

## بررسی میزان بازسازی ضایعه استخوانی کالواریا موش با استفاده از اسکافولد PHBV و سلول‌های بنیادی مزانشیمی خون بند ناف (USSC)

سعید حیدری کشل<sup>۱،۲،۳</sup>؛ مصطفی رضایی طاویرانی<sup>۲\*</sup>؛ اسماعیل بی‌آزار<sup>۴</sup>؛ نایب علی احمدی<sup>۲</sup>؛ مریم ابراهیمی<sup>۲</sup>؛ عبدالعزیز رونقی<sup>۲</sup>؛ غلامرضا بهروزی<sup>۲</sup>؛ رضا روزافزون<sup>۳</sup>

### چکیده

زمینه: لازمه مهندسی بافت استخوان، بازسازی آناتومیکال و عملکردی بافت ازدست‌رفته می‌باشد که نیازمند ساخته شدن مجدد استخوان و اتصال بیولوژیک مناسب با بافت‌های استخوانی اطراف ضایعه می‌باشد. در مطالعه حاضر، از بستر زیست تخریب‌پذیر نانوفیبری PHBV و سلول‌های USSC به منظور تسریع روند ترمیمی در بافت استخوانی آسیب‌دیده استفاده شد. روش‌ها: داربست نانوفیبری توخالی زیست تخریب‌پذیر با روش الکترورسی و تعیین بهترین فاکتورها همانند نوع و مقدار حلال، سرعت و حجم مشخص، به صورت 5% PHBV طراحی شد. جداسازی سلول‌های بنیادی از نمونه خون بند ناف و بررسی ماهیت آن با استفاده از آنالیز فلوسیتومتری انجام شد. تست حیوانی شامل پیوند سلول‌های بنیادی USSC به همراه بستر PHBV در ضایعه استخوانی ایجاد شده در کالواریا موش صحرایی انجام گردید. پس از گذشت ۸ هفته، ابتدا ناحیه پیوندشده با تست CT-SCAN بررسی و سپس به بخش هیستوپاتولوژی ارسال گردید و در نهایت نیز میزان بازسازی و کیفیت بازسازی بعد از رنگ‌آمیزی H&E مشخص شد.

یافته‌ها: نتایج هیستومورفیک، تفاوت قابل ملاحظه‌ای را بین دو گروه نمونه شامل USSC+PHBV و PHBV و گروه کنترل نشان داد. به‌همین ترتیب آنالیز هیستوپاتولوژیک نشان داد که میزان استخوان‌سازی در حفره حاوی سلول بنیادی USSC به‌همراه PHBV در مقایسه با حفره PHBV و کنترل بیشتر بوده و کیفیت استخوان‌سازی و ارتباط بافت استخوانی تازه و بافت استخوانی اطراف بهتر برقرار شده بود.

نتیجه‌گیری: تلفیق اسکافولد PHBV و سلول بنیادی USSC می‌تواند در ترمیم ضایعات وسیع‌تر نیز مفید باشد.

کلیدواژه‌ها: ضایعه استخوانی، PHBV، سلول‌های بنیادی، خون بند ناف

«دریافت: ۱۳۹۱/۹/۶ پذیرش: ۱۳۹۱/۱۲/۱»

۱. کمیته پژوهشی دانشجویی، مرکز تحقیقات پروتئومیکس، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران

۲. مرکز تحقیقات پروتئومیکس، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران

۳. واحد فراهم‌آوری سلول‌های بنیادی، مرکز تحقیقات چشم، بیمارستان فارابی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

۴. گروه فنی و مهندسی، واحد تنکابن، دانشگاه آزاد اسلامی، تنکابن

\* عهده‌دار مکاتبات: تهران، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده پیراپزشکی، مرکز تحقیقات پروتئومیکس، تلفن: ۰۲۱-۲۲۷۱۴۲۴۸

Email: rezaei.tavirani@ibb.ut.ac.ir

### مقدمه

تخریب‌پذیر با ویژگی‌های منحصر به فرد توانسته‌اند، گپ‌های کوچک را ترمیم نمایند (۱-۳). بازسازی ایده‌آل را در علم مهندسی بافت، شامل بازسازی آناتومیکال و عملکردی بافت ازدست‌رفته می‌دانند که در مشکلات استخوانی، نیازمند ساخته شدن مجدد استخوان

ترمیم ضایعات استخوانی با گپ‌های زیاد، مشکلات بسیاری از بیماران می‌باشد که تاکنون تحقیقات زیادی را به خود معطوف نموده است. البته با استفاده از داربست‌های بیولوژیکی و یا ترکیبات مصنوعی غیرزیست

پلیمرهای سنتزی PHBV و سلول‌های USSC به‌منظور تسریع روند ترمیمی در بافت استخوانی آسیب‌دیده می‌باشد. اگر بافت حاصل از پیوند سلول‌های USSC و PHBV بتواند استئوبلاست را بوجود آورد و این سلول‌ها بتوانند با کالواربوم موش اتصال بیولوژیک مناسب ایجاد کنند، می‌توان گفت القا بازسازی توسط USSC و PHBV موفقیت‌آمیز بوده است.

### مواد و روش‌ها

نمونه خون بندناف توسط کارشناسی مامایی در شرایط کاملاً استریل از خانم‌هایی که از زایمان کاملاً طبیعی داشتند گرفته شد. این نمونه‌ها در لوله‌های فالتون ۵۰ میلی‌لیتر که حاوی ضد انعقاد هپارین (۵۰۰ IU) بودند، جمع‌آوری و در دمای کم‌تر از ۱۰°C به آزمایشگاه کشت سلولی منتقل گردید. برای جداسازی سلول‌های تک‌هسته‌ای نمونه خون بندناف از محلول فایکول با دانسیته ۱/۰۷۷ استفاده شد. سپس به مدت ۴۰ دقیقه با دور ۴۰۰G سانتریفوژ و با پردازش لایه سلول‌های تک‌هسته‌ای، سلول‌ها به حالت سوپانسیون درآمده از نمونه خون بندناف جدا شدند. سلول‌های تک‌هسته‌ای جداشده از نمونه خون بندناف به‌صورت سوپانسیون به یک فلاسک ۲۵cm<sup>2</sup> که با فیبرونکتین پوشیده شده و حاوی محیط DMEM و ۲۰ درصد سرم جنین گاوی، (FBS) ۱۰mM دکزامتازون، ۱۰۰۰u/ml پنی‌سیلین و ۰/۱mg استرپتومیسین بود منتقل و در آنکوباتور CO<sub>2</sub> ۵ درصد و دمای ۳۷°C و رطوبت ۹۸ درصد قرار داده شدند.

جهت آنالیز فلوسیتومتری مارکرهای سطحی، ابتدا سلول‌های USSC را ترپسینه کرده و مورد شمارش قرار دادیم. در هر لوله تعداد ۱۰۶ سلول به‌مدت ۱ ساعت درون آنکوباتور و روی شیکر قرار داده شد. سپس سلول‌ها در دور ۳۰۰g به مدت ۶ دقیقه سانتریفوژ شدند. به رسوب سلولی حاصله، سرم انسانی ۲ درصد اضافه گردید و مخلوط حاصل، ۳۰ دقیقه در دمای اتاق قرار

(سلول‌های استئوبلاست) و اتصال بیولوژیک مناسب با بافت‌های استخوانی اطراف ضایعه می‌باشد. علی‌رغم مطالعات بسیار (۳)، هنوز پیشرفت چشم‌گیری در درمان این ضایعات صورت نگرفته است. یکی از روش‌هایی که در حال حاضر به‌منظور بازسازی نواحی تخریب‌شده پرودنتال مورد استفاده قرار می‌گیرد، تکنیک‌های Guided bone و (GTR) Guided tissue regeneration (GBR) regeneration می‌باشد که با استفاده از پودر استخوان و عشاء انجام می‌گردد. تمام روش‌های حاضر برای بازسازی استخوان، نتوانسته آرزوی جراحان برای بهبود کامل استخوان را برآورده سازد. به‌نظر می‌رسد با توجه به کندی فرایند ترمیم در این بیماری، باید از سلول‌های با قدرت بازسازی تخصصی بالا در درمان بهره جست که توانایی تبدیل به استئوبلاست و فیبروبلاست را داشته باشد و بافت همبند را بین بافت قدیمی و استخوان جدید ایجاد نماید. علی‌رغم این‌که اخیراً استفاده از سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان به‌عنوان سلول‌های با توان بالا برای تبدیل به نسوج استخوانی مورد توجه قرار گرفته است (۵-۲) تاکنون، گزارشی مبنی بر استفاده از بستر متخلل زیست تخریب‌پذیر پلی‌هیدروکسی بوتیرات والرات به‌همراه سلول‌های بنیادی خون بند ناف (USSC) به‌منظور بازسازی ناحیه کالواریا منتشر نشده است. در این مطالعه، سعی شد با طراحی بسترهای زیست تخریب‌پذیر نانوفیبری از پلیمرهای سنتزی PHBV و بهره‌گیری از فناوری نانو به‌همراه سلول بنیادی خون بند ناف، آسیب‌های استخوانی ترمیم شود. در مقایسه با سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان، سلول‌های USSC بنیادی‌تر است (توانای تکثیر بیشتر و تمایز به طیف وسیع‌تری از سلول‌ها را دارند) و با توجه به پایین‌تر بودن میزان بیان HLA (کمپلکس ناسازگاری بافتی) در آن، از احتمال رد پیوند کم‌تری برخوردار است. بدین ترتیب، این سلول‌ها می‌توانند کاندیدای مناسبی برای ترمیم بافتی آسیب‌های استخوانی باشد. هدف از مطالعه حاضر، استفاده همزمان بستر زیست تخریب‌پذیر نانوفیبری از

شدن این حلقه موجب تولید کریستال‌های آبی‌رنگ فورمازان می‌شود که در زیر میکروسکوپ به راحتی قابل تشخیص هستند. میزان رنگ تولیدشده با تعداد سلول‌هایی که از نظر متابولیک فعال هستند رابطه مستقیم دارد. کریستال‌های فورمازان در آب غیرمحلول بوده و بایستی قبل از رنگ‌سنجی توسط ماده حلالی نظیر DMSO به حالت محلول درآیند. در نهایت جذب نوری محلول به دست آمده را می‌توان در طول موج ۵۷۰ نانومتر قرائت کرده و به کمک منحنی استاندارد، تعداد سلول‌ها را محاسبه نمود. برای هر رده سلولی، ارتباط خطی بین تعداد سلول‌ها و جذب نوری محلول نهایی وجود دارد. لذا جهت بررسی هر نوع سلول، بایستی منحنی استاندارد مربوط به همان رده را رسم نموده و استفاده کرد. در تحقیق حاضر، ۱۵ عدد موش صحرایی نر با وزن تقریبی ۲۰۰ گرم انتخاب شدند. تمام مراحل بر اساس پروتکل موجود و مقید به اصول اخلاقی مطالعات حیوانی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی انجام شد. ابتدا به مدت ۱ ماه موش‌ها در قفس‌های مخصوص، تحت رژیم غذای یکسان و استاندارد نگاه‌داری شدند. پس از آماده‌سازی غیرجراحی در حیوان‌خانه، موش‌ها با استفاده از تزریق عمیق عضلانی زایلازین ۲ درصد و کتامین ۱۰ درصد بیهوش شدند سپس با استفاده از موتور آنجل و فرز ترفان، حفره‌های با ابعاد فرز (۵ میلی‌متر)، به آرامی و با همراهی External Irrigation با سرم فیزیولوژی در کالواریای موش ایجاد شد. به منظور استاندارد کردن محل حفرات، از لند مارکر استفاده شد. در ناحیه کالواریای هر موش یک حفره ایجاد گردید. سپس حیوانات در شرایط یکسان و در سه گروه پنج تایی قرار گرفتند: گروه اول شامل موش‌هایی بود که اسکافلد ۵% PHBV داشتند، گروه دوم شامل موش‌هایی بود که در محل ضایعه، مجموعه سلول بنیادی USSC و اسکافلد ۵% PHBV را دریافت کرده بودند و در گروه سوم، موش‌های کنترل قرار داشتند که تنها ضایعه داشته و فاقد مداخله درمانی بودند. از ایجاد دو حفره در یک موش به خاطر مداخله

داده شد. سپس در دور ۳۰۰g و به مدت ۶ دقیقه دوباره سلول‌ها سانتریفیوژ شدند و به رسوب سلولی حاصل PBS اضافه شد، مخلوط سلولی را از فیلتر (Nylon mesh) عبور دادیم و به هر لوله مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از آن اضافه کردیم. سلول‌ها را در ۱۰۰  $\mu$ L از PBS به همراه آنتی‌بادی‌های Anti-CD105، Anti-CD73، Anti-CD90 و Anti-CD34 و به مدت ۴۵ دقیقه در ۴°C به دور از نور نگاه‌داری کردیم. پس از شستشو، سلول‌ها در ۱۰۰  $\mu$ L محلول ۱ پارافرم آلدیئد قرار داده شد، سپس آنالیز فلوسایتومتری، روی آن انجام گردید. به منظور بررسی نظم کروموزومی، سلول‌های USSC مورد آنالیز کاریوتایپ قرار گرفتند.

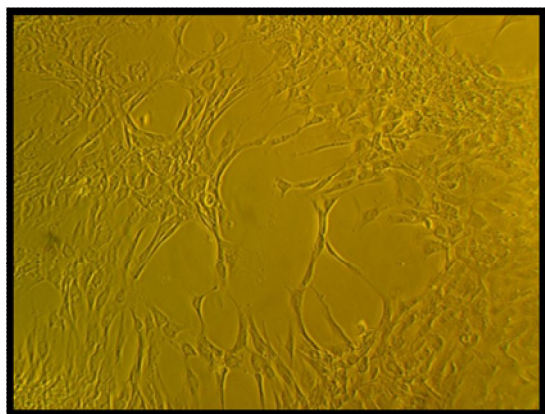
بررسی میزان بقای سلول‌های کاشته شده بر روی ایمپلنت (MTT assay):

MTT یک روش رنگ‌سنجی است که بر اساس احیا و شکسته شدن کریستال‌های زردرنگ تترازولیوم با فرمول شیمیایی 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) به وسیله آنزیم سوکسینات دهیدروژناز و تشکیل کریستال‌های آبی‌رنگ نامحلول انجام می‌شود. ابتدا تعداد مناسبی سلول (ترجیحاً ۵۰۰۰ سلول در هر چاهک) را در هر یک از چاهک‌ها بر روی اسکافلد PHBV کشت و اجازه داده شد تا سلول‌ها به کف پلیت چسبیده و به حالت پایدار خود درآیند. سپس چاهک‌های کنترل و آزمایش، انتخاب شده و مقدار مناسبی از ماده میتوژن یا داروی موردنظر را به چاهک‌های تست اضافه کردیم و پلیت را تا زمان مورد نیاز جهت تأثیر ماده مورد نظر، انکوبه کردیم. پس از اتمام زمان انکوباسیون، محیط کشت رویی را دور ریخته، به هر چاهک ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت حاوی نیم میلی‌گرم در میلی‌لیتر محلول MTT اضافه کردیم و به مدت ۴-۲ ساعت در انکوباتور CO<sub>2</sub> در ۳۷ درجه سانتیگراد قرار دادیم. در طی زمان انکوباسیون MTT توسط سیستم سوکسینات دهیدروژناز که یکی از آنزیم‌های چرخه تنفسی میتوکندری‌هاست احیا می‌شود. احیا و شکسته

و CD73 مثبت و برای مارکر CD34 منفی بودند. این داده بیانگر بنیادی بودن سلول‌های جداسازی شده می‌باشد (تصویر ۲).

آنالیز کاریوتایپ برای سلول‌های USSC:

سلول‌های USSC قبل از شروع آزمایشات در پاساژ ۲ مورد آنالیز کاریوتایپ قرار گرفتند و مشخص گردید که دارای کاریوتایپ کروموزومی نورمال ۴۴XX می‌باشد. پس از گذشت ۴۸ پاساژ دیگر، این سلول‌ها دوباره مورد آنالیز کاریوتایپ قرار گرفتند. مشخص گردید که دارای کاریوتایپ کروموزومی نورمال ۴۴XX هستند. تصویر ۳ نمایی از کروموزوم‌ها را نشان می‌دهد.



تصویر ۱- سلول‌های بنیادی مزانشیمی خون بند ناف (USSC) با مورفولوژی تیبیک دوکی شکل را نشان می‌دهد (بزرگنمایی ۲۰ میکروسکوپ اینورت- فاز کنتراست).

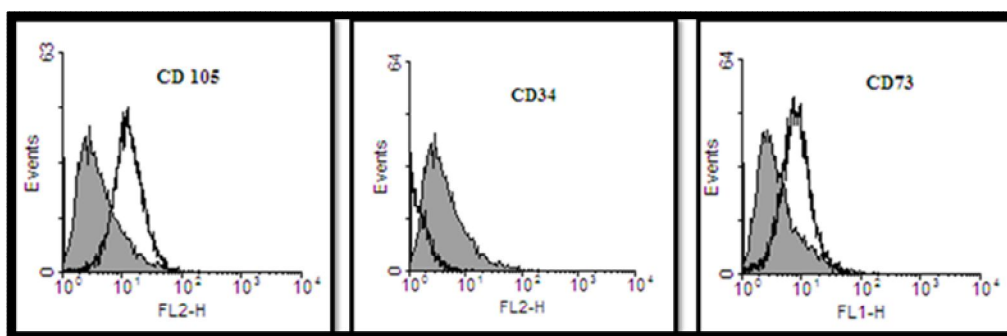
احتمالی سلول‌های بنیادی پرهیز گردید. تزریق سیکلوسپورین به صورت روزانه انجام شد تا از بروز واکنش ایمنی ممانعت به عمل آید. پس از ۸ هفته موش‌ها با رعایت اصول اخلاق کار با حیوانات با تزریق دوز بالا سدیم پتوباریتال (65mg/Kh) بدون درد sacrifice شدند. پس از انجام CT-SCAN ۳T ناحیه کالواریا با ترفان فرز برداشته شد و در فرمالین ۱۰ درصد به مدت ۲ هفته نگهداری گردید. سپس با محلول اسید نیتریک دکلسیفیه شد و به آزمایشگاه پاتولوژیک جهت تهیه لام و رنگ آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین انتقال یافت. میزان بازسازی و کیفیت ترمیم توسط متخصص بافت شناس با میکروسکوپ نوری فاز معکوس (CETI) مورد ارزیابی قرار گرفت.

### یافته‌ها

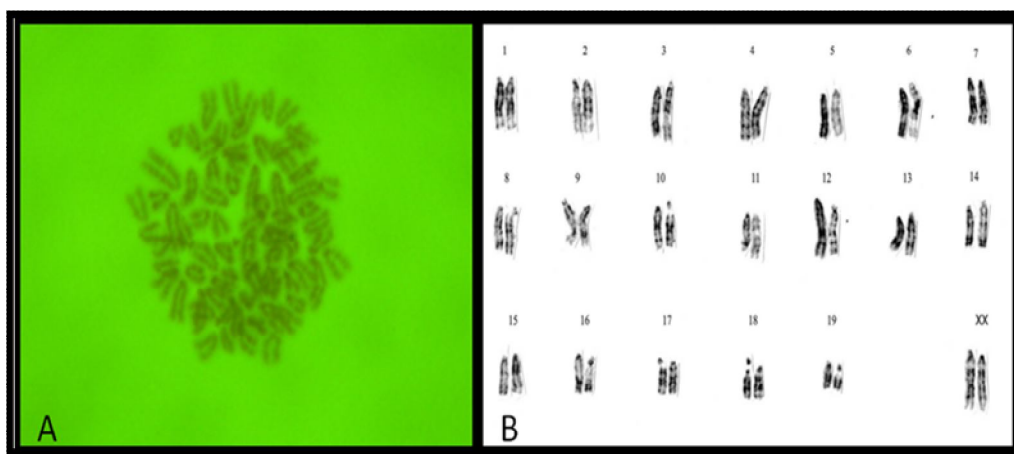
بعد از گذشت ۳ روز، محیط رویی سلول‌های تک‌هسته‌ای جداسازی شده از نمونه خون بندناف دور ریخته شد و محیط تازه اضافه گردید. سلول‌های بنیادی USSC به کف فلاسک چسبیده و پس از تکثیر، خالص و جداسازی شدند (تصویر ۱).

آنالیز فلوسایتومتری برای سلول‌های بنیادی USSC:

سلول‌های USSC برای مارکرهای CD90، CD105،



تصویر ۲- آنالیز فلوسیتومتری را برای سلول‌های بنیادی مزانشیمی (USSC) نشان می‌دهد، مارکر سطحی CD105: 87.56% و CD73: 88.63% بیان مثبت داشتند و CD34: 12.32% دارای بیان منفی بود.



تصویر ۳- در بخش A نمای از کروموزوم‌ها را نشان می‌دهد که هنوز مرتب نشده‌اند (بزرگنمایی ۱۰۰) و در بخش B کروموزوم‌های مرتب شده را ملاحظه می‌نمایید که دارای آرایش طبیعی ۴۴XX می‌باشند.

هیستومورفومتريک مشخص شد (جدول ۱ و ۲). ترمیم کم‌تر از ۲۵ درصد را ترمیم ناقص، ترمیم بین ۲۵-۷۵ درصد را ترمیم نسبی و ترمیم بالاتر از ۷۵ درصد را ترمیم کامل در نظر گرفتیم. نتایج نشان داد که از نظر هیستومورفومتريک، ترمیم ضایعه در گروه نمونه بالاتر از ۷۵ درصد بوده و بررسی بازسازی پس از ۸ هفته انجام گردیده بود. برای این منظور از اور دوز سدیم پنتوباریتال (۶۵mg/Kg) استفاده و حیوانات کشته شدند. جهت انجام آزمایشات پاتولوژیک ناحیه پیوندشده با یک فرز جراحی متصل به هند پیس الکتریکی کم‌سرعت از مجموعه برداشت گردید. سپس در فرم الدهید ۱۰ درصد به بخش پاتولوژی منتقل و پس از دکسیفیته شدن در محلول سدیم سیترات و اسید فومیک ۱۰ درصد به مدت ۵۰ روز بلوک بافتی تهیه و مورد برش‌های تقریباً نازک ۵ میکرونی قرار گرفتند. نهایتاً لام‌ها رنگ‌آمیزی H&E شدند. نتایج هیستومورفیک، تفاوت قابل‌ملاحظه‌ای را در گروه نمونه شامل USSC/PHBV نشان داد و آنالیز هیستوپاتولوژیک نیز نشان داد که میزان استخوان‌سازی در حفره حاوی USSC/PHBV در مقایسه با حفره حامل PHBV و کنترل بیشتر بوده و کیفیت استخوان‌سازی و ارتباط بافت استخوانی تازه و بافت استخوانی اطراف بهتر برقرار شده بود (تصویر ۴ بخش‌های G,K,L و تصویر ۵). التهاب بافتی (جدول ۳) نیز در هیچ‌یک از گروه‌های مورد

### نتایج تست MTT

با اندازه‌گیری جذب نوری محلول به‌دست آمده در طول موج ۵۷۰ نانومتر و به‌کمک منحنی استاندارد، می‌توان تعداد سلول‌ها را محاسبه نمود. برای هر رده سلولی، ارتباط خطی بین تعداد سلول‌ها و جذب نوری محلول نهایی وجود دارد. لذا جهت بررسی هر نوع سلول، بایستی منحنی استاندارد مربوط به همان رده را رسم نموده و استفاده کرد.

نتایج MTT به‌دست آمده، ۹۶ درصد بقای سلول‌ها را در طی ۴۸ ساعت هم‌جواری نشان می‌دهد.

### ارزیابی ترمیم:

در طول مطالعه هیچ یک از حیوانات دچار کاهش وزن، تغییرات رفتاری یا بروز علائم سیستمیک نشدند و همچنین هیچ‌کدام از حیوانات مورد مطالعه از بین نرفتند. در مجموع، تعداد ۳۰ Defect در کالواریم ۳۰ موش صحرائی ایجاد شد. پس از پیوند و گذشت ۸ هفته، ارزیابی هیستوپاتولوژیک و مورفومتريک مقاطع رنگ‌آمیزی شده با H&E بر روی ۱۰۰۰ لام (از هر DEFECT) در بزرگنمایی‌های ۴۰X تا ۱۰۰X میکروسکوپ نوری معکوس (ceti) به تفکیک گروه‌های مورد مطالعه صورت پذیرفت. میزان ترمیم در آنالیز

بنیادی مشخصاً بیشتر بوده است (تصویر ۴ بخش های F تا I) (جدول ۴).

جدول ۱- میزان بازسازی ضایعه در گروه های مورد بررسی

گروه های مورد آزمون	ضایعه باقی مانده (mm2)
USSC/PHBV	۱/۶±۰/۵
PHBV	۲/۴±۰/۸
کنترل	۵/۳±۰/۶

جدول ۲- میزان Pvalue را در نمونه های مورد آزمایش نشان می دهد

حفره خالی	P value		گروه های مورد بررسی
	Collagen	USSC/Collagen	
۰/۰۵	۰/۰۴	۰/۰۵	USSC/PHBV
۰/۸	۰/۰۳	۰/۰۰۱	PHBV
۰/۰۵	۰/۰۶	۰/۰۲	کنترل

بررسی دیده نشد. در گروه ۲ (PHBV به همراه USSC) التهاب خفیف تنها در یک نمونه مشاهده شد. در نمونه کنترل التهاب متوسط در یک نمونه و التهاب خفیف در یک نمونه رؤیت شد. واکنش جسم خارجی در هیچ یک از گروه ها مشاهده نشد. در گروه یک و دو، استخوان ساخته شده از دو نوع Woven و Lamellar می باشد که فراوانی بافت لاملار بیشتر بود. میزان استخوان ساخته شده به شکل معناداری در گروه دو بیشتر از گروه یک و بیشتر از گروه کنترل بودند ( $P < 0/05$ ) (تصویر ۵).  
CT-SCAN:

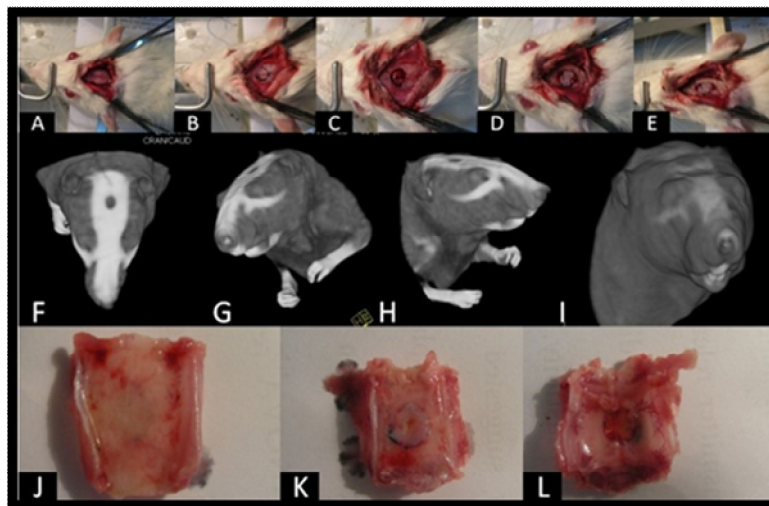
پس از گذشت ۸ هفته، قبل از برداشت ناحیه بازسازی شده، موش ها برای انجام CT-SCAN تحت بیهوشی عمیق با زایلن و کتامین قرار گرفتند. سپس درون باکس مهارکننده قرار گرفته و میزان بازسازی ناحیه آسیب دیده توسط دستگاه CT-SCAN 3 Tesla مورد ارزیابی قرار گرفت. تصویر ۴، تصویر مختصات بازسازی را در نمونه PHBV و در نمونه PHBV به همراه سلول بنیادی USSC نشان می دهد. بازسازی در نمونه PHBV به همراه سلول

جدول ۳- ارزیابی میزان التهاب در گروه های مورد آزمون

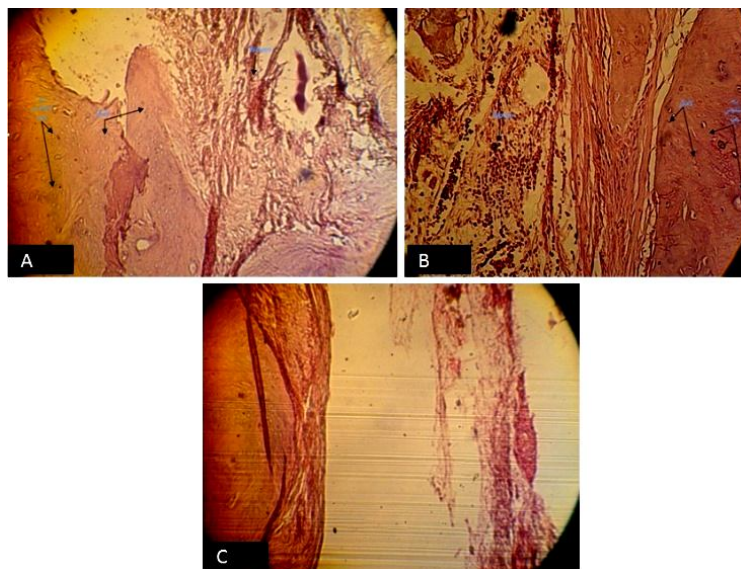
گروه مورد مطالعه	التهاب شدید	التهاب متوسط	التهاب خفیف	فاقد التهاب
PHBV	۰	۰	۰	۱۰
PHBV/ USSC	۰	۰	۱	۹
کنترل	۰	۱	۱	۸

جدول ۴- ابعاد حفره شامل طول و عرض ضایعه را نشان می دهد و میزان بازسازی را بیان می دارد

موش	PHBV(cm)	USSC/PHBV(cm)	کنترل
۱	۰/۳۳، ۰/۳۴	۰/۲۹، ۰/۳۴	۰/۴۴، ۰/۴۹
۲	۰/۳۱، ۰/۳۲	۰/۲۵، ۰/۲۶	۰/۴۸، ۰/۴۷
۳	۰/۳۰، ۰/۳۰	۰/۲۷، ۰/۲۷	۰/۴۶، ۰/۴۴
۴	۰/۳۰، ۰/۲۸	۰/۲۲، ۰/۲۴	۰/۴۹، ۰/۴۵
۵	۰/۲۹، ۰/۳۰	۰/۲۳، ۰/۲۵	۰/۴۴، ۰/۴۹
میزان بازسازی	٪۷۲/۵۶۸	٪۸۰/۰۸	٪۱۰/۶۹۶
P Value	$P < 0/05$	$P < 0/05$	$P < 0/05$



**تصویر ۴-** در بخش A نشان می‌دهد که نقایص در دو طرف سوچور ساژیتال میانی بدون رد کردن خط وسط با استفاده از هند پیس الکتریکی با سرعت ۱۰۰۰ دور در دقیقه و فرز ترفان و شستشو دادن فراوان با سالین فیزیولوژیک ۰/۹ درصد ایجاد شد. در بخش B تصویر به‌طور شماتیک با لند مارکر مختصات محل برش را نشان داده و در بخش C دایره ای به قطر ۵ میلی‌متر ایجاد و در بخش D اسکافولد PHBV به‌همراه سلول‌های USSC و در بخش E نیز حفره با استفاده از اسکافولد به‌تنهایی پر شده است. در بخش‌های F, G, H, I به ترتیب تصویر CT-SCAN مربوط به نمونه‌های کنترل (F)، اسکافلد PHBV به‌تنهایی (G, H) و اسکافلد PHBV/USSC (I) را نشان می‌دهد. تصاویر J, K, L نیز کالواریا برداشت شده را نشان می‌دهد که در نمونه PHBV/USSC بازسازی مطلوب (J) در نمونه PHBV ترمیم صورت گرفته است ولی همچنان مختصات ضایعه قابل مشاهده است و نمونه کنترل که ابعاد ضایعه کاملاً مشهود است (L).



**تصویر ۵-** در بخش A، مختصات بازسازی توسط PHBV را نشان می‌دهد، استخوان‌سازی و تشکیل بافت همبند مابین استخوان جدید و قدیمی مشخص می‌باشد. بافت‌های کلاژنی نیز قابل تشخیص می‌باشند که از کیفیت پیوند می‌کاهد. بخش B، شمایی از سلول‌های USSC/PHBV که در حفره استخوانی پیوند شده بودند. استخوان‌سازی و تشکیل بافت همبند مابین استخوان جدید و قدیمی مشخص می‌باشد. بازسازی با کیفیت مطلوب انجام پذیرفته است. در مقایسه با گروه PHBV و نمونه کنترل، استخوان‌سازی از کیفیت بالاتری برخوردار است. در بخش C، شمایی از حفره کنترل که بازسازی در آن با سرعت پایین در حال انجام می‌باشد به‌طوری که مختصات حفره همچنان قابل مشاهده بوده و ترمیم را می‌توان در مقایسه با گروه‌های دیگر ضعیف ارزیابی نمود (بزرگنمایی ۱۰۰).

## بحث

در روش‌های جراحی متعدد، برای بازسازی استخوان شکسته و لیگمانت‌های پاره شده، به پیچ‌های فلزی نخ بخیه و صفحات فلزی نیاز است. در بعضی موارد، اثرات درازمدت این قطعات فلزی برای بدن می‌تواند زیان‌بار باشد و برای خارج کردن قطعه نیاز به جراحی دوم می‌باشد. از جمله عوارض قابل ذکر، درد (۳۵) ساییدگی (۳۶)، تجمع فلزات در بافت (۳۵-۳۲)، ازدیاد حساسیت به تیتانیوم (۲۴ و ۳۴)، تداخل با رادیوتراپی و عکسبرداری (۱۹) (stress shielding)، محدودیت رشد در بچه‌ها (۲۲) و عفونت و حرکت قطعه (۲۴) و ایجاد فشار ناگهانی در ناحیه هنگام برداشتن قطعه (ایمپلنت) می‌باشد. برای کاهش این اثرات جانبی ساخت ایمپلنت‌های زیست تخریب‌پذیر که در طول زمان تخریب می‌شوند مورد توجه قرار گرفته‌اند. این ایمپلنت‌ها می‌توانند شامل پیچ، بست و صفحات باشند که به آهستگی در بدن حل می‌شوند و نیازی به خارج کردن آن‌ها نیست (۶). در گزارش‌های متعدد، تسریع التیام به وسیله سلول‌های بنیادی بالغ مغز استخوان گزارش شده است. با استفاده از تکنیک‌های مختلف مهندسی بافت سعی می‌گردد تا با به کار بردن انواع داربست‌ها و ایمپلنت‌های مختلف به همراه سلول‌های بنیادی بتوان شکستگی‌های وسیع را هرچه زودتر التیام داد (۱۰). سلول‌های بنیادی مزانشیمی خون بند ناف (USSC) نشان داده‌اند که توانایی رگزایی دارند (۶، ۷ و ۲۳). همچنین، تحقیق بر روی توانایی تمایز این سلول‌ها نشان داده است که این سلول‌ها، قادر به تمایز به سلول‌های هر سه لایه اندودرم (هپاتوسیت)، مزودرم (استئوسیت، آدیپوسیت و کاردیومیوسیت) و اکتودرم (نورون) هستند و بنابراین جایگزین مناسبی برای سلول درمانی به‌شمار می‌آیند (۶ و ۷). همچنین تحقیقات نشان داده است که این سلول‌ها پس از ۵۰ پاساژ متوالی هنوز هم کاربو تیپ نرمالی دارند (۲۳)، سرعت تکثیر این سلول‌ها از سلول‌های بنیادی مغز استخوان و پالپ دندان بالاتر می‌باشد (۱۸ و ۱۹) و بزرگ‌ترین مزیت این

سلول‌ها نسبت به سلول‌های بنیادی دیگر، دستیابی آسان است (۲۳). در تحقیق حاضر از سلول‌های بنیادی مزانشیمی خون بند ناف به‌عنوان منبع جدید از سلول‌های بنیادی استفاده شد. اکثر آسیب‌های استخوانی ایجاد شده در بدن به‌طور خودبه‌خودی و با حداقل درمان بهبود می‌یابند، با این حال در برخی موارد به دلایل متعدد از قبیل جوش خوردن نابه‌جای استخوان در اثر تومور و عفونت در محل ضایعه، التیام خودبه‌خودی انجام نمی‌شود و مداوای بیشتر ضرورت پیدا می‌کند (۷-۵). در چنین مواردی ارتوپدها از روش‌های مختلف از قبیل پیوند استخوان و یا ایمپلنت‌های فلزی جهت ترمیم کامل استخوان بهره می‌گیرند. عمل برداشتن استخوان از فرد، بسیار دردناک بوده و پس از برداشتن، ضایعه‌ای در محل ایجاد می‌شود که این آسیب نیز نیاز به ترمیم دارد (۱۰-۸)، به‌علاوه روش‌های برداشتن استخوان از فرد بیمار با خطر آلودگی همراه است. از عوارض بسیار مهم ایمپلنت‌های فلزی، رها شدن یون‌های مضر و تجمع آن‌ها در اعضای مختلف بدن و در نتیجه افزایش احتمال سرطان است (۳۵ و ۳۶). توانایی سلول‌های بنیادی مزانشیمی در تمایز به رده سلول‌های استخوانی، نویدبخش این است که در آینده نزدیک بتوان از این سلول‌ها در سلول درمانی ضایعات وسیع استخوانی استفاده کرد. برخی از محققان معتقدند که در ضایعات استخوانی، چنانچه از استراتژی سلول درمانی استفاده می‌شود بهتر است سلول‌های مورد استفاده کاملاً تمایز یافته باشند و اگر غیر از این باشد ممکن است در محل پیوند، سلول‌های ناخواسته غیراستخوانی بوجود آید و در نتیجه کارایی پیوند را کاهش دهد. با در نظر گرفتن این مطلب، اهمیت مطالعات مربوط به تمایز به سلول‌های استخوانی سلول‌های بنیادی مزانشیمی از بافت‌های مختلف از جمله خون بند ناف در محیط آزمایشگاهی آشکار می‌گردد (۱۲-۱۰).

محققین پیشنهاد نموده‌اند که توانایی رژنراسیون بالای سلول‌های بنیادی خون بند ناف به‌علت حضور جمعیتی از



سلول‌های بنیادی خاص در آن می‌باشد (۸ و ۲۳).

بزرگ‌تر جهت ارزیابی‌های تکمیلی، مجاز می‌باشد.

### تشکر و قدردانی

### نتیجه‌گیری

تشکر فراوان از گروه مهندسی بافت و سلول‌های

با ارزیابی‌های انجام‌شده در تحقیق حاضر و تأیید

بنیادی مرکز تحقیقات پروتئومیکس دانشگاه شهید بهشتی

به‌دست‌آمده از مدل ضایعه کالواریا، آزمایشات بعدی

و گروه بیومواد دانشگاه آزاد واحد تنکابن. مقاله حاضر

برای مدل‌هایی با ضایعات وسیع‌تر و مدل‌های حیوانی

بخشی از پایان‌نامه دکتری سعید حیدری کشل می‌باشد.

### References

1. Bartold PM, Narayanan AS. Molecular and cell biology of healthily and diseased periodontal tissue. *Periodontology*. 2006; 40(1): 29-49.
2. Bartod PM, Songato SH. Stem cell and periodontal regeneration. *Periodontology*. 2006;40:164-72.
3. Broxmeyer HE, Douglas GW, Hango G, Cooper S, Bard J, English D, et al. Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989;86(10):3828-32.
4. Gluckman E, Broxmeyer HA, Auerbach AD, Friedman HS, Douglas GW, Devergie A, et al. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. *N Engl J Med*. 1989;321(17):1174-8.
5. Gluckman E, Rocha V, Boyer-Chammard A, Locatelli F, Arcese W, Pasquini R, et al. Outcome of cord-blood transplantation from related and unrelated donors. Eurocord Transplant Group and the European Blood and Marrow Transplantation Group. *N Engl J Med*. 1997;337(6):373-81.
6. Kögler G, Sensken S, Airey JA, Trapp T, Müschen M, Feldhahn N, et al. A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential. *J Exp Med*. 2004;200(2):123-35.
7. Kögler G, Radke TF, Lefort A, Sensken S, Fischer J, Sorg RV, et al. Cytokine production and hematopoiesis supporting activity of cord blood-derived unrestricted somatic stem cells. *Exp Hematol*. 2005;33(5):573-83.
8. Erices A, Conget P, Minguell JJ. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br J Haematol*. 2000;109(1):235-42.
9. Mareschi K, Biasin E, Piacibello W, Aglietta M, Madon E, Fagioli F. Isolation of human 608esenchymal stem cells: bone marrow versus umbilical cord blood. *Haematologica*. 2001;86:1099-100.
10. Goodwin HS, Bicknese AR, Chien SN, Bogucki BD, Quinn CO, Wall DA. Multilineage differentiation activity by cells isolated from umbilical cord blood: expression of bone, fat, and neural markers. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2001;7(11):581-8.
11. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999;284(5411):143-7.
12. Schwartz RE, Reyes M, Koodie L, Jiang Y, Blackstad M, Lund T, et al. Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J Clin Invest*. 2002;109(10):1291-302.
13. Kopen GC, Prockop DJ, Phinney DG. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999;96:10711-6.
14. Gao J, Dennis JE, Muzic RF, Lundberg M, Caplan AI. The dynamic in vivo distribution of bone marrow-derived 608esenchymal stem cells after infusion. *Cells Tissues Organs* 2001;169(1):12-20.
15. Airey JA, Almeida-Porada G, Colletti EJ, Porada CD, Chamberlain J, Movsesian M, et al. Human mesenchymal stem cells form Purkinje fibers in fetal sheep heart. *Circulation*. 2004;109(11):1401-7.
16. Romanov YA, Svintsitskaya VA, Smirnov VN. Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from umbilical cord. *Stem Cells*. 2003;21(1):105-10.
17. Goodwin HS, Bicknese AR, Chien SN, Bogucki BD, Quinn CO, Wall DA. Multilineage differentiation activity by cells isolated from umbilical cord blood: expression of bone, fat, and neural markers. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2001;7(11):581-8.
18. Grillner S. The motor infrastructure: from ionchannels to neuronal networks. *Nat Rev Neurosci*. 2003; 4(7):573-86.
19. De Bari C, Dell'Accio F, Tylzanowski P, Luyten FP. Multipotent 608esenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum*. 2001;44(8):1928-42.

20. Sottile V, Halleux C, Bassilana F, Keller H, Seuwen K. Stem cell characteristics of human trabecular bone-derived cells. *Bone*. 2002;30(5):699-704.
21. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell*. 2002;13(12):4279-95.
22. Sanchez-Ramos JR, Song S, Kamath SG, Zigova T, Willing A, Cardozo-Pelaez F, et al. Expression of neural markers in human umbilical cord blood. *Exp Neurol*. 2001;171(1):109-15.
23. Keshel SH, Soleimani M, Tavirani MR, Ebrahimi M, Raeisossadati R, Yasaei H, et al. Evaluation of unrestricted somatic stem cells as a feeder layer to support undifferentiated embryonic stem cells. *Mol Reprod Dev*. 2012;79(10):709-18.
24. Schmidt BL, Perrott DH, Mahan D, Kearns G. The removal of plates and screws after Le Fort I osteotomy. *J Oral Maxillofac Surg*. 1998;56(2):184-8.
25. Agins HJ, Alcock NW, Bansal M, Salvati EA, Wilson PD Jr, Pellicci PM, et al. Metallic wear in failed titanium-alloy total hip replacements. A histological and quantitative analysis. *J Bone Joint Surg Am*. 1988;70(3):347-56.
26. Jorgenson DS, Mayer MH, Ellenbogen RG, Centeno JA, Johnson FB, Mullick FG, et al. Detection of titanium in human tissues after craniofacial surgery. *Plast Reconstr Surg*. 1997;99(4):976-9.
27. Katou F, Andoh N, Motegi K, Nagura H. Immuno-inflammatory responses in the tissue adjacent to titanium miniplates used in the treatment of mandibular fractures. *J Craniomaxillofac Surg*. 1996;24(3):155-62.
28. Rosenberg A, Grätz KW, Sailer HF. Should titanium miniplates be removed after bone healing is complete? *Int J Oral Maxillofac Surg*. 1993;22(3):185-8.
29. Kim YK, Yeo HH, Lim SC. Tissue response to titanium plates: a transmitted electron microscopic study. *J Oral Maxillofac Surg*. 1997;55(4):322-6.
30. Schliephake H, Reiss G, Urban R, Neukam FW, Guckel S. Metal release from titanium fixtures during placement in the mandible: an experimental study. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1993;8(5):502-11.
31. Hunt JA, Williams DF, Ungersböck A, Perrin S. The effect of titanium debris on soft tissue response. *Journal of materials science*. 1994;5(6-7):381-3.
32. Lalor PA, Revell PA, Gray AB, Wright S, Railton GT, Freeman MA. Sensitivity to titanium. A cause of implant failure? *J Bone Joint Surg Br*. 1991;73(1):25-8.
33. Castillo MH, Button TM, Doerr R, Homs MI, Pruett CW, Pearce JI. Effects of radiotherapy on mandibular reconstruction plates. *Am J Surg*. 1988;156(4):261-3.
34. Sullivan PK, Smith JF, Rozzelle AA. Cranio-orbital reconstruction: safety and image quality of metallic implants on CT and MRI scanning. *Plast Reconstr Surg*. 1994;94(5):589-96.
35. Brodke DS, Gollogly S, Alexander Mohr R, Nguyen BK, Dailey AT, Bachus aK. Dynamic cervical plates: biomechanical evaluation of load sharing and stiffness. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2001;26(12):1324-9.
36. Yaremchuk MJ. Experimental studies addressing rigid fixation in craniofacial surgery. *Clin Plast Surg*. 1994;21(4):517-24.