

بررسی هیستولوژیک میزان بازسازی نقایص استخوانی کالواریا خرگوش با استفاده از ماتریکس

دمینرالیزه استخوانی به همراه سلول بنیادی مزانشیمی و پلاسمای غنی از فاکتور رشد

دکتر حسین بهنیا*، دکتر احد خوش‌زیان**، مهرناز زرین‌فر***، دکتر فاطمه مشهدی‌عباس****، دکتر حسن بهرامی‌نسب*****، دکتر آرش خجسته*****

چکیده

سابقه و هدف: با توجه به اینکه رژنراسیون ضایعات استخوانی بزرگ از چالش‌های اصلی بازسازی فکی است، مطالعه حاضر به بررسی تاثیر استفاده همزمان از ماتریکس دمنرالیزه استخوان (DBM) (Demineralized Bone Matrix)، سلول‌های بنیادی مزانشیمال (MSCs) (Mesenchymal Stem Cell) و پلاسمای غنی از فاکتور رشدی (PRGF) (Platelet rich in growth factors) می‌پردازد.

مواد و روشها: سلول‌های بنیادی با استفاده از مغز استخوان ناحیه فمور خرگوش‌ها استخراج و ماهیت بنیادی آنها اثبات گردید. PRGF با استفاده از ۵ سی‌سی خون که از قلب خرگوش‌ها آسپیره شده بود با استفاده از دستگاه سانتریفوژ تهیه گردید. طی فرآیند جراحی، ۴ نقص ۸ میلی‌متری بوسیله فرز ترفاین در ناحیه جمجمه خرگوش‌ها ایجاد شد. سلول‌های پاساژ سوم روی DBM بارگذاری شده، ۲۴ ساعت در انکوباتور نگهداری شدند. ترتیب جایگذاری مواد به این صورت بود: گروه ۱= DBM، گروه ۲= DBM+ PRGF، گروه ۳= DBM+MSCs و گروه ۴= DBM+ PRGF+ MSCs. در هفته ۶ و ۱۲ خرگوش‌ها به شیوه وایتال پرفیوژن قربانی شده، آنالیز هیستومورفومتری بر روی مقاطع ۵ میکرومتری با رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و اتوزین (H&E) انجام شد. تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۴ و با آزمون ANOVA انجام گرفت.

یافته‌ها: آنالیز هیستومورفومتری کلیه مقاطع در ۶ و ۱۲ هفته پس از جراحی، استخوانسازی را در گروه ۱، ۷۴/۶٪ و ۲۰/۳۱٪ در گروه ۲، ۱۴/۳۵٪ و ۲۸/۴۴٪، در گروه ۳، ۱۷/۷۵٪ و ۳۱/۳۳٪ و در گروه ۴، ۱۸/۹۴٪ و ۳۷/۲۱٪ نشان داد. درصد استخوانسازی بالاتر در نقص گروه ۴ مشاهده شد. این اختلاف از لحاظ آماری معنی‌دار نبود ($P > 0.05$).

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد استفاده همزمان DBM، PRGF و MSCs موجب افزایش رژنراسیون استخوان در ضایعات ۸ میلی‌متری کالواریای خرگوش نسبت به استفاده تنها از MSCs یا PRGF خواهد شد.

کلید واژگان: بازسازی استخوان، پلاسمای غنی از فاکتور رشد، سلول بنیادی مزانشیمی، ماتریکس دمنرالیزه استخوانی، مهندسی بافت.

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۱/۲/۱۶ تاریخ اصلاح نهایی: ۱۳۹۱/۶/۱۸ تاریخ تأیید مقاله: ۱۳۹۱/۶/۲۰

Please cite this article as follows:

Behnia H, Khoshzaban A, Zarinfar M, Mashhadiabbas F, Bahraminasab V, Khojasteh A. Surgical success of dental implants placed in sinus lift and non - sinus lift area in patients of Ghazi Tabatabayi clinic from 2001-2008. J Dent Sch 2012;30(3):143-154.

مقدمه

بازسازی استخوان شامل مجموعه‌ای از اتفاقات بیولوژیکی منظم القا و هدایت استخوانی به همراه انواع متعددی از سلول‌ها و راه‌های سیگنال مولکولی داخل و خارج سلولی با ترتیب زمانی مشخص است که در جهت به حداکثر رساندن

ضایعات استخوانی امروزه سبب بروز مشکلات طبّی، اجتماعی و اقتصادی زیادی هستند که به دلایل مختلف از جمله تحلیل فیزیولوژیک ثانویه به از دست دادن دندان‌ها، تروما، پاتولوژی‌های استخوان یا عفونت ایجاد می‌شوند (۱).

*استاد گروه جراحی دهان و فک و صورت، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی.

**دانشجوی دکتری تخصصی بیومواد دندانپزشکی، دانشکده دندانپزشکی، مرکز تحقیقات و بانک فرآورده‌های پیوندی ایران، مجتمع بیمارستانی امام خمینی (ره)، واحد فراهم‌آوری سلول‌های بنیادی، مرکز تحقیقات چشم، بیمارستان فوق تخصصی چشم فارابی، دانشگاه علوم پزشکی تهران.

***دانشجوی دندانپزشکی، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی.

****استادیار گروه آسیب‌شناسی دهان و فک و صورت، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی.

*****دکتری علوم آزمایشگاهی، مرکز تحقیقات و بانک فرآورده‌های پیوندی بیمارستان امام خمینی تهران، دانشگاه علوم پزشکی تهران.

*****نویسنده مسئول: استادیار گروه جراحی دهان و فک و صورت، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی.

درمان‌های رژنراتیو یافته است. درمان‌های سلول محور^۱ با تکیه بر مفاهیم مهندسی بافت، بر پایه استفاده از سلول‌های استخوانی تمایز یافته^۲، سلول‌های پیش‌ساز استخوانی^۳ یا سلول‌های بنیادی^۴ عمل می‌کنند (۶). دو مسیر اصلی در کاربرد سلول‌ها برای درمان ضایعات استخوانی مطرح است: ۱- استفاده از مکانیسم‌هایی جهت افزایش جمعیت سلول‌های موجود در ناحیه و ۲- پیوند سلولی. به منظور به دست آوردن یک جمعیت سلولی مطلوب در شرایط ex vivo با هدف کاربرد پیوند سلولی، کلیه جوانب بیولوژی سلول باید در نظر گرفته شوند. نحوه استخراج، جداسازی و شرایط کشت سلول‌ها همگی از عوامل مهم تاثیرگذار در نتیجه درمان هستند. توانایی تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به رده‌های متعدد، در دسترس بودن نسبی و تکثیر گسترده بدون از دست دادن ظرفیت مولتی پتانسیل‌شان، آنها را به منبع سلولی مورد توجهی برای روش‌های سلول درمانی تبدیل نموده است (۴ و ۸). MSCها می‌توانند از ارگان‌ها یا بافت‌های مختلفی چون چربی، خون بند ناف، ریه، کبد، پوست، پرپوست و عضلات اسکلتی جدا شوند. مشاهدات تجربی به اتفاق نشان داده‌اند که استفاده از MSCs در نقایص استخوانی در مقایسه با نقایص بدون ماده یا همراه با درمان‌های بدون سلول موجب افزایش استخوان‌سازی می‌شود (۱۰-۱۲، ۷).

در مطالعات مختلف تاثیرات فاکتورهای رشدی و سلول‌های بنیادی در رژنراسیون استخوان بررسی شده، نتایج مختلفی گزارش شده‌اند. در هیچ یک از مطالعات، نتایج با استاندارد طلایی یعنی استخوان اتورژن قابل مقایسه نمی‌باشند. به همین دلیل مطالعه حاضر با هدف بررسی تاثیرات همزمان فاکتور رشدی مشتق از پلاکت و سلول‌های بنیادی بارگذاری شده بر روی ماتریکس دمیترالیزه استخوان بر رژنراسیون ضایعات استخوانی کالواریا صورت پذیرفت.

مواد و روشها:

فرایند آزمایشگاهی

در این مطالعه که به صورت preliminary انجام گرفته ۸

بازسازی اسکلتی و بازتوانی عملکرد آن تلاش می‌کند (۲). امروزه روش‌های مختلفی جهت بازسازی استخوان به کار گرفته می‌شود. استخوان اتورژن به عنوان استاندارد طلایی، معیار مقایسه و موفقیت روش‌های جدید به کار گرفته شده می‌باشد (۳-۶). اسکافولدها، فاکتورهای رشدی و سلول‌های استخوان‌ساز به عنوان اضلاع سه‌گانه مهندسی بافت در تحقیقات مختلف جهت افزایش رژنراسیون استخوان به کار گرفته شده‌اند (۷).

آلوگرفت‌ها، زئوگرفت‌ها و مواد صناعی از جنس هیدروکسی آپاتیت شایع‌ترین مواد مورد استفاده در جایگزینی استخوان از دست رفته به عنوان اسکافولد می‌باشند. داشتن ساختار معدنی و شباهت به ساختار استخوانی، خاصیت هدایت‌کنندگی در استخوان‌سازی به این مواد داده است ولی در ضایعات با اندازه بحرانی (Critical Size defect) این مواد به تنهایی برای تبدیل فرایند التیام به رژنراسیون کافی نخواهند بود (۹ و ۸).

در بین فاکتورهای رشدی BMP-2 شایع‌ترین فاکتور به کار گرفته شده می‌باشد که نتایج موفقیت‌آمیزی در افزایش میزان استخوان‌سازی در مطالعات آزمایشگاهی، حیوانی و آزمایشگاهی داشته است اما قیمت زیاد این فاکتور و نحوه انتقال و حفظ آن در ناحیه رژنراتیو از مشکلات اساسی کاربرد وسیع و همگانی آن بوده است (۶). فاکتور رشدی مشتق از پلاکت (PRGF) به صورت موضعی به دلیل جذب کموتاکتیک سلول‌های دیواره‌ای باعث بی‌ثباتی دیواره عروق می‌شود. در نتیجه عروق خونی مجاور با زخم در حال ترمیم قادر به جوانه زدن و تشکیل شبکه عروقی جدید داخل بافت گرانولاسیون خواهند بود. به علاوه به نظر می‌رسد به دلیل پیشبرد واسکولاریزاسیون، PDGF بتواند در آگمنتاسیون همزمان بافت نرم نیز نقش داشته باشد (۱۰). همچنین فاکتور رشدی مشتق از پلاکت در ترکیب با آلوگرفت میترالیزه استخوان freeze-dried بر روی ۲ بیمار مبتلا به تحلیل شدید استخوان نتایج مثبتی نشان داده است (۱۱).

استفاده از سلول درمانی در دهه گذشته جایگاه نوینی در

¹ Cellular therapy

² End-differentiated cells

³ Progenitor cells

⁴ Stem cells

طراحی شده، سانتریفوژ شدند. پس از سانتریفوژ، خون به لایه‌های مشخص تقسیم می‌شود. در این تقسیم‌بندی اجزای سلولی ته لوله باقی مانده، اجزای پلاسماتیک بالای لوله قرار می‌گیرند. بر اساس پروتکل کارخانه سازنده، یک سوم تحتانی قسمت پلاسمایی لوله‌های سانتریفوژ شده بوسیله میکروپیپت جدا شده، به ازای هر سی‌سی از پلازما به آنها ۱۰ میکرولیتر کلرید کلسیم (CaCl₂) اضافه شد.

بارگذاری سلول‌ها بر روی داربست

در این مطالعه از ماتریکس دمیترالیزه استخوان (DBM) تجاری موجود (ITB, Imam Khomeini Hospital, Tehran, Iran) استفاده گردید. سلول‌های بنیادی استخراج شده از کشت سوم بر روی داربست با DBM مخلوط شده، به مدت ۲۴ ساعت پیش از کشت داربست‌ها، در دیش‌های حاوی محیط کشت سلولی در شرایط انکوباسیون ۵٪ دی‌اکسید کربن - ۹۵٪ هوا و در دمای ۳۷ °C قرار گرفتند.

اسکن میکروسکوپ الکترونی

۲۴ ساعت پس از انکوباسیون، یک نمونه از داربست‌های بارگذاری شده با سلول به مدت ۲ ساعت در گلوآرآلدئید ۲/۵٪ فیکس شده، سپس توسط PBS شسته شد. مجدداً ۲ ساعت بعد، فیکساسیون با اسمیم تتراکساید ۱ درصد انجام گرفت. پس از شستشو، نمونه در درجات مختلف اتانول (به ترتیب، ۵۰، ۷۰، ۸۵ و ۱۰۰ درصد هر یک به مدت ۱ ساعت) دهیدراته و در محیط اتاق خشک شد. سپس نمونه با چسب نقره روی استندهای آلومینیومی مانت شده، بوسیله طلا به مدت ۹۰ ثانیه، با جریان ۷۰ میلی‌آمپر روکش گردید و زیر میکروسکوپ الکترونی (SEM; Vega, Tecsan, Philadelphia, PA, USA) مورد بررسی قرار گرفت. میکروگراف‌های دیجیتالی توسط (LEO 440i (LEO, UK) ثبت شدند.

فرآیند جراحی

بیهوشی حیوان‌ها با تزریق کتامین ۱۰٪ (۴ kg/mg) و زایلازین ۲٪ (۵ kg/mg) انجام شد. ضربان قلب و سرعت تنفس به دقت در طول جراحی کنترل گردید. حیوانات در حالت درازکش روی تخت جراحی قرار گرفته، پوست سر تراشیده شده، قبل از جراحی با محلول پوویدون ید ضدعفونی گردید. یک برش در طول میدلاین جمجمه از نقطه وسط پایه گوش‌ها تا حدوداً ۵ سانتی‌متر جلوتر داده شد.

خرگوش سالم بالغ نژاد نیوزیلند با متوسط وزنی ۲/۵ کیلوگرم از انستیتو پاستور خریداری و بر اساس مصوبه دفاع از حقوق حیوانات بیمارستان دامپزشکی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران در قفس‌های جداگانه نگهداری شدند. پس از تزریق وریدی کتامین (Alfasen, mg/kg (The Netherlands ۵/۵ و دیازپام (داروپخش، تهران، ایران) mg/kg ۰/۵ در هر یک از خرگوش‌ها، ناحیه فمور چپ تراشیده شده، اسکراب گردید. تحت شرایط آسپتیک با استفاده از سوزن بیوپسی مغز استخوان شماره ۲۰ از استخوان بازو حدود ۵ میلی‌لیتر مغز استخوان گرفته، جهت جلوگیری از لخته شدن در لوله‌های ۱۰ میلی‌لیتری هپارین (Novartis, France) (۷۰۰ واحد به ازای هر سی‌سی)، ریخته شد. لوله‌های حاوی مغز استخوان در داخل فلاسک‌های یخ به آزمایشگاه مرکز تحقیقات اعضای پیوندی بیمارستان امام خمینی منتقل شدند. نمونه مغز استخوان ارسالی به آزمایشگاه سلولی به نسبت ۱ به ۲ با محیط کشت DMEM (LG) (USA, Calsberg, Invitrogen) رقیق شده، روی محلول فایکول (GE-Healthcare, USA) به نسبت ۱ به ۲ جهت جداسازی سلول‌های تک‌هسته‌ای (MNC) برده، با دور rpm ۱۸۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. سپس لایه MNC به اضافه محیط DMEM با دور rpm ۱۵۰۰ و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. در نهایت محیط کشت که شامل DMEM با مشخصات بالا و ۱۰٪ FBS (Invitrogen, USA) بود ریخته و حجم کل محیط کشت به ۷ cc رسید. در مرحله پاساژ، پس از اینکه سلول به حد مورد نظر رسید از آخرین پاساژ یک نمونه جهت میکروبی‌شناسی و یک نمونه جهت فلوسایتومتری برداشته شده، بقیه سلول‌ها پس از شستشو جهت نشست سلولی بر روی داربست آماده گردیدند.

به دست آوردن PRGF از خون خرگوش

پیش از اعمال بیهوشی، ۵ میلی‌لیتر خون از قلب خرگوش گرفته شده، در لوله‌های شیشه‌ای آزمایشگاه، همراه با سیترات به عنوان ضد انعقاد ریخته، جمع‌آوری گردید. لوله‌ها به مدت ۸ دقیقه در rpm ۱۴۰۰ و در دمای اتاق در یونیت سانتریفوژی که به طور اختصاصی برای این منظور

⁵Double Minimum Essential Medium(low Glucose)

⁶Mono Nuclear Cell

مواد، توسط یک فرز جراحی متصل به هندپیس الکتریکی کم سرعت از جمجمه حیوان برداشته شد. سپس نمونه‌ها در بلوک‌های ۱×۱ سانتی‌متری، قبل از آنالیزهای بعدی، در محلول بافر ۱۰٪ فرمالدهید به آزمایشگاه بافت‌شناسی بخش آسیب‌شناسی دهان و فک و صورت دانشکده دندانپزشکی شهید بهشتی انتقال یافته، با pH ۷/۰ نگهداری و ثابت شدند. پس از آن به مدت ۲۴ ساعت شسته و ۵۰ روز در محلول سدیم سیترات و اسید فرمیک ۱۰٪ غرق شدند تا به طور کامل دکلسیفیه شوند. هر بلوک شامل منطقه پیوند شده، با الکل خشک و در پارافین جاسازی شد. سپس برش‌های ۵μm از آن تهیه گردیدند. برش‌ها توسط رنگ‌آمیزی هماتوکسی لین-ئوزین رنگ‌آمیزی شده، برای اجرای آنالیزهای هیستومورفومتریک و هیستولوژیک به طور تصادفی به ۴ گروه، شامل بررسی ساخت استخوان یا ماتریکس ارگانیک، نوع استخوان‌سازی، حضور سلول‌های التهابی حاد یا مزمن زیر میکروسکوپ نوری دسته‌بندی شدند. به منظور اندازه‌گیری کمی میزان استخوان تولید شده، از میکروسکوپ نوری (Nikon E400, Japan) با بزرگنمایی ۱۰۰ استفاده شد. عکس‌ها با کمک دوربین دیجیتال Nikon E8400, Japan به گونه‌ای تهیه شدند که کل نمونه‌ها به طور کامل در تصویر قرار گیرند. میزان استخوان تولید شده (Bone Ratio) در تصاویر مذکور با استفاده از نرم‌افزار Iranian Histomorphometric Analysis software اندازه‌گیری شد. داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS vs. ۱۴/۰ و با آزمون کروسکال والیس ارزیابی شدند.

یافته‌ها:

یافته های *In vitro*

کشت سلولی

در مشاهده میکروسکوپی می‌توان سلول‌های بنیادی مزانشیمی را که با نمای دوکی شکل شبه فیبروبلاستی شناخته می‌شوند، تشخیص داد. در پاساژهای اولیه علاوه بر این سلول‌ها، سلول‌های گرد غیر چسبیده نیز مشاهده شدند که شمار آنها متعاقب پاساژهای سلولی بعدی کاهش یافت.

پوست قبل از ایجاد برش پریوست در محل، توسط پنس جراحی کشیده و سپس پریوست توسط الواتور پریوست از سطح استخوان جدا گردید. ۴ نقص استخوانی به قطر داخلی میلی‌متر ۸، ضخامت ۰/۵ میلی‌متر در استخوان پاریتال در هر حیوان ایجاد شد.

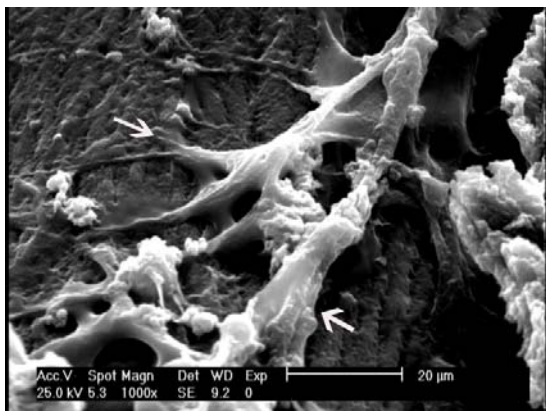
نقایص در دو طرف سوچور ساژیتال میانی بدون رد کردن خط وسط با استفاده از هندپیس الکتریکی با سرعت ۱۰۰۰ در دقیقه و فرز ترفاین و شستشو دادن فراوان توسط سالیین فیزیولوژیک ۰/۹٪ ایجاد شدند.

به صورت همزمان با جراحی، سلول‌های بنیادی جدا شده مربوط به هر خرگوش از انکوباتور خارج شده، در شرایط استریل و زیر هود، پس از جدا شدن از ظرف نگهدارنده به پلیته‌های ۱۲ خانه انتقال داده شدند. بدین ترتیب که ۴ خانه به هر خرگوش اختصاص داده شد. در هر خانه به میزان ۲ میلی‌لیتر محیط کشت سلول اضافه شد. در خانه شماره یک علاوه بر محیط کشت سلولی، ۱۰۰۰۰۰ سلول بنیادی نیز اضافه شد. در خانه شماره ۲ به جای سلول‌های بنیادی، ۱ میلی‌لیتر PRGF و در خانه شماره ۳ سلول و فاکتور رشدی به صورت همزمان اضافه شدند. در خانه شماره ۴ مقدار ۰/۲ میلی‌گرم از ماتریکس دمیترالیزه استخوان به تنهایی اضافه شد.

در هر خرگوش نقایص به ترتیب زیر پر شدند:

- ۱- بالا سمت راست: 0.2 mg DBM+1ml autologous PRGF + 2ml acellular culture medium
- ۲- بالا سمت چپ: 0.2 mg DBM + 2ml culture medium
- ۳- پایین سمت راست: 0.2mg DBM + 2ml culture medium containing 100,000 autogenous MSCs + 1ml autologous PRGF
- ۴- پایین سمت چپ: 0.2mg DBM + 2ml culture medium containing 100,000 autogenous MSCs

پریوست و بافت زیرپوست توسط بخیه کانگوت ساده ۳/۰ (SUPA) بسته شد. پوست با بخیه ی ممتد سیلک ۳/۰ به محل بازگردانده شد. آموکسی سیلین (۱/۵ mg/kg IM) و سفازولین (۳۰ mg/kg IV) پس از جراحی به مدت ۷ روز و بوپرمورفین (۱۰ mg) نیز برای تسکین درد تجویز گردید. نیمی از حیوان‌ها ۶ هفته پس از مداخله از طریق اوردوز سدیم پنتوباریتال (۶۵mg/kg IV) و نیم دیگر ۱۲ هفته بعد به همین روش کشته شدند. بلوک‌های استخوانی حاوی

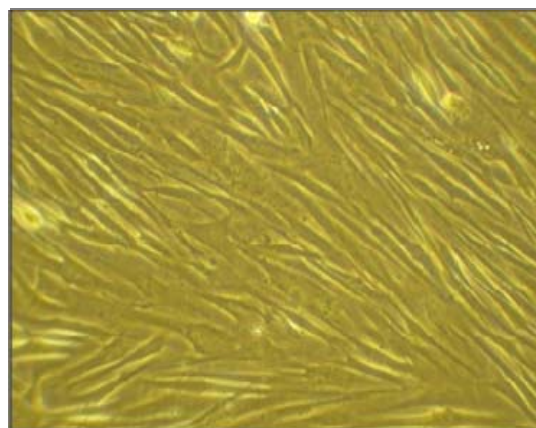


شکل ۳- در تصویر SEM استتاله‌های سلولی به داربست به خوبی مشخص است و با فلش نشان داده شده است (بزرگنمایی SEM: $\times 1000$).

یافته‌های *In vivo*

بررسی کیفی تصاویر هیستولوژی

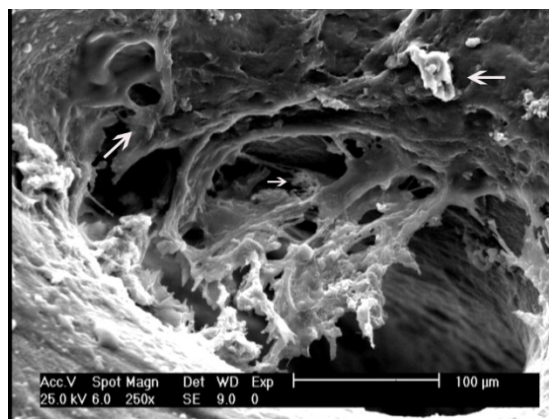
ارتشاح سلول‌های آماسی PMN در همه گروه‌ها مشاهده شد (شکل ۴). استخوان‌سازی به صورت عمده از اطراف ضایعه (peripheral) به سمت مرکز، عمدتاً در مجاورت DBM و به صورت عمده به شکل تراکولار بود. باقی مانده DBM در همه گروه‌ها در ۶ و ۱۲ هفته مشاهده شد. میزان استخوان‌سازی در نمونه‌های ۶ هفته کمتر از نمونه‌های ۱۲ هفته بوده، به همان نسبت میزان DBM باقی مانده در نمونه‌های ۶ هفته بیشتر بود. نمونه‌های حاوی PRGF و DBM استخوان‌سازی بیشتری را نسبت به نمونه‌های حاوی DBM به تنهایی نشان می‌دادند همان طور که مشابه این امر در نمونه‌های حاوی سلول و DBM نسبت به نمونه‌های بدون سلول مشاهده شد (شکل ۴). بیشترین استخوان تراکولار جدید تشکیل شده در گروه سه‌گانه سلول، PRGF و DBM مشاهده شد (شکل ۵). در نمای میکروسکوپ نوری بین گروه حاوی سلول و گروه حاوی PRGF تفاوت قابل ملاحظه‌ای وجود نداشت ولی در گروه سه‌گانه میزان استخوان‌سازی بیشتر بود. در هیچ کدام از نمونه‌ها عفونت وجود نداشت.



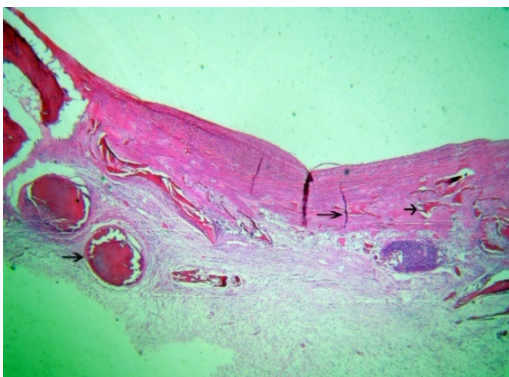
شکل ۱- سلول‌های بنیادی دوکی شکل در حال تقسیم در میکروسکوپ نوری

بارگذاری سلول‌ها روی داربست DBM

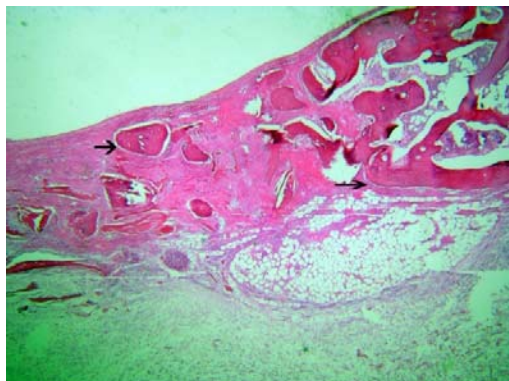
۲۴ ساعت پس از بارگذاری سلولی، پراکندگی سلول‌های بنیادی به صورت کلی در سطوح مختلف داربست توسط میکروسکوپ الکترونی در بزرگنمایی‌های پایین‌تر ($\times 250$) دیده شد (شکل ۲). در بزرگنمایی‌های بالاتر ($\times 1000$) مورفولوژی سلول‌ها از گرد تا کشیده متغیر بود. پادها و استتاله‌های سلولی که در تصاویر کاملاً مشخص بودند، پیوستگی و اتصال سلول به داربست را نشان می‌دادند (شکل ۳). به علاوه در گراف‌ها نفوذ سلول‌ها به داخل منافذ و پوره‌های داربست به خوبی مشخص بود (اشکال ۳ و ۲).



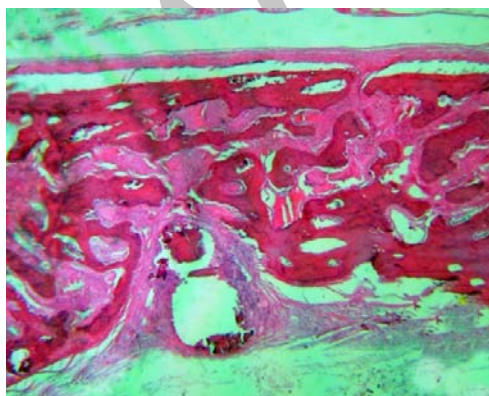
شکل ۲- در این بزرگنمایی فلش نفوذ سلول‌ها به داخل منافذ داربست نشان می‌دهد (بزرگنمایی SEM: $\times 250$).



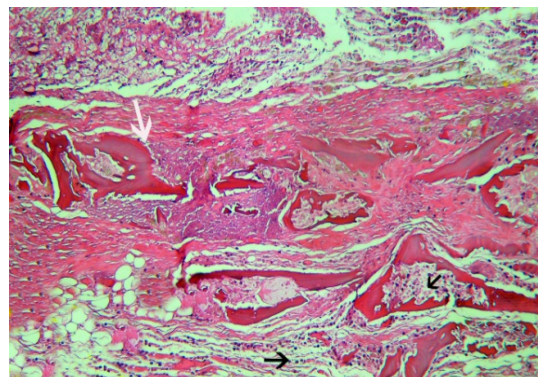
شکل ۵. ج- در نمای میکروسکوپی پس از ۱۲ هفته نیز در گروه حاوی DBM تنها استخوان‌سازی به میزان حداقل مشاهده شد و ذرات DBM باقی مانده با فلش به صورت محاط در غلاف فیبروزه مشاهده می‌شود. (۴۰×)



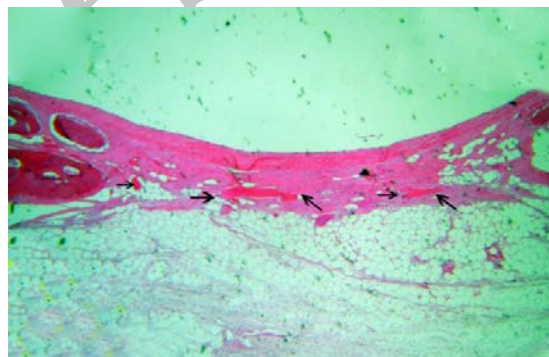
شکل ۶- در گروه حاوی DBM و PRGF استخوان‌سازی به صورت عمده از اطراف ضایعه به سمت مرکز و به شکل ترایکولار بوده است (بزرگنمایی ۱۰۰×). استخوان‌سازی پس از ۶ هفته در شکل فلش‌های سمت راست نشان‌دهنده باقی مانده‌های DBM و فلش سمت چپ نشان‌دهنده حاشیه استخوان ضایعه است.



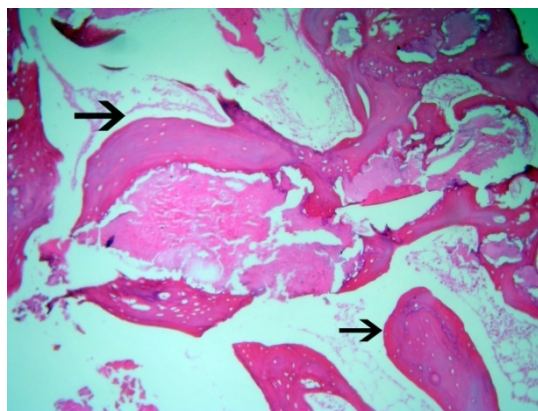
شکل ۷- بیشترین استخوان ترایکولار جدید تشکیل شده در گروه سه گانه ی DBM، PRGF و سلول بود (بزرگنمایی ۱۰۰×)



شکل ۴- ارتشاح سلول‌های آماسی در بررسی میکروسکوپی مشاهده می‌شود (گروه حاوی DBM پس از ۱۲ هفته). فلش سفید نشان‌دهنده باقی مانده DBM و فلش سیاه نشان‌دهنده سلول‌های منتشر آماسی است. (بزرگنمایی ۱۰۰×)



شکل ۵. الف- استخوان‌سازی در گروه حاوی DBM تنها پس از ۶ هفته مشاهده می‌شود (۴۰×).



شکل ۵. ب- بزرگنمایی بیشتر باقی مانده‌های DBM در ضایعه پس از ۶ هفته.

آنالیز هیستومورفومتری

توانایی رژنراتیو پروتکل درمانی مورد استفاده با کمک آنالیز هیستومورفومتری و به واسطه اندازه‌گیری سطح استخوان تازه تشکیل شده نیز بررسی گردید. جدول ۱ نشان دهنده درصد استخوان ساخته شده به تفکیک زمان در گروه‌های مختلف می‌باشد.

جدول ۱- درصد استخوان‌سازی در گروه‌ها بر حسب زمان

گروه‌ها	۶ هفته	۱۲ هفته
	B.F%	B.F%
گروه ۱ (DBM)	۶/۷۴٪	۲۰/۳۱٪
گروه ۲ (DBM+PRGF)	۱۴/۳۵٪	۲۸/۴۴٪
گروه ۳ (DBM+MSCs)	۱۷/۷۵٪	۳۱/۳۳٪
گروه ۴ (DBM+PRGF+MSCs)	۱۸/۹۴٪	۳۷/۲۱٪

اندازه‌گیری‌ها به صورت میانگین و انحراف معیار بیان شدند. نتایج کمی هیستومورفومتری ضایعات استخوانی درصد استخوان‌سازی را در همه گروه‌ها پس از گذشت ۱۲ هفته بیشتر از ۶ هفته نشان داد. بیشترین نتیجه استخوان‌سازی در سه‌گانه سلول، فاکتور رشدی و اسکافولد پس از ۱۲ هفته نشان داده شد (۳۷/۲۱٪) و کمترین آن در اسکافولد به تنهایی (۶/۷۴٪). افزودن سلول یا فاکتور رشدی نیز موجب افزایش میزان استخوان‌سازی شد که این میزان در گروه حاوی سلول بیش از گروه حاوی فاکتور رشدی بود. (۱۷/۷۵٪ در مقابل ۱۴/۳۵٪ پس از ۶ هفته و ۳۱/۳۳٪ در مقابل ۲۸/۴۴٪ پس از ۱۲ هفته).

آنالیز کروسکال والیس انجام شده تفاوت آماری مشخصی را در آزمون درون گروهی میان گروه‌های ۱، ۲، ۳ و ۴ پس از هفته‌های ششم و دوازدهم نشان نداد ($P > 0.05$). در ارزیابی میان گروهی تنها در گروه ۴، استخوان جدید تشکیل شده پس از ۱۲ هفته (۳۷/۲۱٪) نسبت به گروه ۱ تفاوت آماری معنی‌داری داشت ($P < 0.05$).

بحث:

مهندسی بافت به علت عدم وجود بایوراکتورهای قابل کاربرد در بافت زنده، امروزه عملاً به پزشکی رژنراتیو

تبدیل شده است. استفاده از سلول‌های بنیادی به همراه اسکافولدهای مختلف نتایج ضد و نقیصی در رژنراسیون استخوان نشان داده است (۹ و ۸). به علت یکسان نبودن پروتکل‌های تحقیقاتی در استفاده از سلول‌های بنیادی عملاً بسیاری از تحقیقات قابل مقایسه با یکدیگر نمی‌باشند. در این مطالعه ۴ گروه طراحی شدند تا بتوان اسکافولد به تنهایی، اسکافولد- سلول، اسکافولد- فاکتور رشدی و اسکافولد- سلول به همراه فاکتور رشدی را با یکدیگر مقایسه کرد.

در این مطالعه ماتریکس دمیترالیزه استخوان (DBM) به تنهایی در ترمیم ضایعات ۸ میلیمتری استخوان کالواریا پس از ۶ و ۱۲ هفته کمترین میزان استخوان‌سازی را نشان داد. Öztürk و همکاران در سال ۲۰۰۶ نشان دادند که DBM موجبات ترمیم سریع و بدون التهاب استخوان را در ضایعات ۵ میلی متری موش فراهم می‌کند (۵). هر چند ماتریکس استخوانی دمیترالیزه در مطالعات فراوانی نشان داده که موجب افزایش میزان استخوان‌سازی خواهد شد (۹-۲۳)، اما خاصیت مورد ادعای آن یعنی القای استخوان‌سازی^۷ مورد تردید است. نتایج بدست آمده در حیوانات مختلف با نتایج بدست آمده در انسان متفاوت است (۲۴، ۲۵). در مطالعه حاضر نیز مقدار استخوان‌سازی انجام شده به تنهایی بوسیله DBM نسبت به سایر گروه‌ها می‌تواند خاصیت القای استخوان‌سازی DBM را زیر سوال ببرد. ذرات DBM باقی مانده پس از ۱۲ هفته، حدود نیمی از مقدار باقی مانده آن پس از ۶ هفته بود. استخوان جدید در لبه‌های نقایص تشکیل شده، ذرات DBM را به سمت مرکز هدایت کرده بود. این نتایج مشابه نتایج Jackson و Clokie (۲۰۰۲) می‌باشد (۲۶).

افزودن فاکتور رشدی مشتق از پلاکت (PRGF) در گروه دوم نقص جمجمه خرگوش به DBM موجب افزایش میزان استخوان‌سازی در هر ۲ دوره ۶ و ۱۲ هفته شد. این ترکیب نتایج ساخت استخوان جدید را به ترتیب ۱۴/۳۵٪ پس از ۶ هفته و ۲۸/۴۴٪ پس از ۱۲ هفته نشان داد که نسبت به گروه DBM به تنهایی استخوان‌سازی بالاتری را نشان می‌داد.

⁷Osteoinduction

در صد استخوان‌سازی به ۲/۵۳٪ رسید (۳). این سلول‌ها با بحرانی‌تر شدن ضایعات قدرت کمتری از خود نشان می‌دادند. در مطالعه‌ای که بر روی ترمیم ضایعات بحرانی مندیبل سگ انجام شد قرار دادن این سلول‌ها بر روی اسکافولد کامپوزیتی پلی کاپرولاکتون به همراه تری کلسیم فسفات^۸ میزان ۴۸/۶۳٪ استخوان‌سازی را در مقایسه با گروه کنترل فاقد سلول که ۱۷/۲۷٪ بود نشان داد (۲۹). اضافه نمودن فاکتور رشدی rh-PDGF به سلول‌های بنیادی مزانشیمی موجب افزایش قابل توجه میزان استخوان‌سازی در ضایعات بحرانی مندیبل سگ نشد. (۱۵/۸۸٪ در مقابل ۹/۲۷٪ در گروه کنترل) (۳۰). سلول‌های بنیادی مزانشیمی نیز در اغلب مطالعات افزایش میزان استخوان‌سازی را نشان می‌دادند اما استرومال بودن آنها به جای بنیادی بودن، مشکلات در انتقال و امکان شسته شدن از محل، همگی موجب محدودیت در میزان استخوان تازه ساخته شده در ضایعات استخوانی می‌شدند. استفاده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان به همراه اسکافولد HA/TCP در آگمنتاسیون سینوس ماگزیلاری نتایج امیدوارکننده‌ای را نشان داد که احتمالاً به دلیل فراهم بودن محیط امن رژنراسیون در آگمنتاسیون سینوس فکی می‌باشد (۳۱).

در نهایت در بررسی نقص گروه ۴ که با هر ۳ ماده مورد بررسی MSC، PRGF و DBM پر شده بود نتایج نشان‌دهنده بیشترین میزان استخوان‌سازی بود. در این گروه نقص استخوان‌سازی در هفته ۶ پس از جراحی ۱۸/۹۴٪ و در هفته ۱۲، ۳۷/۲۱٪ بوده، نسبت به گروه ۱ تفاوت آماری معنی داری داشت ($P < 0.05$). نتایج مطالعه Ohya و همکاران در سال ۲۰۰۵ نیز نشان داد که ترکیب MSC و PRGF نتایج خوبی در استئوژنز و حجم استخوانی در مقایسه با استخوان اتولوگ به همراه دارد (۳۲).

در مطالعه انجام شده بر روی هیدروکسی آپاتیت نانو به همراه سیلیکاژل در ضایعات مشابه جمجمه خرگوش و با گروه‌های درمانی مشابه، توالی نتایج در گروه‌ها مشابه بود

Anitua و همکاران (۲۰۰۹) نشان دادند استفاده از PRGF در نقایص با طول ۸/۵ و قطر ۳ میلی‌متر استخوان‌سازی بیشتری را نسبت به گروه کنترل نشان داد که این به دلیل افزایش سرعت بازسازی استخوان در نقایص ایجاد شده می‌باشد (۲۷). در مطالعه فعلی نیز در تمامی گروه‌ها PRGF موجب افزایش میزان استخوان‌سازی شده بود ولی حتی پس از ۱۲ هفته نیز این میزان به ۵۰ درصد ضایعه ایجاد شده نرسید و در هیچ کدام از مقاطع رژنراسیون کامل استخوان مشاهده نشد. داشتن نتیجه مثبت در رژنراسیون استخوان بدون تاثیر قطعی نتیجه‌ای است که با بسیاری از مطالعات مشابه موافق می‌باشد.

بررسی نقص گروه ۳ که با ماتریکس دمیترالیزه استخوان حاوی سلول‌های بنیادی مزانشیمی (DBM + MSCs) به کار گرفته شده بود، استخوان‌سازی به ترتیب ۱۷/۷۵٪ در هفته ۶ پس از عمل و ۳۱/۳۳٪ در هفته ۱۲ مشخص بود که تفاوت چندانی با گروه ۲ نشان نداد. هر چند در مقایسه با گروه ۱ تفاوت قابل ملاحظه‌ای داشت. استفاده از MSCs به همراه اسکافولد تری کلسیم فسفات در مطالعه Khojasteh و همکاران (۲۰۰۸) در ضایعات ۷ میلی‌متری جمجمه موش نیز نتایج بهتری نسبت به PRP نشان داده بود (۳). نقایص بحرانی با سایز ۱۵ میلی‌متر در جمجمه خرگوش که به وسیله صفحه‌های MSC ایجاد شده به صورت *in vitro*، در ترکیب با DBM پر شده بودند حاکی از افزایش میزان استخوان‌سازی به میزان ۲۶/۷٪ بود (۲۸). طبق این مطالعه، گروه DBM نسبت استخوان‌سازی بالایی (۲۶/۷٪) را به نسبت گروه خالی (۸/۶٪) در هفته نشان داد. استخوان تشکیل شده غالباً در لبه‌های نقص بوده، استخوان نابالغ کمی هم در مرکز نقص گروه DBM دیده می‌شد. شمایل تشکیل استخوان در مطالعه فوق و مطالعه اخیر متناسب است.

سلول‌های بنیادی به همراه اسکافولد صناعی HA/TCP در ضایعات ۱۰ میلی‌متری مندیبل سگ ۶۵/۷۸٪ استخوان جدید را نشان دادند (۸). میزان استخوان‌سازی این سلول‌ها در اسکافولد مشابه در محیط خارج از استخوان در عضله ۲۹/۱۱٪ بوده است. در ضایعات ۵ میلی‌متری جمجمه موش

⁸PCL-TCP

فاکتورهای رشدی به همراه سلول‌های بنیادی بر روی داربست مناسب صورت گیرد.

نتیجه‌گیری:

پزشکی رژنراتیو حتی با استفاده از ۳ ضلع مثلث مهندسی بافت (سلول، فاکتور رشدی و اسکافولد) راه طولانی برای رسیدن به بازسازی کامل ضایعات استخوانی بحرانی در پیش خواهد داشت.

تقدیر و تشکر:

این مقاله منتج از پایان‌نامه خانم مهرناز زرین‌فر به راهنمایی دکتر حسین بهنیا و دکتر آرش خجسته به شماره ۲۹۷۴ مربوط به دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی می‌باشد.

References

1. Cavalcanti SC, Pereira CL, Mazzone R, de Moraes M, Moreira RW. Histological and histomorphometric analyses of calcium phosphate cement in rabbit calvaria. *J Craniomaxillofac Surg* 2008;36:354-359.
2. Schroeder JE, Mosheiff R. Tissue engineering approaches for bone repair: concepts and evidence. *Injury* 2011;42:609-613.
3. Khojasteh A, Eslaminejad MB, Nazarian H. Mesenchymal stem cells enhance bone regeneration in rat calvarial critical size defects more than platelete-rich plasma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2008;106:356-362.
4. Behnia H, Khojasteh A, Soleimani M, Tehrani A, Khoshzaban A, Keshel SH, et al. Secondary repair of alveolar clefts using human mesenchymal stem cells. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2009;108:e1-6.
5. Öztürk A, Yetkin H, Memis L, Cila E, Bolukbasi S, Gemalmaz C. Demineralized bone matrix and hydroxyapatite/tri-calcium phosphate mixture for bone healing in rats. *Int Orthop* 2006;30:147-152.
6. Hoffer MJ, Griffon DJ, Schaeffer DJ, Johnson AL, Thomas MW. Clinical applications of demineralized bone matrix: A retrospective and case-matched study of seventy-five dogs. *Vet Surg* 2008;37:639-647.
7. Khojasteh A, Behnia H, Dashti SG, Stevens M. Current trends in mesenchymal stem cell

با این تفاوت که مقدار استخوان‌سازی در هر گروه نسبت به گروه مشابه و حاوی DBM کمی بیشتر بود. ولی در هیچ کدام از دو مطالعه حتی پس از ۱۲ هفته، ترمیم کامل ضایعه استخوانی مشاهده نشد (۳۳). در مطالعه انسانی که با سه‌گانه سلول بنیادی، فاکتور رشدی پلاکتی و اسکافولد HA/TCP بر روی شکاف آلونول انجام شد میزان استخوان ۵۱/۳٪ گزارش شد. این میزان نسبت به بیمارانی که برای آنها دوگانه سلول- اسکافولد استفاده شده بود، بیشتر نسبت به بیمارانی که بوسیله استخوان اتوزن درمان شده بودند کمتر بود (۳۴).

با توجه به تمام موارد گفته شده و نتایج به دست آمده از این مطالعه، به نظر می‌رسد تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های ترمیم شده به وسیله فاکتور رشدی و سلول‌های بنیادی مزانشیمی در ترکیب با ماتریکس دمینرالیزه استخوان وجود نداشته، اما ترکیب سلول‌های بنیادی، فاکتور رشد و اسکافولد و به استخوان‌سازی بیشتری می‌انجامد. در نهایت به نظر می‌رسد مطالعات بیشتری باید در زمینه استفاده از

- application in bone augmentation: a review of the literature. *J Oral Maxillofac Surg* 2012;70:972-982.
8. Jafarian M, Eslaminejad MB, Khojasteh A, Mashhadi Abbas F, Dehghan MM, Hassanizadeh R, Houshmand B. Marrow-derived mesenchymal stem cells-directed bone regeneration in the dog mandible: a comparison between biphasic calcium phosphate and natural bone mineral. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2008;105:e14-24.
 9. Schwartz Z, Doukarsky-Marx T, Nasatzky E, Goultschin J, Ranly DM, Greenspan DC, et al. Differential effects of bone graft substitutes on regeneration of bone marrow. *Clin Oral Implants Res* 2008;19:1233-1245.
 10. Fagan MC, Miller RE, Lynch SE, Kao RT. Simultaneous augmentation of hard and soft tissues for implant site preparation using recombinant human platelet-derived growth factor: a human case report. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2008;28:37-43.
 11. Nevins M, Hanratty J, Lynch SE. Clinical results using recombinant human platelet-derived growth factor and mineralized freeze-dried bone allograft in periodontal defects. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2007;27:421-427.
 12. Ma D, Ren L, Chen F, Liu Y, Zhang J, Xue Z, et al. Reconstruction of rabbit critical-size calvarial defects using autologous bone marrow stromal cell sheets. *Ann Plast Surg* 2010;65:259-265.
 13. Haddad AJ, Peel SA, Clokie CML, Sándor GK. Closure of rabbit calvarial critical-sized defects using protective composite allogeneic and alloplastic bone substitutes. *J Craniofac Surg* 2006;17:926-934.
 14. Canter HI, Vargel I, Mavili ME. Reconstruction of mandibular defects using autografts combined with demineralized bone matrix and cancellous allograft. *J Craniofac Surg* 2007;18:101-103.
 15. Pieske O, Wittmann A, Zaspel J, Löffler T, Rubenbauer B, Trentzsch H, et al. Autologous bone graft versus demineralized bone matrix in internal fixation of ununited long bones. *J Trauma Manag Outcomes* 2009; 3:11-16.
 16. Acarturk TO, Hollinger JO. Commercially available demineralized bone matrix compositions to regenerate calvarial critical-sized bone defects. *Plast Reconstr Surg* 2006;118:862-873.
 17. Lin X, Peña LA, Zamora PO, Champion SL, Takahashi K. Augmentation of demineralized bone matrix (DBM) mineralization by a synthetic growth factor mimetic. *J Orthop Res* 2006;24:2051-2058.
 18. Qiu QQ, Mendenhall HV, Garlick DS, Connor J. Evaluation of bone regeneration at critical-sized calvarial defect by DBM/AM composite. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2007;8:516-523.
 19. Katz JM, Nataraj C, Jaw R, Deigl E, Bursac P. Demineralized bone matrix as an osteoinductive biomaterial and in vitro predictors of its biological potential. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2009;89:12-134.

20. Bigham AS, Dehghani SN, Shafiei Z, Torabi Nezhad S. Xenogenic demineralized bone matrix and fresh autogenous cortical bone effects on experimental bone healing: radiological, histopathological and biomechanical evaluation. *J Orthop Traumatol* 2008;9:73-80.
21. Bostrom MP, Seigerman DA. The clinical use of allografts, demineralized bone matrices, synthetic bone graft substitutes and osteoinductive growth factors: a survey study. *HSS J* 2005;1:9-18.
22. Liu G, Sun J, Li Y, Zhou H, Cui L, Liu W, Cao Y. Evaluation of partially demineralized osteoporotic cancellous bone matrix combined with human bone marrow stromal cells for tissue engineering: an in vitro and in vivo study. *Calcif Tissue Int* 2008;83:176-185.
23. Gurevitch O, Kurkalli BG, Prigozhina T, Kasir J, Gaft A, Slavin S. Reconstruction of cartilage, bone and hematopoietic microenvironment with demineralized bone matrix and bone marrow cells. *Stem Cells* 2003;21:588-597.
24. Groeneveld EH, van den Bergh JP, Holzmann P, ten Bruggenkate CM, Tuinzing DB, Burger EH. Mineralization processes in demineralized bone matrix grafts in human maxillary sinus floor elevations. *J Biomed Mater Res* 1999;48:393-402.
25. Block JE, Poser J. Does xenogenic demineralized bone matrix have clinical utility as a bone graft substitute? *Med Hypotheses* 1995;45:27-32.
26. Clokie CM, Moghadam H, Jackson MT, Sandor GK. Closure of critical size defects with allogeneic and alloplastic bone substitutes. *J Craniofac Surg* 2002;13:111-121.
27. Anitua E, Orive G, Pla R, Roman P, Serrano V, Andia I. The effects of PRGF on bone regeneration and on titanium implant osseointegration in goats: a histologic and histomorphometric study. *J Biomed Mater Res*, 2009; 91A: 158-165.
28. Vaccaro AR, Stubbs HA, Block JE. Demineralized bone matrix composite grafting for posterolateral spinal fusion. *Orthopedics* 2007;30:567-570.
29. Khojasteh A, Behnia H, Hosseini FS, Mashhadi Abbas F, Dehghan MM, Abbasnia P. The effect of PCL-TCP scaffold loaded with mesenchymal stem cells on vertical bone augmentation in dog mandible. *J Biomed mater Res Part B* 2013. (In Press)
30. Khojasteh A, Behnia H, Dashti SG, Dehghan MM, Abbasnia P. The osteoregenerative effects of platelet derived growth factor BB co-transplanted with mesenchymal stem cells, loaded on freeze dried bone allograft: a pilot study in dog mandible. *J Craniomaxillofac Surg* 2013, (In Press).
31. Shayesteh YS, Khojasteh A, Soleimani M, Alikhasi M, Khoshzaban A, Ahmadbeigi N. Sinus augmentation using human mesenchymal stem cells loaded into a beta-tricalcium phosphate/hydroxyapatite scaffold. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2008;106:203-209.

32. Ohya M, Yamada Y, Ozawa R, Ito K, Takahashi M, Ueda M. Sinus floor elevation applied tissue-engineered bone Comparative study between mesenchymal stem cells/platelet-rich plasma (PRP) and autogenous bone with PRP complexes in rabbits. *Clin Oral Implants Res* 2005;16:622-629.
33. Behnia H, Khojasteh A, Kiani MT, Khoshzaban A, Mashhadi Abbas F, Bashtar M, et al. Bone regeneration with a combination of nanocrystalline hydroxyapatite silica gel, platelet-rich growth factor, and mesenchymal stem cells: a histologic study in rabbit calvaria. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2013;115(2):e7-e15.
34. Behnia H, Khojasteh A, Soleimani M, Tehranchi A, Atashi A. Repair of alveolar cleft defect with mesenchymal stem cells and platelet derived growth factors: a preliminary report. *J Craniomaxillofac Surg* 2012;40:2-7.

Archive of SID