

## مقایسه روند رشد سلول‌های استخوان‌ساز استخوان‌های پهن و بلند موش و

### خرگوش

بهزاد یثربی<sup>۱\*</sup> (Ph.D)، سمیده خوئی<sup>۲</sup> (Ph.D)، سید محمود طباطبائی<sup>۳</sup> (M.Sc)، علی اکبر ملکی راد<sup>۴</sup> (M.Sc)

۱- دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز، گروه مهندسی پزشکی

۲- دانشگاه علوم پزشکی ایران، گروه فیزیک پزشکی

۳- دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز، دانشکده پزشکی، گروه ژنتیک

۴- دانشگاه پیام نور سازند، گروه فیزیولوژی

### چکیده

سابقه و هدف: سلول‌های استخوانی حیوانات برای بررسی نحوه‌ی تاثیر محرک‌های خارجی بر تسریع ترمیم شکستگی استخوان‌های در شرایط *In Vitro* استفاده می‌شود. هدف این مطالعه، امکان سنجی و ایجاد شرایط مناسب تکثیر سلول‌های استخوانی استخوان‌های پهن و بلند موش و خرگوش است.

مواد و روش‌ها: سلول‌های استخوانی استخوان‌های پهن (Calvaria) و بلند (Tibia) موش و خرگوش پس از کشت در ظروف ۱۲ خانه ای و رسیدن سلول‌ها به سطح مناسب رشد (در روز چهاردهم) با روش‌های رنگ‌آمیزی اختصاصی و شمارش سلولی بررسی شدند.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که بین تعداد سلول‌های تکثیر یافته استخوان کالوریای خرگوش و نیز بین تعداد سلول‌های تکثیر یافته استخوان تیبیای در هفته‌های اول، دوم و سوم کشت سلولی، اختلاف معنی‌داری وجود داشت ( $P < 0/05$ ). بیش‌ترین، نرخ تغییرات در هفته سوم بود. بین تعداد سلول‌های تکثیر یافته استخوان کالوریای و نیز تیبیای موش در هفته‌های اول، دوم و سوم کشت سلولی، اختلاف معنی‌داری وجود داشت ( $P < 0/05$ ). در استخوان کالوریای بیش‌ترین نرخ تغییرات رشد سلولی در هفته دوم و در استخوان تیبیای هفته سوم بود.

نتیجه‌گیری: چنین به نظر می‌رسد که سرعت رشد و تکثیر سلول‌های استخوانی پهن در موش و خرگوش بیش‌تر از سرعت رشد و تکثیر سلول‌های استخوانی بلند آن‌هاست. بنابراین، در بررسی روند ترمیم بافت استخوانی در شرایط *In Vitro* باید این نکته مدنظر قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: کشت سلولی، استخوان بلند، استخوان پهن، موش، خرگوش

### مقدمه

می‌انجامد. علی‌رغم این‌که اکثر شکستگی‌ها بدون ایجاد مشکل خاصی، جوش می‌خورند، شرایط متعددی نیز وجود دارد که در آن‌ها تسریع و افزایش فرایند ترمیم، جهت اطمینان از بازگشت سریع عمل‌کرد اسکلتی، سودمند است [۱]. در این بین نقش سلول‌ها به عنوان واکنش‌دهنده به عوامل تحریکی بسیار مهم است. نتایج تحقیقات سلولی حاکی از آن است که

یکی از عمده‌ترین صدمات استخوانی در استخوان‌های بلند، شکستگی است. هر چند شکستگی، انواع متعددی دارد، ولی روند التیام و بهبود استخوان در انواع مختلف شکستگی‌ها یکسان است. ترمیم شکستگی استخوان، نوع خاصی از ترمیم زخم است که در آن تولید استخوان به حفظ تمامیت اسکلتی

شده از انستیتو پاستور کرج، استفاده گردید. تمامی حیوانات در شرایط محیطی استاندارد، بدون تنش و صدا، در حرارت مناسب ۲۰ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد و با تهویه مناسب (۸ بار جابه‌جایی هوا از طریق فن در ساعت) نگهداری شدند. قفس‌های مورد استفاده جهت نگهداری خرگوش‌ها دارای طول و عرض ۵۰ و ارتفاع ۳۵ سانتی‌متری قابل ضد عفونی و قفس‌های مخصوص موش‌ها دارای طول ۳۰، عرض ۱۴ و ارتفاع ۱۲ سانتی‌متری قابل استریل و اتوکلاو بودند.

روش جداسازی استخوان پهن و بلند، بعد از قطع نخاع موش، پوست موش کنده شده (در قسمت پاها و سر)، سپس ساق پا از ناحیه انتهایی ران جدا گردیده و نیز استخوان جمجمه خارج شد. سپس قسمت دیافیز استخوان تیبیا و قسمت رویی استخوان جمجمه که استخوان پهن است) در ظرف جداگانه حاوی PBS قرار داده شد. سپس در آزمایشگاه زیر هود در شرایط استریل هر یک از استخوان‌ها به طور جداگانه به قطعات ۱ تا ۲ میلی‌متری ریز گردیده و در ظرف حاوی PBS قرار گرفت.

در مورد جراحی خرگوش نیز همان مراحل انجام شد. تنها با این تفاوت که برای کشتن خرگوش از کلروفورم استفاده شد و قبل از خرد کردن استخوان تیبیای خرگوش، با استفاده از سرنگ انسولین، bone marrow توسط محلول PBS تخلیه گردید.

روش کشت سلولی، ابتدا محیط PBS تعویض گردیده و به مقدار ۸ میلی‌لیتر محلول کلژناز نوع ۲ برای موش و نوع ۱ برای خرگوش به صورت تازه تهیه شده، پس از فیلتر نمودن، به مدت ۱ ساعت، فالكون حاوی قطعات استخوان دراز و ۴<sup>cc</sup> محلول کلژناز در انکوباتور ۳۷ درجه یا بن‌ماری شیکردار قرار داده شد. پس از یک ساعت فالكون تکان داده شد و مجدداً ۱ ساعت دیگر در انکوباتور قرار گرفت. این مراحل برای استخوان پهن کمی متفاوت بود. بدین ترتیب که ابتدا به مدت ۳۰ دقیقه فالكون حاوی قطعات استخوان پهن و ۴<sup>cc</sup> محلول کلژناز در انکوباتور ۳۷ درجه (و یا بن‌ماری شیکردار) گذاشته شده، سپس کلژناز با کلژناز جدید و تازه

این واکنش‌ها می‌تواند به صورت‌های مختلف نظیر تغییر شکل سلولی، تظاهرات ژنی و تغییر در ساخت مولکول‌های ماتریکس و نیز پروستوگلاندین‌ها باشد [۲، ۳]. بدین ترتیب سلول‌های استخوانی در انواع صدمات اعم از شکستگی‌ها، آسیب‌های پاتولوژیکی و آتروفی نقش اصلی و عمده را ایفا کرده و به تحریکات مکانیکی پاسخ می‌دهند Wolf و همکاران (۲۰۰۱)، تأثیر ارتعاش ناشی از صفحه نیرو را بر روی ترمیم استخوان مطالعه نمودند [۴]. Smith-Adaline و همکاران (۲۰۰۴)، مطالعه خود را تحت این عنوان که محیط مکانیکی الگوهای شکل‌گیری بافتی را در طی ترمیم استخوان فعال می‌کند، انجام دادند [۵]. آنچه در این راستا مهم به نظر می‌رسد زمان تحریک و اثربخشی عوامل محرک بر ترمیم ناحیه شکستگی است. Claes و همکاران (۲۰۰۵)، در استفاده از امواج فراصوتی در استخوان‌های متاتارس استئوتومی شده گوسفند، بیش‌ترین تأثیر امواج را در ترمیم ناحیه، از هفته سوم مشاهده نمودند [۶]. Esteki و همکاران (۲۰۱۰)، بیش‌ترین تأثیر امواج فراصوتی کم‌توان پالسی بر روی ترمیم ناحیه سوراخ شده در قسمت میانی استخوان درشت نی خرگوش را در هفته چهارم گزارش کردند [۷].

با توجه به تحقیقات به عمل آمده در زمینه ترمیم شکستگی استخوان‌های بلند، تیم تحقیق در نظر دارد ارتباط بین زمان تأثیرپذیری تحریک و تکثیر سلولی در ناحیه آسیب‌دیده، بررسی گردیده و نیز توجه‌پذیری استفاده از تأثیر محرک بر ترمیم استخوان‌های بلند از تکثیر سلولی استخوان‌های پهن را ارزیابی نماید. در این خصوص، با توجه به استفاده فراوان از موش و خرگوش در مطالعات In Vivo حیوانی و نیز شباهت نحوه ترمیم استخوانی آن‌ها با انسان، در این مطالعه نیز از این دو حیوان آزمایشگاهی استفاده گردیده است.

## مواد و روش‌ها

حیوانات، برای انجام این تحقیق تعداد ۱۰ عدد خرگوش سفید نیوزیلندی بالغ و تعداد ۲۰ عدد موش نژاد Balb/c تهیه

۴۰۰ میکرولیتر محیط کشت CCM (یعنی ۲ برابر تریپسین) روی محتویات هر فالکون اضافه گردید تا اثر تریپسین را خنثی کند. ول‌ها زیر میکروسکوپ مشاهده گردید، چنان‌که باز هم دارای سلول بود مراحل فوق تکرار شد. در ادامه، فالکون‌ها را به مدت ۷ دقیقه با دور ۱۰۰۰ سانتریفوژ نموده، محتویات هر فالکون را خالی و روی آن ۱ سی‌سی محیط کشت CCM اضافه کرده، به خوبی پیتاژ گردید تا رسوب سلول‌ها در محیط کشت معلق شده و به‌صورت تک سلول درآید. سپس به ازای هر فالکون دو ویال برداشته، در یکی ۹۰ میکرولیتر رنگ (متیل‌گرین) و ۱۰ میکرولیتر از سلول‌ها را جهت شمارش، ریخته و پیتاژ کرده و در دیگری ۱۰ میکرولیتر رنگ (تریپان بلو) و ۹۰ میکرولیتر سلول برای به‌دست آوردن viability (بدون پیتاژ) ریخته می‌شود. حدود ۲۰ میکرولیتر از محتویات هر ویال روی لام ریخته شده و شمارش انجام گرفت. در انتها تعداد سلول‌ها با استفاده از رابطه  $Viability \times Average \times 10^4 \times 10^4$  "محاسبه شد.

آنالیز آماری. تحلیل آماری بر روی داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS Ver.13 از طریق آزمون Paired Samples T-Test انجام شد.

## نتایج

رشد سلول‌های استخوانی کالوریای و تییبای خرگوش. شکل ۱ نمونه‌ای از سلول‌های استخوان ساز خرگوش را در استخوان بلند (A) و پهن (B) نشان می‌دهد. بین تعداد سلول‌های تکثیر یافته استخوان کالوریای خرگوش در هفته‌های اول، دوم و سوم کشت سلولی، اختلاف معنی‌داری وجود داشت ( $P < 0.05$ )، (شکل ۲ الف). هم‌چنین، نرخ تغییرات رشد سلول‌های تکثیر یافته، از هفته دوم بیش‌ترین است (شکل ۲ ب). بین تعداد سلول‌های تکثیر یافته استخوان تییبای خرگوش در هفته‌های اول، دوم و سوم کشت سلولی، اختلاف معنی‌داری وجود دارد ( $P < 0.05$ ) (شکل ۳ الف). هم‌چنین، نرخ تغییرات رشد سلول‌های تکثیر یافته، در هفته سوم بیش‌ترین است (شکل ۳ ب).

تعویض گردیده، مجدداً به مدت ۳۰ دقیقه در بن‌ماری شیکردار قرار داده شد. بعد از آن، کلاژناز با  $4^{\circ}C$  محلول تریپسین تعویض شده، در بن‌ماری ۳۷ درجه شیکردار قرار گرفت. در نهایت، تریپسین با  $4^{\circ}C$  کلاژناز تازه تعویض شده و مجدداً در بن‌ماری ۳۷ درجه شیکردار، قرار داده شدو در انتهای این مرحله ذکر چند نکته ضروری است:

۱- برای مهار کلاژناز، ۴ سی‌سی محیط CCM به فالکون‌های حاوی کلاژناز و استخوان‌های دراز و پهن پیتاژ نموده و با تیپ، محلول آن خالی گردید.

۲- در سه مرحله، هر بار با ۲ سی‌سی محیط DMEM، شستشو انجام گرفت.

۳- حدود ۲۰ تا ۳۰ قطعه از استخوان دراز و پهن (به‌طور جداگانه) در فلاسک T25 حاوی ۵ سی‌سی محیط کشت، قرار داده شد.

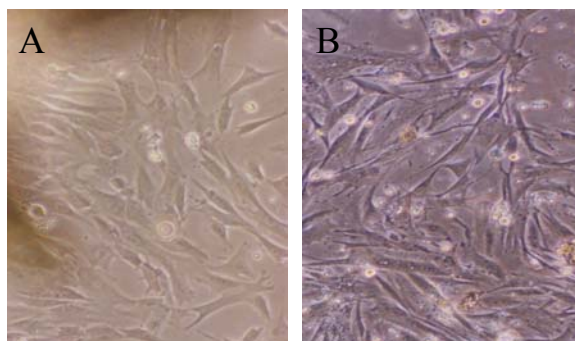
۴- فلاسک‌ها در انکوباتور ۳۷ درجه با در نیمه باز قرار گرفت. محیط فلاسک‌ها دو بار در هفته تعویض شد.

روش شمارش سلولی. ابتدا سه عدد فالکون ۱۵ میلی‌لیتری زیر هود در حالت استریل باز شده، توسط تیپ محتویات هر کدام از سه ول را در فالکون جداگانه ریخته شد (از این مرحله به بعد هر فالکون با ول متناظرش یکی بود).

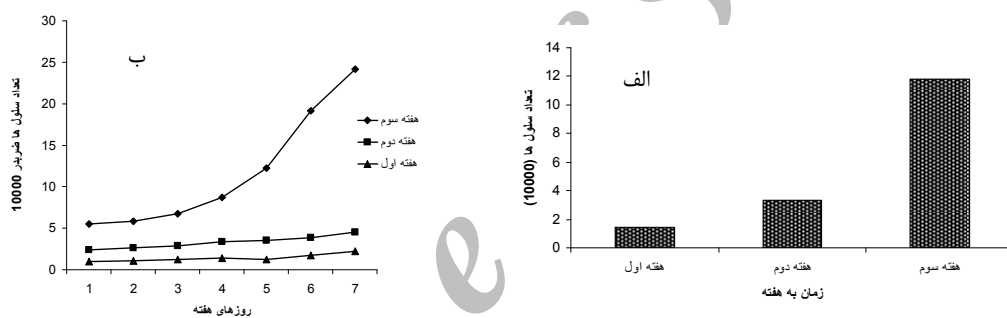
سپس شستشوی سلول‌ها با SFM دوبار انجام گرفت (۲۰۰ میکرولیتر برای هر ول در هر بار شستشو). در ادامه، محلول کلاژناز نوع ۷ (حاوی ۷۵ میکرولیتر کلاژناز نوع ۷، ۱/۲ میکرولیتر کلسیم کلراید و ۵۲۳/۸ میکرولیتر SFM) به ۳ ول اضافه گردید. فلاسک به مدت ۲ ساعت انکوبه شده و محلول کلاژناز نوع ۷ به طوری که سلول‌ها کنده نشود، خارج گردید. سپس، ۲۰۰ میکرولیتر PBS فاقد کلسیم و منیزیم به هر ول اضافه شده، به مدت ۱ دقیقه با حرکات آرام و صلیبی شستشو داده شد. محتویات داخل ول‌ها درون فالکون متناظر ریخته شده، سپس ۲۰۰ میکرولیتر تریپسین-EDTA محلول در HBSS تازه از فریز درآمده به هر ول اضافه شده، به صورت آهسته تکان داده شد. مجدداً، محتویات داخل ول‌ها درون فالکون متناظر ریخته شده، در صورت شناور بودن سلول‌ها،

هفته دوم بیشترین است (شکل ۵-ب). بین تعداد سلول‌های تکثیر یافته استخوان تییبای موش (شکل B) در هفته‌های اول، دوم و سوم کشت سلولی، اختلاف معنی‌داری وجود دارد ( $P < 0.05$ )، (شکل ۶ الف). هم‌چنین، نرخ تغییرات رشد سلول‌های تکثیر یافته، از هفته سوم بیشترین است (شکل ۶ ب).

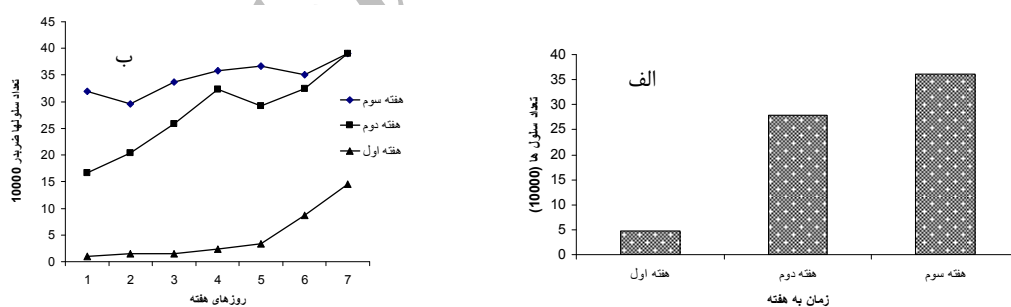
رشد سلول‌های استخوانی کالوریای و تییبای موش. شکل ۴ نمونه ای از سلول‌های استخوان ساز موش را در استخوان بلند (A) و پهن (B) نشان می‌دهد. بین تعداد سلول‌های تکثیر یافته استخوان کالوریای موش در هفته‌های اول، دوم و سوم کشت سلولی، اختلاف معنی‌داری وجود دارد ( $P < 0.05$ ) (شکل ۵ الف). هم‌چنین، نرخ تغییرات رشد سلول‌های تکثیر یافته، از



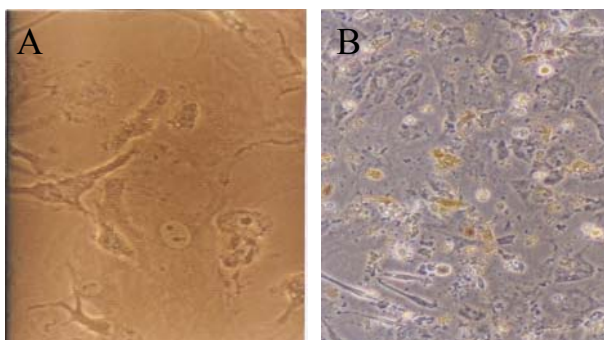
شکل ۱. سلول‌های استخوان ساز خرگوش (A پهن (Calvaria) B بلند (Tibia))



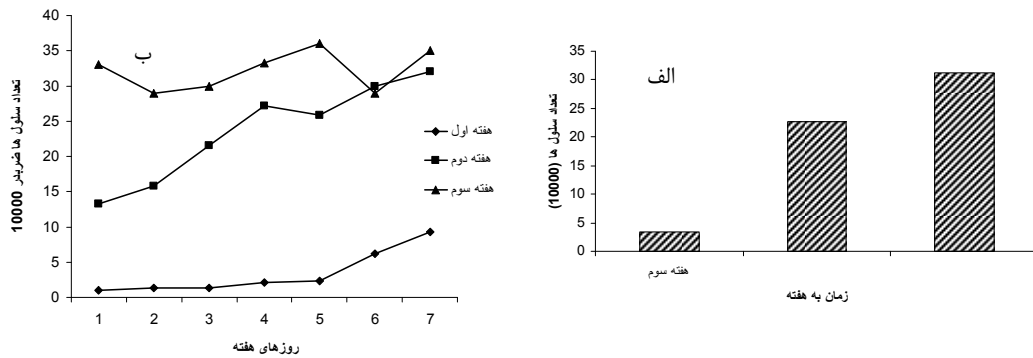
شکل ۲. میزان رشد (الف) و نرخ تغییرات رشد (ب) سلول‌های استخوان تییبای خرگوش



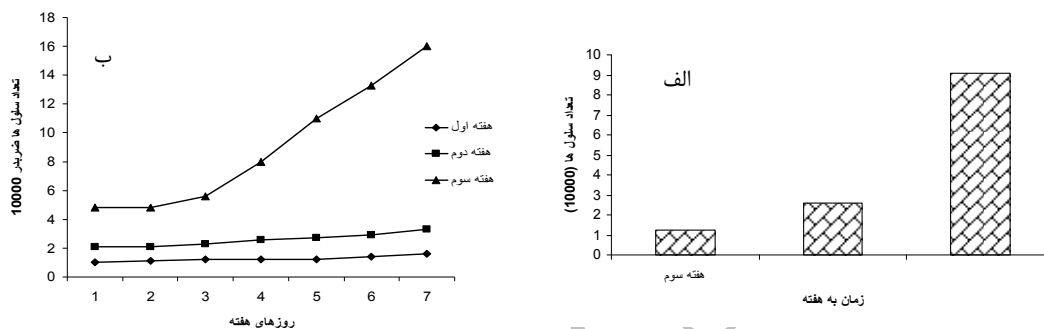
شکل ۳. میزان رشد (الف) و نرخ تغییرات (ب) رشد سلول‌های استخوان کالوریای خرگوش



شکل ۴. سلول‌های استخوان ساز موش (A پهن (Calvaria) B بلند (Tibia))



شکل ۵. میزان رشد (الف) و نرخ تغییرات رشد (ب) سلول‌های استخوان کالوریای موش



شکل ۶. میزان رشد (الف) و نرخ تغییرات رشد (ب) سلول‌های استخوان تییبای موش

در شکستگی استخوان‌های بلند استفاده کرده‌اند [۱۴-۱۹]. حال آن‌که، مقایسه سرعت رشد و تکثیر سلولی استخوان‌های پهن و بلند، بیانگر این واقعیت است که نمی‌توان جهت توجیه تاثیرپذیری محرک‌های خارجی بر ترمیم شکستگی استخوان‌های بلند از روند رشد سلولی استخوان‌های پهن در شرایط *In Vitro* استفاده نمود، چرا که زمان تاثیرگذاری محرک و زمان تسریع رشد سلولی، هم‌خوانی ندارد. هم‌چنین با توجه به این‌که در اکثر مطالعات *In Vivo* حیوانی مربوط به شکستگی‌های استخوانی، از موش و خرگوش استفاده می‌گردد [۲۰-۲۴]، در این تحقیق، جهت کسب اطمینان از امکان مقایسه نتایج تحقیقات به عمل آمده بر روی موش و خرگوش، روند تکثیر سلولی استخوان‌های پهن و بلند این دو حیوان با یک‌دیگر مقایسه گردید که نتایج، بیانگر هم‌خوانی رفتاری تکثیر سلولی استخوان‌های پهن و بلند موش و خرگوش به طور نظیر به نظیر است.

این تحقیق نشان داد که روند تکثیر سلولی و زمان تسریع رشد سلولی استخوان‌های پهن و بلند در موش و خرگوش با یک‌دیگر متفاوت است. لذا به همکارانی که علاقه‌مند به تحقیق

## بحث و نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج به دست آمده از این مطالعه، چنین به نظر می‌رسد که رفتار سلولی استخوان‌های پهن و بلند در موش و خرگوش یکسان است، به طوری که سرعت تکثیر سلولی استخوان‌های پهن در هر دو حیوان به نسبت استخوان‌های بلند بیش‌تر است. با توجه به مقایسه این نتایج با دست آورد محققین در زمینه تاثیر محرک‌های خارجی بر ترمیم ناحیه شکستگی استخوان‌های بلند [۸]، چنین استنباط می‌گردد که ارتباط منطقی بین رشد تکثیر سلولی استخوان‌های بلند و زمان استفاده از این محرک‌ها وجود دارد. چرا که طبق تحقیقات انجام یافته، بیش‌ترین تاثیر محرک‌های خارجی، از هفته سوم بعد از شکستگی است [۹-۱۳] که این مهم، با توجه به نتایج تحقیق حاضر، با زمان تسریع روند رشد و تکثیر سلولی استخوان‌های بلند هم‌خوانی داشته و می‌توان گفت که این روند تکثیر سلولی، بیش‌ترین واکنش ناحیه آسیب دیده به محرک‌های خارجی را سبب می‌گردد.

در همین راستا، برخی از محققین، از روند تکثیر سلولی استخوان‌های پهن جهت بررسی عمل‌کرد محرک‌های خارجی

[9] Le AX, Miclau T, Hu D, Helms JA. Molecular aspects of healing in stabilized and non-stabilized fractures. *J Orthop Res* 2001; 19: 78-84.

[10] Yang KH, Park SJ. Stimulation of fracture healing in a canine full-defect model by low-intensity pulsed ultrasound. *Yonesi Med J* 2001; 42: 503-508.

[11] Balion A, Mullen CH. Beneficial effects of moderate, early loading and adverse effects of delayed or excessive loading on bone healing. *J Biomech* 2003; 36: 1069-77.

[12] Takeda T, Narita T, Ito H. Experimental study on the effect of mechanical stimulation on the early stage of fracture healing. *J Biomech* 2004; 71: 252-262.

[13] Leung KS, Lee WS, Tsui HF, Liu PP, Cheung WH. Complex tibial fracture outcomes following treatment with low-intensity pulsed ultrasound. *Ultrasound Med Biol* 2004; 30: 389-395.

[14] Tis JE, Meffert CR, Inoue N, McCarthy EF, Machen MS, McHale KA, Chao EY. The effect of low intensity pulsed ultrasound applied to rabbit tibia during the consolidation phase of distraction osteogenesis. *J Orthop Res* 2002; 20: 793-800.

[15] Heybeli N, Yeşildağ A, Oyar O, Gülsoy UK, Tekinsoy MA, Mumcu EF. Diagnostic ultrasound treatment increases the bone fracture-healing rate in an internally fixed rat femoral osteotomy model. *J Ultrasound Med* 2002; 21: 1357-1363.

[16] Ebersson CP, Hogan KA, Moore DC, and Ehrlich MG. Effect of low-intensity ultrasound stimulation on consolidation of the regenerate zone in a rat model of distraction osteogenesis. *J Pediatr Orthop* 2003; 23: 46-51.

[17] Matziolis G, Tuischer J, Kasper G, Thompson M, Bartmeyer B, Krockner D, et al. Simulation of cell differentiation in fracture healing: mechanically loading composite scaffolds in a novel bioreactor system. *Tissue Eng* 2006; 12: 201-208.

[18] Chan CW, Qin L, Lee KM, Zhang M, Cheng JC, Leung KS. Low intensity pulsed ultrasound accelerated bone remodeling during consolidation stage of distraction osteogenesis. *J Orthop Res* 2006; 24: 263-270.

[19] Claes L, Ruter A, Mayr E. Low-intensity ultrasound enhances maturation of callus after segmental transport. *Clin Orthop Relat Res* 2005; 430: 189-194.

[20] Mayr E, Laule A, Suger G, Ruter A, Claes L. Radiographic results of callus distraction aided by pulsed low-intensity ultrasound. *J Orthop Trauma* 2001; 15: 407-414.

[21] Chang WH, Sun JS, Chang SP, and Lin JC. Study of thermal effects of ultrasound stimulation on fracture healing. *Bioelectromagnetics* 2002; 23: 256-263.

[22] Hente R, Fuchtmeyer B, Schlegel U, Ernstberger A, Perren SM. The influence of cyclic compression and distraction on the healing of experimental tibia fractures. *J Orthop Res* 2004; 22: 709-715.

[23] Hantes ME, Mavrodontidis AN, Zalavras CG, Karantanas AH, Karachalios T, Malizos KN. Low-intensity transosseous ultrasound accelerates osteotomy healing in a sheep fracture model. *J Bone Joint Surg Am* 2004; 86-A: 2275-2282.

[24] Sakurakichi K, Tsuchiya H, Uehara K, Yamashiro T, Tomita K, Azuma Y. Effects of timing of low-intensity pulsed ultrasound on distraction osteogenesis. *J Orthop Res* 2004; 22: 395-403.

و بررسی تاثیر عوامل خارجی بر ترمیم آسیب‌های استخوانی هستند، توصیه می‌گردد که بازده زمانی درمان را در استخوان‌های پهن از روز هفتم بعد از عمل جراحی و در استخوان‌های بلند از هفته سوم بعد از عمل جراحی آغاز نمایند.

## تشکر و قدردانی

این مطالعه با استفاده از هزینه طرح پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی تبریز و با استفاده از امکانات آزمایشگاهی مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی ایران انجام یافته است. از همه همکاران محترم این مراکز که در اجرای این تحقیق ما را مورد لطف قرار دادند، کمال تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

## منابع

[1] Robling AG, Duijvelaar KM, Geevers JV, Ohashi N, Turner CH. Modulation of appositional and longitudinal bone growth in the rat ulna by applied static and dynamic force. *Bone* 2001; 29: 105-113.

[2] Takikawa S, Matsui N, Kokubu T, Tsunoda M, Fujioka H, Mizuno K, Azuma Y. Low intensity pulsed ultrasound initiates bone healing in rat nonunion fracture model. *J Ultrasound Med* 2001; 20: 197-205.

[3] Uglow MG, Peat RA, Hile MS, Bilston LE, Smith EJ, and Little DG. Low-intensity ultrasound stimulation in distraction osteogenesis in rabbits. *Clin Orthop* 2003; 41: 303-312.

[4] Wolf S, Augat P, Eckert-Hübner K, Laule A, Krischak GD, Claes LE. Effects of high frequency low magnitude mechanical stimulus on bone healing. *Clin Orthop Relat Res* 2001; 385: 192-198.

[5] Schortinghuis J, Ruben JL, Raghoebar GM, Stegenga B. Ultrasound to stimulate mandibular bone defect healing: a placebo-controlled single – blind study in rats. *J Oral Maxillofac Surg* 2004; 62: 194-201.

[6] Claes L, Willie B. The enhancement of bone regeneration by ultrasound. *Prog Biophys Mol Biol* 2006; 23: 115-121.

[7] Esteki A, Yasrebi B, Shadmehr A. Pulsed low-intensity ultrasound enhances healing rate in the osteoperforated tibia in a rabbit model. *J Orthop trauma* 2010; 24: 170-175.

[8] Shadmehr A, Esteki A, Oliaie GR, et al. The influence of controlled cyclic movements upon healing of experimental tibia fractures. *J Faculty Medi* 2006; 63: 965-73.

## Comparison of osteoblast cells growth in flat and long bones in mice and rabbits

Behzad Yasrebi (Ph.D)<sup>\*1</sup>, Samideh Khoei (Ph.D)<sup>2</sup>, Seyed Mahmoud Tabatabaei (M.Sc)<sup>3</sup>, Ali Akbar Malekirad (M.Sc)<sup>4</sup>

1- Dept. of Biomedical engineering, Islamic Azad University Tabriz Branch, Tabriz, Iran

2 - Dept. of Medical Physics, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

3 – Dept. of Genetic, Islamic Azad University Tabriz Branch, Tabriz, Iran

4 – Dept. of Physiology, Shazand center of Payame Noor University, Shahzand, Iran

(Received: 6 Jul 2010 Accepted: 1 Feb 2011)

**Introduction:** Several *in vitro* studies have shown the effect of external stimulus on acceleration of long bone fracture repair in experimental animals. The aim of this study was to determine feasibility and creation of appropriate conditions for proliferation of the bone cells, in flat and long bones of mice and rabbits.

**Materials and Methods:** Mice and rabbits flat and long bones were cultured in 12 plates. At 14<sup>th</sup> day of culture, they reached an appropriate level of cell growth. Then specific staining methods were used to study the pattern of cell growth.

**Results:** The results showed a significant differences ( $P < 0.05$ ) in the number of proliferated flat bone (Calvaria) and long bone (Tibia) of rabbits in the first, second and third weeks of cell cultures. The highest rate of growth was observed in the third week in both bones. Similar differences were found in mice. The highest rate of growth in calvaria and tibial bones of mice were found in the second and third weeks, respectively.

**Conclusion:** It seems that growth and proliferation rate of flat bones in mice and rabbits spread more quickly than their lone bones. Thus, this point should be taken into account in the *in vitro* study of repair pattern of bone tissue.

**Keywords:** Cell culture, Long bone, Flat bone, Mice, Rabbit

\* Corresponding author: Fax: +98 411 5571921 ; Tel: +98 411 6552129  
mebyas@yahoo.com