



استفاده از داربست هیدروکسی آپاتیت- ژلاتین پوشیده شده با سلول‌های بنیادی استرومایی مغز استخوان به عنوان گرافت استخوانی در مدل حیوانی

معصومه بهروزی^۱، هاتف قاسمی حمیدآبادی^۱، مظاهر قلی‌پور ملک آبادی^۲، نورا... رضایی^۱

مریم نظم بجنوردی^۱، مجید ملک زاده شفارودی^{۱*}

^۱ مرکز تحقیقات ایمونونوتیک، گروه علوم تشریح و بیولوژی سلولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

^۲ دپارتمان بیوتکنولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

(دریافت مقاله: ۹۴/۶/۹- پذیرش مقاله: ۹۴/۹/۲)

چکیده

زمینه: داربست‌های کامپوزیتی با دارا بودن برخی از ویژگی‌های مطلوبشان امروزه کاربردهای فراوانی در مهندسی بافت‌های سخت دارند. در مطالعه حاضر با بررسی‌های آزمایشگاهی (*In vitro*) و همچنین پیوند به مجموعه رت بالغ (*In vivo*)، نقش کامپوزیت هیدروکسی آپاتیت-ژلاتین در دو حالت، یکی به تنهایی و دیگری پوشیده شده با سلول‌های بنیادی استرومایی مغز استخوان (BMSCs) در روند بهبودی ضایعات استخوانی، کاهش زمان ترمیم و میزان پاسخ ایمنی بدن مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: در مطالعه حاضر، جهت تهیه نانو داربست هیدروکسی آپاتیت-ژلاتین از پودر نانوهیدروکسی آپاتیت و ژلاتین استفاده شد. BMSCs با روش فلوشینگ (خروج مغز قرمز استخوان با جریان پر فشار مایع) جداسازی و کشت داده شدند. در این پژوهش از ۱۵ سر رت نر بالغ نژاد ویستار با وزن حدود ۲۵۰-۲۰۰ گرم استفاده شد. گروه‌های مورد مطالعه شامل: گروه نقص استخوانی با داربست هیدروکسی آپاتیت-ژلاتین، گروه نقص استخوانی با هیدروکسی آپاتیت-ژلاتین به همراه BMSCs و گروه نقص استخوانی بدون داربست که پس از یک هفته و یک ماه از جراحی مورد بررسی قرار گرفت. از آزمون MTT جهت بررسی زیست سازگاری داربست مذکور استفاده شد. جهت تأیید روند پیشرفت ترمیم و میزان حضور سلول‌های التهابی از رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین و به منظور بررسی سنتز رشته‌های کلاژن از رنگ‌آمیزی تری کروم ماسون استفاده شد.

یافته‌ها: نتایج ارزیابی MTT نشان داد که داربست (Scaffold) مورد نظر اثر سمی بر روی سلول‌های استرومایی ندارد. اولین نشانه‌های استخوان‌سازی در هفته اول در گروه پیوند هیدروکسی آپاتیت-ژلاتین به همراه سلول‌های BMSCs ظاهر شد. اما در هفته چهارم استخوان‌سازی کامل‌تر شده و باقی مانده‌های داربست مورد نظر به صورت جزایری در بافت استخوانی اسفنجی یافت شد. بیشترین تعداد لنفوسیت‌ها در گروه‌های تجربی پس از یک هفته از کاشت داربست‌ها مشاهده گردید.

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد که داربست هیدروکسی آپاتیت-ژلاتین پوشیده شده با سلول‌های BMSCs، نقش بالقوه‌ای در روند ترمیم داشته است و به‌عنوان راهکار درمانی مناسب در ترمیم ضایعات وسیع استخوانی می‌توان از آن بهره جست.

واژگان کلیدی: پیوند، داربست، رت، سلول بنیادی مزانشیمی مغز استخوان، مهندسی بافت

* ساری، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریح و بیولوژی سلولی

مقدمه

دارد. به این منظور، مهندسی بافت استخوان، سلول‌های بنیادی تحت شرایط کنترل شده بر روی داربست‌های مناسب کشت داده می‌شوند. یکی از اهداف اصلی مهندسی بافت استخوان، طراحی و ساخت داربست‌های سه بعدی زیست فعال (Bioactive) و قابل جذبی (Resorbable) است که بتواند یکپارچگی ساختاری خود را در طول زمان ترمیم حفظ نماید. یکی از رویکردهای دستیابی به این هدف، ساخت داربست‌های مخلوط از چند ترکیب شیمیایی (Composite) است. داربست (Scaffold)، ماتریکس موقتی برای رشد استخوان است که محیطی اختصاصی را برای تکامل بافت فراهم نموده و باعث تسهیل چسبندگی، رشد و تمایز سلول‌ها می‌شود. تاکنون انواع مختلفی از داربست‌های سرامیکی، پلیمری و کامپوزیتی مورد استفاده قرار گرفته‌اند. مطالعات جدید بر استفاده از مواد زیستی حاوی مواد زیست فعال تأکید داشته که تحریک کننده مهاجرت سلولی به محل ضایعه هستند. از آنجایی که بافت استخوان شامل یک فاز معدنی و یک فاز آلی است، داربست‌های تقلید کننده ماتریکس استخوان نیز از دوفاز معدنی (عمدتاً هیدروکسی آپاتیت) و آلی (پروتئین‌هایی نظیر کلاژن یا ژلاتین) تشکیل شده‌اند. داربست‌ها به عنوان یک پشتیبان فیزیکی حمایت ساختاری لازم برای اتصال سلول‌ها و تکوین بافت ترمیمی را تأمین می‌نمایند. داربست باید ماتریکس خارج سلولی مناسبی جهت رشد و تمایز سلول‌ها فراهم و همچنین عملکرد مناسب بافت را بازسازی نماید. یک داربست ایده‌آل برای اینکه بتواند محیط مناسبی جهت تکامل بافت استخوانی پدید آورد، باید دارای ویژگی‌هایی نظیر: زیست سازگاری، کاربرد آسان و امکان تثبیت شدن در محل ضایعه، محرک استخوان‌سازی، سرعت تجزیه‌پذیری مشابه سرعت

علی‌رغم قابلیت بسیار زیاد بافت استخوانی در روند ترمیم، این فرآیند تحت شرایط خاص (مانند بیماری، تروما و شکستگی‌های مرکب و خوردشدگی) به خوبی عمل نمی‌نماید. بدین منظور اخیراً ترمیم نقایص استخوانی از طریق پیوندهای اتوژن (Autogenous)، آلوژن (Allogenuous)، ایزوژن (Isogenous) و با استفاده از مواد سنتتیک صورت می‌گیرد (۱-۳). در بازسازی نقایص استخوانی، پیوند اتولوگ به علت فراهم آوردن اجزای ضروری برای تشکیل استخوان همواره مناسب‌ترین گزینه محسوب می‌شود. اگرچه مشکلاتی نظیر درد مزمن، عفونت، آسیب عصبی، شکل‌گیری استخوان به شکل غیرطبیعی، خونریزی و افزایش زمان جراحی را در پی دارد. آلوگرفت نیز گزینه مناسب بعدی جهت پیوند می‌باشد که به معنای پیوند عضو یا بافت بین دو جاندار از یک گونه واحد می‌باشد که از نظر ژنتیکی با هم یکسان نیستند. بیشتر پیوندهای استخوانی از این نوع می‌باشند. آلوگرفت از طریق بانک نگهداری بافت در دسترس است اما با خطر انتقال بیماری و عدم ایجاد رگرایی (Vascularization) مواجه می‌باشد (۴ و ۵). ایزوگرفت (Isograft) نوعی پیوند آلوگرفت است با این تفاوت که دهنده و گیرنده، از نظر ژنتیکی همسان هستند، مانند پیوند بین دوقلوهای همسان. این نوع پیوند از نظر پاسخ ایمنی مانند اتوگرافت عمل می‌کند (۶).

علی‌رغم موفقیت‌هایی که پیوندهای استخوانی در بهبود نقایص به همراه داشته‌اند، محدودیت منابع استخوانی در پیوند و سایر موارد ذکر شده، انگیزه را برای ساخت مواد جایگزین ایجاد نمود (۷). از این رو مهندسی بافت با تلفیق سلول‌های استئوبلاست و مواد زیست سازگار مناسب، سعی در برگرداندن فعالیت بیولوژیکی استخوان

سلول‌ها سبب تحریک رشد استخوان پس از شکستگی گردیده است. سلول‌های BMSCs با توجه به ویژگی‌های منحصر بفردی نظیر دسترسی آسان، عدم برانگیختن خواص آنتی‌ژنیک، بقای طولانی مدت و سازگاری با بافت میزبان، گزینه مناسبی جهت ترمیم بافت استخوانی ضایعه دیده محسوب می‌شود (۱۷). علاوه بر قابلیت تمایز به سلول‌های استخوانی، سلول‌های بنیادی مغز استخوان می‌توانند منجر به ترشح فاکتورهای رشد و سیتوکین‌ها شده و همچنین سلول‌ها را برای ترمیم استخوان تحریک کنند.

از جمله موادی که قابلیت جایگزینی پیوندهای استخوانی، جهت ترمیم نقایص استخوانی را دارا می‌باشند، مشتقات کلسیم فسفات هستند (۲۲-۱۸). از آنجایی که این مواد دارای ترکیب شیمیایی و فیزیکی مشابه مواد معدنی استخوان می‌باشند، کمتر باعث بروز تحریک و واکنش‌های آماسی در بافت میزبان می‌شوند. یک داربست مناسب جهت ترمیم ضایعات استخوانی، باید حداقل سه ویژگی طراحی آناتومیکی صحیح، توانایی تحمل فشارهای مکانیکی و افزایش میزان فاکتورهای رشد را داشته باشد (۲۳).

این تحقیق با تغییر در ترکیب آلی کامپوزیت از کلاژن به ژلاتین و همچنین بکارگیری سلول‌های بنیادی، تأثیر آن را در روند ترمیم ضایعات استخوانی مورد بررسی قرار می‌دهد. تا به واسطه آن بتوان کارایی ترمیم را افزایش و زمان ترمیم را تا حد ممکن کاهش داد. همچنین مطالعات همزمان آزمایشگاهی (In vitro) و پیوند به جمجمه موش نژاد سوری بالغ (In vivo)، نقش کامپوزیت‌های حاصله در ترمیم استخوان، میزان پاسخ ایمنی بدن به کامپوزیت و تأثیر این داربست در تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان مورد بررسی قرار داده است.

ساخت استخوان جدید در بدن باشد. این داربست همچنین باید ساختاری با تخلخل‌های بهم پیوسته باشد که امکان رشد و تمایز سلول‌های بنیادی و ورود و خروج مواد را فراهم نماید. علاوه بر این خواص مکانیکی مشابه استخوان طبیعی و قابلیت رگ‌زایی سریع را نیز داشته باشد (۸). یکی از مهم‌ترین کامپوزیت‌های مورد استفاده جهت آماده‌سازی داربست‌های استخوانی هیدروکسی آپاتیت-ژلاتین است (۹-۱۲). ژلاتین یک کلاژن بی‌شکل می‌باشد که از حرارت دهی تدریجی کلاژن نوع I ایجاد شده و از مزایای آن می‌توان به ارزان‌تر بودن و تهیه آسان‌تر محلول آن نسبت به کلاژن اشاره کرد. همچنین مشاهده شده که هیدروکسی آپاتیت-ژلاتین نسبت به هیدروکسی آپاتیت-کلاژن در تحریک پاسخ استئوبلاست‌ها فعال‌تر است (۱۳).

در همین ارتباط در مطالعه‌ای در سال ۲۰۰۵، هیدروکسی آپاتیت-ژلاتین به عنوان داربستی مناسب جهت القای استخوان‌سازی شناخته شد (۱۴). همچنین، تأثیر ژلاتین ماتریکس استخوانی انسان در ترمیم نقایص استخوان جمجمه‌ای در رت مورد بررسی قرار گرفت و مشاهده شد که سرعت ترمیم بافت استخوانی با ژلاتین ماتریکس استخوانی انسان بیشتر بوده است (۱۵).

کاربرد همزمان نانوکامپوزیت هیدروکسی آپاتیت-ژلاتین به همراه سلول‌های بنیادی مشتق از بافت اندومتر رحمی در مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۳ نیز منجر به شکل‌گیری قابل توجه بافت استخوانی گردید (۱۶).

از آنجایی که نقش سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان (Bone Marrow Stromal Cells, BMSCs) در مهندسی بافت استخوان به طور وسیع مطالعه گردیده و به عنوان سلول‌های ترمیم‌کننده بافت مورد استفاده قرار گرفته‌اند. استفاده از پیوند این

مواد و روش‌ها

بدین ترتیب که با استفاده از سرنگ انسولین که حاوی ۱۰ Fetal Bovine Serum (FBS), DMEM/F12 درصد، ۱۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر پنی‌سیلین (Gibco) و ۱۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر استرپتومایسین (Gibco) است (محیط کشت پایه)، مغز استخوان از هر دو انتهای استخوان بریده شده خارج شده و تمام محتویات سرنگ به درون یک فلاسک کشت سلول ۲۵ سی سی منتقل و در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و میزان ۵ درصد دی‌اکسید کربن و شرایط رطوبت ۹۵ درصد برای مدت یک شبانه روز کشت داده شدند. پس از آن تعویض محیط هر ۲ تا ۳ روز تا تخلیه کامل سلول‌های خونی و خونساز ادامه یافت. سلول‌های مزانشیمال مغز استخوان عمدتاً دوکی شکل و چسبیده به کف فلاسک باقی ماندند. پس از پرشدن کف فلاسک (۸۰-۷۰ درصد)، سلول‌ها با استفاده از تریپسین ۰/۲۵ درصد (Gibco) جدا و پاساژ داده شدند. به منظور خالص‌سازی سلول‌های استرومایی مزانشیمی از پاساژ ۳-۵ استفاده شد.

طراحی تحقیق

در این پژوهش از ۱۵ سر موش صحرایی نر بالغ نژاد ویستار با وزن حدود ۲۵۰-۲۰۰ گرم استفاده شد. جانوران در دمای 22 ± 2 درجه سانتی‌گراد و روشنایی متناوب ۱۲ ساعته در حیوانخانه دانشگاه علوم پزشکی مازندران نگهداری شدند. مطالعه روی ۳ گروه (هر گروه ۵ عضو) شامل گروه کنترل و ۲ گروه تریال صورت گرفت. در هر یک از گروه‌ها ضایعه‌ای به قطر ۷ میلی‌متر توسط ابزار فرز دندان پزشکی، در استخوان پریئال، نزدیک به خط وسط ایجاد شد. گروه‌های مورد مطالعه به شرح زیر بود:

(۱) ایجاد ضایعه بدون هیچ‌گونه پیوند (گروه کنترل)

آماده‌سازی اسکفولد هیدروکسی آپاتیت - ژلاتین

ابتدا هیدروکسی آپاتیت (Merck, 2196, Germany) به صورت پودر در اندازه نانومیکرون خریداری شد. علاوه بر این محلول ۱۰ درصد ژلاتین (Merck Inc, 4070, Germany) در آب دو بار تقطیر دیونیزه تهیه گردید. سپس پودر نانوهیدروکسی آپاتیت به محلول اضافه شد تا ترکیبی با وزن نهایی ۶۰ درصد ژل-۴۰ درصد هیدروکسی آپاتیت تهیه گردد. محلول حاصل به مدت ۴۵ دقیقه در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد در همزن گرمایشی (MR Hei-/Heidolph) قرار گرفت تا یکنواخت گردد. محلول حاصل در درون پتری دیش پلاستیکی قرار گرفت (از شکل‌گیری حباب یا کف جلوگیری شد) تا به ضخامت ۲ میلی‌متر برسد. سپس به سرعت پتری دیش حاوی محلول به مدت ۱ ساعت در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار گرفت تا لایه‌های جامد تشکیل شود. نمونه فوق به مدت ۲۴ ساعت در دستگاه Freeze Dryer (EYELA/Japan) در شرایط دمای ۵۷- درجه سانتی‌گراد و فشار ۰/۰۳ میلی‌بار نگهداری شد تا کاملاً خشک شود (۹). محصول به دست آمده در این مرحله کامپوزیت متخلخل ژلاتین-نانوهیدروکسی آپاتیت بود که در صورت انحلال مجدد در آب به صورت محلول دو جزئی در آمده و استحکام آن کاسته خواهد شد.

استخراج و کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان

استخراج سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان بر مبنای روش Flushing از استخوان‌های ران و ساق پای موش‌های نژاد (سوری) ۸-۶ هفته‌ای انجام شد.

این مدت جهت پیوند به محل ضایعه، آماده شدند. جهت فیکس کردن داربست‌ها درون حفره (در گروه‌های ۲ و ۳) از آلژینات استفاده گردید.

آزمون سمیت سلولی (MTT)

به منظور بررسی سمیت سلولی داربست هیدروکسی آپاتیت- ژلاتین بر روی سلول‌های استرومایی مغز استخوان از آزمون MTT استفاده شد. بدین ترتیب، ابتدا به هر یک از چاهک‌های پلیت ۶ خانه ۹۰۰۰۰ سلول استرومایی منتقل شد. علاوه بر این در گروه تست، داربست مورد نظر به میزان ۶ میلی گرم اضافه شد و در ادامه سلول‌ها به مدت ۷۲ ساعت در انکوباتور و در شرایط استاندارد دمایی و رطوبت کشت داده شدند. سپس با برداشتن ۱۵۰ میکرولیتر محیط از هر دو گروه تست و کنترل و افزودن ۱۵۰ میکرولیتر محلول (Sigma) MTT به هر یک از آن‌ها، سلول‌ها به مدت ۲ ساعت انکوبه شدند. در ادامه با افزودن (Sigma) DMSO و ۱۵ دقیقه shaking محلول رنگی شکل گرفت. سپس محلول رنگی حاصل توسط دستگاه ELISA Reader و در طول موج‌های ۵۳۰ و ۶۳۰ مورد بررسی قرار گرفتند.

ارزیابی ترمیم استخوانی پس از بررسی میکروسکوپی

آماده‌سازی بافت جهت میکروسکوپ نوری

یک هفته و یک ماه پس از جراحی، جانوران قربانی شده و ناحیه مورد نظر به همراه اندکی از حاشیه استخوان میزبان برداشته شد هر نمونه درون ظرف شیشه‌ای کوچکی قرار گرفت. ابتدا به منظور فیکساسیون در محلول فرمالین ۱۰ درصد (Sigma) به مدت یک هفته و سپس جهت دکلسیفیه شدن به مدت ۱۶ روز در داخل محلول ۱۴ درصد EDTA

(۲) پیوند نانوکامپوزیت هیدروکسی آپاتیت- ژلاتین
(۳) پیوند نانوکامپوزیت هیدروکسی آپاتیت- ژلاتین
به همراه سلول‌های بنیادی مزانشیمی

ایجاد ضایعه استخوانی

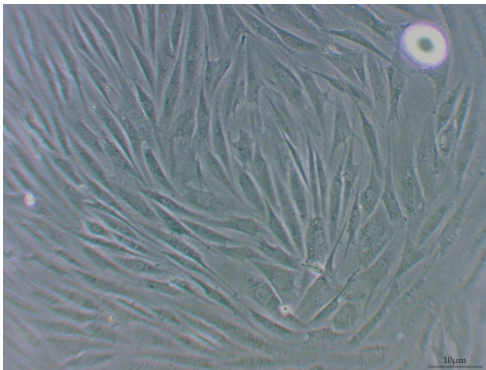
تحت شرایط استریل، جانوران با تزریق داخل صفاقی کتامین هیدروکلراید ۴۰ میلی گرم بر کیلوگرم و زایلزین هیدروکلراید ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم (Merck-Germany) بیهوش شدند. پس از بیهوشی کامل جانور، موهای سطح فوقانی جمجمه به وسیله تیغ معمولی تراشیده شد. سپس تحت شرایط استریل، یک برش پوستی از ناحیه وسط گوش‌ها تا پایین تر از ناحیه چشم‌ها ایجاد شده و پس از کنار زدن پوست و پریوست، ضایعه مورد نظر در محل استخوان‌های پریتال در خط وسط و در فاصله مساوی از عضله تمپورالیس و درز ساژیتال به کمک ابزار فرز دندانپزشکی Critical size defect برش مدوری به قطر هفت میلی متر ایجاد شد. به طوری که در طی جراحی تمام ضخامت استخوان تا سطح سخت شامه بدون صدمه زدن به شریان منژیال میانی برداشته شد.

کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان بر

روی داربست هیدروکسی آپاتیت - ژلاتین

به منظور کشت سلول، از سلول‌های استرومایی مغز استخوان (BMSCs) در پاساژ ۳-۵ سلولی استفاده شد. شمارش سلولی صورت گرفت و به تعداد ۱۰-۵ هزار سلول روی قطعات هفت میلی متری داربست‌ها که از قبل آماده و با استفاده از آنتی بیوتیک مناسب استریل شدند و در پلیت‌های ۶ خانه کشت سلولی قرار داده شده بودند، منتقل گشت. سلول‌ها بر روی داربست‌های مذکور به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شده (۵ درصد CO₂- دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد) و طی

سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان هستند (شکل ۱).



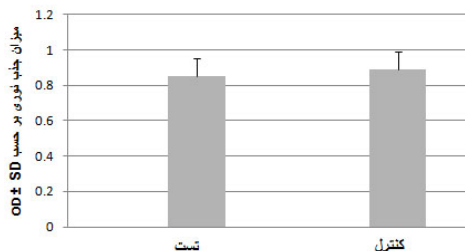
شکل ۱) تصویر میکروسکوپ فاز کنتراست در پاساژ چهارم از کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان

بررسی سمیت داربست هیدروکسی آپاتیت - ژلاتین

بر روی سلول‌های استرومال مغز استخوان

نتایج ارزیابی MTT نشان داد که میانگین میزان زنده بودن سلول‌ها در گروه‌های تست و کنترل به ترتیب 0.89 ± 0.02 و 0.85 ± 0.097 بودند، به طوری که مقایسه این دو میانگین نشان می‌دهد که داربست‌های مورد نظر اثر سمی بر روی سلول‌های استرومایی نداشته است (نمودار ۱).

میزان زنده بودن سلول‌ها



نمودار ۱) نتایج تست سمیت سلولی داربست هیدروکسی آپاتیت - ژلاتین بر روی سلول‌های استرومال مغز استخوان ($P < 0.05$)

Fig 1) Hydroxyapatite scaffold - gelatinytotoxicity test resultson bone marrow stromal cells

یافته‌های هیستوپاتولوژی نشان دادند که اولین نشانه‌های شروع استخوان سازی در هفته اول در گروه پیوند

(Gibco) به‌عنوان یک محلول Calcium challenger قرار گرفتند. مراحل پاساژ و تهیه بلوک طبق روش‌های استاندارد آماده سازی بافتی شامل آبیگری، شفاف‌سازی و آغشتگی صورت گرفت. از هر نمونه یک بلوک و از هر بلوک ۱۰ برش با ضخامت هفت میکرومتر و به صورت سریال تهیه و رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین جهت میزان حضور سلول‌های التهابی و ترمیم بافتی صورت گرفت. لازم بذکر است که علاوه بر این به منظور بررسی سنتز رشته‌های کلاژن از رنگ‌آمیزی تری‌کروم ماسون (Trichrome Mason) استفاده شد (۱۸).

آنالیز آماری داده‌ها

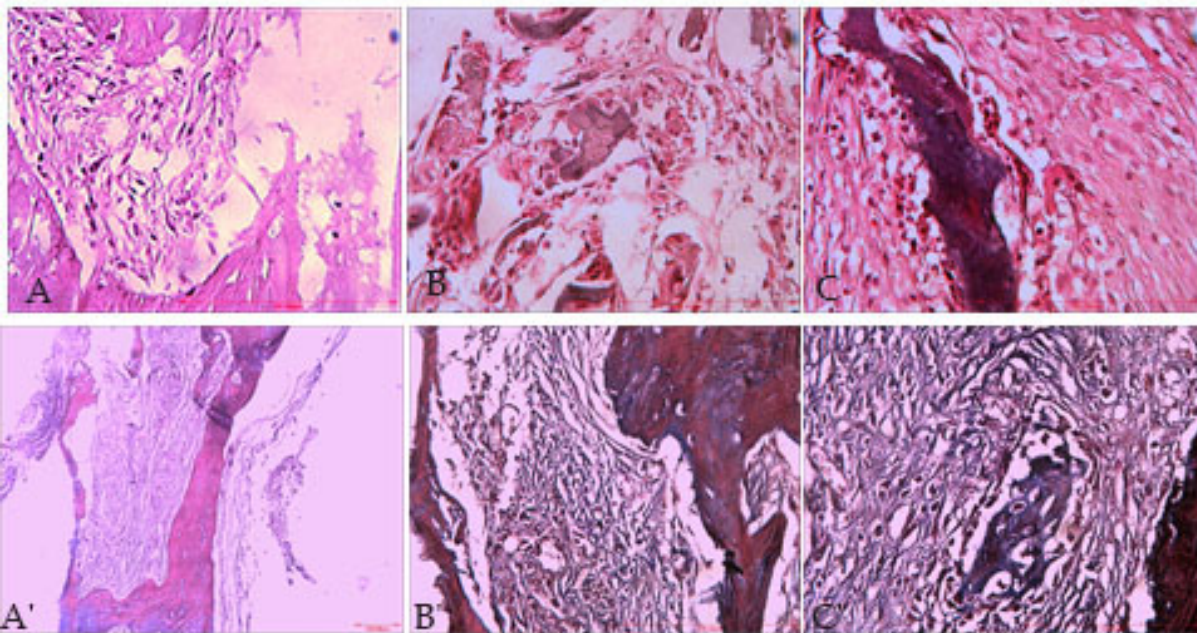
یافته‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS ویرایش ۱۶ و با آزمون‌های آماری ANOVA یک طرفه و Paired t-test تجزیه و تحلیل شدند. همچنین نتایج به‌صورت انحراف معیار \pm میانگین ارائه شده‌اند، به طوری که سطح معنی‌داری ($P < 0.05$) کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار محسوب می‌گردد.

یافته‌ها

کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان در پاساژهای اولیه نشان داد که انواع مختلفی از فنوتیپ‌های سلولی از جمله سلول‌هایی با مورفولوژی گرد و غیر چسبنده دیده شدند که بدنبال پاساژهای متوالی از تعداد آنها به‌طور چشمگیری کاسته شد. علاوه بر این سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان طی ۴ الی ۵ روز معمولاً به ۷۰-۸۰ درصد تراکم رسیدند. در ادامه، نتایج ارزیابی‌های میکروسکوپی در پاساژهای ۳-۵ حضور سلول‌های با ظاهر شبه فیبروبلاستی و دوکی شکلی را ثابت کرد که بیانگر

گروه پیوند نانوکامپوزیت هیدروکسی آپاتیت - ژلاتین پس از سپری شدن یک هفته، بافت همبند شل با ضخامت متوسط اطراف داربست را در بر گرفته بود به طوری که در هفته چهارم در گروه مذکور بافت همبند در اطراف داربست شروع به کلاژن سازی نموده و استخوان سازی در حاشیه های حفره و نزدیک به محل پیوند دیده شد (شکل ۲ تصاویر B و B'). در گروه کنترل بافت همبند نازکی محل ضایعه را پر کرده بود و هیچ گونه نشانه ای از استخوان سازی مشاهده نشد (شکل ۲، تصاویر A و A').

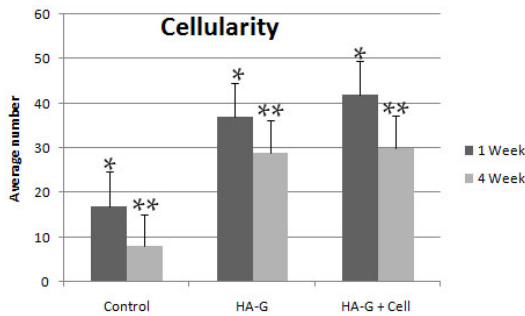
نانوکامپوزیت هیدروکسی آپاتیت - ژلاتین به همراه سلول های بنیادی مزانشیمی ظاهر شد، به طوری که کال همبندی در اطراف داربست شکل گرفته و در مواردی بافت مذکور با بافت داربست ممزوج گردیده بود. علاوه بر این استخوان اسفنجی نیز در وسط حفره شکل گرفت. اما در هفته چهارم استخوان سازی کامل تر شده و باقی مانده های داربست مورد نظر به صورت جزایری در بافت استخوانی اسفنجی یافت شد. علاوه بر این رنگ آمیزی تری کروم ماسون حضور دستجات کلاژن متراکم را در این گروه تأیید می کند (شکل ۲: تصاویر C و C'). اما در



شکل ۲) مقاطع هیستولوژیک پس از ۴ هفته پیوند در جمجمه موش صحرایی. (A)، (B) و (C) به ترتیب تصاویر مربوط به گروه کنترل، گروه پیوند نانوکامپوزیت هیدروکسی آپاتیت-ژلاتین و گروه پیوند نانوکامپوزیت هیدروکسی آپاتیت-ژلاتین به همراه سلول های بنیادی مزانشیمی را نشان می دهد که توسط هماتوکسیلین و انوزین رنگ آمیزی شدند. (A')، (B') و (C') به ترتیب تصاویر مربوط به گروه کنترل، گروه پیوند نانوکامپوزیت هیدروکسی آپاتیت-ژلاتین و گروه پیوند نانوکامپوزیت هیدروکسی آپاتیت-ژلاتین به همراه سلول های بنیادی مزانشیمی را نشان می دهد که توسط تری کروم ماسون رنگ آمیزی شدند. شکل گیری استخوان در محل ضایعه استخوانی با فلش سفید رنگ مشخص گردیده است. هیچ اثری از تشکیل بافت استخوانی در گروه کنترل مشاهده نمی گردد.

سلول های پلی مورفو نوکلتر در تمامی گروه ها مشاهده شدند؛ ثانیاً بیشترین تعداد لنفوسیت ها در گروه های تجربی پس از یک هفته از کاشت داربست ها مشاهده گردید (نمودار ۲). همچنین اختلاف میانگین معنی داری در تعداد پلی مورفو نوکلترها موجود در

میزان حضور سلول های آماسی و تمامی سلول های فراخوانده شده به محل پیوند همچون ائوزینوفیل ها تحت عنوان سلولاریتی که (تراکم سلولی) نامیده می شود در گروه های مختلف مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج ارزیابی ها نشان داد که اولاً لنفوسیت ها و



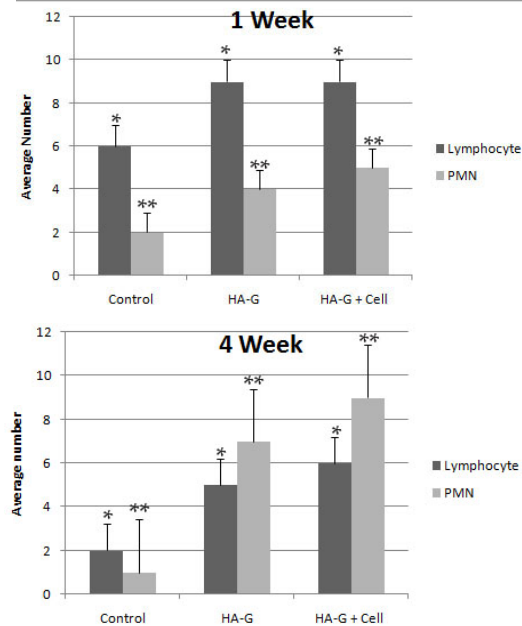
نمودار ۳) نتایج شمارش تمام سلول‌های موجود در محل پیوند (سلولاریتی) بین گروه کنترل، گروه پیوند نانوکامپوزیت هیدروکسی آپاتیت-ژلاتین و گروه پیوند نانوکامپوزیت هیدروکسی آپاتیت-ژلاتین به همراه سلول‌های بنیادی مزانشیمی ($P < 0.05$)

Fig 3) The results of counting all the cells in the alginate (Cellularity) between control group, hydroxyapatite-gelatin composite transplantation and Hydroxyapatite-gelatin nanocomposites transplant with mesenchymal stem cells ($P < 0.05$)

بحث

اکثر آسیب‌های استخوانی ایجاد شده در بدن به طور خودبه‌خودی و با حداقل درمان بهبود می‌یابند. با این حال در برخی موارد به دلایل متعدد، التیام خودبه‌خودی صورت نگرفته و اقدامات بیشتری ضرورت پیدا می‌کند. امروزه با استفاده از تکنیک مهندسی بافت و کاربرد انواع داربست‌ها سعی می‌گردد تا التیام هرچه سریع‌تر شکستگی‌های وسیع استخوانی حاصل شود. همچنین کشت سلول‌های استخوان‌ساز بر روی داربست‌ها که در مطالعات متعددی مورد بررسی قرار گرفته، جهت ترمیم مؤثر به نظر می‌رسد (۲۳). در این تئوری این سلول‌ها ترزاید یافته و شروع به ترشح ماتریکس القا کننده استخوانی بر روی داربست می‌کنند که بهبودی را تسهیل می‌بخشد. برای به دست آوردن بهترین نتیجه از عمل پیوند سلول، سلول باید دارای ویژگی‌هایی نظیر قابلیت دسترسی آسان، گسترش سریع در محیط کشت، ایمنولوژی خنثی، بقای طولانی مدت و سازگاری با بافت میزبان باشد.

محل پیوند بین گروه‌های تیمار و کنترل وجود داشت به طوری که حداکثر تعداد سلول‌های پلی مورفونوکلتر در گروه پیوند داربست به همراه سلول‌های مزانشیمی پس از ۴ هفته دیده شد (نمودار ۲).



نمودار ۲) نتایج شمارش سلول‌های لنفوسیتی و پلی مورفونوکلتر در محل پیوند بین گروه کنترل، گروه پیوند نانوکامپوزیت هیدروکسی آپاتیت-ژلاتین و گروه پیوند نانوکامپوزیت هیدروکسی آپاتیت-ژلاتین به همراه سلول‌های بنیادی مزانشیمی. (A) یک هفته پس از پیوند. (B) چهار هفته پس از پیوند ($P < 0.05$ و $P < 0.01$)

Fig 2) Lymphocyte and polymorphonuclear cell count results in graft between control group hydroxyapatite-gelatin composite transplantation and Hydroxyapatite-gelatin nanocomposites transplant with mesenchymal stem cell (A) One week after transplantation. (B) Four weeks after transplantation ($P < 0.05$, $P < 0.01$)

میزان سلولاریتی در گروه‌های تیمار در هفته اول و هم در هفته چهارم به طور قابل توجهی بیشتر از گروه کنترل بود، اما تفاوت معنی‌داری میان دو گروه تجربی که در آنها داربست با و بدون سلول‌های بنیادی به کار گرفته شده بود مشاهده نشد (نمودار ۳).

ارزیابی‌های هیستوپاتولوژیک بر روی مجموعه رت نشان داد که پیوند نانوکامپوزیت هیدروکسی آپاتیت-ژلاتین به همراه سلول‌های بنیادی مزانشیمی نتایج بهتری را در ترمیم نقص استخوانی ایجاد شده نسبت به سایر گروه‌ها ایجاد می‌کند. به طوری که اولین نشانه‌های شروع استخوان‌سازی طی هفته اول به صورت کال هم‌بندی در اطراف داربست شکل گرفته بود و پس از سپری شدن چهار هفته استخوان‌سازی به صورت کامل‌تری شکل گرفته و میزان ضخامت داربست‌ها کاهش یافته و به صورت جزایری یافت شد. علاوه بر این رشته‌های کلاژن متراکم در نمونه‌های بافتی به وضوح قابل مشاهده بود. در همین راستا مطالعه‌ای که توسط کاپلان (kaplan) و همکاران در سال ۲۰۰۵ صورت گرفته نشان داد که هیدروکسی آپاتیت-ژلاتین به عنوان داربستی مناسب جهت القای استخوان‌سازی شناخته شد (۱۹). همچنین در مطالعه‌ای، تأثیر ژلاتین ماتریکس استخوانی انسان در ترمیم نقایص استخوان پری‌تال در رت مورد بررسی قرار گرفت و مشاهده شد که سرعت ترمیم بافت استخوانی با ژلاتین ماتریکس استخوانی انسان بیشتر بوده است (۲۰). در مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۳ نانوکامپوزیت هیدروکسی آپاتیت-ژلاتین به همراه سلول‌های بنیادی اندومتريال منجر به شکل‌گیری قابل توجه بافت استخوانی گردید (۲۱). در سال ۲۰۱۰ کاربرد داربست هیدروکسی آپاتیت-سیلک فیبروئین به همراه سلول‌های استرومال مغز استخوان، به ترمیم کامل ضایعه استخوانی در استخوان ساعد خرگوش انجامید (۲۲). همچنین مطالعاتی دیگر جهت طراحی، سنتز و بررسی خواص نانوکامپوزیت‌هایی از قبیل هیدروکسی آپاتیت-کلاژن و هیدروکسی آپاتیت-

برای این منظور به نظر می‌رسد سلول‌های استرومایی مغز استخوان (BMSCs) گزینه مناسبی باشند (۲۴). در تحقیق حاضر ابتدا بنیادی بودن (Stemness) سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان مورد ارزیابی قرار گرفت. فنوتیپ شبه فیروبلاستی حاصل از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان طی پاساژهای متوالی حفظ گردید. علاوه بر این سلول‌های مذکور دارای ویژگی نظیر کلون‌زایی و قدرت تکثیر بالا و ونیز چسبندگی بودند که این خصوصیات در سلول‌های به کار رفته شده در این پژوهش نشانگر کاربرد جمعیت خالصی از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان است که با یافته‌های سایر محققین یکسان می‌باشد (۲۵).

یکی از ویژگی‌های داربست ایده‌آل فراهم آوردن زمینه مناسب برای تکثیر سلولی است. در مجموع نتایج ارزیابی سمیت سلولی در مطالعه کنونی حاکی از زیست سازگاری مناسب سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان بر روی داربست مورد نظر است. یافته‌های تحقیق حاضر با مطالعات قبلی صورت گرفته در این زمینه مطابقت دارد (۲۶).

به نظر می‌رسد که کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان بر روی داربست مورد نظر به صورت سه بعدی و مشابه استئوبلاست‌ها در ماتریکس استخوان در شرایط *In vivo* باشد. علاوه بر این گزارشات متعددی مبنی بر وجود سیگنال‌های موجود در ماتریکس خارج سلولی (Extracellular matrix) است که سبب بیان فاکتورهای نسخه‌برداری و ژن می‌گردند که نهایتاً بر برخی از عملکردهای حیاتی سلول نظیر زیستایی، مهاجرت، چسبندگی، رشد، تکثیر و تمایز سلولی تأثیر بسزایی می‌گذارند (۲۷ و ۲۸).

این بدان جهت است که لنفوسیت‌ها به‌عنوان سلول‌های غذا دهنده (Feeding cells) نقش مهمی در این روند دارند. ضمناً کاهش تعداد لنفوسیت‌ها در مقایسه با پلی‌مورفونوکلئرها نشان دهنده روند کاهش سرعت ترمیم از هفته اول تا هفته چهارم در گروه‌های تجربی است که نشان‌دهنده سرعت بیشتر ترمیم جایگزینی استخوان در این گروه‌ها در مقایسه با گروه کنترل است. حال آنکه در طول چهار هفته پس از ایجاد ضایعه استخوانی، بیشتر باقی ماندن تعداد لنفوسیت‌ها در مقایسه با پلی‌مورفونوکلئرها همچنان پس از چهار هفته در گروه کنترل نشان‌دهنده کندتر بودن معنی‌دار روند غذارسانی و ترمیم در گروه کنترل در مقایسه با گروه‌های تجربی که مجهز به داربست‌ها بوده‌اند، می‌باشد. از سوی دیگر، مهاجرت سلول‌های پلی‌مورفونوکلئرها به محل پیوند، نسبت به گروه کنترل، افزایش قابل توجهی نشان داد. این افزایش می‌تواند به علت پدیده دگرداسیون/ فرایند جذب (degradation) باشد که طی آن سلول‌های پلی‌مورفونوکلئرها به هضم داربست می‌پردازند. به علاوه افزایش میزان سلولاریته در محل پیوند می‌تواند اطلاعات مفیدی در زمینه تحلیل داربست و پیشرفت بازسازی بافت استخوانی در اختیار محقق بگذارد، که برای این منظور به مطالعات بیشتری در این رابطه نیاز است. نتایج تحقیق حاضر در این زمینه در توافق با نتایج به‌دست آمده توسط اعظمی در سال ۲۰۱۲ و قلی‌پور در سال ۲۰۱۴ می‌باشد (۲۵ و ۲۹).

در بررسی انجام شده توسط این گروه، در ابتدا محل شکستگی توسط لخته خون پر شد. پس از گذشت چند روز بافت هم‌بند شلی که حاوی تعداد زیادی پلی‌مورفونوکلئرها (ناشی از التهاب حاد) می‌باشد، جایگزین لخته شده و با گذشت یک هفته به تدریج کال استخوانی شکل گرفته و بافت هم‌بند متراکم دو لبه شکستگی را

سیلکون در ترمیم استخوان و استفاده به عنوان جایگزین استخوانی مورد بررسی قرار گرفت (۲۹). در مطالعه‌ای دیگر که توسط قلی‌پور و همکاران در سال ۲۰۱۴ صورت گرفت نشان داد که اسکفولدهای هیدروکسی آپاتیت-سیلک فیروئین در مقایسه با گروه شاهد، ماهیت زیستی سلول‌های بنیادی مزانشیمال مغز استخوان را تغییر نداده است. علاوه بر این میکروگراف‌های تهیه شده توسط میکروسکوپ الکترونی اسکینینگ نشان داد که سلول‌ها به سوی حفرات مهاجرت کرده و کاملاً به داربست‌ها اتصال یافته و امکان تمایز آنها به استئوبلاست‌ها وجود دارد که این حاکی از اتصال سلولی مناسب، سازگاری زیستی بالا و عدم سمیت سلولی در اسکفولدهای هیدروکسی آپاتیت-سیلک فیروئین می‌باشد (۲۶).

بخش اصلی مطالعه کنونی به بررسی مقایسه بین سلول‌های آماسی و سلولاریتی در گروه‌های مختلف پرداخته است. میزان سلول‌های التهابی مانند پلی‌مورفونوکلئرها و لنفوسیت و همچنین میزان سلولاریته در محل تماس داربست و بافت میزبان شمارش شده و مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

سلول‌های پلی‌مورفونوکلئرها و لنفوسیت به ترتیب در پاسخ به جذب داربست و حمله ایمنولوژیکی علیه پیوند شرکت می‌کنند. همانند مطالعات قبلی، ما نیز به این نتیجه رسیدیم که داربست هیدروکسی آپاتیت-ژلاتین زیست سازگاری قابل توجهی در شرایط *In vivo* از خود نشان می‌دهد (۳۰).

نتایج نشان دادند که بیشترین تعداد لنفوسیت‌ها در گروه‌های تجربی پس از یک هفته از کاشت داربست‌ها مشاهده گردید. افزایش تعداد لنفوسیت‌ها در گروه‌های تجربی در مقایسه با گروه‌های کنترل نشان‌دهنده سرعت یافتن روند ترمیم استخوانی در گروه‌های تجربی است؛

داربست‌های سازگار با سلول‌های بنیادین ترمیمی نیز متذکر می‌گردد (۳۲).

نتیجه‌گیری

در مجموع و با توجه به اینکه هیدروکسی آپاتیت ژلاتین علاوه بر غیرسمی بودن، بستر مناسبی جهت رشد، تمایز و مهاجرت سلولی فراهم می‌کند، به نظر می‌رسد که داربست هیدروکسی آپاتیت - ژلاتین تقویت شده با سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان نقش بالقوه‌ای در روند ترمیم استخوان دارد و می‌تواند به‌عنوان راهکار درمانی مناسب در ترمیم ضایعات وسیع استخوانی استفاده شود.

سپاس و قدردانی

این مقاله در راستای پایان نامه دانشجوی کارشناسی ارشد، معصومه بهروزی، به شماره ثبت ۴۴۹-۹۳ با تصویب مرکز تحقیقات ایمینولوژیک دانشگاه علوم پزشکی مازندران و با هزینه معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه مذکور در مرکز تحقیقات علوم تشریحی به انجام رسیده است. از همکاری صمیمانه کارشناسان محترم مرکز تحقیقات علوم تشریح و بافت‌شناسی (خانم‌ها حسن‌نژاد و گیل) در اجرای این تحقیق، کمال تشکر را داریم.

تضاد منافع

هیچ گونه تعارض منافع توسط نویسندگان بیان نشده است.

بهم متصل می‌نماید. پس از حدود ۱ ماه، بافت استخوانی تشکیل شده و سلول‌های استخوان‌ساز به همراه عروق خونی قابل مشاهده بودند. در نمونه‌های یک هفته‌ای افزایش در تعداد پلی‌مورفونوکلیترها و سلول‌های ماکروفاژیک Giant مشاهده شد که در تجزیه داربست‌ها نقش داشته‌اند. همانند سایر مطالعات، میزان لئوسیت در گروه‌های مختلف تفاوت قابل توجهی نداشت. همچنین در داربست‌ها علائم قابل ملاحظه‌ای از التهاب مزمن (لئوسیت، پلاسماسل، ائوزینوفیل) مشاهده نشد (۲۵).

با این حال در پژوهش حاضر، گروه‌های تجربی که در آنها داربست هیدروکسی آپاتیت با و بدون سلول‌های بنیادی مشتق از مغز قرمز استخوان بکار گرفته شده بود، سلولاریتی مشابهی را در هفته‌های اول و چهارم از خود نشان دادند. همچنین در گروه‌های تجربی حامل داربست‌ها، کاهش تعداد لئوسیت‌ها در فاصله هفته اول تا چهارم نشان‌دهنده کاهش نیاز به غذا رسانی لئوسیت‌ها به سلول‌های استخوان‌ساز در حال رشد و بافت استخوانی در حال تکامل در عین کاهش میزان التهاب مزمن ناشی از حضور لئوسیت، بود.

بسیاری از انواع سلول‌های بنیادی به دست آمده از بافت‌های مختلف بدن انسان منجمله بند ناف و پالپ دندان و مغز قرمز استخوان تمایل به تمایز به سلول‌های غضروفی و استخوانی را دارا می‌باشند (۳۱) این تحقیق همچنین اهمیت کاربرد چاپگرهای سه بعدی زیستی را در ترمیم‌های بافتی در آینده نزدیک در راستای ایجاد

References:

1. Wegman F, Poldervaart MT, van der Helm YJ, et al. Combination of bone morphogenetic protein-2 plasmid DNA with chemokine CXCL12 creates an additive effect on bone formation onset and volume. *European cells & Materials* 2015; 30: 1-11.
2. Mobini S, Solati-Hashjin M, Hesaraki S, et al. Fabrication and Characterization of Regenerated Silk/bioglass Composites for

- Bone Tissue Engineering. *Modares J Med Sci Pathobiol* 2012; 15(2): 47-60. (Persian)
3. Schmidmaier G, Capanna R, Wildemann B, et al. Bone morphogenetic proteins in critical-size bone defects: what are the options. *Injury* 2009; 40(3): S39-43.
 4. Porter JR, Ruckh TT, Popat KC. Bone tissue engineering: a review in bone biomimetics and drug delivery strategies. *Biotechnol Prog* 2009; 25(6): 1539-60.
 5. Salgado AJ, Coutinho OP, Reis RL. Bone tissue engineering: state of the art and future trends. *Macromol Biosci* 2004; 4(8): 743-65.
 6. Damien CJ, Parsons JR. Bone graft and bone graft substitutes: a review of current technology and applications. *J Appl Biomater* 1991; 2(3): 187-208.
 7. Hollinger JO, Einhorn TA, Doll B, et al. Bone tissue engineering. Boca Raton, Florida: CRC Press, 2004, 277-301.
 8. Runyan CM, Taylor JA. Clinical applications of stem cells in craniofacial surgery. *Facial Plast Surg* 2010; 26(5): 385-95.
 9. Yunoki S, Ikoma T, Monkawa A, et al. Control of pore structure and mechanical property in hydroxyapatite/collagen composite using unidirectional ice growth. *Materials letters* 2006; 60(8): 999-1002.
 10. Mozafari M, Gholipourmalekabadi M, Chauhan NP, et al. Synthesis and characterization of nanocrystalline forsterite coated poly (l-lactide-co-β-malic acid) scaffolds for bone tissue engineering applications. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2015; 50: 117-23.
 11. Liao SS, Cui FZ, Zhu Y. Osteoblasts adherence and migration through three-dimensional porous mineralized collagen based composite: nHAC/PLA. *J Bioactive Compatible Polymers* 2004; 19(2): 117-30.
 12. Zhang SM, Cui FZ, Liao SS, et al. Synthesis and biocompatibility of porous nano-hydroxyapatite/collagen/alginate composite. *J Mater Sci Mater Med* 2003; 14(7): 641-5.
 13. Diba M, Kharaziha M, Fathi MH, et al. Preparation and characterization of polycaprolactone/forsterite nanocomposite porous scaffolds designed for bone tissue regeneration. *Comp Sci Technol* 2012; 72(6): 716-23.
 14. Kim HW, Kim HE, Salih V. Stimulation of osteoblast responses to biomimetic nanocomposites of gelatin-hydroxyapatite for tissue engineering scaffolds. *Biomaterials* 2005; 26(25): 5221-30.
 15. Wang J, Glimcher MJ. Temporal and Spatial Independence of Bone and Cartilage Induction by Demineralized Bone Powder in Cranial Defects and Subcutaneous Tissues of Rats. *Connect Tissue Res* 1996; 34: 116-70.
 16. Ai J, Heidari-Keshel S, Azami M, et al. Repair of critical size rat calvarial defects using endometrial-derived stem cells embedded within gelatin/apatite nanocomposite scaffold. *Stem Cell Disc* 2013; 3(1): 36-43.
 17. Joe AW, Gregory-Evans K. Mesenchymal stem cells and potential applications in treating ocular disease. *Curr Eye Res* 2010; 35(11): 941-52.
 18. Bancroft JD, Stevens A. "Theory and Practice Histological Techniques". Scotland: Churchill Livingstone Publication Company, 1990, 133-5.
 19. Karageorgiou V, Kaplan D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials* 2005; 26(27): 5474-91.
 20. Takaoka K, Nakahara H, Yoshikawa H, et al. Ectopic bone induction on and in porous hydroxyapatite combined with collagen and bone morphogenetic protein. *Clin Orthopaedics Related Res* 1988; 234: 250-4.
 21. Scott CK, Hightower JA. The matrix of endochondral bone differs from the matrix of intramembranous bone. *Calcif Tissue Int* 1991; 49(5): 349-54.
 22. Yamashita K, Takagi T. Ultrastructural observation of calcification preceding new bone formation induced by demineralized bone matrix gelatin. *Acta Anat (Basel)* 1992; 143(4): 261-7.
 23. Moghadam HG, Sándor GK, Holmes HH, et al. Histomorphometric evaluation of bone regeneration using allogeneic and alloplastic bone substitutes. *J Oral maxillofac Surg* 2004; 62(2): 202-13.

24. Kale AA, Di Cesare PE. Osteoinductive agents. Basic science and clinical applications. Am J Orthop (Belle Mead NJ) 1995; 24(10): 752-61.
25. Baghbani F, Moztarzadeh F, Nazari AG, et al. Biological response of biphasic hydroxyapatite/tricalcium phosphate scaffolds intended for low load-bearing orthopaedic applications. Adv Comp Lett 2012; 21(1): 16-24.
26. Gholipourmalekabadi M, Mozafari M, Gholipourmalekabadi M, et al. In vitro and in vivo evaluations of three-dimensional hydroxyapatite/silk fibroin nanocomposite scaffolds. Biotechnol Appl Biochem 2015; 62(4): 441-50.
27. Kagami H, Agata H, Tojo A. Bone marrow stromal cells (bone marrow-derived multipotent mesenchymal stromal cells) for bone tissue engineering: basic science to clinical translation. Int J of Bioch Cell Biol 2011; 43(3): 286-9.
28. Baksh D, Song L, Tuan RS. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. J Cell Mol Med 2004; 8(3): 301-16.
29. Aminian A, Solati-Hashjin M, Samadikuchaksaraei A, et al. Synthesis of silicon-substituted hydroxyapatite by a hydrothermal method with two different phosphorous sources. Ceram Int 2011; 37(4): 1219-29.
30. Azami M, Tavakol Sh, Samadikuchaksaraei A, et al. A porous hydroxyapatite/gelatin nanocomposite scaffold for bone tissue repair: in vitro and in vivo evaluation. J Biomater Sci Polym Edition 2012; 23(18): 2353-68.
31. Zare M, Baghaban Eslaminejad MR, Hosseini A. Study of mesenchymal stem cells derived from human umbilical cord vein wall and determining the Process of differentiation to cartilage and bone. Iran South Med J 2015; 17(6): 1135-42. (Persian)
32. Nabipour I. The future of 3D printing technology in biomedicine. Iran South Med J 2015; 18 (3): 680-8. (Persian)

Original Article

Using Hydroxyapatite-Gelatin Scaffold Seeded With Bone Marrow Stromal Cells as a Bone Graft in Animal Model

M. Behruzi¹, H. Ghasemi Hamidabadi¹, M. Gholipour Malekabadi²,
N. Rezaei¹, M. Nazm Bojnordi¹, M. Malekzadeh Shafaroudi^{1*}

¹ Immunogenetic Research Center (IRC), Department of Anatomy & Cell Biology, School of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

² Biotechnology Department, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

(Received 31 Aug, 2015

Accepted 23 Nov, 2015)

Abstract

Background: Nowadays, composite scaffolds with some desired characteristics have a numerous applications in hard tissue engineering. In present study, the role of composite hydroxyapatite - gelatin was examined in both alone and coated by Bone Marrow Stromal Stem Cells (BMSCs) conditions in the process of healing bone defects, reduction of time repair and the immune response of body by laboratory studies (in vitro) and in vivo on the skull of adult rats as well.

Materials and Methods: In present study, nano-hydroxyapatite powder and gelatin were used to provide nano-hydroxyapatite-gelatin scaffold, BMSCs were isolated by Flushing method. Fifteen adult male Wistar rats weighing 250-200 g were used. Studing groups included bone defect with hydroxyapatite-gelatin scaffold, bone defect with hydroxyapatite-gelatin with BMSCs and bone defects without scaffolding as a control which were examined after a week and a month after surgery. MTT assay was used in order to evaluation of biocompatibility of scaffolds. To confirm the healing progress trend and the presence of inflammatory cells we used hematoxylin-eosin and we used Masson's trichrome staining in order to study of synthesis of collagen fibers.

Results: The results of MTT showed that the scaffold has no toxic effects on stromal cells. The first signs of ossification in hydroxyapatite-gelatin with BMSCs cells group, appeared in the first week. However, in the fourth week, ossification was completed and the scaffold remaining was found as embedded islands in the spongy bone tissue. The greatest number of lymphocytes was observed in the experimental group after one week of planting scaffold.

Conclusion: it seems that Hydroxyapatite-gelatin scaffold coated with BMSCs cells has a potential role in the healing process of bone and it can be suitable as a therapeutic strategy to repair extensive bone lesions.

Key words: Transplantation, Scaffold, Rat, Bone marrow mesenchymal stem cell, Tissue engineering.

©Iran South Med J. All rights reserved.

Cite this article as: Behruzi M, Ghasemi Hamidabadi H, Gholipour Malekabadi M, Rezaei N, Nazm Bojnordi M, and Malekzadeh Shafaroudi M. Using Hydroxyapatite-Gelatin Scaffold Seeded with Bone Marrow Stromal Cells as a Bone Graft in Animal Model. Iran South Med J 2016; 19(5): 773-786.

Copyright © 2016 Behruzi, et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-noncommercial 4.0 International License which permits copy and redistribute the material just in noncommercial usages, provided the original work is properly cited.

*Address for correspondence: Department of Anatomy & Cell Biology, Immunogenetic Research Center (IRC), School of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran. E.mail: malek1344@gmail.com

Website: <http://bpums.ac.ir>
Journal Address: <http://ismj.bpums.ac.ir>