

شیوه‌های نوین ترمیم ضایعات ارتوپدی با رویکرد سلول‌های بنیادی در مهندسی بافت استخوان

مصطفی شاهرضایی^۱، محمدحسین لشگری^۲، بنفشه درمیش^۳، مسعود حافظی^۴، *محمدعلی صاحب‌الزمانی^۵

تاریخ اعلام قبولی مقاله: ۹۱/۱۱/۲۵

تاریخ اعلام وصول: ۹۱/۸/۹

چکیده

سابقه و هدف: در دنیای مدرن و ماشینی امروزی، انسان در معرض طیف وسیعی از بیماری‌ها و آسیب‌های بافت استخوانی قرار دارد. اغلب این آسیب‌ها با روش‌های رایج پزشکی قابل درمان هستند ولی برخی از آنها غیرقابل درمان و یا ناعلاج تلقی می‌شوند. اینها اغلب ضایعاتی هستند که در آنها بخش وسیعی از بافت استخوان از بین رفته و مکانیسم‌های طبیعی بدن قادر به بازسازی بافت صدمه دیده نیست. درمان چنین آسیب‌هایی به عهده شاخه‌ای از علوم پزشکی موسوم به طب ترمیمی است. یکی از ابزارهای طب ترمیمی پیوند سازه‌های شبه استخوانی ساخته شده به روش مهندسی بافت است.

مواد و روش‌ها: مهندسی بافت استخوان از سه جز اصلی سلول، داربست و فاکتور رشد بهره می‌گیرد. به کارگیری سلول بنیادی مزانشیمی به عنوان عامل سلولی در طراحی داربست مهندسی، فرآیند ساخت سازه استخوانی را به مقدار زیادی تسهیل و حوزة مهندسی بافت استخوان را متحول کرده است. این تأثیرات سلول بنیادی مزانشیمی مرهون توان خودنوازی، پتانسیل بالای تمایز به استخوان و عدم تحریک سیستم ایمنی است. کشت سلول‌های استخوان زا روی داربست متخلخل می‌تواند یک راه حل جدید برای پیوند استخوان با استفاده از سلول‌های مزانشیمی خود شخص باشد.

بحث و نتیجه‌گیری: تحقیقات درون تنی و نتایج بالینی حاصله نیز نشان داد که درمان ضایعات با این استراتژی کاملاً قابل اعتماد است. دانشمندان بر این تلاش‌اند تا با توسعه این استراتژی و انجام ابتکارهای جدید همچون استفاده از نانو ذرات یا داربست‌های نانو ساختار به روش‌های درمانی نوینی برای درمان انواع صدمات و ضایعات بافت اسکلتی بدن در آینده‌ای نزدیک دست پیدا کنند.

کلمات کلیدی: مهندسی بافت استخوان، سلول‌های بنیادی، داربست، ضایعات ارتوپدی

مقدمه

دلایل متعدد از قبیل جوش خوردن نابجای استخوان، از بین رفتن کامل استخوان در اثر تومور و عفونت محل ضایعه بطور خودبه‌خودی التیام نمی‌یابند. در چنین مواردی از روش‌های مختلفی از قبیل پیوند استخوان و یا ایمپلنت‌های فلزی جهت ترمیم کامل استخوان استفاده می‌شود. طبق آمار ارایه شده بیماری‌های استخوانی در اروپا بیش از ۳۹ میلیون نفر و در آمریکا بیش از ۲۰ میلیون نفر را مبتلا کرده است

با توجه به اعمال مهم بافت استخوانی در بدن، هر گونه تغییر اساسی در ساختار آن که ممکن است به دنبال زخم، ضایعه و یا بیماری ایجاد شود تعادل بدن و طبیعت زندگی فرد را تحت تأثیر قرار میدهد. خوشبختانه، اکثریت آسیب‌های استخوانی ایجاد شده در بدن به‌طور خودبخودی و با حداقل درمان بهبود می‌یابند ولی برخی دیگر به

۱- استادیار، تهران، دانشگاه علوم پزشکی آجا، دانشکده پزشکی، گروه ارتوپدی

۲- استادیار، تهران، دانشگاه علوم پزشکی آجا، دانشکده پزشکی، گروه جراحی

۳- استادیار، تهران، دانشگاه علوم پزشکی آجا، دانشکده پزشکی، گروه کودکان

۴- استادیار، البرز، پژوهشکده فناوری نانو و مواد پیشرفته پژوهشگاه مواد و انرژی

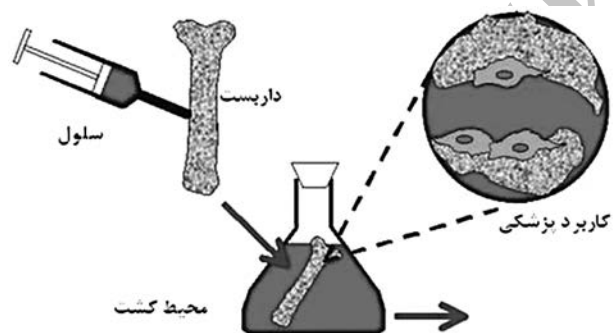
۵- پژوهشگر، تهران، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، دانشکده مهندسی پزشکی و عضو بنیاد نخبگان نیروهای مسلح (**نویسنده مسئول)

آدرس الکترونیک: m.sahebalzamani@srbiau.ac.ir

اندام‌های آسیب دیده و جایگزین قسمت‌های از دست رفته به علت عوامل مختلف است. در بین بافت‌های بدن، استخوان پتانسیل بالایی برای تولید مجدد دارد و از این رو یک نمونه مناسب برای مهندسی بافت به شمار می‌رود. اولین قدم در مهندسی بافت استخوان بررسی ساختار و عملکرد سلول‌های استخوان‌زا است. استخوان از یک قالب یا ماتریس آلی محکم تشکیل شده که به وسیلهٔ رسوب املاح کلسیم تقویت می‌شود. کشت سلول‌های استخوان‌زا روی داربست متخلخل می‌تواند یک راه حل جدید برای پیوند استخوان با استفاده از سلول‌های مزانشیمی خود شخص باشد (۳).

بافت‌ها و ارگان‌ها از سلول‌های زنده مخصوص تشکیل شده‌اند که در داخل چارچوب پیچیده ساختمانی تحت عنوان ماتریس خارج سلولی (ECM: extracellular matrix) شناخته می‌شوند. داربست‌ها جایگزین‌های مصنوعی برای ECM هستند که وظایف بیولوژیک ECM و استحکام مکانیکی لازم را تامین می‌کنند.

روش‌های مهندسی بافت به دو گروه کلی داربست‌های بدون سلول و داربست‌های با سلول تقسیم می‌شوند. داربست‌های بدون سلول داربست‌هایی هستند که به تنهایی و با تکیه بر توانایی طبیعی ترمیم

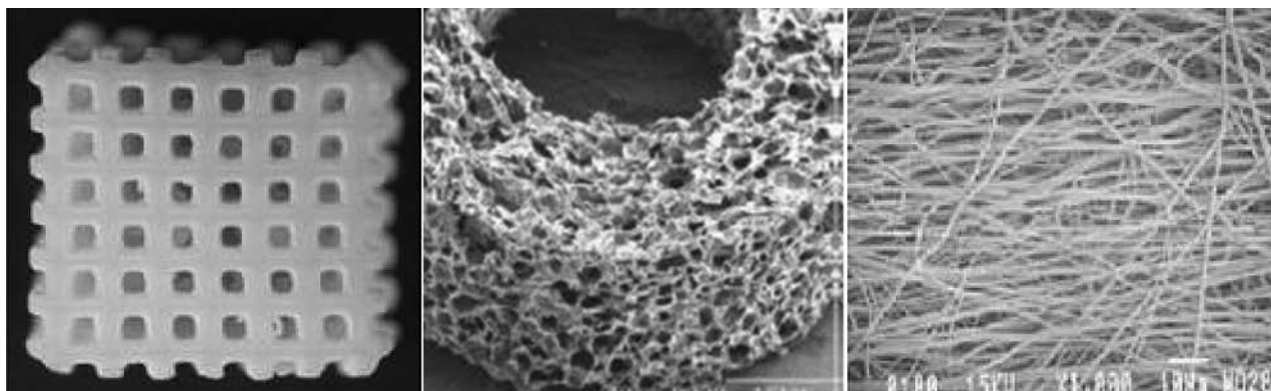


شکل ۲- شماتیک نحوه تزریق و کشت سلول در داربست

و پیش‌بینی می‌شود تا سال ۲۰۲۰ این تعداد دو برابر شود. فقط در آلمان هزینه‌هایی که به‌طور مستقیم یا غیرمستقیم مربوط به درمان ضایعات استخوانی می‌شود سالانه بالغ بر ۸ میلیارد یورو گزارش شده است (۱). با وجودی که اتوگرافت استاندارد طلایی پیوند استخوان محسوب می‌شود محدود بودن منابع آن، استفاده از این روش را بویژه در ضایعات وسیع استخوانی غیر عملی کرده است به علاوه روش‌های برداشتن استخوان از فرد بیمار با خطر آلودگی همراه است و از طرفی استفاده از ایمپلنت‌های فلزی در ترمیم ضایعات استخوانی، با احتمال رها شدن یون‌های مضر و تجمع آنها در اعضای مختلف بدن و در نتیجه افزایش احتمال سرطان همراه است. به همین دلیل محققین تلاش‌های خود را به سمت یافتن موادی جدید سوق داده‌اند تا از بروز این مشکلات جلوگیری به عمل آورند که در این راستا، بیومتریال‌های زیست تخریب پذیر توسعه یافته است و بحث مهندسی بافت مطرح شده است. مهندسی بافت و سلول درمانی یک حوزه از فناوری پزشکی بین رشته‌ای می‌باشد که می‌تواند انقلابی در علوم پزشکی ایجاد نماید. مهندسی بافت با فراهم آوردن امکان رشد مجدد بافت به شکل طبیعی یا بازسازی و ترمیم آن امید جدیدی را تداعی می‌کند و امکانات تازه‌ای را برای درمان در دسترس بشر قرار می‌دهد. بر اساس تعریف برای ساخت یک بافت به شیوه‌های مهندسی نیاز به طراحی یک داربست با ساختار فیزیکی مناسب با امکان چسبندگی سلول‌ها به آن، تکثیر و تمایز سلولی و در نهایت رشد و جایگزینی بافت جدید است (۲).

مهندسی بافت استخوان

مهندسی بافت علم طراحی و تولید بافت‌های جدید برای ترمیم



شکل ۱- شمای انواع داربست‌های مهندسی بافت

میکرون و برای بازسازی استخوان حدود ۳۰ تا ۳۵۰ میکرون برآورد شده است. در شکل ۳ در مرحله اول مبنای مهندسی بافت را مشاهده می‌کنیم که از داربست، سلول و فاکتورهای رشد تشکیل شده است. مرحله دوم شامل فراهم کردن محیط کشت مناسب برای فعالیت بهتر سلول‌ها در داربست می‌باشد و مرحله سوم قرار دهی داربست در ناحیه آسیب دیده می‌باشد که منجر به ترمیم بافت آسیب دیده می‌شود (۵).

به‌طور خلاصه درجه موفقیت روش مهندسی بافت به‌طور زیادی به خواص داربست بستگی دارد. احتیاجات طراحی داربست شامل تخریب پذیری، قابلیت هدایت رشد سلول‌ها و خواص مکانیکی مطلوب می‌باشد.

مواد

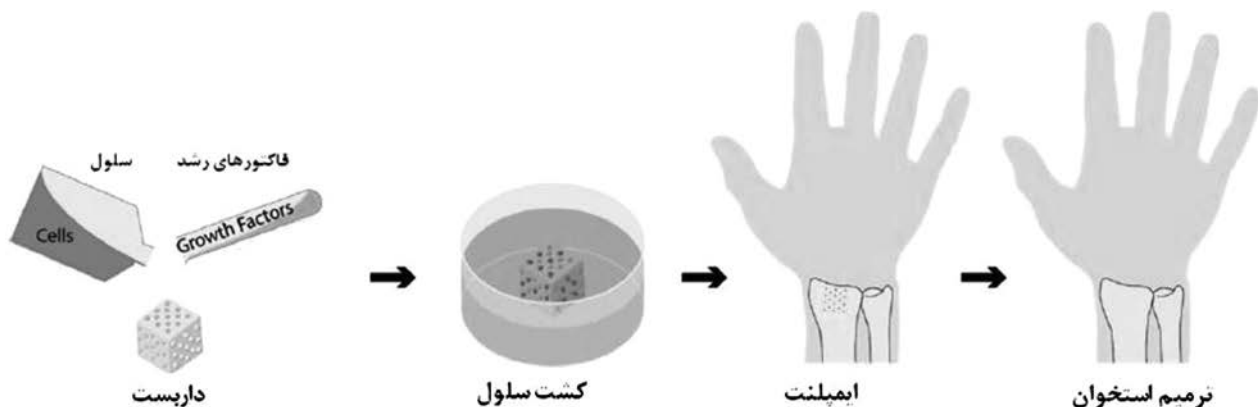
ویژگی‌های که در تمام داربست‌های ساخته شده به روش‌های مختلف وجود دارد بطور خلاصه شامل زیست سازگاری، زیست تخریب پذیری، خواص مکانیکی مناسب برای قرارگیری در محیط درون تنی (In vivo)، خواص مطلوب جهت هدایت و انتقال هرچه بهتر سلول‌ها و خصوصیات مناسب سطحی می‌باشد از آنجا که استخوان یک کامپوزیت طبیعی است، بدیهی است برای تقلید ساختار استخوان، باید داربست متخلخل کامپوزیتی تولید شود. سرامیک‌های زیست فعال و پلیمرهای مختلفی در ساخت داربست‌های مهندسی بافت استخوان به کار می‌روند.

در سال‌های اخیر استفاده وسیعی از بیوسرامیک‌های کلسیم فسفاتی، از قبیل هیدروکسی آپاتیت و تری کلسیم فسفات در کاربردهای

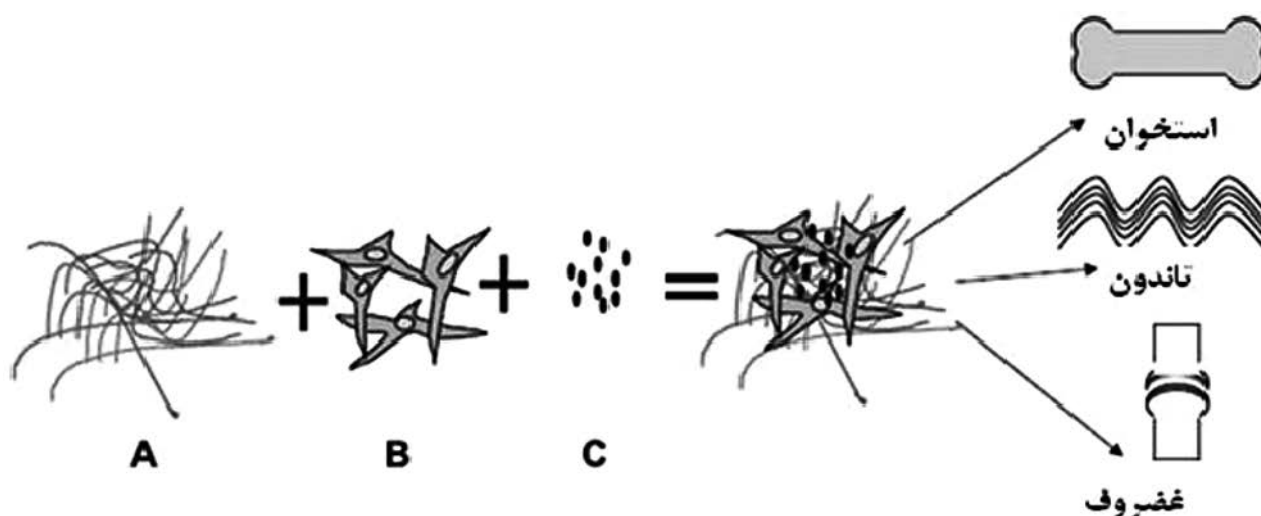
بدن برای جهت دهی رشد بافت جدید به کار می‌روند. این داربست به آهستگی در محل کاشت تخریب می‌شوند و پروتئین‌های ECM جایگزین آن می‌شوند. در داربست‌های با سلول، سلول‌های مورد استفاده در مهندسی بافت را از قسمت کوچکی از بافت دهنده تهیه می‌کنند. این سلول‌ها یا مستقیماً در بدن میزبان قرار می‌دهند یا کشت داده و در یک داربست حمایت کننده گذاشته و سپس در بدن میزبان کاشته می‌شود (۴).

پارامترهای مهم در طراحی داربست‌ها

برای رشد سریع سلول، داربست باید دارای میکرو ساختار بهینه باشد هدف اصلی در ساخت داربست، کنترل دقیق اندازه تخلخل و نحوه ایجاد چسبندگی مناسب سلول به سطح داربست است. از داربست‌های تخریب پذیر و متخلخل به همراه سلول‌های القاء کننده (مثل استئوبلاست کشت شده با سلول‌های مغز استخوان) و عامل رشد و سپس کشت داربست برای رشد مستقیم بافت سالم و جدید استفاده می‌شود. خواص تخریب‌پذیری یک داربست تحت تاثیر رشد سلول، ترمیم بافت و پاسخ میزبان قرار دارد که چنین خواصی مهم‌ترین عوامل در برتری طولانی مدت پلیمرهای مهندسی بافت هستند. در حالت ذره‌ای سایز خلل و فرج و شکل آنها و البته نوع حامل تحت تاثیر قرار می‌گیرند. حداقل قطر تخلخل‌ها برای نفوذ عروق و سلول‌ها حدود ۱۰ تا ۱۲ میکرون است. ریز تخلخل‌های با سایز ۳۰ میکرون برای رشد عروق و رشد سلول‌ها به خوبی عمل می‌کنند. همچنین سایز تخلخل‌های بهینه برای رشد فیبروبلاست‌ها ۴۵ میکرون، برای بازسازی پوست یک پستاندار بالغ ۲۰ تا ۱۲۵



شکل ۳- شماتیک داربست ساخته شده، سلول کشت داده شده، در بدن ایمپلنت شده و ترمیم ضایعه استخوانی



شکل ۴- داربست ساخته شده با توجه به سلول تمایز یافته و فاکتور رشد به بافت مورد نظر تبدیل می‌شود. A یک بیوماده سازگار با بافت مورد نظر است- B سلول‌های بنیادی تمایز یافته به بافت مورد نظر است- C شامل فاکتورهای رشد می‌باشد.

روش‌های متعددی برای طراحی و ساخت داربست‌های مطلوب و مناسب به کار گرفته می‌شود. بدیهی است انتخاب روش مناسب شکل دهی داربست به شدت به ریز ساختار بافت طبیعی مورد نظر بستگی دارد و لازم است تا در طراحی و ساخت داربست مقیاس‌های مختلف اعم از میکرومتر تا نانومتر در نظر گرفته شود. لذا اهمیت طراحی و ساخت داربست متخلخل زیست تخریب پذیر بسیار دشوار و پراهمیت است و در حقیقت تعیین کننده موفقیت نهایی استراتژی مهندسی بافت است. طی سال‌های گذشته روشها و فرآیندهای مختلفی، شامل: ریخته‌گری حلال، جدا شدن فازی، تکنیک‌های مبتنی بر اتصال الیاف، تکنیک‌های مبتنی بر مذاب، تکنیک‌های مبتنی بر فشار بالا، خشک کردن انجمادی و تکنیک‌های مبتنی بر نمونه سازی سریع برای داربست‌های متخلخل در مهندسی بافت استخوان ارائه شده است. ویژگی‌های که در تمام داربست‌های ساخته شده به روش‌های مختلف وجود دارد بطور خلاصه شامل زیست سازگاری، زیست تخریب پذیری، خواص مکانیکی مناسب برای قرارگیری در محیط درون تنی خواص مطلوب جهت هدایت و انتقال هرچه بهتر سلول‌ها و خصوصیات مناسب سطحی می‌باشد. با توجه به کاربرد یک داربست در مهندسی بافت که در بافت سخت است یا بافت نرم است و همچنین خواص ماده پلیمری مورد نظر روش ساخت مناسب تعیین می‌شود (۸).

سلول‌های بنیادی مزانشیمی

سلول‌های بنیادی سلول‌هایی هستند که دارای دو خاصیت مهمند

بازسازی و ترمیم استخوان، صورت گرفته است. این بیوسرامیک‌های کلسیم فسفاتی دارای شباهت شیمیایی و ساختاری با فاز معدنی استخوان هستند و موجب تسریع رشد سلول‌های استخوانی می‌شوند. از بیوسرامیک‌های زیست فعال، در ارتوپدی برای ترمیم نقایص استخوان و پوشش سطوح ایمپلنت‌های فلزی، جهت بهبود یکپارچگی ایمپلنت، استفاده می‌شود.

سرامیک‌های زیست فعال ترکیب شیمیایی مشابه استخوان دارند لیکن ذاتاً ترد و شکننده هستند؛ به علاوه آهنگ تخریب کم سرامیکها، کاربرد کلینیکی آنها را محدود می‌سازد. از طرف دیگر، خواص مکانیکی و آهنگ تخریب بیوپلیمرها را می‌توان برای کاربردهای مختلف اصلاح کرد. به همین دلیل، به منظور غلبه بر تردی سرامیکها از کامپوزیت آن با پلیمرها استفاده میشود. انواع پلیمرهای بیولوژیکی کلاژن و ژلاتین یا پلیمرهای سنتزی نظیر پلیمرهای متداول دارای کاربرد بیولوژی، پلی گلیکولیک اسید و لاکتیک اسید یا پلیمرهای سنتزی بیومواد جدید مثل پلی ارتو استر و پلی انیدرید و پلی اتر استر امید در ساخت داربستهای پلیمری استفاده می‌شوند. از طرف دیگر، مواد کامپوزیت سرامیک- پلیمر دارای مزیت ترکیب خاصیت زیست فعالی سرامیکها با توانایی کنترل آهنگ تخریب داربست پلیمری و بهبود خواص مکانیکی هستند (۶، ۷).

روش‌ها

باتوجه به نقش بسیار مهم داربست در فناوری مهندسی بافت، امروزه

بنیادی مزانشیمی به دلیل دارا بودن خاصیت خود تجدیدی و توان تمایز به بافت‌های اسکلتی منبع مناسبی برای برخی استراتژی‌های سلول درمانی و ژن درمانی محسوب می‌شوند. با وجود اهمیت سلول‌های مزانشیمی در سلول درمانی هنوز شرایط لازم برای استفاده بالینی فراهم نشده است. مانع عمده در این زمینه به شرایط تکثیر آزمایشگاه بر می‌گردد. تعداد کم سلول‌های بنیادی مزانشیمی در نمونه‌های گرفته شده و نیاز سلول درمانی به تعداد زیاد سلول، کشت و تکثیر سلول مزانشیمی را در محیط آزمایشگاه را اجتناب ناپذیر کرده است. همچنین تحقیقات اخیر انعطاف و شکل پذیری این سلول‌ها را در تمایز به سلول‌های استخوانی، عصبی، پوششی پوست، ریه، کبد، کلیه و طحال به اثبات رسانده است (۱۰).

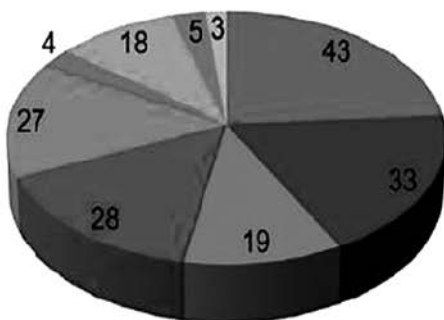
تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی

یک سوال کلیدی در ارتباط با تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی این است که چه زمانی سلول تصمیم به توقف تکثیر و ورود به مرحله تمایز می‌کند. در حقیقت خروج سلول‌های بنیادی از مرحله تکثیر و متعهد شدن سلول زمانی اتفاق می‌افتد که سلول‌های پیش ساز به صورت قرینه تقسیم شوند و سلول‌های تک ظرفیتی بسازند. در واقع سلول‌های متعهد شامل سلول‌هایی با توان تمایز به یک

که آنها را از سایر سلول‌ها متمایز می‌کند. اول اینکه این سلول‌ها، سلول‌های غیر اختصاصی هستند که قادرند خود را برای مدت زمان طولانی نو سازی کنند. و دوم اینکه تحت شرایط آزمایشگاهی و فیزیولوژیکی به خصوصی می‌توان آنها را تبدیل به سلول‌های خاصی نظیر سلول‌های ضربان ساز قلب و یا سلول‌های انسولین ساز پانکراس نمود. اصولاً دانشمندان بر روی دو نوع سلول بنیادی کار می‌کنند سلول‌های بنیادی جنینی و سلول‌های بنیادی بالغ (۹). سلول‌های بنیادی افراد بالغ (Adult stem cell) را می‌توان از ارگان‌ها و بافت‌های زیادی از بدن جدا کرد اما نکته مهم در این است که تعداد بسیار محدودی از این سلول‌ها در هر بافت وجود دارد. یکی از سلول‌های بنیادی بالغ، سلول‌های بنیادی مزانشیمی هستند این سلول‌ها می‌توانند به محل‌های آسیب، التهاب و تومورها مهاجرت کنند از این رو گزینه مناسبی برای کاربردهای بازسازی بافت‌ها می‌باشد. سلول‌های بنیادی مزانشیمی نوعی سلول غیر خونساز ساکن در مغز استخوان و سایر بافت‌های اسکلتی توصیف می‌شود. سلول‌های بنیادی مزانشیمی به دلیل در دسترس بودن و سهولت کشت آنها در برون تنی (In vitro) جز امید بخش‌ترین سلول‌های بنیادی به شمار می‌روند. منابع سلول‌های بنیادی مزانشیمی شامل مغز استخوان، عضله، بافت چربی، غضروف و پالپ دندان می‌باشند. سلول‌های

آزمایشات بالینی ثبت شده

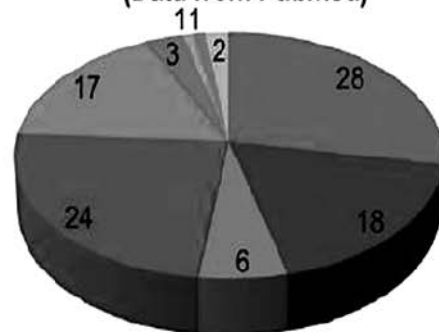
(Data from clinicaltrials.gov)



- بیماری‌های ارتوبدی
- بیماری‌های دستگاه ایمنی
- بیماری‌های دستگاه عصبی
- بیماری‌های کبدی
- بیماری‌های دیگر
- پیوند بافت
- بیماری‌های قلبی عروقی
- ترمیم سوختگی‌ها و زخم‌ها
- بیماری‌های ریه

مقالات بالینی چاپ شده

(Data from Pubmed)



- بیماری‌های ارتوبدی
- بیماری‌های دستگاه ایمنی
- بیماری‌های دستگاه عصبی
- بیماری‌های کبدی
- بیماری‌های دیگر
- پیوند بافت
- بیماری‌های قلبی عروقی
- ترمیم سوختگی‌ها و زخم‌ها
- بیماری‌های ریه

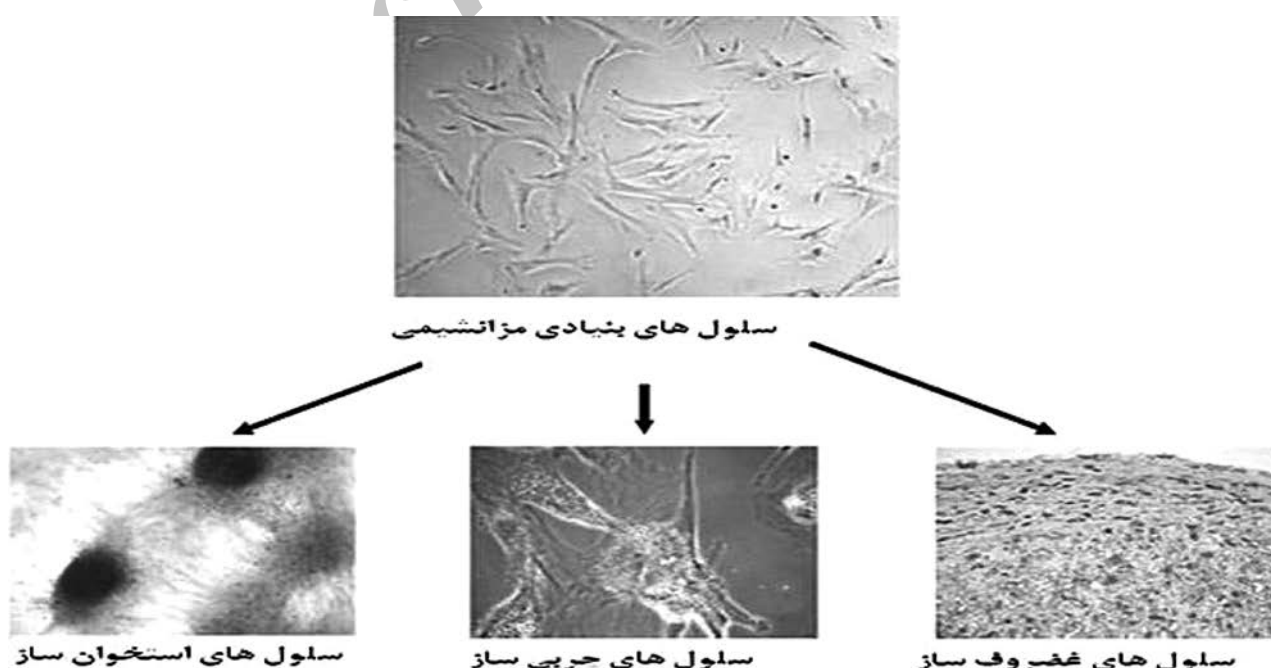
شکل ۵- نمودار استفاده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی برای درمان بیماری‌ها که در فاز آزمایشات بالینی انجام شده و مقالات بالینی چاپ شده در این زمینه را از سال ۲۰۰۴ تا ۲۰۱۲ نشان می‌دهد (۱۱).

در محل آسیب دیدگی قرار می‌گیرد. داربست به عنوان تکیه گاه موقتی سلول است و می‌بایست طوری ساخته شود که پس از مدتی تجزیه واز بین برود و سلول‌های بنیادی مزانشیمی ماتریکس خود را روی داربست ترشح کنند تا استخوان جدید تشکیل شود (۱۳، ۱۲).

تحقیقات بالینی

محققان نام Quarto و همکارانش اولین کسانی بودند که در سال ۲۰۰۱ با استفاده از مهندسی بافت مبتنی بر سلول بنیادی مزانشیمی اقدام به بازسازی بافت استخوان کردند. بیماران مورد مطالعه دارای ضایعات وسیع با وسعت ضایعه ۷-۴ سانتیمتر در استخوانهای درشت‌نی (Tibia)، زند زیرین (Ulna) و استخوان بازو بودند. این محققین سرامیک‌های هیدروکسی آپاتیت را به شکل و اندازه محل ضایعه تهیه کردند و سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان را به داخل تخلخل‌های آن وارد کردند. در این مطالعه ۳ بیمار ۴۱-۱۶ ساله انتخاب شدند و داربست‌های با سلول در محل‌های ضایعه قرار گرفت. بر اساس نتایج گزارش شده در هیچ‌کدام از بیماران مورد مطالعه عارضه‌ای مشاهده نشد. ۷-۵ ماه بعد، بین ایمپلنت و بافت‌های اطراف پیوند برقرار شد و بیماران ۱۲-۶ ماه بعد عملکرد طبیعی اندام را باز یافتند. عکس‌های رادیوگرافی A, B, C مربوط به یک زن ۴۱ ساله که با از دست دادن یک بخش ۴ سانتی متر از

رده سلولی است. تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به استخوان فرآیند پیچیده‌ای است که به عوامل محیطی و فاکتورهای رشد متعدد نیازمند است. اغلب به منظور تمایز استخوان، از کشت تک لایه استفاده می‌شود. برای این منظور ابتدا سلول مزانشیمی در ظروف پلاستیکی کشت داده تا زمانی که تمام سطح کشت از یک لایه سلول پوشیده شود. آنگاه محیط تکثیر خارج می‌شود و محیط تمایز به استخوان اضافه می‌شود این محیط معمولاً دارای ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر اسکوربیک اسید، ۱۰ نانومولار دگزامتازون و ۱۰ میلی مولار بتا گلیسرول فسفات است. کشت تمایز در انکوباتور ۳۷ درجه قرار داده می‌شود و اغلب به مدت ۲۱ روز نگهداری می‌شود و طی این مدت محیط کشت آن ۲ بار در هفته تعویض می‌شود. در بین مواد تشکیل دهنده محیط استیوژنیک، دگزامتازون جز اصلی است. به طوری که اگر دگزامتازون از محیط کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسانی حذف شود، تمایز اتفاق نمی‌افتد. بنابراین حضور مداوم دگزامتازون برای تمایز استخوانی ضروری است. برای استفاده از این سلول‌ها دو استراتژی وجود دارد. اولین استراتژی پیوند سلول به صورت تمایز نیافته است که در این حالت فرض بر این است که سلول در محل ضایعه استخوانی و محیط آن به استئوبلاست متمایز می‌شود و دوم اینکه سلول به صورت تمایز یافته بر روی داربست سوار می‌شود و سازه حاصل



شکل ۶- تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سلول‌های استخوان ساز، چربی و غضروف ساز

محل نقص استخوانی را تعیین کرد و بر اساس آن داربستی تو خالی از جنس تیتانیوم ساخت. این داربست تیتانیومی از سرامیک‌های هیدروکسی آپاتیت حاوی BMP-۷ (Bone morphogenetic proteins) و سلول‌های بنیادی مزانشیمی پر شد. مجموعه حاصل در عضله لایسموس بیمار پیوند زده شد تا داخل آن استخوان سازی اکتوپیک تشکیل شود و عروق خونی از اطراف به داخل آن نفوذ کند. ۷ هفته بعد سازه به همراه پایه عروقی از عضله به فک بیمار انتقال داده شد و نهایتاً در طی ۴ هفته پس از پیوند، بیمار قادر به جویدن شد و تا هفته ششم، بیمار مرتب از بهبود وضعیت خود خبر می‌داد. باید خاطر نشان داد کرد که از خاصیت استوژنیک سلول‌های بنیادی مزانشیمی در حوزه جراحی ماگزیلو فاشیال نیز بهره داری می‌شود (۱۵).

یکی از مشکلاتی که جراحان ارتوپدی همواره با آن روبرو هستند، شکستگی نا متعارف یا خوردشدگی (Nonunion model) استخوان است از این رو در مطالعه Nakamura و همکاران بر آن بر آمدند که با ساخت صفحه سلولی با استفاده از سلول‌های مزانشیمی ترمیم یکپارچه استخوان را ایجاد کنند. برای این منظور ابتدا یک شکستگی غیر متعارف در فمور موش ایجاد کردند سپس صفحه سلولی ساخته شده با استفاده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی را به صورت گرافت صفحه سلولی در محل شکستگی پیوند زدند. تصویربرداری اشعه ایکس و آنالیز بافت شناسی ۲، ۴، ۸ هفته بعد

دیافیز استخوان درشت نی سمت راست دچار آسیب شده بود که با قرارگیری این داربست سرامیکی حاوی سلول‌های بنیادی مزانشیمی ترمیم شده است. عکس‌های رادیوگرافی D,E,F مربوط به یک دختر ۱۶ ساله است که با از دست دادن ۵ سانتی متر از بخش دیافیز استخوان زندزیرین خود دچار صدمه شده بود که با گذاشتن داربست مذکور ناحیه صدمه دیده ترمیم شده است. عکس‌های رادیوگرافی G,H,I مربوط به یک مرد ۲۲ ساله است که با از دست دادن یک بخش ۷ سانتی متری از استخوان بازو خود دچار سانحه شده بود و با استفاده از این داربست متخلخل بیوسرامیکی حاوی سلول بعد از یک سال بهبود پیدا کرد. محققین بر این باورند که این خاصیت استخوان زایی سلول‌های بنیادی مزانشیمی در بستر داربست‌های بیوسرامیکی می‌تواند راهکار شاخصی برای ترمیم ضایعات بزرگ در استخوان‌های بلند باشد. استفاده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی در داربست هیدروکسی آپاتیت در بازسازی حفره استخوانی ناشی از خارج کردن تومور نیز موفقیت آمیز توصیف شده است (۱۴).

یکی دیگر از کارهای برجسته‌ای که در ارتباط با بازسازی استخوان، با استفاده از مهندسی بافت انجام شده، مطالعه Gronthos است. بیمار مورد مطالعه شخصی ۵۶ ساله بود که بخش وسیعی از استخوان فک پایین خود را به طول ۷ سانتی متر به دلیل تومور از دست داده بود. برای بازسازی آن Gronthos با استفاده از کامپیوتر، شکل و اندازه

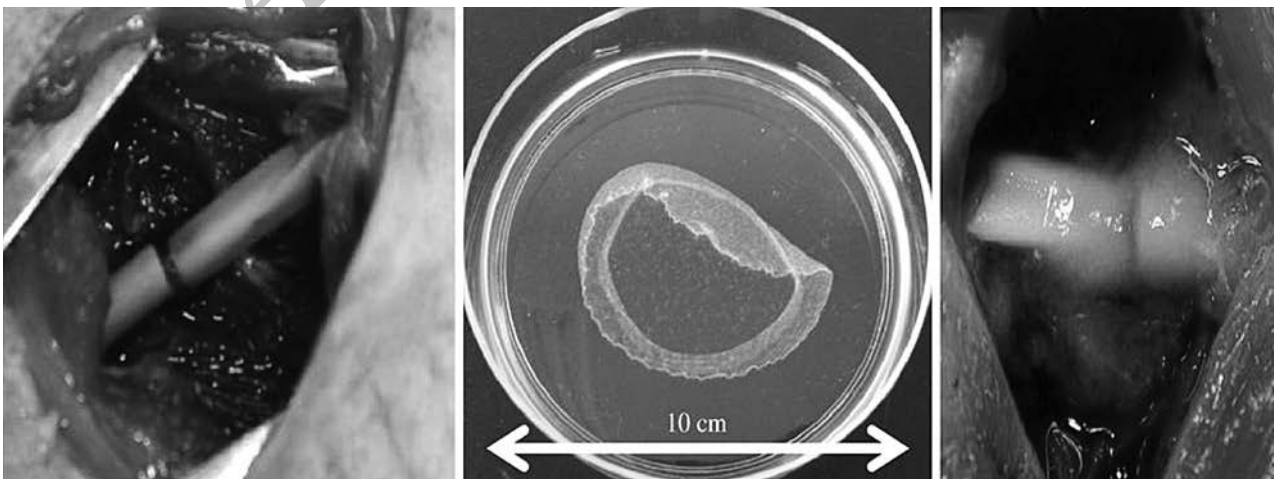


شکل ۷- عکس‌های رادیوگرافی A,B,C مربوط به ترمیم ضایعه استخوان درشت نی، عکس‌های رادیوگرافی D,E,F مربوط به ترمیم ضایعه استخوان زندزیرین و عکس‌های رادیوگرافی G,H,I مربوط به ضایعه استخوان بازو می‌باشد.

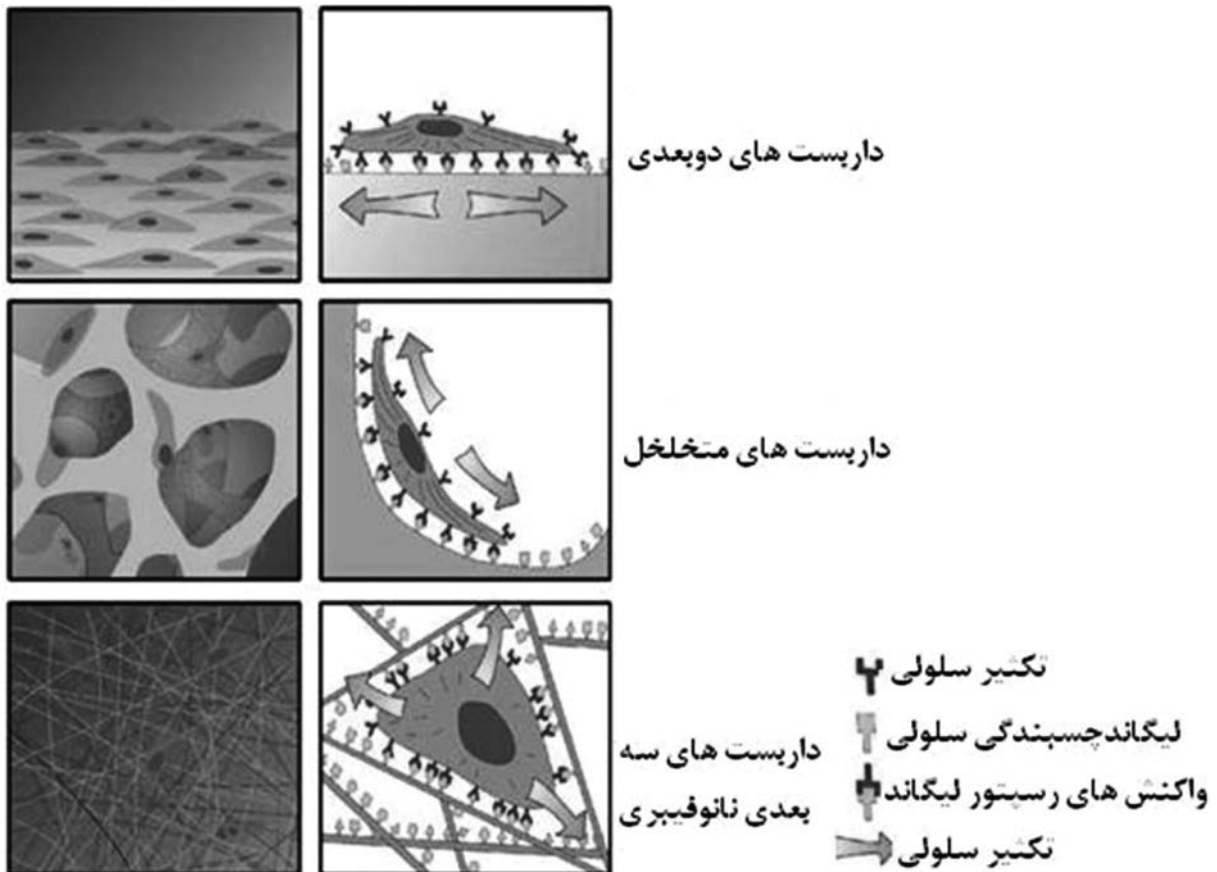


شکل ۸- تصاویر سمت راست طراحی داربست به کمک کامپیوتر است، تصاویر وسط پرشدن داربست تیتانیومی با سلول و قرارگیری در محل ضایعه است و تصویر سمت چپ محل پیوند در عضله لاتیسموس دورسی می‌باشد تا داخل آن استخوان سازی و عروق خونی ایجاد شود و سپس به محل ضایعه پیوند زده شود. از پیوند انجام شد که نتایج حاصله حاکی از درمان شکستگی بطور کامل بوده است. در واقع در این مطالعه با فراهم کردن محیط کشت مناسب و استفاده از فاکتورهای رشد متعدد پس از تعداد زیادی پاساژ سلول‌ها خاصیت تمایز به استخوان خود را حفظ کرده و در محای ضایعه به استئوبلاست متمایز شده و ماتریکس معدنی تولید می‌کنند (۱۶). همچنین آخرین تحقیقات انجام شده بیشتر به سمت نانو تکنولوژی

در ساخت داربست‌های استخوانی سوق پیدا کرده است. استخوان یک کامپوزیت طبیعی متشکل از پلیمر کلاژن است که با ذرات سرامیک نانو هیدروکسی کربنات آپاتیت تقویت شده است. تحقیقات اخیر در بازسازی استخوان نشان داده است که هدایت استخوانی بهتری در صورت استفاده از ذرات نانو به دست می‌آید. نانو ذرات هیدروکسی آپاتیت در استخوان به علت داشتن اندازه کوچک و سطح مخصوص زیاد آن خواص ویژه‌ای مانند چسبیدن پروتئین‌ها



شکل ۹- تصویر سمت چپ ایجاد یک شکستگی بی‌شکل در استخوان فمور موش می‌باشد. تصویر وسط ساخت صفحه سلولی با استفاده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی و تصویر سمت راست گرفت صفحه سلولی در محل است



شکل ۱۰- تصویر شماتیکی از مکانسیم عملکرد بهتر سلول‌ها در داربست‌های سه بعدی می‌باشد که در داربست‌های نانو ساختاری سلول‌ها بصورت دینامیک در سه جهت فعال هستند و تکثیر می‌کنند.

فیبروبلاست‌ها تا ۲۳۵ درصد پس از ۴ ساعت شده است. همچنین تحقیقات اخیر نشان داده که داربست نانو ساختار سه بعدی میزان پروتئین بیشتری شامل فیبرونکتین و ویترونکتین را جذب می‌کند که دلیل این امر به انرژی سطحی آن مربوط می‌شود (۱۸).

نتیجه گیری

بافت استخوان از جمله بافت‌هایی است که اغلب به دنبال حادثه و بیماری دچار تخریب می‌شود و جایگزین‌های استخوانی شامل پیوند اتولوگ و آلولوگ در بازسازی آن باز می‌مانند. به کمک علم مهندسی بافت می‌توان سازه‌های شبه استخوانی برای ترمیم این ضایعات طراحی کرد. این سازه‌ها از سه جز سلول، داربست و فاکتورهای رشد ساخته می‌شوند. در ساخت سازه استخوانی طراحی داربست ایده آل با خواص و استحکام مکانیکی مطلوب مورد نظر است که وابسته به انتخاب نوع ماده و روش ساخت داربست می‌باشد همچنین چندین سلول شامل غیربنیادی (استئوبلاست‌ها)

و در نتیجه، چسبیدن استئوبلاست‌ها را روی نانو ذرات سرامیکی در مقایسه با میکرو ذرات آن ایجاد می‌کنند. نانو ذرات برای ساختن مواد بیوپلیمری جایگزین استخوان با خاصیت بیواکتیویته بیشتر استفاده شوند. نانو هیدروکسی آپاتیت می‌تواند خواص مکانیکی داربست‌ها را بهبود بخشد و شکل دهی آنها را آسان تر کند. علاوه بر این نانو ذرات هیدروکسی آپاتیت آب کمتری جذب می‌کنند و باعث می‌شوند که خواص مکانیکی کامپوزیت در شرایط مرطوب کاهش نیابد (۱۷).

مطالعات کمی روی مکانسیم استئوبلاست‌ها و مواد نانو انجام شده است. یک مطالعه برون تنی علت زیست سازگاری نانو مواد را اندازه آن نشان داده است. در مقایسه با مواد اندازه بزرگتر، مواد نانو سبب بهبود چسبندگی استئوبلاست‌ها و کاهش چسبندگی فیبروبلاست‌ها در آلومینا، تیتانیم و هیدروکسی آپاتیت شده است. درحقیقت با کاهش اندازه ذرات از ۱۶۷ به ۲۴ نانومتر، افزایش چسبندگی استئوبلاست‌ها تا ۵۱ درصد و هم زمان کاهش چسبندگی

نیز نشان داد که درمان ضایعات با این استراتژی کاملاً قابل اعتماد است. دانشمندان بر این تلاش‌اند تا با توسعه این استراتژی و انجام ابتکارهای جدید همچون استفاده از نانو ذرات یا داربست‌های نانو ساختار به روش‌های درمانی نوینی برای درمان انواع صدمات و ضایعات بافت اسکلتی بدن در آینده‌ای نزدیک دست پیدا کنند.

و بنیادی (جنینی، پرتوان و بنیادی مزانشیمی) قابل استفاده هستند. در این بین سلول‌های بنیادی مزانشیمی به دلیل دارا بودن برخی خصوصیات ذاتی از اهمیت بسزایی برخوردارند. به همین دلیل مهندسی بافت استخوان مبتنی بر سلول‌های بنیادی مزانشیمی کانون توجه ترمیم ضایعات استخوانی به خصوص در صدمات استخوانی بزرگ قرار گرفته است. تحقیقات درون تنی و نتایج بالینی حاصله

References

- 1- Csaki C, Schneider P, Shakibaei M. Mesenchymal stem cells as a potential pool for cartilage tissue engineering. *Annals of Anatomy- Anat Anzeiger* 2008; 190(5): 395-412.
- 2- Salgado AJ, Coutinho OP, Reis RL. Bone tissue engineering: state of the art and future trends. *Macromol Biosci* 2004 Aug 9; 4(8): 743-65. PubMed PMID: 15468269.
- 3- Papenburg BJ. Design strategies for tissue engineering scaffolds: University of Twente; 2009.
- 4- Chu PK, Liu X. Biomaterials fabrication and processing handbook. Boca Raton, Fla.: CRC ; London : Taylor & Francis [distributor]; 2008.
- 5- Khang G, Lee S, Kim M, Lee H. Biomaterials: tissue engineering and scaffold. In: Webster JG, editor. *Encyclopedia of medical devices & instrumentation*. 2nd ed. ed. New York: Wiley-Interscience ; [Chichester : John Wiley, distributor]; 2006.
- 6- Seal B, Otero T, Panitch A. Polymeric biomaterials for tissue and organ regeneration. *Mat Sci Eng R* 2001; 34(4): 147-230.
- 7- Dorozhkin SV, Epple M. Biological and medical significance of calcium phosphates. *Angew Chem Int Ed Engl* 2002 Sep 2; 41(17): 3130-46. PubMed PMID: 12207375.
- 8- Ikada Y. *Tissue engineering: fundamentals and applications*. London: Elsevier Science Ltd.; 2006.
- 9- Tanimoto Y, Nishiyama N. Preparation and physical properties of tricalcium phosphate laminates for bone-tissue engineering. *J Biomed Mater Res A* 2008 May; 85(2): 427-33. PubMed PMID: 17701974.
- 10- Baksh D, Yao R, Tuan RS. Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord and bone marrow. *Stem Cells* 2007 Jun; 25(6): 1384-92. PubMed PMID: 17332507.
- 11- Zhang ZY, Teoh SH, Hui JH, Fisk NM, Choolani M, Chan JK. The potential of human fetal mesenchymal stem cells for off-the-shelf bone tissue engineering application. *Biomaterials* 2012 Mar; 33(9): 2656-72. PubMed PMID: 22217806.
- 12- Krampera M, Pizzolo G, Aprili G, Franchini M. Mesenchymal stem cells for bone, cartilage, tendon and skeletal muscle repair. *Bone* 2006 Oct; 39(4): 678-83. PubMed PMID: 16765663.
- 13- Deans RJ, Moseley AB. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Exp Hematol* 2000 Aug; 28(8): 875-84. PubMed PMID: 10989188.
- 14- Quarto R, Mastrogiacomo M, Cancedda R, Kutepov SM, Mukhachev V, Lavroukov A, et al. Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells. *N Engl J Med* 2001 Feb 1; 344(5): 385-6. PubMed PMID: 11195802.
- 15- Warnke PH, Springer IN, Wiltfang J, Acil Y, Eufinger H, Wehmoller M, et al. Growth and transplantation of a custom vascularised bone graft in a man. *Lancet* 2004 Aug 28-Sep 3; 364(9436): 766-70. PubMed PMID: 15337402.
- 16- Nakamura A, Akahane M, Shigematsu H, Tadokoro M, Morita Y, Ohgushi H, et al. Cell sheet transplantation of cultured mesenchymal stem cells enhances bone formation in a rat nonunion model. *Bone* 2010 Feb; 46(2): 418-24. PubMed PMID: 19716454.
- 17- Ramakrishna S. *An introduction to electrospinning and nanofibers*: World Scientific Publishing Company Incorporated; 2005.
- 18- Hesaraki S, Moztarzadeh F, Nemati R, Nezafati N. Preparation and characterization of calcium sulfate-biomimetic apatite nanocomposites for controlled release of antibiotics. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2009 Nov; 91(2): 651-61. PubMed PMID: 19582854.

Modern Methods to Repair Orthopedic Injuries through Stem Cells Approach in Bone Tissue Engineering

Mostafa Shahrezaie¹, Mohammad Hossein Lashgari², Banafshe Dormanesh³,
Masoud Hafezi⁴, *Mohammad Ali Sahebalzamani⁵

Received: 30 Oct 2012

Accepted: 13 Feb 2013

Abstract

Background: In today's modern and mechanical world, humans are exposed to a wide range of bone tissue diseases and injuries. Most of these injuries can be treated using conventional medical methods, but some are considered incurable or refractory. These injuries are often those in which large parts of bone tissue have been destroyed and natural body mechanisms are not able to rebuild the damaged tissue. A branch of medical sciences called the regenerative medicine is responsible for treating such injuries. One of the tools of regenerative medicine is the transplantation of bone-like structures made by tissue engineering method.

Results: Bone tissue engineering is benefitted from three main parts including the cell, the scaffold and the growth factor. The use of mesenchymal stem cells as the cell factor in the design of engineering scaffold, has been greatly facilitated the construction process of bone structures and revolutionized the field of bone tissue engineering. Such effects of mesenchymal stem cells are due to their self-renewal ability and high potential to differentiate into bones while not stimulating the immune system. The culture of osteoblasts on porous scaffolds can be a new solution for bone transplantation using the person's own mesenchymal cells.

Conclusions: In-vivo studies and the obtained clinical results also showed that treating injuries using this strategy is completely reliable. Scientists try to attain modern treatment methods to treat different kinds of skeletal tissue injuries of the body in the near future through developing this strategy and employing new innovations such as the use of nanoparticles or nanostructured scaffolds.

Keywords: Tissue Engineering, Bone and Bones Stem Cells, Tissue Scaffold, Orthopedics, Wounds and Injuries

1- Assistant Professor, Department of Orthopedic, AJA University of Medical Sciences, Tehran, Iran

2- Assistant Professor, Department of Surgery, AJA University of Medical Sciences, Tehran, Iran

3- Assistant Professor, Department of Pediatrics, AJA University of Medical Sciences, Tehran, Iran

4- Assistant Professor, Department of Biomaterials of Nanotechnology and Advanced Materials, Materials and Energy Research center, Alborz, Iran

5- (*Corresponding Author) Researcher, Department of Biomedical Engineering, Islamic Azad University, Sciences and Research Branch, Tehran, Iran. Tel.: 09122889351 E-mail: m.sahebalzamani@srbiau.ac.ir