Archive of SID

● مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی کرمان، دورهٔ‌سیزدهم، شمارهٔ ۲، ص ۶۶-۵۷، ۱۳۸۵

مقالهٔ پژوهشی

بررسی قابلیت کشت سلول‌های بنیادی استخوان فک انسان در آزمایشگاه

دکتر جواد فاریابی [*۱]، دکتر سیدنورالدین نعمت‌اللهی ماهانی [۲]، دکتر رضا ملک‌پور افشار [۳]، دکتر علی نعمتی‌پور [۴] و دکتر سورنا فردیسی [۵]

خلاصه

مقدمه: هدف از انجام این مطالعه کشت سلول‌های استخوانی انسان و دست‌یابی به اطلاعات عملی در زمینه کشت این سلول‌ها بود.

روش: در این مطالعه قطعات استخوانی و پریوستی پس از جداسازی از فک انسان و انتقال به آزمایشگاه به قطعات کوچک تقسیم شدند و تحت تأثیر آنزیم‌های تریپسین و کلاژناز سلول‌های موجود در قطعات بافتی آزاد شده و سه کشت اولیه از سلول‌های بافت استخوانی، پریوستی و اندوستی فراهم شد. پس از گذشت زمان لازم برای رشد نمونه‌ها، از آنها لامل تهیه و با رنگ‌آمیزی آلکالین فسفاتاز درصد سلول‌های آلکالین فسفاتاز مثبت اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: بر پایه نتایج حاصله متوسط مدت زمان مطلوب رشد سلول‌ها در حد پوشاندن کف فلاسک ۲۳ روز بود.

نتیجه‌گیری: تحت شرایط خاص و استریل آزمایشگاهی سلول‌های استخوانی فک انسان قابل کشت دادن می‌باشند که می‌توان با انجام کشت سه بعدی آنها از این پروسه در بازسازی نقایص ناحیه فک و صورت استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی : کشت سلول‌های بنیادی، استئوبلاست، فک انسان

۱ـ استادیار گروه جراحی دهان، فک و صورت، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی –درمانی کرمان ۲- استادیار گروه آناتومی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی –درمانی کرمان ۳- استادیار گروه پاتولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی –درمانی کرمان ۴- دندانپزشک، بهداری نیروی انتظامی کرمان ۵- دندانپزشک، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی- درمانی شیراز

* **نویسنده مسؤول:** گروه جراحی دهان، فک و صورت، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان ● **آدرس پست الکترونیک :** jfr@kmu.ac.ir

دریافت مقاله: ۱۳۸٤/۹/۵ **دریافت مقاله اصلاح شده :** ۱۳۸۵/۳/۲۸ **پذیرش مقاله:** ۱۳۸۵/٤/۱٤

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

تاکنون در اعمال جراحی فک و صورت از دو روش اساسی: ۱) استئوتومی استخوان‌ها و قرار دادن آنها در محل جدید ۲) افزودن (Augmentation) یا کاستن (Reduction) از استخوان‌ها برای تغییرشکل و اصلاح نقایص اکتسابی و مادرزادی استخوان‌های صورت استفاده شده است که این روش‌ها دارای معایب زیر می‌باشند:

۱) تهیه آنها محدودیت دارد.
۲) در محل دهنده باعث موربیدیتی می‌شوند.
۳) شکل دادن به آنها مشکل است.
۴) خورده شدن(Resorption) آنها غیر قابل پیش‌بینی است

جهت غلبه بر مشکلات یاد شده در بازسازی نقایص استخوانی ناحیه فک و صورت، استفاده از روش جدید مهندسی بافتی (Tissue engineering) یک راه حل مناسب برای تهیه ساختمان‌های بافتی است. در این روش ابتدا سلول‌های استخوانی از طریق جراحی و برداشت ازنواحی مختلف بدن از جمله فک انسان تهیه و در آزمایشگاه به صورت تک لایه (monolayer) کشت داده می‌شود (۱،۱۸) و سپس ادامه کشت سلولی در یک داربست (scaffold) مناسب قابل جذب از جنس کلاژن، آلژینات، پلی‌گلیکولید و پلی‌لاکتیک انجام وسلول‌ها به صورت سه بعدی رشد داده می‌شوند (۱۴). در ادامه روند کشت سلولی می‌توان داربست قابل جذب را به شکل نقص استخوانی مورد نظر که قرار هست بازسازی شود ساخت و از آن جهت ترمیم نواحی مختلف فک وصورت استفاده کرد (۵،۱۳،۱۶) و با هزینه‌ای بسیار کمتر از آنچه که فعلاً جهت بازسازی این‌گونه نقایص صرف می‌شود و با نتایج بسیار بهتر به درمان این‌گونه بیماران پرداخت. لذا با توجه به انجام تحقیقات مشابه در خارج از کشور (۲،۶،۹،۱۰،۱۲) و عدم وجود سابقه انجام این تحقیق در ایران بر آن شدیم تا ضمن کشت سلول‌های استخوانی انسان به صورت تک لایه (Monolayer) و کسب اطلاعات لازم، زمینه برای کشت سلول‌های استخوانی در الگوهای سه بعدی در تحقیقات بعدی فراهم شود. همچنین با توجه به نبودن اطلاعات کافی در خصوص مقایسه کشت سلول‌های استخوانی با منشأ پریوستی و استخوانی در این مورد نیز اقدام گردید.

روش بررسی

پس از توضیح دادن در مورد اهداف طرح و اخذ رضایت بیماران، ۴ نفر بیمار مراجعه‌کننده به بخش جراحی دانشکده دندانپزشکی کرمان ویک نفر از بیماران کاندید عمل جراحی ترمیم شکستگی فک در بیمارستان شهید باهنر کرمان در این مطالعه آزمایشی شرکت داده شدند. در اکثر تحقیقات مشابه قبلی نیز همین تعداد نمونه وجود داشته است. بیماران انتخاب شده مبتلا به هیچ نوع بیماری استخوانی نبوده، سابقه بیماری سیستمیک نداشته و در محدوده سنی ۵۰-۲۰ سال بودند. جراحی کلیه بیماران به جز بیمار شماره ۳ توسط بی حسی موضعی و در بخش جراحی دانشکده دندانپزشکی کرمان انجام شد. از بیمار شماره ۳ تحت بیهوشی عمومی نمونه لازم جهت کشت سلولی تهیه شد و سپس ترمیم شکستگی‌های فک بالا و پایین انجام شد. لازم به توضیح است که به علت دست‌یابی بهتر و آسان‌تر به استخوان اسفنجی کلیه نمونه‌ها از فک بالای بیماران برداشت شده است.

روش تهیه نمونه

ابتدا بلوکی از استخوان فک بیمار با اندازه تقریبی ۵×۵×۵ میلی‌متر تحت شرایط استریل و توسط فرز ظریف همراه با شستشوی فراوان و یا توسط استئوتوم ظریف یا رانژور (Rangeur) و قطعه‌ای از پریوست استخوان فک به اندازه ۱×۱ سانتی‌متر جدا شده و در محیط Hanck's در لوله‌های مخصوص به آزمایشگاه کشت سلولی منتقل و سپس طی مراحل ذیل کشت سلول‌های استئوبلاست انجام شد.

مراحل تهیه سلول‌های شبه استئوبلاست از قطعات استخوان اسفنجی:

پس از انتقال بلوک‌های استخوانی به آزمایشگاه کشت سلولی واقع در آزمایشگاه ویروس‌شناسی دانشکده پزشکی کرمان به کمک تیغ جراحی استخوان به قطعات حدود ۱ میلی‌متر خرد شده و پس از شستشو با بافرفسفاته PBS (سیگما-آمریکا) به پلیت حاوی ۱۰-۵ میلی لیتر آنزیم تریپسین- EDTA (سیگما-آمریکا) منتقل شدند. پلیت به مدت ۳۰ دقیقه در انکوباتور CO_2 در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفته و هر چند دقیقه یک بار پلیت محتوی قطعات استخوان تکان داده می‌شد. پس از پایان هضم به کمک آنزیم تریپسین ،نیم میلی‌لیتر(NCS) Newborn calf serum (Gibco-استرالیا) جهت خنثی شدن آنزیم به پلیت اضافه شد و محلول حاوی سلول‌ها به کمک پیپتور به لوله استریل منتقل و در ۱۵۰۰ دور به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ گردید. سپس سلول‌های سانتریفوژ شده به فلاسک ۲۵ سانتی‌متر مربع حاوی محیط کشت DMEM F12 (سیگما-آمریکا)، 10% FBS (seromed-استرالیا)،۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر پنی‌سیلین (سیگما-آمریکا)، ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر استرپتومایسین (سیگما-آمریکا) و۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر اسید اسکوربیک (سیگما-آمریکا) منتقل شد که نمونه اندوستی

www.SID.ir

Archive of SID

را تشکیل می‌داد. قطعه‌های استخوانی باقیمانده نیز در یک پلیت جداگانه درهمان محیط کشت داده شدند که نمونه با منشأ استخوانی را تشکیل می‌دادند (۳،۱).

مراحل تهیه سلول‌های شبه استئوبلاست از پریوست

قطعه پریوست جدا شده از فک بیمار به قطعات کوچک تقسیم شده و توسط محلول PBS شستشو داده شدند. سپس قطعات پریوست به پلیت منتقل گردیدند. به یکی از پلیت‌ها محیط کشت مشابه قطعات استخوان اسفنجی اضافه و در انکوباتور قرار داده شد و به پلیت دیگرسه میلی‌لیتر آنزیم کلاژناز(سیگما-آمریکا) اضافه شد و به مدت ۲ ساعت در انکوباتور CO_2 با دمای ۳۷ درجه قرارگرفت. هر ۱۵ دقیقه پلیت حاوی قطعات پریوست تکان داده می‌شد و بعد از گذشت ۲ ساعت و هضم قطعات پریوستی توسط آنزیم کلاژناز، محتوی پلیت به لوله استریل منتقل و با ۱۵۰۰ دور به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شد. سپس ته‌نشین سلولی به فلاسک ۲۵ سانتی‌متر مربع حاوی محیط کشت منتقل شد.

فلاسک‌های حاوی سلول‌ها در انکوباتور CO_2 و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری و میزان رشد سلول‌ها به کمک میکروسکوپ معکوس، روزانه بررسی می‌شد. پس از ۸۵ الی ۹۰ درصد پوشش سلولی کف فلاسک، سلول‌ها به کمک تریپسین از فلاسک کنده و معلق می‌شدند. سلول‌های به دست آمده جهت وا کشت‌های بعدی استفاده می‌شدند.

بررسی سلول‌های شبه استئوبلاست حاصل از کشت بافت‌های مختلف

جهت بررسی وجود سلول‌های استئوبلاست تست الکالین فسفاتاز (سیگما-آمریکا) انجام می‌شد. بدین ترتیب که تعدادی از سلول‌ها روی یک لامل کشت داده می‌شد. سپس لامل حاوی سلول‌ها به مدت ۲ دقیقه در محلول استون- فرمالدئید تثبیت و بعد از آن ۱۵ دقیقه در محلول Diazonioum قرار داده می‌شد که این عمل موجب تشکیل رنگ قرمز - ارغوانی در جایگاه‌های حاوی پیگمان‌هایALP می‌شود. سپس لام‌ها با هماتوکسیلین‌ائوزین رنگ‌آمیزی زمینه شده وسایر سلول‌ها رنگ خاکستری به خود می‌گرفتند و نهایتاً لامل برای بررسی میکروسکوپی به آزمایشگاه فرستاده می‌شد. این بررسی میکروسکوپی توسط دو نفر متخصص پاتولوژی پزشکی جداگانه و بدون اطلاع یکدیگر وبا فاصله زمانی ۴ ماه انجام شده و درصد سلول‌های استئوبلاست اعلام شده معدل‌گیری و گزارش شده است. متخصص پاتولوژی دوم از میزان نتایج اعلام شده توسط پاتولوژیست اول اطلاعی نداشت و لام‌ها به صورت blind در اختیار وی قرار می‌گرفت.

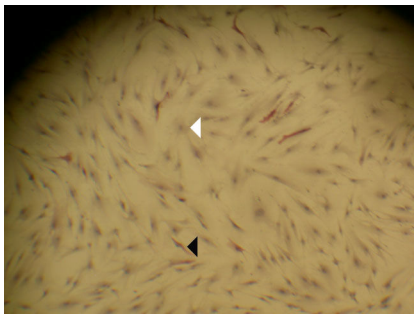
نتایج

نمونه شماره یک

این نمونه از سمت راست فک بالای مردی ۳۰ ساله در ناحیه دندان سانترال شامل پریوست و استخوان اسفنجی برداشته شد و نتایج حاصله به شرح زیر می‌باشد:

الف : روند رشد سلول‌ها با منشأ پریوستی:

۱۴ روز پس از شروع کشت، سلول‌های با منشأ پریوستی دارای رشد قابل ملاحظه‌ای بودند. این سلول‌ها در ادامه مراحل آزمایشگاهی روی لامل و داخل پلیت کشت داده شدند و ۲۲ روز پس از کشت اولیه رنگ‌آمیزی آلکالین فسفاتاز انجام و در field مربوطه روی لامل شمارش سلولی انجام و معادل ۷/۵٪ سلول‌های شمارش شده استئوبلاست گزارش شد که در شکل ۱ اسلاید رنگ‌آمیزی مربوطه نشان داده شده است.



شکل ۱: *اسلاید رنگ‌آمیزی شده نمونه شماره ۱*

◁ *سلول استئوبلاستی* ◀ *سلول فیبروبلاستی*

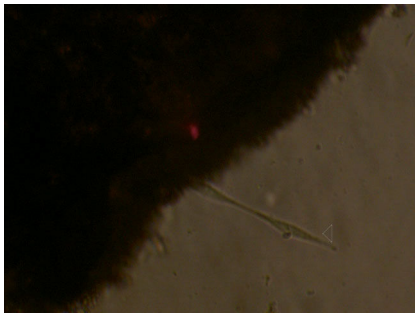
متعاقباً سلول‌های حاصل از پاساژ اول با منشأ پریوستی کشت داده شده و ۴۲ روز بعد از کشت اولیه سلول‌های حاصل از پاساژ دوم شمارش سلولی شدند که معادل ۳۶/۵٪ وجود سلول‌های استئوبلاست گزارش گردید.

ب : روند رشد سلول‌های با منشأ بافت استخوانی

۱۶ روز پس از کشت اولیه، سلول‌های مشتق شده از نمونه بافت استخوانی دارای رشد قابل ملاحظه‌ای در مقایسه با سلول‌های مشتق شده از پریوست نبودند اما جدا شدن سلول‌های استئوبلاست از توده استخوانی و رشد آنها مشاهده می‌شد. (شکل ۲). سلول‌ها با تعویض محیط کشت به صورت ۱ تا ۳ روز در میان با توجه به سرعت رشد، تحت نظر قرار گرفتند. این سلول‌ها ۶۲ روز پس از کشت اولیه رنگ‌آمیزی شدند که تعداد سلول‌های استئوبلاست معادل ۴۶/۴٪ گزارش گردید.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۲: *سلول‌های رشد کرده از نمونه استخوانی نمونه شماره یک*

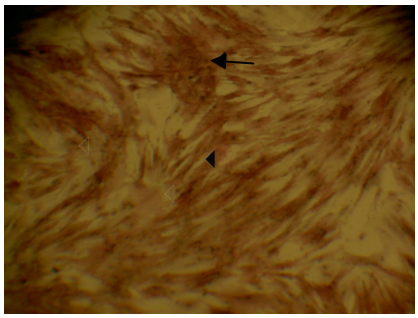
◄ سلول‌های جدا شده از توده استئوسیت

نمونه شماره دو

این نمونه از خانمی ۱۸ ساله از ناحیه سمت راست فک بالا دندان ۴ شامل پریوست و استخوان تهیه و به آزمایشگاه منتقل گردید. در این بیمار علاوه بر رشد دادن سلول‌ها با منشأ پریوستی و بافت استخوانی، از نمونه اندوستیوم نیز استفاده شد. ۱۱ روز پس از کشت اولیه، نمونه‌های مشتق شده از اندوستیوم رشد کافی داشتند اما نمونه مشتق شده از بافت استخوانی و نمونه پریوستی همراه با کلاژناز رشد کافی نداشتند (در روش اجرا نمونه‌های پریوستی در دو پلیت جداگانه کشت داده شدند که در یک پلیت قطعات پریوستی مستقیم در محیط کشت قرار داده شدند و در پلیت دیگر قطعات به مدت ۲ ساعت در کلاژناز قرار گرفتند. (کلاژناز باعث جدا شدن اتصالات سلولی و هضم قطعات پریوست می‌شود) اما نمونه پریوستی بدون کلاژناز مقداری رشد کرده بود.

الف : روند رشد سلول‌های با منشأ اندوستیوم

۱۶ روز پس از کشت اولیه درصد سلول‌های استئوبلاست ۴۷٪ گزارش شد که در شکل ۳ اسلاید رنگ‌آمیزی شده آنها نشان داده شده است.

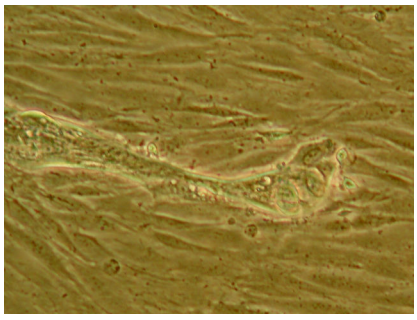


شکل ۳ : *اسلاید رنگ‌آمیزی شده نمونه شماره دو*

◄ سلول استئوبلاستی ◄ سلول فیبروبلاستی

ب – روند رشد سلول‌های با منشأ پریوستی

نمونه‌های پریوستی بدون کلاژناز ۱۶ روز متعاقب کشت اولیه دارای تجمع سلولی قابل توجهی بودند که در شکل ۴ مشهود است و در رنگ‌آمیزی انجام شده وجود ۲ – ۱ درصد سلول‌های استئوبلاست گزارش شد



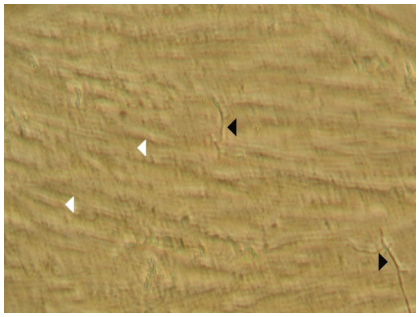
شکل ٤ : *سلول‌های رشد کرده از نمونه پریوستی نمونه شماره دو*

ج) روند رشد سلول‌ها با منشأ بافت استخوانی

۲۸ روز متعاقب کشت اولیه در دو اسلاید رنگ‌آمیزی شده جداگانه در یکی ۳۰/۸٪ سلول‌ها و دیگری ۱۲٪ آنها استئوبلاست گزارش شد.

نمونه شماره سه

این نمونه از فک بالای پسری ۱۶ ساله که دارای شکستگی‌های متعدد فک بالا و پایین بود تحت بیهوشی عمومی شامل پریوست و استخوان برداشته شد و ۹ روز بعد از کشت اولیه از رشد سلول‌های با منشأ اندوستی اسلاید ۵ تهیه شد. به علت آلودگی قارچی که در این اسلاید مشخص است، نگهداری نمونه و ادامه کشت امکان‌پذیر نشد. نمونه پریوستی این بیمار نیز به علت آلودگی قارچی قادر به ادامه روند رشد سلولی نبود.



شکل ۵ : *اسلاید رنگ‌آمیزی شده نمونه شماره سه*

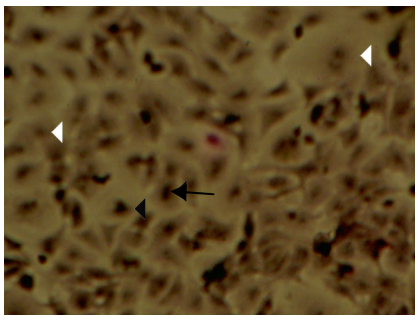
◄ آلودگی قارچی ◄ سلول‌های رشد کرده با منشأ اندوستی

www.SID.ir

Archive of SID

نمونه شماره چهار

این نمونه از سمت راست فک بالای خانمی ۵۵ ساله شامل پریوست و استخوان اسفنجی برداشته شد اما به علت اسکلروتیک‌بودن استخوان اسفنجی بیمار که قوامی شبیه استخوان کورتکس داشت این نمونه با تأخیر بسیار زیاد شروع به رشد نمود و ۱۱ روز پس از کشت اولیه، سلول‌های اندوستی رشد بسیار کمی داشتند. همچنین سلول‌های حاصل از کشت قطعات پریوستی ۲۶ روز پس از کشت اولیه و متعاقب پاساژ اول دارای رشد قابل قبولی بودند که در شکل ۱۴ قابل مشاهده است. با این وجود در گزارش شمارش سلولی نمونه اندوستی این بیمار و متعاقب پاساژ دوم رشد ۱ درصد برای سلول های استئوبلاستی گزارش شد (شکل ۶).



شکل ٦: *اسلاید رنگ‌آمیزی شده نمونه شماره چهار*

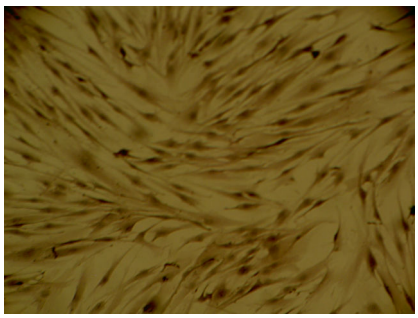
◁ *سلول استئوبلاستی* ← *سلول فیبروبلاستی*

نمونه شماره پنج

این نمونه از خانمی ۲۳ ساله از فک بالا سمت چپ ناحیه دندان پره مولر شامل پریوست و استخوان اسفنجی برداشته شد.

الف : روند رشد سلول‌ها با منشأ پریوستی

۱۵ روز پس از کشت اولیه در سلول‌های پریوستی آزاد شده به وسیله کلاژناز رشد مناسبی دیده شد. پس از پاساژ دوم از این سلول‌ها و یک ماه پس از کشت اولیه نیز سلول‌ها رشد مناسبی داشتند در صورتی که سلول‌های پریوستی بدون کلاژناز تا ۱۵ روز بعد از کشت اولیه رشدی نداشتند. در این نمونه علی‌رغم مشاهده رشد مناسب سلول‌ها در بررسی‌های روزانه در اسلاید رنگ‌آمیزی شده درصد سلول‌های استئوبلاستی یک درصد گزارش شد (شکل ۷).



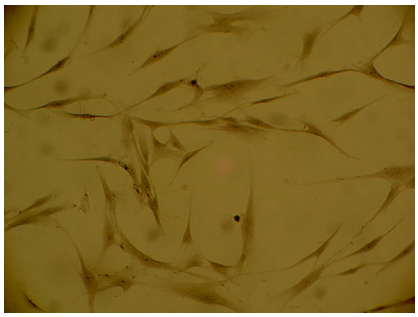
شکل ۷ : *اسلاید رنگ‌آمیزی شده سلول‌های پریوستی نمونه شماره پنج*

ب : روند رشد سلول‌های با منشأ بافت استخوانی

۱۵ روز بعد از کشت اولیه این سلول‌ها دارای رشد مطلوبی بودند و درصد سلول‌های استئوبلاست گزارش شده از اسلاید رنگ‌آمیزی شده ۸ درصد بود

ج : روند رشد سلول‌ها با منشأ اندوستیوم

این سلول‌ها ۱۵ روز بعد از کشت اولیه دارای ۳ درصد استئوبلاست در اسلاید رنگ‌آمیزی شده بودند (شکل ۸) که درپاساژ اول این میزان به ۵٪ افزایش یافت.



شکل ۸: *اسلاید رنگ‌آمیزی شده سلول‌های با منشأ اندوستی نمونه شماره پنج*

خلاصه نتایج حاصل از کشت قطعات استخوان و پریوست به صورت مقایسه ای در جدول یک آمده است.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱: *خلاصه نتایج حاصل از کشت قطعات استخوان و پریوست در پنج نمونه مورد بررسی*

شماره نمونه	جنس	سن	محل نمونه‌برداری	نحوه رشد و درصد سلولی در پاساژهای مختلف با منشأ پریوست			نحوه رشد و درصد سلولی در پاساژهای مختلف با منشأ اندوست		نحوه رشد و درصد سلولی در پاساژهای مختلف با منشأ استئوسیت		
				شروع رشد (روز)	درصد سلولی PI†	درصد سلولی PII††	شروع رشد (روز)	درصد سلولی PI	شروع رشد (روز)	درصد سلولی PI	درصد سلولی PII
۱	مرد	۲۳	سانترال بالا راست	۱٤	*٤/۹	۳٦/۵	-	-	٦۲	٤٦/٤	-
۲	زن	۱۸	پریمولربالا راست	۱٦	۲-۱	-	۱٦	٤۷	۲۸	۱۲** ۳۰/۸	۱۱
۳	مرد	۱٦	پریمولر بالا چپ	آلودگی قارچی			۹	آلودگی قارچی		آلودگی‌قارچی	-
٤	زن	۵۵	نیش بالا راست	۲٦	-	۱	-	-	-	-	-
۵	زن	۲۳	پریمولر بالا چپ	۱۵	۱		۱۵	۵	۱۵	۸	

* تمام اعداد ذکر شده به درصد می‌باشد.

** از این نمونه دو اسلاید رنگ‌آمیزی و شمارش شده است.

†: پاساژ اول

††: پاساژ دوم

بحث و نتیجه‌گیری

تاکنون برای تحقیق در مورد کشت سلول‌های استخوانی (استئوبلاست) از سلول‌های مغز استخوان (۱۲،۱۰،۶)، سر فمور (۹)، فک تحتانی (۱۷)، فک فوقانی (۱۸)، پریوستیوم فک تحتانی (۱۳)، رده‌های سلولی مشخص استئوسارکوم انسانی (CAL 72 human osteosarcoma cell line) (۱۵)،Tibia و فمور انسان دو ساعت بعد از مرگ نیز استفاده شده است (۱۱) که دو روش آخر برای مطالعه سلول‌های طبیعی انسانی مناسب نمی‌باشند (۶).

در این مطالعه مقدماتی از استخوان اسفنجی ،پریوست و استخوان کورتیکال فک بالا استفاده شده است. لازم به توضیح است که با توجه به بررسی منابع معتبر موجود، تحقیقی در مورد مقایسه نتایج حاصل از کشت با هر کدام از روش‌های فوق انجام نشده است.

محیط کشت مورد استفاده در مطالعه حاضرDMEM -F12 می‌باشد که تا حدودی مشابه با اکثر تحقیقات انجام شده در این زمینه می‌باشد (۹،۱۰،۱۱،۱۲،۱۳،۱۷). گر چه در تحقیقات دیگر از α-MEM (Minimum Essential Medium-α modification) نیز استفاده شده است (۸،۱۵،۱۸)، توجه به این نکته که غلظت مواد مغذی محیط DMEM بیشتر از α-MEM می‌باشد باعث شد که Coelho تحقیقی در مورد مقایسه این دو محیط کشت انجام دهد و نتایج حاصل از آن نشان داد که پرولیفراسیون سلولی در ۲ محیط مشابه است اما فعالیت فسفاتاز و رسوب مواد معدنی در DMEM کمتر می‌باشد (۲).

فاصله زمانی تعویض محیط کشت در این مطالعه بر اساس مشاهده روزانه میزان رشد سلول‌ها و بررسی نیاز به تعویض محیط بوده که بطور متوسط هر ۳ - ۲ روز یک بار می‌باشد. در صورتی که در تحقیق Schecroun و همکاران بر روی سلول‌های مغز استخوان انسان، زمان تعویض محیط کشت هر ۷ روز یک بار ذکر شده است (۱۲). در تحقیق Coelho و همکاران این زمان به دو هفته یک بار افزایش یافته است (۲) و در تحقیق Kim و همکاران فقط نیمی از محیط کشت هر ۳ - ۲ روز یک بار تعویض شده است (۸) و در تحقیق Li و همکاران هر ۳ تا ۴ روز یک بار تعویض انجام شده است (۹).

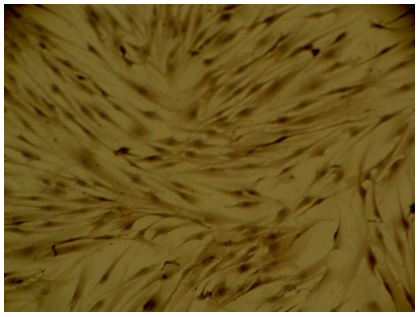
شرایط آزمایشگاهی مورد استفاده در این تحقیق جهت قرار دادن فلاسک و پلیت های حاوی سلول و محیط کشت مثل وجود درجه حرارت ۳۷ درجه سانتیگراد، Co2 ۵٪ و رطوبت هوای ۹۵٪ مشابه سایر تحقیقات انجام شده بود (۱۲،۱۳،۱۵،۱۷). جهت کشت دادن سلول‌های استئوبلاست در این مطالعه از فلاسک ها و پلیت‌ها استفاده شد بدون این که هیچ‌گونه تغییری در کف آنها ایجاد شود. در صورتی که در تحقیق Van Griensven و همکاران از خراشیدن کف پتری دیش‌های مورد استفاده توسط اسکالپل، جهت ایجاد تماس پایدار استئوبلاست‌ها با کف

www.SID.ir

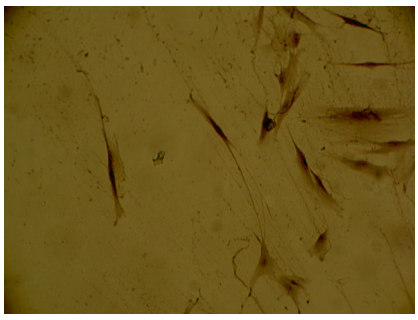
Archive of SID

پتری دیش استفاده شده و همین طور از Fibrin glue جهت چسبیدن بیشتر سلول‌ها استفاده شده و ادعا شده است که این ماده بدون تغییر محیط فیزیولوژیک رشد، باعث چسبندگی بیشتر سلول‌ها می‌شود (۶). در سایر تحقیقات انجام شده نیز در کف فلاسک‌ها، پلیت‌ها و یا پتری‌دیش‌ها همانند تحقیق حاضر هیچ گونه تغییری داده نشده است (۸،۱۱،۱۲،۱۷،۱۸) که با توجه به نیاز سلول‌های استئوبلاستی در حال تکثیر، به چسبیدن به کف محیط مورد نظر استفاده از روش پیشنهادی Van Griensven می‌تواند به افزایش تعداد سلول‌ها کمک قابل توجهی نماید. در بعضی تحقیقات این زمان هر دو روز یک بار (۱۳) و دو تا سه بار در هفته هم ذکر شده است (۱۷).

در این تحقیق جهت آماده‌سازی نمونه‌های استخوانی و پریوستی و آزاد شدن بهتر سلول‌ها از کلاژناز استفاده شده و در نمونه‌هایی که در آنها از کلاژناز استفاده شد در مقایسه با نمونه‌هایی که از کلاژناز استفاده نشد، رشد بهتر و سریع‌تر استئوبلاست‌ها مشاهده گردید (شکل ۹و۱۰).



شکل ۹ : *نمونه کلاژناز زده شده*



شکل ۱۰: *نمونه بدون کلاژناز*

در تحقیق Schimming و همکاران نیز جهت کشت استئوبلاست‌ها از پریوست فک بالا و از کلاژناز برای هضم نمونه‌های پریوستی استفاده شده است (۱۳) در تحقیق Sanchez و همکاران علاوه بر استفاده از کلاژناز از هیالورونیداز نیز برای کمک به هضم بهتر نمونه‌های استخوانی ناحیه ساب کندورال فمور و تیبیا استفاده شده است (۱۱). همچنین در تحقیق Van Griensven و همکاران برای هضم بهتر نمونه‌های استخوانی لگن از کلاژناز استفاده شده است (۶). البته در بسیاری از تحقیقات انجام شده بر روی نمونه‌های استخوانی، از کلاژناز جهت هضم اولیه نمونه‌ها استفاده نشده است (۹،۱۰،۱۲،۱۷،۱۸). ذکر این نکته ضروری است که استفاده از کلاژناز جهت جداسازی سلول‌های استئوبلاست از نمونه‌ها (که غالباً هم همین ماده مورد استفاده قرار می‌گیرد) برای چندین ساعت باعث آزاد شدن فراوان فیبروبلاست‌ها به همراه استئوبلاست‌ها می‌شود که خود یک مشکل جدی در ادامه پروسه کشت استئوبلاست‌ها خواهد بود (۶).

جهت کنترل آلودگی نمونه‌ها در تحقیقات مختلف از آنتی‌بیوتیک‌های متعدد با غلظت‌های مختلف و داروهای ضد قارچ استفاده شده است که در این تحقیق نیز از پنی‌سیلین و استرپتومایسین و از Fungizone به عنوان داروی ضد قارچ استفاده شد. توجه به ایجاد شرایط استریل در محیط آزمایشگاه و محیط کشت در کشت سلول موضوعی مهم و قابل توجه می‌باشد. همچنین در طی جداسازی نمونه‌ها از محل اولیه بدن موجود زنده، نیز بایستی به این امر توجه نمود. چون در صورت آلوده شدن نمونه‌ها حتی با اضافه کردن آنتی بیوتیک‌های مختلف و ضد قارچ ممکن است کنترل رشد میکروارگانیسم‌ها در محیط بسیار مساعد و مغذی کشت امکان‌پذیر نباشد. کما این که علی‌رغم دقت فراوان در برداشتن نمونه تحت شرایط استریل اطاق عمل و وسایل عمل، در یک بیمار دارای شکستگی‌های متعدد فکی (نمونه ۳) به علت آلودگی بافت‌های استخوانی و پریوست داخل دهان علی‌رغم شستشوی ناحیه عمل در چندین مرحله توسط بتادین در روند کشت سلولی اختلال ایجاد شد و پس از ۹ روز آلودگی شدید قارچی اجازه رشد به سلول‌های استئوبلاست را نداد.

در این مطالعه جهت اثبات وجود سلول‌های استئوبلاست در محیط کشت از نتایج حاصل از تست آلکالین فسفاتاز استفاده شد که با شمارش سلول‌های استئوبلاست متعاقب انجام این تست درصد سلول‌های استئوبلاستی محاسبه شد. اثبات وجود سلول‌های استئوبلاست با استفاده از این تست در تحقیقات مختلف مورد استفاده قرار گرفته است (۶،۱۵،۱۸) ولی در بعضی تحقیقات

www.SID.ir

Archive of SID

دیگر گزارش میزان رشد سلولی به صورت گزارش تعداد سلول‌ها در یک سی‌سی محیط کشت می‌باشد (۶،۹،۱۰،۱۸). لازم به توضیح است که برداشت استخوان یا پریوست از بدن و انتقال آن به محیط کشت به معنی الزام پیشرفت روند رشد سلول‌های استئوبلاست نمی‌باشد. کیفیت استخوان ناحیه از نظر میزان استخوان اسفنجی و آزاد شدن سلول‌ها قبل از انتقال به محیط کشت و خصوصاً آلودگی‌های میکروبی احتمالی، همگی می‌توانند بر روی رشد و یا عدم رشد سلول‌ها تأثیر بگذارند که در خصوص نمونه‌های شماره ۳ و ۴ مطالعه حاضر این موضوع مشهود است. نمونه شماره ۳ به علت آلودگی قارچی قادر به ادامه رشد نبود و نمونه شماره ۴ به علت اسکلروتیک بودن شدید استخوان اسفنجی برداشته شده قادر به رشد ایده‌آل نبود. مشابه این موضوع در تحقیق Van Griensven و همکاران نیز اتفاق افتاده و ذکر شده که در برداشتن نمونه از کندیل فمور و سر فمور در دو بیمار استئوبلاست‌ها هیچ‌گونه رشدی نداشته‌اند (۶).

در این مطالعه متوسط مدت زمان مطلوب رشد سلول‌ها در حد پوشاندن کف فلاسک ۲۳ روز بود. در صورتی که در تحقیقات مشابه این زمان ۱۲ روز (۶)، ۱۰ روز (۷)، ۱۲-۱۰ روز (۱) و ۵-۴ هفته (۱۸) بوده است. علت تفاوت در مدت زمان پوشش سطح فلاسک به استفاده از مواد مختلف اضافی در محیط‌های کشت مثل اسکوربیک اسید (۴،۱۵،۱۷) دگزامتازون (۱۵،۱۷)، بتاگلیسروفسفات (۱۵،۱۷)، CaCl2 (۱۷) و غلظت‌های مختلف این مواد در تحقیقات مختلف مربوط می‌باشد . لازم به ذکر است که در مطالعه حاضر به غیر از اسید اسکوربیک و CaCl2 بقیه مواد در محیط کشت استفاده نشده‌اند.

از میان نمونه‌های گرفته شده درصد سلول‌های مثبت نسبت به ALP در نمونه اندوستی و استئوسیتی بیشتر بود. نمونه‌های پریوستی درصد کمتری را نشان می‌دادند و درصد حاصل از شمارش سلول‌ها در پاساژ اول از پاساژهای بعدی بیشتر بود. مثبت شدن رنگ‌آمیزی ALP نشانه رشد سلول‌های استئوبلاست در محیط می‌باشد. کمتر بودن میزان سلول‌های استئوبلاست در نمونه‌های پریوستی به علت آزاد شدن سلول‌های فیبروبلاست موجود در لایه‌های پریوست و جدا شدن قسمتی از بافت همبند اطراف پریوست در هنگام نمونه‌برداری می‌باشد به طوری که در نمونه‌های اندوستی و استئوسیتی که فاکتور بافت همبند حذف شده بود درصد ALP بیشتر بود کمتر شدن میزان ALP در کشت‌های متعدد متعاقب پاساژ اول به علت بالغ شدن سلول‌های استئوبلاست به استئوسیت می‌باشد با توجه به آنچه که تاکنون بیان شد بر این امر واقفیم که کشت سلول‌های استخوانی در کشور ما در ابتدای راه قرار دارد و در تحقیقات انجام شده در سایر مناطق دنیا هم توسط محققین مختلف روش‌های مختلف و متعددی بیان شده است اما همه این تحقیقات در یک موضوع مشترک هستند و آن هم استفاده از نتایج این تحقیقات برای بازسازی بافت‌های مختلف بدن انسان با بهترین شکل و کمترین هزینه و کمترین دست اندازی به مناطق مختلف بدن در برداشتن پیوند به صورت فعلی می‌باشد. لذا مطالعه مقدماتی انجام شده شروع تحقیقات بسیار گسترده را در زمینه‌های یاد شده هموار کرده است و به عنوان پایه‌ای برای انجام این تحقیقات برای کلیه محققین علاقمند محسوب می‌شود.

تقدیر و تشکر

این مطالعه در قالب طرح پژوهشی شماره ۸۳/۱۱ و با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی کرمان انجام شده است که بدین وسیله از همکاری و مساعدت معاونت و مدیریت محترم پژوهشی دانشگاه یاد شده تشکر می‌گردد. همچنین از آقای دکتر تورج‌رضا میرشکاری جهت بازبینی لام‌ها قدردانی می‌شود.

www.SID.ir

Archive of SID

Summary

A Laboratory Study on Human Jaw Osteoblastic Stem Cells Culturing

Faryabi J., DDs.[1], Nematollahi Mahani S.N., PhD.[2], Malekpoor Afshar R., PhD.[3], Nematipoor A., DDs.[4], Fardisi S., DDs.[5]

1. Assistant Professor of Oral and Maxillofacial Surgery, School of Dentistry, Kerman University of Medical Sciences and Health Services, Kerman, Iran. 2. Assistant Professor of Anatomy, School of Medicine, Kerman University of Medical Sciences and Health Services, Kerman, Iran. 3. Assistant Professor of Pathology, School of Medicine, Kerman University of Medical Sciences and Health Services, Kerman, Iran. 4. Dentist, Kerman Military Medical Center, Kerman, Iran. 5. Dentist, Shiraz University of Medical Science and Health Services, Shiraz, Iran.

Introduction: *The goal of this study was to evaluate different methods of cultivating human bone cells.*

Method: *Five periosteal and bone specimens obtained from the human jaw were divided into small pieces in the laboratory. After the addition of trypsin and collagenase enzymes and releasing of cells, three primary periostal, endosteal, and bony chips cells were prepared. After passing the required time for the growth of specimens, lamella were prepared and stained with alkaline phosphatase (ALP) in order to determine ALP positive cells.*

Results: *Mean time of cellular growth was 23 days.*

Conclusion: *Human bone cells have the capability of being cultured under special sterile laboratory conditions and three dimensional culturing of them can be used for reconstruction of maxillofacial region defects.*

Key words : *Stem Cell Culture, Osteoblast, Human jaw*

Journal of Kerman University of Medical Sciences,2006; 13(2): 57-66

References

1. Blom EJ, Klein-Nulend J, Klein C. P, Kurashina K, Van Wass MA, Burger EH. Transforming growth factor - β_1 incorporated during setting in calcium phosphate cement stimulates bone cell differentiation *In vitro. J Biomed Mater Res* 2000; 50(1): 67-74.
2. Coelho M.J, Trigo cabral A, and fernandes M.H. Human bone cell cultures in biocompatibility testing. part I: osteoblastic differentiation of serialy passaged human bone marrow cells cultured in α - MEM and in DMEM. *Biomaterials* 2000; 21(11): 1087-1094.
3. Doherty MJ, Schlag G, Schwarz N, Mallan RA, Nolan PC, Wilson DJ. Biocompatibility of xenogeneic bone, commercially available coral, a bioceramic and tissue sealant for human osteoblasts. *Biomaterials* 1994; 15(8): 601-7.
4. Declercq H, Van den Vreken N, DeMaeyer E, Verbeeck R, Schacht E, De Ridder L. 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.
5. 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.
6. VanGriensven M, Zeichen J, Tschernig T, Seekamp A, Pape HC. A modified method to culture human osteoblasts from bone tissue speciemens using fibrin glue. *EXP Toxicol Pathol* 2002; 54(1): 25-9.
7. Hagewald S, Pischon N, Jawor P, Bernimoulin JP, Zimmermann B. Effects of enamel matrix derivative on proliferation and differentiation of primary osteoblasts . *J Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Oral Ended* 2004; 98(2): 243-9.
8. Kim HJ, Kim UJ, Vunjak-Novakovic G, Min BH, Kaplan DL. Influence of macroporous protein scaffolds on bone tissue engineering from bone marrow stem cells. *Biomaterials* 2005; 26(21): 4442-52.
9. Li WJ, Tuli R, Huang X, Laquerriere P, Tuan RS. Multilineage differentiation of human mesenchymal stem cells in a three - dimensional nonofibrous scaffold. *Biomaterials* 2005; 26(25): 5158-66.
10. Mauney JR, Jaquiery C, Volloch V, Heberer M, Martin I, Kaplan DL. *In vitro* and *In vivo* evaluation

www.SID.ir

Archive of SID

of differentially demineralized cancellous bone scaffolds combined with human bone marrow stromal cells for tissue engineering. *Biomaterials* 2005; 26(16): 3173-85.

11. Sanchez C, Deberg MA, piccardi N, Msika P, Reginster JY, Henrotin YE. Osteoblasts from the sclerotic subchondral bone downregulate aggrecan but upregulate metalloproteinases expression by chondrocytes. This effects is mimicked by interleukin -6 , 1β and oncostatin M pre - treated non- sclerotic Osteoblasts. *Osteoarthritis Cartilage* 2005; 13(11): 979-87.
12. Schecroun N, Delloye CH. *In vitro* growth and osteoblastic differentiation of human bone marrow stromal cells supported by autologous plasma. *Bone* 2004; 35(2): 517-24.
13. Schimming R, Schmelzeisen R. Tissue-engineered bone for maxillary sinus augmentation. *Oral Maxillofac Surg* 2004; 62(6): 724-9.
14. Shieh SJ, Vacanti JP. State-of – the – art tissue engineering: from tissue engineering to organ building. *Surgery* 2005; 137(1): 1-7.
15. 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.
16. Terheyden H, Knak C, Jepsen S, Palmie S, Rueger DR. Mandibular reconstruction with a prefabricated vascularized bone graft using recombinant human osteogenic protein- 1: an experimental study in miniature pigs.part I: prefabrication. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2001; 30(5): 373-9.
17. Turhani D, Weissenbock M, Watzinger E, Yerit K, Cvikl B, Ewers R, *et al. In vitro* study of adherent mandibular osteoblast-like cells on carrier materials. *Int J Oral Maxllofac Surg* 2005; 34(5): 543-50.
18. 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.

www.SID.ir