

## دستیابی به کشت سه بعدی سلول‌های استئوبلاست مشتق از کالواریای انسانی در ایران

دکتر عباسعلی ربیعی\*، دکتر ابراهیم اسفندیاری\*\*، مهرآفرین فشارکی\*\*\*، معصومه سنایی\*\*\*\*، دکتر بهرام امین منصور\*\*\*\*، دکتر بتول هاشمی بنی\*

\* استادیار، گروه علوم تشریحی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.  
\*\* استاد، گروه علوم تشریحی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.  
\*\*\* مربی، گروه فیزیولوژی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.  
\*\*\*\* مربی گروه علوم تشریحی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جهرم، جهرم، ایران.  
\*\*\*\*\* استادیار، جراح مغز و اعصاب، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

تاریخ دریافت: ۸۷/۱۰/۲۵

تاریخ پذیرش: ۸۸/۵/۱

### چکیده

شیوع بالای نقایص استخوانی در بیماران دچار ضربه در تصادفات و بروز کمبود بافت استخوانی در اعمال جراحی کرائیوتومی، ضرورت تام و تمام اجرای این پژوهش را نشان می‌دهد. در تحقیق حاضر سلول‌های استئوبلاست به دست آمده از استخوان کالواریا در محیط سه بعدی آلژینات کشت داده شد و میزان تکثیر و زنده ماندن آن‌ها با سلول‌های حاصل از کشت تک لایه‌ای مقایسه گردید.

مقدمه:

در جریان اعمال جراحی کرائیوتومی ۶ نمونه‌ی استخوانی در اندازه‌های ۱ × ۱ سانتی‌متر از استخوان کالواریا تحت شرایط استریل بر داشته و پس از جداسازی بافت‌های همبند و شستشوی مکرر با سرم فیزیولوژی، قطعات استخوانی به ابعاد کوچک در حدود ۱ × ۱ میلی‌متر خرد شد و در دیش‌های محتوی محیط کشت قرار داده شد و به انکوباتور محتوی ۵ درصد دی اکسید کربن با رطوبت نسبی و دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد منتقل گردید. پس از گذشت ۹ تا ۱۰ روز، سلول‌ها شروع به خروج از استخوان نمودند و ۲ هفته پس از شروع کشت، سلول‌ها کف پلیت را به طور کامل پوشاندند. پس از تریپسینه کردن و شمارش، سلول‌ها به طور مساوی به دو بخش تقسیم گردید و کشت تک لایه‌ای و در محیط دارای ژل آلژینات انجام شد. جهت اثبات وجود سلول‌های استئوبلاست و فعالیت آن‌ها از رنگ‌آمیزی‌های Von kossa, Alkaline phosphatase و Azan استفاده شد. برای بررسی درصد زنده ماندن سلول‌ها از رنگ‌آمیزی Trypan blue استفاده گردید.

روش‌ها:

در کشت تک لایه‌ای، سلول‌ها با ظاهری شبه فیبروبلاستی و دوکی مشخص گردید در حالی که در کشت آلژینات، سلول‌ها نمای مدور داشت. در هر دو نوع کشت، تکثیر سلولی و فعالیت استخوان سازی وجود داشت. رنگ‌آمیزی Alkaline phosphatase در دو گروه وجود سلول‌های استئوبلاست را به اثبات رسانید و رنگ‌آمیزی‌های Von kossa و Azan وجود ماتریکس معدنی و آلی را در دو گروه تأیید کرد. با مقایسه تعداد سلول‌ها در روز ۲۱ با تعداد سلول‌ها در روز ۱ همان گروه، اختلاف معنی‌داری مشخص شد ( $P < 0/001$ ). همچنین شمارش سلولی دو گروه در روز ۲۱ نشان داد که میزان تکثیر در گروه آلژینات نسبت به گروه تک لایه‌ای بیشتر بوده، اختلاف معنی‌داری مشاهده شد ( $P < 0/001$ ).

یافته‌ها:

این مطالعه نشان داد که سلول‌های استئوبلاستی بدون استفاده از آنزیم در محیط کشت قادر به خروج از بافت استخوانی است و محیط سه بعدی ژل آلژینات سدیم در مقایسه با کشت تک لایه، قادر است تکثیر و بقای این سلول‌ها را به طور بارز افزایش دهد.

نتیجه‌گیری:

استئوبلاست، کشت تک لایه، آلژینات، آلكالین فسفاتاز.

واژگان کلیدی:

تعداد صفحات: ۱۱

تعداد جدول‌ها: ۱

تعداد نمودارها: ۷

تعداد منابع: ۳۸

دکتر ابراهیم اسفندیاری، استاد، گروه علوم تشریحی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.  
E-mail: esfandiari@med.mui.ac.ir

آدرس نویسنده مسؤوول:

## مقدمه

در دنیای امروز، افزایش روز افزون آمار تصادفات و در پی آن شیوع بالای نقایص استخوانی، مشکلات زیادی را برای بیماران و جراحان ایجاد کرده است؛ چرا که استخوان خرد شده دیگر قادر به ترمیم نخواهد بود و بیمار دچار مشکلات زیادی از قبیل کوتاهی عضو و از بین رفتن زیبایی ظاهری به خصوص در نواحی سر و صورت می شود. همچنین مشکل کمبود بافت استخوانی جهت ترمیم در اعمال جراحی کرانیوتومی و نیز در ناهنجاری های مادرزادی از قبیل کرانیوسینوستوز خود نمایی می کند (۱).

به تازگی برای درمان بیماری ها و آسیب های بافت استخوانی از روش سلول درمانی (Cell therapy) و مهندسی بافت (Tissue engineering) استفاده می شود. بدین منظور سلول های دارای توانایی استخوان زایی (Osteogenic cell) را در محیط آزمایشگاه (In vitro) کشت می دهند، سپس آن ها را بر روی داربست سه بعدی منتقل کرده، به بیمار پیوند می زنند (۸-۲). این روش بر روش های متداول ترمیم نقایص بزرگ استخوانی که شامل اتوگرافت، آلوگرافت و پروتزهای ساختگی است و دارای عیوب فراوان هستند، برتری دارد (۱۰-۹، ۲-۱).

در روش اخیر، سلول ها بر روی داربستی منتقل می شوند و سپس آن ها را به محل مورد نظر پیوند می زنند. دو نوع داربست طبیعی و سنتتیک برای این کار وجود دارد. از بین تمام داربست های طبیعی و سنتتیک، آلژینات دارای بهترین زیست سازگاری (Biocompatibility)، قابلیت تجزیه شدن (Biodegradability) با سرعت مناسب پس از پیوند و بهترین پایداری (Stability) در بدن موجود زنده می باشد (۱۴-۱۱).

تاکنون استفاده های گوناگونی از آلژینات شده است. در ۱۹۳۰ از این ماده در صنایع غذایی به عنوان نگهدارنده استفاده شد (۱۵). Lim و همکار و Soon-Shiong و همکاران از آلژینات برای انتقال سلول های غیر اتولوگ، به بیماران مبتلا به دیابت نوع اول، استفاده نمودند و نشان دادند که این سلول ها قادرند بدون برانگیختن سیستم ایمنی، زنده بمانند و انسولین تولید نمایند (۱۷-۱۶). Tomas از آلژینات به عنوان ماده ای در پانسمان زخم های جراحی استفاده کرد (۱۸). Cirone و همکاران در سال ۲۰۰۲ از آلژینات برای انتقال سلول هایی که مواد محدود کننده ی تومورها را ترشح می کنند، استفاده کردند. در این مورد ژل آلژینات از این سلول ها در برابر واکنش های ایمنی بدن محافظت می کند (۱۹).

امروزه محققان موفق به کشت انواع سلول ها از قبیل کندروسیت، سلول های مغز استخوان، میوبلاست، فیبروبلاست، سلول شوان، سلول های کلیه، سلول های اپی تلیال، هپاتوسیت و استئوبلاست در ژل آلژینات شده اند (۲۲-۲۰).

Kamishina و همکاران در سال ۲۰۰۶ در تحقیقی که بر روی کندروسیت های مشتق از غضروف هیالین گربه انجام دادند، رفتار این سلول ها را در ژل آلژینات ارزیابی کردند و نشان دادند که رشد کندروسیت ها در آلژینات به مراتب بیشتر از زمانی است که این سلول ها در محیط کشت تک لایه ای رشد داده شوند (۲۳).

دکتر اسفندیاری و همکاران (۲۰۰۸) برای اولین بار در ایران به کشت کندروسیت های انسانی در ژل آلژینات پرداختند و نشان دادند که ژل آلژینات قادر به حفظ حیات این سلول ها در آزمایشگاه به مدت ۹ ماه می باشد (۲۴). جهت جدا کردن سلول های استئوبلاست، از

نمونه‌های استخوانی در تحقیقات مختلف، به طور عموم از استخوان‌های اسفنجی استفاده شده است. از آن جمله می‌توان استخوان فک فوقانی انسان (۲۵)، سر فمور و استخوان ایلیاک انسان (۲۶)، کالواریای خرگوش (۵)، موش (۲۷)، موش صحرایی (۷) و جوجه‌ی مرغ (۲۸) را نام برد. با توجه به این که در منابع موجود، هیچ مطالعه‌ای در جهت جداسازی سلول‌های استئوبلاست از کالواریای انسان انجام نشده است و تهیه قطعات استخوان در حین عمل جراحی کرانیوتومی به راحتی امکان پذیر می‌باشد؛ به طوری که این قطعات به طور معمول حین عمل جراحی جدا شده، اغلب دور ریخته می‌شوند، بنابراین در این تحقیق از کالواریای انسان جهت جداسازی سلول‌های استئوبلاست استفاده شد.

از آن جا که تاکنون در ایران در مورد کشت استئوبلاست‌ها در آلزینات مطالعه‌ای انجام نشده است و تعداد سلول مورد نیاز برای ترمیم در ضایعات وسیع استخوانی بسیار زیاد می‌باشد، بر آن شدیم که استئوبلاست‌ها را در آلزینات کشت دهیم و رشد آن‌ها را مورد بررسی قرار دهیم تا شاید بتوان در یک زمان کوتاه تعداد سلول مورد نیاز جهت ترمیم استخوان را به دست آورد.

## روش‌ها

تعداد ۶ نمونه‌ی استخوان، به صورت تصادفی آسان از بین بیماران مراجعه کننده به بیمارستان الزهرا (س) اصفهان در جریان عمل جراحی کرانیوتومی، جمع‌آوری شد. نمونه‌ها از کالواریای افراد مذکر ۲۰-۴۰ سال، که به هیچ نوع بیماری استخوانی مبتلا نبودند و سابقه‌ی بیماری سیستمیک نداشتند، برداشته می‌شد.

نمونه‌ی استخوانی تحت بیهوشی عمومی و شرایط

کاملاً استریل با ابعاد ۱ × ۱ سانتی‌متر توسط جراح جدا و در سرم فیزیولوژی ۰/۹ درصد، به آزمایشگاه کشت سلول گروه علوم تشریحی دانشکده‌ی پزشکی اصفهان منتقل گردید.

### آماده سازی نمونه‌ها جهت کشت اولیه:

نمونه‌ها چندین بار توسط سرم فیزیولوژی ۰/۹ درصد شستشو گردید تا خون و بافت‌های همبند آن تا حد امکان جدا شود. سپس پریوست به صورت مکانیکی به وسیله‌ی تیغ جراحی جدا و نمونه‌ها به قطعات ۱ میلی‌متری خرد گردید. قطعات استخوانی به پتری دیش‌های ۱۰ سانتی‌متری محتوی ۱۰ میلی‌لیتر DMEM حاوی FCS ۱۰ درصد، ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر اسید آسکوربیک، ۱۰ میلی‌مول بتا گلیسرو فسفات، ۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر پنی‌سیلین، ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر استرپتومایسین و ۱ میکروگرم در میلی‌لیتر آمفوترسین B (کلیه‌ی مواد از شرکت سیگما آمریکا تهیه گردید) منتقل شد و در شرایط ۵ درصد دی‌اکسیدکربن با رطوبت نسبی و دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد کشت داده شد. تعویض محیط کشت بر اساس نیاز و هر دو روز یک مرتبه انجام گردید.

### کشت تک لایه‌ای سلول‌ها:

پس از مهاجرت سلول‌ها از درون قطعات استخوانی، هنگامی که سطح بستر پتری دیش به طور کامل توسط سلول‌ها اشغال می‌گردید، سلول‌ها با استفاده از مخلوط تریسین EDTA ۰/۰۵ درصد از کف پتری دیش جدا و به دو بخش مساوی تقسیم شدند. بخشی از سلول‌ها جهت کشت تک لایه‌ای ثانویه به پتری دیش‌های ۲ سانتی‌متری منتقل گردید؛ به گونه‌ای که هر پتری دیش به طور متوسط محتوی  $10^4 \times 5$  سلول بود و بخش دیگر به ژل آلزینات، جهت رشد سه بعدی اضافه می‌شد.

**کشت سلول‌ها در آلزینات (کشت سه بعدی):**

رسوب سلولی حاوی  $10^4 \times 5$  را با ۱ میلی لیتر محلول آلزینات ۱/۲ درصد مخلوط نمودیم تا در نهایت یک سوسپانسیون همگن و یکنواخت از سلول و آلزینات حاصل شود. سپس سوسپانسیون سلول آلزینات به آرامی به داخل سرنگی با اندازه‌ی سوزن ۲۲ G منتقل و به آرامی به صورت قطره قطره در داخل محلول استریل شده‌ی  $CaCl_2$  (۱۰۲ mM) چکانده شد. بدین ترتیب قطره‌های کروی شکل (Beads) آلزینات-سلول تشکیل گردید. دانه‌های آلزینات توسط نرمال سالین استریل ۰/۹ درصد و محیط کشت DMEM شستشو داده شد. در نهایت به هر کدام از پتری دیش‌های ۲ سانتی متری محتوی نمونه‌ها، ۲ میلی لیتر محیط کشت اضافه و به انکوباتور منتقل گردید. محیط کشت، هر دو روز یک مرتبه تعویض شد.

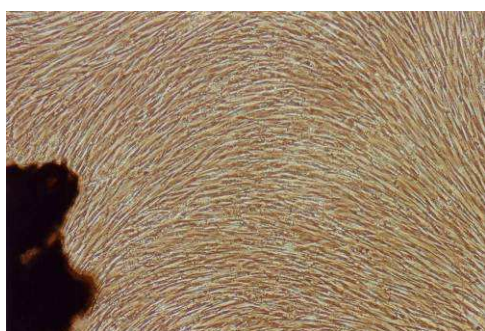
**بررسی کشت‌ها:**

پتری دیش‌های کشت، هر روز با استفاده از میکروسکپ معکوس از نظر مهاجرت سلول‌ها از درون قطعات استخوانی، رشد سلولی و آلودگی محیط کشت مورد بررسی قرار می‌گرفت.

جهت اثبات وجود سلول‌های استئوبلاست و فعالیت آن‌ها از رنگ آمیزی‌های Von kossa, Alkaline phosphatase و Azan در روزهای ۷، ۱۴ و ۲۱ استفاده و شمارش سلول‌ها با استفاده از لام هموسایتومتر در روزهای ۱ و ۲۱ در دو گروه انجام شد. برای بررسی درصد زنده ماندن سلول‌ها از رنگ آمیزی Trypan blue و شمارش سلول‌ها به وسیله لام هموسایتومتر استفاده گردید. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS Paired- (SPSS Inc., Chicago, IL) و روش آماری Independent t-test و sampels t-test مقایسه گردید.

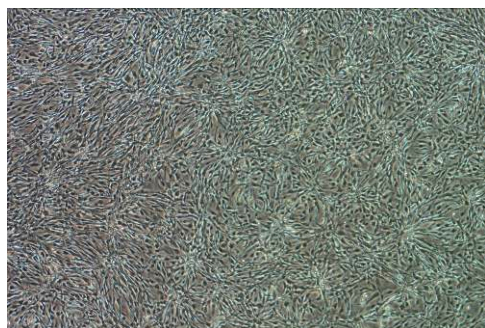
**یافته‌ها**

**نتایج حاصل از کشت تک لایه‌ای:** در کشت اولیه، سلول‌های استئوبلاست پس از گذشت ۹-۱۰ روز شروع به مهاجرت از درون توده‌های استخوانی نموده، به کف پتری دیش‌ها چسبیدند. شکل سلول‌ها از فرم دوکی تا فیروبلاستی متغیر بود (شکل ۱). متوسط زمان پوشش کامل کف پتری دیش‌ها به وسیله سلول‌ها ۱۴ روز بود.



شکل ۱. مهاجرت سلول‌ها از استخوان. قطعه‌ی استخوان به رنگ تیره در کنار تصویر مشخص است (۶۰×)

در تمام نمونه‌ها سلول‌های تریپسینه شده‌ای که به پتری دیش‌های کوچک ۲ سانتی متری، جهت پاساژ دوم، انتقال یافته بودند، پس از گذشت یک روز به سطح کشت چسبیدند. این سلول‌ها ظاهر فیروبلاستی خود را تا روز ۲۱ همچنان حفظ نمودند (شکل ۲).



شکل ۲. سلول‌ها در پاساژ دوم کشت تک لایه‌ای تا روز ۲۱ ظاهر فیروبلاستی خود را حفظ نمودند (۴۰×)

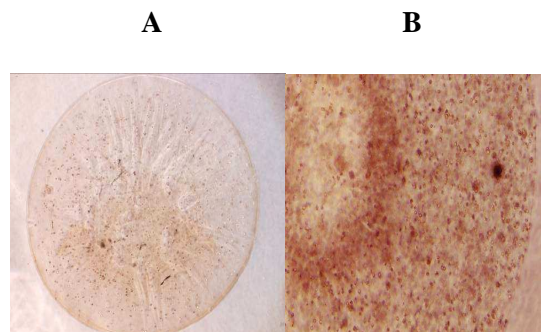
استئوبلاست را به اثبات رساند (شکل ۴) و در روز ۲۱ این رنگ آمیزی بر روی هر دو گروه ناچیز و قابل اغماض بود.

#### نتایج حاصل از رنگ آمیزی Von kossa

رنگ آمیزی با Von kossa در روز ۷ و ۱۴ بر روی پاساژ سلولی، نشان داد که نواحی معدنی شده در مرکز اجتماعات سلولی تشکیل شده است (شکل ۵A). این رنگ آمیزی در روزهای ۱۴ و ۲۱ نشان داد که تعداد و اندازه‌ی نواحی معدنی شده در کشت‌های ثانویه در حال افزایش است (شکل ۵B). همچنین رنگ آمیزی Von kossa در روز ۷ بر روی نمونه‌های آلژینات، نشان داد که معدنی شدن در ماتریکس خارج سلولی انجام شده است (شکل ۵C). این رنگ آمیزی در روزهای بعد و در نهایت در روز ۲۱ افزایش میزان معدنی شدن ماتریکس را نشان داد (شکل ۵D).

#### نتایج حاصل از کشت سلول‌ها در آلژینات:

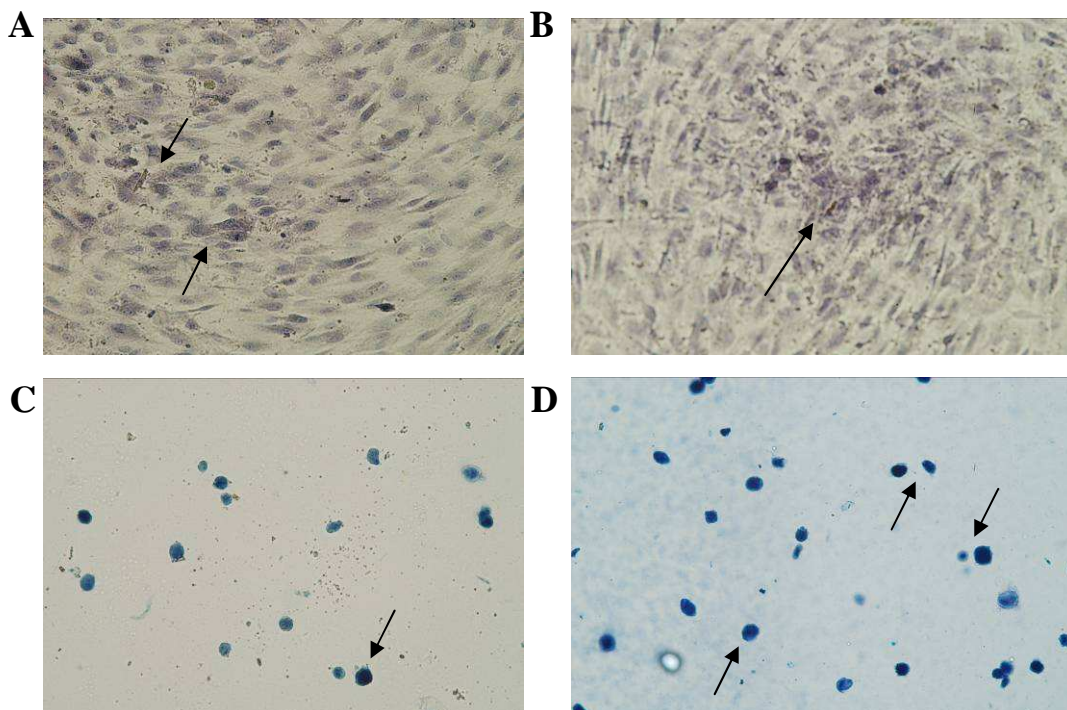
سلول‌ها در ژل آلژینات، نمای مدور داشتند (شکل ۳). تکثیر سلولی با بررسی روزانه سلول‌ها قابل مشاهده بود.



شکل ۳. A: یک قطره ژل آلژینات (Bead) دارای سلول‌های استئوبلاست (۶۰×)، B: بزرگ‌نمایی بیشتر از قطره ژل آلژینات (۳۰۰×).

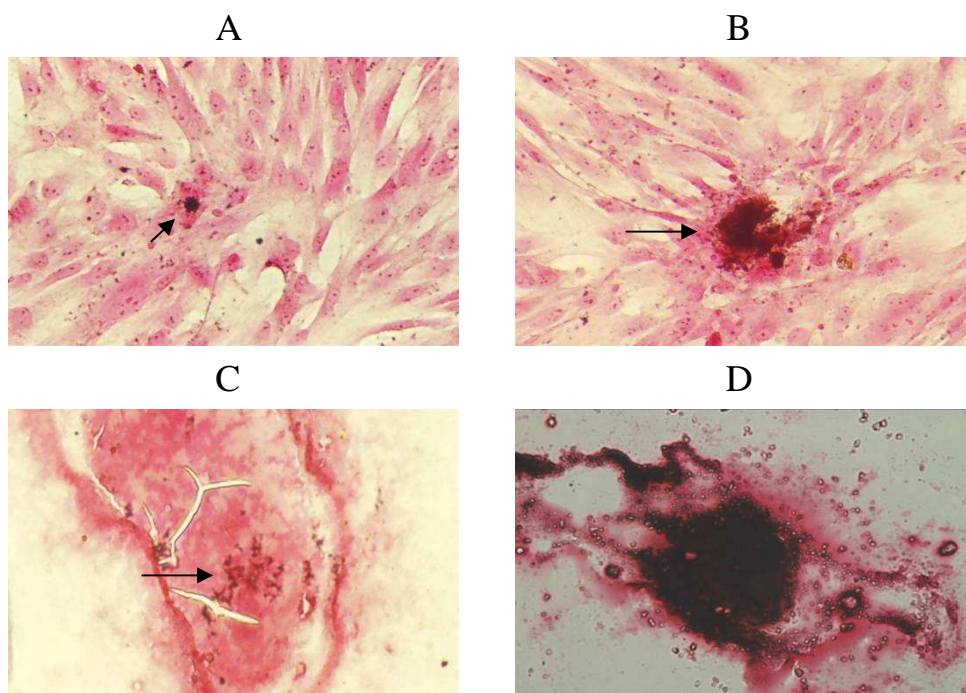
#### نتایج حاصل از تست آلکالین فسفاتاز: رنگ آمیزی

با آلکالین فسفاتاز در روزهای ۷ و ۱۴ بر روی پاساژ سلولی و نمونه‌های آلژینات، وجود سلول‌های



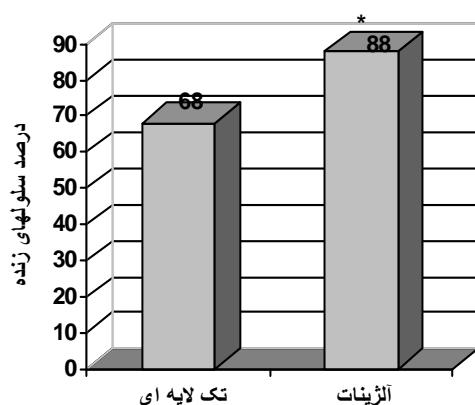
شکل ۴. A و B نمونه‌های رنگ شده با آلکالین فسفاتاز در کشت تک لایه‌ای به ترتیب در روزهای ۷ و ۱۴.

پیکان‌ها محل فعالیت آلکالین فسفاتاز را نشان می‌دهد. C و D رنگ آمیزی آلکالین فسفاتاز بر روی نمونه‌ی آلژینات به ترتیب در روزهای ۷ و ۱۴، پیکان‌ها سلول‌های آلکالین فسفاتاز مثبت را نشان می‌دهند (۳۰۰×).



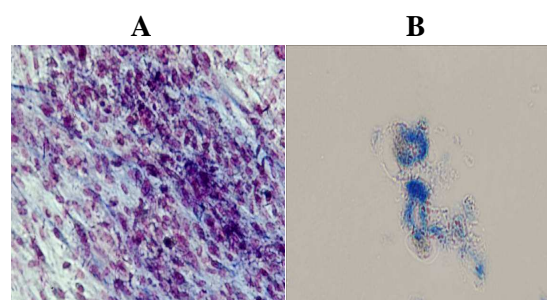
شکل ۵. رنگ آمیزی Von kossa در روز ۷ و ۱۴. پیکان‌ها نواحی معدنی شده را نشان می‌دهند.  
A و B نمونه‌ی تک لایه‌ای، C و D نمونه‌ی آلزینات ( $\times 300$ ).

کشت تک لایه‌ای و آلزینات در روز ۲۱ نسبت به روز اول همان گروه، اختلاف معنی‌داری را نشان داد ( $P < 0/001$ ). به علاوه، اختلاف میانگین تعداد سلول‌های موجود در کشت تک لایه‌ای و آلزینات در روز ۲۱ معنی‌دار بود ( $P < 0/001$ ). (جدول ۱).



نمودار ۱. نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی Trypan blue در دو گروه در روز ۲۱. اختلاف درصد سلول‌های زنده بین گروه‌های آلزینات و تک لایه‌ای معنی‌دار است ( $P < 0/001$ )

نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی Azan پس از رنگ‌آمیزی سلول‌های حاصل از کشت تک لایه‌ای و همچنین آلزینات مشخص گردید که این سلول‌ها در روزهای ۷، ۱۴ و ۲۱ با Azan رنگ می‌گیرند (شکل ۶A,B).



شکل ۶. رنگ‌آمیزی Azan بر روی نمونه‌ی تک لایه‌ای (A) و آلزینات (B) جهت مشخص نمودن ماتریکس آلی استخوان ( $\times 600$ ).

نتایج حاصل از شمارش سلول‌ها و درصد سلول‌های زنده با استفاده از رنگ‌آمیزی Trypan blue میانگین تعداد سلول‌های موجود در

جدول ۱. میانگین تعداد سلول‌ها در روزهای ۱ و ۲۱

گروه	تعداد سلول‌ها در روز ۱ میانگین $\pm$ خطای معیار N = ۶	تعداد سلول‌ها در روز ۲۱ میانگین $\pm$ خطای معیار N = ۶	P-value
تک لایه‌ای	$5/9 \times 10^5 \pm 5/8 \times 10^4$	$1/9 \times 10^6 \pm 2/4 \times 10^5$	< ۰/۰۰۱
آلژینات	$5/9 \times 10^5 \pm 5/8 \times 10^4$	$3/9 \times 10^6 \pm 3/7 \times 10^5$	< ۰/۰۰۱
P-value	-	< ۰/۰۰۱	-

P < ۰/۰۰۵ معنی دار محسوب می‌شود.

مدت زمان ۱۲-۱۰ روز گزارش شده است. در مطالعه‌ی حاضر، مدت زمان پوشش کامل کف پتری دیش توسط سلول‌ها به ۱۴ روز رسید. علت این تفاوت‌ها می‌تواند مربوط به اضافه کردن ترکیبات مختلف از قبیل اسید اسکوربیک (۳۲-۳۰)، دکزامتازون (۳۳-۳۲)، بتا گلیسرو فسفات (۳۳-۳۲) و کلرید کلسیم (۳۲) و با غلظت‌های مختلف به محیط کشت باشد؛ به طوری که در مطالعه‌ی Wiedmann-Al-Ahmad و همکاران از هیچ یک از مواد فوق استفاده نشده است، در حالی که در مطالعه‌ی حاضر از اسید اسکوربیک و بتا گلیسروفسفات در محیط کشت استفاده شد. از طرف دیگر، باید گفت نوع محیط کشت مصرفی نیز در رشد و تکثیر سلولی تأثیر بسزایی دارد؛ چرا که محیط‌های کشت مختلف، محتوی مواد مغذی متفاوتی هستند و می‌توانند روی رشد و تکثیر سلول‌ها تأثیر گذار باشند. در مطالعه‌ی van Griensven و همکاران از محیط کشت BGJb (۲۶) و در مطالعه‌ی Wiedmann-Al-Ahmad و همکاران از محیط کشت  $\alpha$ MEM استفاده شد (۲۵). در مطالعه‌ی Hagewald و همکاران و Blom و همکاران از محیط کشت DMEM استفاده شد. به دلیل این که در اکثر تحقیقات از محیط کشت DMEM استفاده شده است (۳۴-۳۶)، در این مطالعه نیز از DMEM به عنوان محیط کشت پایه استفاده گردید.

در روش رنگ‌آمیزی با Trypan blue در روز ۲۱، در دو گروه کشت، مشخص گردید که میانگین درصد سلول‌های زنده در گروه آلژینات به طور معنی‌داری بیشتر از کشت تک لایه‌ای می‌باشد (P < ۰/۰۰۱) (نمودار ۱).

## بحث

در این مطالعه‌ی مقدماتی، سلول‌های استئوبلاستی مشتق از کالوارای انسان بدون استفاده از آنزیم خاص از نمونه‌های استخوانی جدا شده، شروع به تکثیر نمودند.

van Griensven و همکاران (۲۰۰۲) با مطالعه‌ی نمونه‌هایی که از سر استخوان فمور و استخوان ایلپاک بیماران تهیه کرده بودند، مدت زمان لازم برای خروج سلول‌ها از بافت استخوانی را ۱۲ روز گزارش کردند (۲۶). این مدت زمان در مطالعه‌ی حاضر به طور متوسط ۹ تا ۱۰ روز بود که با مطالعه فوق همخوانی دارد.

همچنین Wiedmann-Al-Ahmad و همکاران (۲۵) و van Griensven و همکاران (۲۶)، مدت زمانی را که طی آن سلول‌ها کف پتری دیش را به طور کامل می‌پوشانند، ۵-۴ هفته گزارش داده‌اند. اما در دو تحقیق دیگر، که یکی توسط Hagewald و همکاران (۲۷) و دیگری توسط Blom و همکاران (۲۹) انجام شد، این

جهت اثبات وجود سلول‌های استئوبلاست در تحقیقات مختلف از تست آلکالین فسفاتاز استفاده شده است (۳۷، ۳۳، ۲۵). به طور معمول از روش‌های آنزیمی، جهت سرعت بخشیدن به امر جداسازی سلول‌ها استفاده می‌شود (۲۶). آنزیمی که به طور معمول مورد استفاده قرار می‌گیرد، کلاژناز I است و مطالعات نشان داده‌اند که استفاده از کلاژناز، جهت جداسازی سلول‌ها از نمونه‌ها، موجب آزاد شدن بیشتر فیبروبلاست‌ها نیز می‌گردد (۲۶).

در این تحقیق، برای آماده سازی نمونه‌ها از هیچ آنزیمی استفاده نشد و بدین‌وسیله سعی گردید احتمال حضور فیبروبلاست‌ها به حداقل رسانیده شود. به علاوه، تست آلکالین فسفاتاز در روز ۷ انجام گرفت و در روزهای ۱۴ و ۲۱ تکرار گردید. نتیجه‌ی این تست در روزهای ۷ و ۱۴ مثبت و در روز ۲۱ منفی بود که با نتایج مطالعه‌ای که توسط Akbari و همکاران در جهت تمایز سلول‌های بنیادی مغز استخوان به استئوبلاست انجام شد، مطابقت داشت (۳۷). فعالیت آلکالین فسفاتاز در روزهای ۷ و ۱۴ نشانه‌ی فعالیت سلول‌های استئوبلاست می‌باشد و عدم وجود فعالیت آلکالین فسفاتاز در روز ۲۱ نشان دهنده‌ی معدنی شدن ماده‌ی بنیادی خارج سلولی و نشانه‌ی تبدیل سلول‌های استئوبلاست به استئوسیت می‌باشد (۳۷).

در مطالعات مختلف از رنگ‌آمیزی Von kossa جهت اثبات وجود ماتریکس معدنی و از Azan برای اثبات وجود کلاژن استفاده شده است (۳۸، ۲۶، ۱۲). به علاوه، نتایج این رنگ‌آمیزی‌ها خود می‌تواند تأییدی بر نتایج تست آلکالین فسفاتاز باشد.

در این مطالعه، نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی

Von kossa بر روی دو گروه مورد آزمایش (تک لایه‌ای و آلزینات) در روزهای ۷، ۱۴ و ۲۱، افزایش تدریجی در معدنی شدن ماتریکس را نشان داد که این نتیجه با نتایج حاصل از تحقیقات Abbah و همکاران و Li و همکاران همخوانی دارد (۳۸، ۱۲).

Abbah و همکاران در سال ۲۰۰۶ با کشت سلول‌های بنیادی بافت چربی در آلزینات و تمایز آن به استئوبلاست نشان دادند که این ژل، محیطی را به وجود می‌آورد که از تکثیر و بقای استئوبلاست‌ها حمایت می‌کند. به علاوه در تحقیق مذکور بین تکثیر سلول‌ها در دو گروه آلزینات و تک لایه‌ای در روزهای ۷ و ۱۴ اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد؛ در حالی که در روز ۲۱، تعداد سلول‌ها و درصد زنده ماندن آن‌ها در گروه تک لایه‌ای به طور معنی‌داری کاهش یافته بود (۱۲). این پژوهشگر در سال ۲۰۰۸ در تحقیق مقایسه‌ای دیگری، سلول‌های بنیادی حاصل از مغز استخوان را در ژل آلزینات کشت و آن را به استئوبلاست تمایز داد و نتایج تحقیقات قبلی خود را در مورد ژل آلزینات تأیید کرد (۱۱).

نتایج مطالعه‌ی حاضر نیز نشان داد که سلول‌های استئوبلاست مشتق از بافت استخوان کالواریا که در ژل آلزینات رشد نموده بودند، در مقایسه با نمونه‌ی تک لایه‌ای دارای تکثیر بیشتری بوده، درصد سلول‌های زنده در آلزینات نسبت به گروه تک لایه‌ای به طور معنی‌داری بیشتر بود. علت این مسأله این است که ژل آلزینات، محیطی را فراهم می‌آورد که فعالیت‌های سلولی و متابولیکی در آن بهتر صورت می‌گیرد (۱۱).

### نتیجه‌گیری

این مطالعه نشان داد که سلول‌های استئوبلاستی بدون



### تشکر و قدردانی

مؤلفان مراتب تقدیر و تشکر صمیمانه‌ی خود را از همکاری‌های جناب آقای دکتر مسیح صبوری و جناب آقای دکتر هوشنگ معین، استادان محترم گروه جراحی اعصاب دانشکده‌ی پزشکی که در این تحقیق با ما کمال همکاری را داشتند، ابراز می‌دارند.

استفاده از آنزیم قادر به خروج از بافت استخوانی هستند و هیدروژل آلژینات سدیم به عنوان داربست قادر است از تکثیر و بقای این سلول‌ها حمایت نماید. اما باید توجه داشت که در زمینه‌ی کشت و پیوند سلول‌های استخوانی، نیاز به مطالعات وسیع و گسترده است.

### References

- Gamradt SC, Lieberman JR. Genetic modification of stem cells to enhance bone repair. *Ann Biomed Eng* 2004; 32(1): 136-47.
- Kneser U, Schaefer DJ, Polykandriotis E, Horch RE. Tissue engineering of bone: the reconstructive surgeon's point of view. *J Cell Mol Med* 2006; 10(1): 7-19.
- Schantz JT, Hutmacher DW, Chim H, Ng KW, Lim TC, Teoh SH. Induction of ectopic bone formation by using human periosteal cells in combination with a novel scaffold technology. *Cell Transplant* 2002; 11(2): 125-38.
- Sakata Y, Ueno T, Kagawa T, Kanou M, Fujii T, Yamachika E, et al. Osteogenic potential of cultured human periosteum-derived cells - a pilot study of human cell transplantation into a rat calvarial defect model. *J Craniomaxillofac Surg* 2006; 34(8): 461-5.
- Schantz JT, Hutmacher DW, Lam CX, Brinkmann M, Wong KM, Lim TC, et al. Repair of calvarial defects with customised tissue-engineered bone grafts II. Evaluation of cellular efficiency and efficacy in vivo. *Tissue Eng* 2003; 9(Suppl 1): S127-S139.
- Karp JM, Shoichet MS, Davies JE. Bone formation on two-dimensional poly(DL-lactide-co-glycolide) (PLGA) films and three-dimensional PLGA tissue engineering scaffolds in vitro. *J Biomed Mater Res A* 2003; 64(2): 388-96.
- Ishaug-Riley SL, Crane-Kruger GM, Yaszemski MJ, Mikos AG. Three-dimensional culture of rat calvarial osteoblasts in porous biodegradable polymers. *Biomaterials* 1998; 19(15): 1405-12.
- Wang L, Wang Z, Li X, Li DC, Xu SF, Lu BH. Rotating three-dimensional dynamic culture of osteoblasts seeded on segmental scaffolds with controlled internal channel architectures for construction of segmental tissue engineered bone in vitro. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2007; 87(3): 200-3.
- Ciapetti G, Ambrosio L, Savarino L, Granchi D, Cenni E, Baldini N, et al. Osteoblast growth and function in porous poly epsilon-caprolactone matrices for bone repair: a preliminary study. *Biomaterials* 2003; 24(21): 3815-24.
- Stevens MM, Marini RP, Schaefer D, Aronson J, Langer R, Shastri VP. In vivo engineering of organs: the bone bioreactor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102(32): 11450-5.
- Abbah SA, Lu WW, Chan D, Cheung KM, Liu WG, Zhao F, et al. Osteogenic behavior of alginate encapsulated bone marrow stromal cells: an in vitro study. *J Mater Sci Mater Med* 2008; 19(5): 2113-9.
- Abbah SA, Lu WW, Chan D, Cheung KM, Liu WG, Zhao F, et al. In vitro evaluation of alginate encapsulated adipose-tissue stromal cells for use as injectable bone graft substitute. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 347(1): 185-91.
- Barralet JE, Wang L, Lawson M, Triffitt JT, Cooper PR, Shelton RM. Comparison of bone marrow cell growth on 2D and 3D alginate hydrogels. *J Mater Sci Mater Med* 2005; 16(6): 515-9.
- Li Z, Ramay HR, Hauch KD, Xiao D, Zhang M. Chitosan-alginate hybrid scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2005; 26(18): 3919-28.
- Walker JM. *Methods in Molecular Biology: Proteins*. New Jersey: Humana Press Inc; 2002. p. 77-83.
- Lim F, Sun AM. Microencapsulated islets as bioartificial endocrine pancreas. *Science* 1980; 210(4472): 908-10.
- Soon-Shiong P, Heintz RE, Merideth N, Yao QX, Yao Z, Zheng T, et al. Insulin independence in a type 1 diabetic patient after encapsulated islet transplantation. *Lancet* 1994; 343(8903): 950-1.
- Thomas S. Alginate dressings in surgery and wound management--Part 1. *J Wound Care* 2000; 9(2): 56-60.

19. Cirone P, Bourgeois JM, Austin RC, Chang PL. A novel approach to tumor suppression with microencapsulated recombinant cells. *Hum Gene Ther* 2002; 13(10): 1157-66.
20. Shang Q, Wang Z, Liu W, Shi Y, Cui L, Cao Y. Tissue-engineered bone repair of sheep cranial defects with autologous bone marrow stromal cells. *J Craniofac Surg* 2001; 12(6): 586-93.
21. Fragonas E, Valente M, Pozzi-Mucelli M, Toffanin R, Rizzo R, Silvestri F, et al. Articular cartilage repair in rabbits by using suspensions of allogenic chondrocytes in alginate. *Biomaterials* 2000; 21(8): 795-801.
22. Chang SC, Rowley JA, Tobias G, Genes NG, Roy AK, Mooney DJ, et al. Injection molding of chondrocyte/alginate constructs in the shape of facial implants. *J Biomed Mater Res* 2001; 55(4): 503-11.
23. Kamishina H, Miyabayashi T, Clemmons RM, Farese JP, Uhl EW. Three-dimensional culture of feline articular chondrocytes in alginate microspheres. *J Vet Med Sci* 2006; 68(11): 1239-42.
24. Esfandiary E, Amirpour N, Fesharaki M, Nasr Esfahani MH, Molavi F, Molavi F, et al. Access to chondrocyte culture, with alginate, in Iran. *Yakhteh Med J* 2008; 10(1): 73-5.
25. Wiedmann-Al-Ahmad M, Gutwald R, Lauer G, Hubner U, Schmelzeisen R. How to optimize seeding and culturing of human osteoblast-like cells on various biomaterials. *Biomaterials* 2002; 23(16): 3319-28.
26. van Griensven M, Zeichen J, Tschernig T, Seekamp A, Pape HC. A modified method to culture human osteoblasts from bone tissue specimens using fibrin glue. *Exp Toxicol Pathol* 2002; 54(1): 25-9.
27. Hagewald S, Pischon N, Jawor P, Bernimoulin JP, Zimmermann B. Effects of enamel matrix derivative on proliferation and differentiation of primary osteoblasts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004; 98(2): 243-9.
28. van der PA, Nijweide PJ. Isolation and purification of osteocytes. *J Bone Miner Res* 1992; 7(4): 389-96.
29. Blom EJ, Klein-Nulend J, Klein CP, Kurashina K, van Waas MA, Burger EH. Transforming growth factor-beta1 incorporated during setting in calcium phosphate cement stimulates bone cell differentiation in vitro. *J Biomed Mater Res* 2000; 50(1): 67-74.
30. Declercq H, van den V, De Maeyer E, Verbeeck R, Schacht E, De Ridder L, et al. Isolation, proliferation and differentiation of osteoblastic cells to study cell/biomaterial interactions: comparison of different isolation techniques and source. *Biomaterials* 2004; 25(5): 757-68.
31. Fennis JP, Stoelinga PJ, Jansen JA. Mandibular reconstruction: a histological and histomorphometric study on the use of autogenous scaffolds, particulate cortico-cancellous bone grafts and platelet rich plasma in goats. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2004; 33(1): 48-55.
32. Turhani D, Weissenbock M, Watzinger E, Yerit K, Cvikl B, Ewers R, et al. Invitro study of adherent mandibular osteoblast-like cells on carrier materials. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2005; 34(5): 543-50.
33. Trojani C, Weiss P, Michiels JF, Vinatier C, Guicheux J, Daculsi G, et al. Three-dimensional culture and differentiation of human osteogenic cells in an injectable hydroxypropylmethylcellulose hydrogel. *Biomaterials* 2005; 26(27):5509-17.
34. Weber M, Steinert A, Jork A, Dimmler A, Thurmer F, Schutze N, et al. Formation of cartilage matrix proteins by BMP-transfected murine mesenchymal stem cells encapsulated in a novel class of alginates. *Biomaterials* 2002; 23(9): 2003-13.
35. Mastrogiacomo M, Papadimitropoulos A, Cedola A, Peyrin F, Giannoni P, Pearce SG, et al. Engineering of bone using bone marrow stromal cells and a silicon-stabilized tricalcium phosphate bioceramic: evidence for a coupling between bone formation and scaffold resorption. *Biomaterials* 2007; 28(7): 1376-84.
36. Kuang WY, Zhou XF, Zhang GS, Liu LH, Chen SF, Li RJ, et al. In vitro expansion of the adult human bone marrow mesenchymal stem cells for clinic application in HSCT. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* 2008; 16(3): 633-8.
37. Akbari M, Nikbakht M, Sobhani A. Expression of alkaline phosphatase during osteogenic differentiation of rat bone marrow stromal cells. *Yakhteh Med J* 2002; 3(11): 131-6.
38. Li Z, Ramay HR, Hauch KD, Xiao D, Zhang M. Chitosan-alginate hybrid scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2005; 26(18): 3919-28.

Received: 2009.1.14  
Accepted: 2009.7.23**Access to a Three Dimensional Osteoblasts Culture in Iran****Abbasali Rabie PhD<sup>\*</sup>, Ebrahim Esfandiari PhD<sup>\*\*</sup>,  
Mehrfarin Fesharaki MSc<sup>\*\*\*</sup>, Masoomeh Sanaie MSc<sup>\*\*\*\*</sup>,  
Bahram Aminmansur MD<sup>\*\*\*\*\*</sup>, Batool Hashemibeni PhD<sup>\*</sup>**<sup>\*</sup> Assistant Professor, Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.<sup>\*\*</sup> Professor, Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.<sup>\*\*\*</sup> Department of Physiology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.<sup>\*\*\*\*</sup> Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Jahrom University of Medical Sciences, Jahrom, Iran.<sup>\*\*\*\*\*</sup> Assistant Professor, Department of Neurosurgery, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.

<b>Background:</b>	<b>Abstract</b> The problem of bone defects during treatments of bone lesions, especially cranial trauma, and also during craniotomy operations indicates isolation of osteoblasts and culturing them for filling these bone effects.
<b>Methods:</b>	Bone tissue specimens were obtained from 6 patients' carvaria undergoing craniotomy surgery operations in Al-zahra teaching hospital and transferred to lab. These specimens were cut into small pieces measuring 1 × 1 mm and put in Petri dishes having culture medium and then transferred to the incubator. The mean interval of observed cellular outgrowth was 9-10 days. After 2 weeks, the cells in cultures reached confluency. First passage cells were detached from Petri dishes, using Trypsin EDTA, and were divided in two portions. One portion was used for monolayer osteoblast culture, and the other, was added to alginate gel. The activity of these cells was tested by Alkalin phosphatase, Von kossa and Azan staining. Cell viability was also tested by Trypan blue staining.
<b>Findings:</b>	The morphology of osteoblasts in monolayer cultures appeared fusiform and fibroblastic, while in the alginate beads, cells appearance was round. Alkaline phosphatase staining method confirmed the presence of osteoblasts. Von kossa and Azan staining demonstrated, mineralized and organised matrix in both groups. The number of harvested cells in day 1 and day 21 were significantly different in each group (P < 0.001). In addition, there was significant difference in the mean of cells number and viability between monolayer cultures and alginate beads in day 21 (P < 0.001).
<b>Conclusion:</b>	This study showed that osteoblasts can come out from bones in dish culture without using any enzyme; and sodium Alginate gel supports cell viability and proliferation of osteoblasts cells significantly in comparison with the monolayer culture.
<b>Key words:</b>	<b>Osteoblast, Monolayer culture, Alginate, Alkaline phosphatase.</b>
<b>Page count:</b>	11
<b>Tables:</b>	1
<b>Figures:</b>	7
<b>References:</b>	38
<b>Address of Correspondence:</b>	Ebrahim Esfandiari PhD, Professor, Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran E-mail: esfandiari@med.mui.ac.ir