis in Rabbits

Izadi M. ¹MD MPH, Jazayeri A. ^{*2} MD, Baghban Eslaminejad M.R. ³ PhD, Jahangir Sh. ³ MSc, Khodayari S. ⁴ BSc, Khodayari H. ⁴ BSc, Abbaspour A. ⁵ MD, Hashemi Taheri A.P. ⁶ MD, Imani Fooladi A.A. ⁷ PhD, Jonaidi N. ¹ MD, PhD, Alizadeh A.M. ⁴ PhD

¹ Health Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

² Student Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

³ Stem Cell Department, Royan Institute, Tehran, Iran

⁴ Cancer Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

⁵ Orthopedic Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

⁶ Radiology Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

⁷ Applied Microbiology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Abstract

Aims: Osteomyelitis is one of common diseases in Iran due to trauma, especially during war time. There is a variety of treatment methods for osteomyelitis. In this study we have tried to design a new animal model which is similar to human disease for future use as a standard model through studies.

Methods: staphylococcus aureus was used to induce osteomyelitis in 24 rabbits' tibia. We performed radiologic assessments on days 0, 14 and 28 after surgery. Bacteriologic studies and pathologic assessment were done on the 28th day too.

Results: At the end of 4th week, more than 95% of animals showed radiologic signs of osteomyelitis. In pathological studies, invasion of inflammatory cells and other signs of osteomyelitis were seen.

Conclusion: This modeling method can be used for study of osteomyelitis whereby comparing different antibiotics or scaffolds and stem cells.

Key words: osteomyelitis, rabbit, staphylococcus aureus

روشی نوین جهت القای مدل استئومیلیت مزمن در خرگوش‌های آزمایشگاهی

مرتضی ایزدی^۱ MD, MPH، علی جزایری^{۲*} MD، محمد رضا باغبان اسلامی نژاد^۳ PhD، شهربانو جهانگیر^۳ MSc، سعید خدایاری^۴ BSc، حمید خدایاری^۴ BSc، عزیز عباسپور^۵ MD، امیر پژمان هاشمی طاهری^۶ MD، عباس علی ایمانی فولادی^۷ PhD، نعمت الله جنیدی^۱ MD, MPH، علی محمد علیزاده^۴ PhD

^۱ مرکز تحقیقات بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران، ایران

^۲ مرکز تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

^۳ دیارتمان سلول‌های بنیادی، موسسه رویان، تهران، ایران

^۴ مرکز تحقیقات سرطان، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

^۵ مرکز تحقیقات ارتوپدی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران، ایران

^۶ مرکز تحقیقات رادیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

^۷ مرکز تحقیقات میکروبیولوژی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران، ایران

چکیده

اهداف: در کشور ما با توجه به نرخ بالای سوانح جاده‌ای و مجروحان برجای‌مانده در اثر آن و نیز مجروحانی که طی جنگ دچار استئومیلیت شده‌اند، استئومیلیت از شیوع بالایی برخوردار است، لذا تحقیق و بررسی جهت شناخت هرچه بیشتر این بیماری و راه‌های تشخیص و درمان آن از اهمیت به‌سزایی برخوردار است. در مطالعه حاضر سعی نموده‌ایم یک مدل حیوانی که از جهات بسیاری مشابه نوع ضایعات استئومیلیت در انسان باشد ارائه دهیم تا در مطالعات آینده بتوان از آن جهت استانداردسازی مطالعات استفاده نمود.

روش‌ها: در این مطالعه، باکتری استافیلوکوکوس اورئوس به دست آمده از زخم بیماران مبتلا به استئومیلیت مزمن به استخوان درشت نی ۲۴ عدد خرگوش سالم نر تزریق گردید و ارزیابی رادیولوژیک در روزهای ۰ و ۱۴ و ۲۸ صورت گرفت. همچنین بررسی از جهات کشت باکتری و ارزیابی پاتولوژیک نیز در پایان ۴ هفته انجام شد.

یافته‌ها: در انتهای ۴ هفته، بیش از ۹۵٪ نمونه‌ها علائم رادیولوژیک بیماری را به طور کامل نشان می‌دادند. همچنین در اسلایدهای پاتولوژی تهیه‌شده، تهاجم سلول‌های التهابی و سایر علائم استئومیلیت به وضوح دیده شد.

نتیجه‌گیری: از این مدل می‌توان در مطالعاتی که تأثیر داروهای گوناگون از جمله آنتی‌بیوتیک‌های سیستمیک و موضعی بر روند بهبود استئومیلیت را بررسی می‌کنند و نیز پژوهش‌هایی که تأثیر درمان‌های دیگر مثل داربست‌های مختلف و نیز سلول‌های بنیادی را روی این بیماری مطالعه می‌نمایند استفاده نمود.

کلیدواژه‌ها: استئومیلیت، خرگوش، استافیلوکوکوس اورئوس

مقدمه

یکی از قدیمی‌ترین بیماری‌هایی که همواره گریبان گیر بشر بوده است، عفونت بافت استخوانی یا همان استئومیلیت است که در قرن اخیر به خاطر تغییر شیوه‌ی زندگی بشر و افزایش تصادفات جاده‌ای و نیز وقوع جنگ‌های متعدد شیوع بیشتری پیدا کرده است. این بیماری در هر دو جنس و در همه سنین دیده می‌شود. در کودکان استخوان‌هایی که معمولاً درگیر می‌شوند عبارت‌اند از استخوان ران، درشتنی، استخوان بازو یا ساعد، حال آنکه در بزرگسالان استخوان‌های لگن و ستون فقرات معمولاً درگیر می‌شوند. علت این بیماری اغلب عفونت استافیلوکوکی است ولی سایر باکتری‌ها نیز می‌توانند عامل آن باشند. تاکنون مطالعات بسیاری جهت بررسی پاتوفیزیولوژی، تشخیص و درمان استئومیلیت بر روی مدل‌های حیوانی گوناگون انجام گرفته است [۱-۴]؛ ولی متأسفانه اکثر این مطالعات در حد همان فاز مطالعه آزمایشگاهی محدود مانده و وارد فاز کلینیکال نشده‌اند که علت این مسأله می‌تواند: (۱) پیچیدگی ترکیب ضایعات استخوانی و میکروبی موجود در استئومیلیت، (۲) بعضاً عدم شباهت مدل‌های حیوانی به کار گرفته شده با ضایعات استئومیلیت در انسان و در نهایت (۳) تفاوت بسیار زیاد بین روش‌های ایجاد مدل در آزمایشگاه‌های مختلف و نبود روش استاندارد ایجاد مدل جهت بررسی درمان‌های پیشنهاد شده باشد [۵-۷]. درمان این بیماران چه از لحاظ درمان عفونت و چه از نظر درمان ضایعات استخوانی با مشکلات بسیاری روبرو است که از جمله علل این مسأله می‌توان به این موارد اشاره نمود: (۱) وجود سوش‌های مقاوم میکروبی و بعضاً ترکیبی از سوش‌های گوناگون، (۲) تشخیص نادرست یا نا کامل سوش‌ها و (۳) نیاز به درمان ترکیبی شامل دبریدمان وسیع، آنتی‌بیوتیک طولانی مدت و بعضاً استفاده از فلپ می‌باشد.

مطالعات نشان داده‌اند که در انسان در بسیاری موارد استئومیلیت به دنبال تروماهایی که باعث بروز زخم باز و آسیب بافت نرم می‌شوند ایجاد می‌گردد که در اکثر موارد عامل عفونت *S. aureus* می‌باشد. در کشور ما با توجه به نرخ بالای سوانح جاده‌ای و مجروحان برجای مانده در اثر آن و نیز مجروحانی که طی جنگ دچار استئومیلیت شده‌اند، استئومیلیت از شیوع بالایی برخوردار است، لذا تحقیق و بررسی جهت شناخت هرچه بیشتر این بیماری و راه‌های تشخیص و درمان آن از اهمیت به‌سزایی برخوردار است [۸-۱۰].

در مطالعه حاضر سعی نموده‌ایم یک مدل حیوانی که از جهات بسیاری مشابه نوع ضایعات استئومیلیت در انسان باشد ارائه دهیم تا در مطالعات آینده بتوان از آن جهت استانداردسازی مطالعات از جمله روش‌های نوین درمانی استفاده نمود.

مواد و روش‌ها

آماده سازی باکتری‌ها: با توجه به ارگانیزم شایع مسبب استئومیلیت در انسان، برای ایجاد مدل از باکتری استافیلوکوکوس اورئوس استفاده گردید. برای این منظور، از زخم بیماران مبتلا به استئومیلیت مزمن کشت به عمل آمد و آنتی بیوگرام تهیه شد و یک

نمونه حساس به متی‌سیلین (Methicillin Sensitive *Staphylococcus Aureus*) انتخاب گردید و سوسپانسیون باکتریایی با غلظت 10^9 CFU/ml آماده گردید.

ایجاد مدل: در این مطالعه، تعداد ۲۴ عدد خرگوش سالم نر با وزن $2.5 \pm 5\%$ کیلوگرم استفاده نمودیم. برای القای بیهوشی، به هر کدام از حیوانات 3cc کتامین (ketamin) + ۱۵٪ زایلین (xylesin) به صورت داخل عضلانی تزریق گردید و پس از ۵ دقیقه حیوانات آماده ایجاد مدل بودند. ابتدا سطح داخلی پای حیوان تراشیده شد و با محلول بتادین آغشته گردید. برشی طولی به طول ۳ سانتی‌متر روی این سطح از ۲ سانتی‌متری زیر زانو تا حدود ۲ سانتی‌متری بالای مچ پای حیوان ایجاد گردید. عضلات و فاشیا کنار زده شد تا سطح استخوان درشت نی (tibia) نمایان گردد و با استفاده از دریل یک سوراخ 2×2 میلی‌متر برای دسترسی به مغز استخوان ایجاد و با استفاده از یک سرنگ انسولین، مقدار 500 mcg از سوسپانسیون باکتری به سمت پاشنه پای حیوان به داخل حفره مغز استخوان تلقیح گردید و در نهایت پوست و بافت عضلانی در دو لایه مجزا بخیه زده شد.

ارزیابی رادیولوژیک: در روز عمل درست پیش از ایجاد مدل برای اثبات فقدان هرگونه ضایعه استخوانی قبلی و نیز بلافاصله بعد از جراحی برای نشان دادن ضایعه استخوانی ایجاد شده، دو نوبت عکس برداری رادیولوژیک انجام شد. همچنین در هفته‌های ۲ و ۴ بعد از جراحی جهت نمایش سیر تغییرات رادیولوژیک ناشی از استئومیلیت، رادیوگرافی مجدد صورت گرفت. در نهایت تصاویر تهیه شده توسط یک متخصص رادیولوژی از نظر شاخص‌های بروز استئومیلیت شامل تورم بافت نرم (soft tissue swelling)، تخریب کورتکس استخوان (cortical erosion)، واکنش پریوستی (periosteal reaction) و نیز mixed lucency and sclerosis بررسی شد.

ارزیابی باکتریولوژیک: بعد از گذشت ۴ هفته از القای مدل، ۴ حیوان به صورت تصادفی انتخاب شدند و محل جراحی آن‌ها بازگردید و با استفاده از کورت (curettage)، از استخوان حیوان نمونه برداری جهت تهیه کشت باکتریولوژیک صورت گرفت و نمونه‌ها به آزمایشگاه کشت میکروبی ارسال گردید.

ارزیابی پاتولوژیک: در پایان ۴ هفته تمام حیوانات مورد آزمایش، بر اساس پروتکل اخلاق در پژوهش دانشگاه بقیه الله کشته شدند و استخوان درشت نی آن‌ها خارج گردید و در محلول فرمالین قرار داده شد. بعد از گذشت یک هفته، استخوان‌ها از فرمالین خارج و درون محلول اسید کلریدریک قرار گرفتند و هر ۳ روز یک بار محلول آن‌ها تعویض شد تا در نهایت پس از گذشت ۱۰ روز، استخوان‌ها آماده برش دادن شده، از هر نمونه ۳ عدد لام تهیه گردید و بعد از انجام رنگ‌آمیزی H&E، توسط یک متخصص پاتولوژی از نظر شاخص‌های حضور سلول‌های التهابی (polymorphonuclear و lymphocyte)، شاخص‌های عروقی (small vessel thrombosis و edema، congestion)، نکروز استخوان و نیز osteoblastic plump ارزیابی شد.



شکل ۱. روند ایجاد تغییرات رادیولوژیک. (A) قبل از جراحی، (B) بلافاصله بعد از جراحی (روز ۰) ایجاد مدل، (C) ۲ هفته پس از جراحی، (D) ۴ هفته پس از جراحی. فلش‌های سفید، نشانگر محل تزریق باکتری می‌باشند.

بودند، نمونه‌برداری انجام شد که پس از ۷۲ ساعت، کشت هر ۴ مورد مثبت گزارش گردید.

نتایج ارزیابی پاتولوژیک: تصاویر پاتولوژی تهیه‌شده در شکل ۲ نشان داده شده است که نشانگر تهاجم شدید سلول‌های التهابی اعم از چند هسته‌ای‌ها و تک‌هسته‌ای‌ها و نیز ادم و ترومبوز شدید در منطقه می‌باشد.

بحث و نتیجه‌گیری

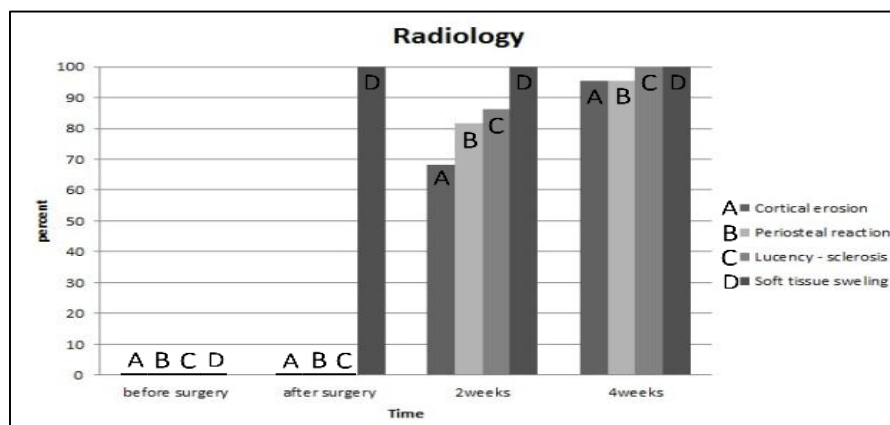
رویکردهای گوناگونی جهت القای استئومیلیت اتخاذ شده است که هر یک مزایا و معایب مخصوص به خود را دارند؛ به عنوان مثال، در یکی از این روش‌ها از وزنه‌ای با وزن مشخص که از ارتفاع ثابتی روی استخوان مورد نظر رها می‌شود، برای ایجاد شکستگی استفاده می‌گردد که در این روش شکل شکستگی ایجاد شده می‌تواند بسیار متغیر باشد [۱۱-۱۵].

نتایج

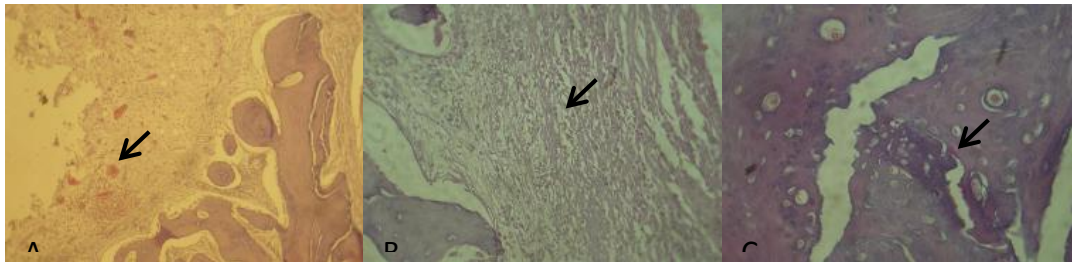
در طول مدت اجرای طرح، دو عدد از حیوانات به علت مشکلات گوارشی از بین رفتند ولی سایر حیوانات تا انتهای پروژه زنده ماندند و نتایج بررسی‌های صورت‌گرفته در ذیل آورده شده‌است.

نتایج ارزیابی رادیولوژیک: روند تغییرات ناشی از استئومیلیت در عکس‌های رادیولوژی در شکل ۱ نشان داده شده است. اولین تغییر مشاهده‌شده در تصاویر رادیولوژی که در عکس‌های گرفته‌شده بلافاصله بعد از جراحی دیده شد، تورم بافت نرم است که در تمامی نمونه‌ها مثبت بود (۱۰۰٪). با گذشت دو هفته از جراحی، به تدریج سایر تغییرات رادیولوژیک نیز رویت شدند و در نهایت با گذشت ۴ هفته، بیش از ۹۵٪ از حیوانات مورد آزمایش از نظر هر ۴ شاخص مورد ارزیابی مثبت بودند. (نمودار ۱)

نتایج ارزیابی باکتریولوژیک: در پایان هفته چهارم، از محل ضایعه استخوانی چهار حیوان که به صورت تصادفی انتخاب شده



نمودار ۱. فراوانی ۴ معیار رادیولوژیک در نمونه‌ها.



شکل ۲. مقاطع پاتولوژی نشان‌دهنده التهاب و تغییرات عروقی در منطقه دچار استئومیلیت. (A) بزرگنمایی ۱۰ برابر نشان‌دهنده ترومبوز عروق کوچک. (B) بزرگنمایی ۴۰ برابر نشان‌دهنده تجمع سلول‌های التهابی در منطقه. (C) بزرگنمایی ۴۰ برابر نشان‌دهنده استخوان نکروتیک

درمان‌های دیگر مثل اسکافولدهای مختلف و نیز سلول‌های بنیادی را روی این بیماری مطالعه می‌نمایند استفاده نمود. همچنین با ایجاد تغییرات جزئی در روش ایجاد مدل یا استفاده از گونه‌های دیگر مسبب استئومیلیت، می‌توان در سایر مطالعات هم از این روش استفاده نمود.

تقدیر و تشکر: در پایان بر خود لازم می‌دانیم تا از زحمات همه عزیزانی که ما را در انجام این پروژه یاری نمودند خصوصاً ریاست محترم دانشگاه بقیه الله (عج)، ریاست محترم پژوهشکده رویان و نیز ریاست محترم انستیتو کنسر بیمارستان امام خمینی، صمیمانه قدردانی کنیم.

منابع

- Xie Z, Cui X, Zhao C, Huang W, Wang J, Zhang C. Gentamicin-loaded borate bioactive glass eradicates osteomyelitis due to Escherichia coli in a rabbit model. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013; 57(7):3293-8.
- Poeppl W, Tobudic S, Lingscheid T, Plasenzotti R, Kozakowski N, Lagler H, et al. Daptomycin, Fosfomycin, or Both for Treatment of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Osteomyelitis in an Experimental Rat Model. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55(11):4999-5003.
- Aktekin CN, Ozturk AM, Tabak AY, Altay M, Korkusuz F. A Different Perspective For Radiological Evaluation Of Experimental Osteomyelitis. *J Bone Joint Surg-2009;91-B(Supp II):314-5*.
- Funao H, Ishii K, Nagai S, Sasaki A, Hoshikawa T, Aizawa M, et al. Establishment of a Real-Time , Quantitative, and Reproducible Mouse Model of Staphylococcus Osteomyelitis Using Bioluminescence Imaging. *Infect Immun*. 2012; 80(2):733-41.
- Dartnell J, Ramachandran M, Katchburian M. Haematogenous acute and subacute paediatric osteomyelitis: a systematic review of the literature. *J Bone Joint Surg Br*. 2012;94(5):584-95.
- Calhoun JH, Manring MM, Shirliff M. Osteomyelitis of the long bones. *Semin Plast Surg*. 2009;23(2):59-72.
- Patel M, Rojavin Y, Jamali AA, Wasielewski SJ, Salgado CJ. Animal models for the study of osteomyelitis. *Semin Plast Surg*. 2009;23(2):148-54.
- Izadi M, Nourbakhsh MS, Musavi SA, Nesari J, Izadinejad M, Jafari SJ, et al. Empirical Antibiotic Treatment of Veterans with Chronic Osteomyelitis. *Journal of Military Medicine*. 2013;14(3):222-5.[Persian]
- Jorge LS, Chueire AG, Rossit AR. Osteomyelitis: a current challenge. *Braz J Infect Dis*. 2010;14(3):310-5.
- Izadi M, Zamani MM, Mousavi SA, Sadat SM, Siami Z, Vais Ahmadi N, et al. Is vancomycin still a choice for chronic osteomyelitis empirical therapy in iran? *Iran Red Crescent Med J*. 2012; 14(12):782-6.
- Gaudin A, Amador Del Valle G, Hamel A, Le Mabecque V, Miegerville AF, Potel G, et al. A new experimental model of acute osteomyelitis due to methicillin-resistant Staphylococcus aureus in rabbit. *Lett Appl Microbiol*. 2011;52(3):253-7.
- Robinson DA, Bechtold JE, Carlson CS, Evans RB, Conzemius MG. Development of a fracture osteomyelitis model in the rat femur. *J Orthop Res*. 2011;29(1):131-7.
- Jensen HE, Nielsen OL, Agerholm JS, Iburg T, Johansen LK, Johannesson E, et al. A non-traumatic Staphylococcus aureus osteomyelitis model in pigs. *In Vivo*. 2010;24(3):257-64.
- Lindsey BA, Clovis NB, Smith ES, Salihu S, Hubbard DF. An animal model for open femur fracture and osteomyelitis: Part I. *J Orthop Res*. 2010;28(1):38-42.
- Lindsey BA, Clovis NB, Smith ES, Salihu S, Hubbard DF. An animal model for open femur fracture and osteomyelitis-Part II: Immunomodulation with systemic IL-12. *J Orthop Res*. 2010;28(1):43-7.