مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال بیست و هشتم/شماره ۱۱۹/هفته سوم بهمن ماه ۱۳۸۹

مقاله پژوهشی
تاریخ دریافت: ۸۹/۹/۳ تاریخ پذیرش: ۸۹/۱۱/۳

بررسی ویژگی‌های سلول‌های استئوبلاست انسانی در دو روش کشت تک لایه‌ای و کشت سه بعدی هیدروکسی آپاتیت– تری‌کلسیم فسفات

دکتر بتول هاشمی بنی[۱]، فرشته علی اکبری[۲]،فرزانه صادقی[۳]، دکتر ابراهیم اسفندیاری[۴]، دکتر حمید بهرامیان[۵]، دکتر حسین صادقی[۱]

خلاصه

مقدمه: بیماری‌ها و آسیب‌های استخوانی شامل شکستگی‌های استخوانی در طی تصادفات و تروما در همه‌ی جوامع شیوع فراوانی دارد و در اکثر موارد استخوان خرد شده قادر به ترمیم نیست؛ به علاوه، روش‌های درمانی مورد استفاده نظیر پیوند بافت استخوانی به صورت آلوگرافت و اتوگرافت خطرات و مشکلاتی را به دنبال دارد. یکی از راه‌های درمان، استفاده از سلول‌های استخوانی خود فرد، کشت آن‌ها بر روی داربست مناسب و انتقال به بیمار می‌باشد. در این مطالعه، ضمن کشت سلول‌های استئوبلاست به صورت تک لایه‌ای و داربست هیدروکسی آپاتیت– تری کلسیم فسفات (HA-TC)، ویژگی‌های این سلول‌ها در دو روش کشت متفاوت مورد بررسی قرار گرفت.

روش‌ها: در جریان عمل جراحی کرانیوتومی در بیمارستان الزهرای (س) اصفهان از ۵ فرد نمونه‌ی استخوانی تهیه و به روش استریل به آزمایشگاه ارسال شد. هر نمونه پس از شستشو با PBS به قطعات کوچک تقسیم و پس ازقرار دادن در پلیت محتوی محیط کشت به انکوباتور منتقل گردید. در روز ۱۲–۱۰ سلول‌ها شروع به خروج از استخوان نموده، پس از پوشاندن کف پلیت با استفاده از آنزیم Trypsin_EDTA ازکف پلیت جدا شد و به دوگروه تقسیم گردید. در گروه اول، سلول‌ها بر داربست HA-TC و در گروه دیگر به صورت تک لایه‌ای کشت داده شدند. رنگ آمیزی Van kossa، شمارش سلولی، روش MTT، رنگ آمیزی آلکالین فسفاتاز و روش فلوسایتومتری جهت بررسی ویژگی‌های سلول‌های استئوبلاستی به کار گرفته شد.

یافته‌ها: در کشت سلول‌ها به صورت تک لایه‌ای، سلول‌هایی با مورفولوژی فیبروبلاستی و یا دوکی مشاهده شد. با رنگ آمیزی Van kossa وجود رسوبات مواد معدنی در دو گروه مشخص گردید. میزان تکثیر سلولی در داربست HA-TC نسبت به تک لایه‌ای بیشتر بود ($P < ۰/۰۰۱$). میزان فعالیت سلول‌های زنده نیز در داربست HA-TC نسبت به تک لایه‌ای افزایش نشان داد ($P < ۰/۰۰۱$). در رنگ آمیزی آلکالین فسفاتاز وجود گرانول‌های آبی مشاهده شد؛ نتایج فلوسایتومتری نشان داد که ۵۷ درصد سلول‌ها در کشت اولیه و ۵ درصد در پاساژ سوم دارای مارکر آلکالین فسفاتاز هستند.

نتیجه گیری: با توجه به نتایج تحقیق حاضر می‌توان گفت که داربست هیدروکسی آپاتیت– تری‌کلسیم داربست مناسب تری برای کشت سلول‌های استئوبلاستی نسبت به کشت تک لایه‌ای است. احتمال می‌رود علت این باشد که داربست هیدروکسی آپاتیت– تری‌کلسیم حاوی کلسیم و اجزای مشابه ماتریکس استخوانی است و وجود تخلخل و منافذ مناسب در این داربست موجب تسهیل تغذیه‌ی سلول‌ها نسبت به کشت تک لایه‌ای می‌شود.

واژگان کلیدی: کشت تک لایه‌ای، ترمیم استخوان، هیدروکسی آپاتیت–تری‌کلسیم فسفات، استئوبلاست.

مقدمه

از آن جایی که بیماری‌ها و آسیب‌های استخوانی، مانند شکستگی‌های استخوانی در طی تصادفات و تروما، در همه‌ی جوامع شیوع فراوانی دارد و در اکثر موارد استخوان خرد شده قادر به ترمیم نیست، به علاوه روش‌های درمانی مختلف نظیر پیوند بافت استخوانی به صورت آلوگرافت و اتوگرافت، خطرات و مشکلاتی را به دنبال دارد، طراحی بافت استخوانی و

[۱] استادیار، گروه علوم تشریحی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.
[۲] دانشجوی دکتری، گروه علوم تشریحی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.
[۳] کارشناس ارشد، گروه علوم تشریحی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.
[۴] استاد، گروه علوم تشریحی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.
[۵] دانشیار، گروه علوم تشریحی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.
نویسنده‌ی مسؤول: : دکتر بتول هاشمی بنی
Email: hashemibeni@med.mui.ac.ir

Archive of SID
www.SID.ir

پیوند آن به بیماران ضروری به نظر می‌رسد (۱). به همین دلیل، ضرورت تأمین یک منبع بافت استخوانی، برای ترمیم ناحیه‌ی آسیب دیده غیر قابل انکار است. یکی از راه‌های درمان، استفاده از سلول‌های استخوانی خود فرد، کشت آن‌ها بر روی داربست مناسب و انتقال به بیمار است (۲). از آن جا که کشت سلول‌ها به عوامل حمایتی از قبیل محیط، زمان و داربست مناسب نیاز دارد، جداسازی سلول‌های استئوبلاست از استخوان خرد شده و کشت آن‌ها بر روی داربست مناسب برای رسیدن به حداکثر تعداد استئوبلاست (در فاصله‌ی زمانی کمتر) ضروری به نظر می‌رسد. سپس، در صورت امکان با انتقال هر چه سریع‌تر این سلول‌ها به محل شکستگی، شاید بتوان موجبات ترمیم سریع‌تر استخوان را فراهم نمود (۳).

ساده‌ترین نوع کشت سلولی، کشت تک لایه‌ای است که در آن سلول‌ها به کف ظرف چسبیده، رشد می‌نمایند. به طور معمول در این نوع کشت، علاوه بر سلول‌های اصلی مورد نظر، انواع مختلفی از سلول‌ها، مانند فیبروبلاست‌ها، وجود دارند که با انجام چندین پاساژ سلولی جمعیت سلولی خالص‌تر می‌شود. کشت تک لایه‌ای سلول‌های استخوانی بیشتر با هدف تحقیقات اولیه صورت می‌گیرد (۴).

اولین گزارش از کشت سلول‌های استخوانی توسط Peck و همکاران در سال ۱۹۶۴ منتشر شد و از آن پس دانشمندان در این زمینه تحقیقات زیادی انجام دادند (۵). جهت جدا کردن سلول‌های استئوبلاست در تحقیقات مختلف، اغلب از استخوان‌های اسفنجی استفاده شده است؛ از جمله، در بررسی Wiedmann و همکاران سلول‌های استئوبلاست از استخوان اسفنجی جدا گردید (۶). همچنین Hagewald نیز از سلول‌های استئوبلاستی استفاده کرد که از استخوان اسفنجی جدا شده بود (۷).

در کشت داربستی (سه بعدی)، سلول‌ها بر روی داربست منتقل شده، سپس به محل مورد نظر پیوند زده می‌شوند. این داربست چسبندگی سلول‌ها را تسهیل می‌کند و باعث توسعه‌ی بافت می‌شود؛ به علاوه باعث تسهیل انتقال مواد غذایی و متابولیت‌ها به سلولها شده، خروج مواد زاید را از سلول‌ها آسان می‌کند (۸). ضمن این که داربست باید در بدن بیمار پایدار باشد و بلافاصله تخریب نشود؛ به علاوه از قابلیت تجزیه شدن با سرعت مناسب و ویژگی زیست سازگاری برخوردار باشد (۹).

ترکیبات کلسیم از اجزای بافت استخوانی است و داربست هیدروکسی آپاتیت-تری کلسیم فسفات (HA-TC) به دلیل داشتن کلسیم و در عین حال ساختمان سه بعدی، از جمله داربست‌هایی است که در زمینه‌ی تکثیر سلول‌های استئوبلاست می‌توان از آن استفاده نمود. اگر چه در بعضی تحقیقات از شکل مجزای این دو به عنوان داربست استفاده شده اما در اکثر تحقیقات هیدروکسی آپاتیت به همراه تری‌کلسیم فسفات مورد استفاده قرار گرفته است (۱۱-۱۰). در تحقیق Kurashina وهمکاران بر روی خرگوش مشاهده شده زمانی که هیدروکسی آپاتیت به تنهایی استفاده شود، نقشی در القای استخوان سازی ندارد؛ اما زمانی که هیدروکسی آپاتیت با تری‌کلسیم فسفات به طور هم‌زمان مورد استفاده قرار گیرد، باعث القای استخوان سازی می‌شود (۱۰). در تحقیق دیگری برای کشت سلول‌های استئوبلاستی از هیدروکسی آپاتیت و تری‌کلسیم فسفات هم‌زمان استفاده و مشاهده شد که طی سه روز اول، جمعیت سلولی کاهش یافت ولی

Archive of SID
www.SID.ir

بعد از آن تا روز ۷ جمعیت سلولی به تدریج افزایش پیدا کرد. همچنین این داربست میزان فعالیت آلکالین فسفاتازی را در سلول‌های استئوبلاست افزایش داد و باعث افزایش میزان پروتئین مورفوژنتیک استخوانی (BMPs) نیز گردید (۱۲).

در تحقیق دیگر به عمل آمده، سلول‌های استئوبلاست از استخوان ایلئوم به دست آمد و سپس با منتقل کردن بر روی داربست و انتقال آن (داربست/سلول) به محل نقص در استخوان ماندیبل مشاهده شد که در مهندسی بافت، نوع داربست اهمیت ویژه‌ای دارد (۱۳). در مطالعه‌ای دیگر، انتقال سلول‌های مزانشیمی بر روی دو داربست انجام گرفت، داربست اول شامل PLGA/TCP و داربست دوم شامل PLGA/TCP/HA/Collagen. داربست اول سطح کافی برای اتصال سلول‌ها نداشت و سلول‌ها تکثیر قابل ملاحظه‌ای پیدا نکردند که به دلیل ویژگی هیدروفوبی داربست PLGA می‌باشد؛ در صورتی که داربست دوم داربست مناسب‌تری بود و ترمیم استخوان بر روی آن انجام گرفت؛ این مسأله نیز به دلیل داشتن هیدروکسی آپاتیت و کلاژن می‌باشد؛ چرا که هر دو از عناصر اصلی ماتریکس استخوانی هستند و باعث ترمیم استخوان می‌شوند. این شواهد حاکی از آن است که با استفاده از داربست‌های سه بعدی می‌توان توانایی استئوژنیک سلول‌ها را بالا برد (۱۴).

همان گونه که بیان شد داربست HA-TC و کشت تک لایه‌ای قادر به فراهم نمودن شرایطی برای کشت سلول‌های استخوانی می‌باشند. لذا در مطالعه‌ی ما جهت شناسایی روش کشت بهتر و مناسب‌تر ویژگی‌های سلول‌های استئوبلاست به دست آمده از استخوان جمجمه‌ی انسان در دو روش کشت سه بعدی هیدروکسی آپاتیت– تری کلسیم فسفات و کشت تک لایه‌ای مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت.

روش‌ها

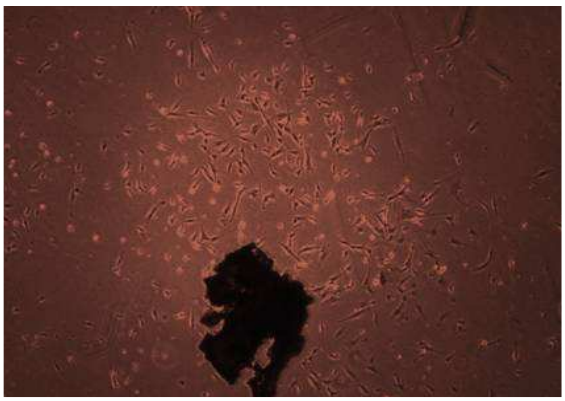
روش تهیه‌ی نمونه: از بین بیماران مراجعه کننده به بیمارستان الزهرای (س) اصفهان، طی عمل جراحی کرانیوتومی ۵ نمونه‌ی استخوانی جمع آوری شد. نمونه‌ها با رضایت کامل از بیماران مردی برداشت شد که به بیماری استخوانی مبتلا نبوده، در محدوده‌ی سنی ۴۵–۱۸ سال قرار داشتند. هر نمونه‌ی استخوانی، که شامل قطعه‌ای از کالواریای بیمار بود، با ابعاد ۱ × ۱ سانتی‌متر تحت بیهوشی عمومی و شرایط استریل کامل توسط جراح برداشته شد و در لوله‌های فالکون ۵۰ سی‌سی محتوی PBS حاوی ۱ درصد آنتی‌بیوتیک به آزمایشگاه کشت سلول گروه علوم تشریحی دانشکده‌ی پزشکی اصفهان منتقل گردید.

آماده سازی نمونه‌ها جهت کشت اولیه: ابتدا نمونه‌ها جهت خروج خون و بافت‌های اضافی، چندین بار توسط PBS شستشو گردید. سپس پریوست استخوان به صورت مکانیکی به وسیله‌ی تیغ جراحی جدا شد. در مرحله‌ی بعد، نمونه‌ها به وسیله‌ی Bone cutter به قطعات ۱ میلی‌متری خرد شد و شستشوی مجدد به وسیله‌ی PBS انجام گرفت. بعد از این مرحله قطعات استخوانی به پتری دیش ۱۰ سانتی‌متری محتوی ۱۰ میلی‌لیتر DMEM حاوی FBS (۱۰ درصد)، اسید آسکوربیک (۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر)، بتا گلیسرول فسفات (۱۰ میلی‌مول) و پنی‌سیلین– استرپتومایسین (۱ درصد) انتقال داده شد و پتری دیش محتوی نمونه به انکوباتور دارای اتمسفر مرطوب، محتوی ۵ درصد دی اکسید کربن و دمای ۳۷

Archive of SID
www.SID.ir

درجه‌ی سانتی‌گراد منتقل گردید. بعد از ۲ روز، محیط رویی خارج و با محیط DMEM تازه تعویض گردید. محیط کشت هر ۴-۳ روز یک بار به مدت دو هفته تعویض شد. ظروف کشت از لحاظ خروج سلول‌های استخوانی از قطعات موجود در آن و همچنین تکثیر آن‌ها هر روز مورد بررسی قرار گرفت. زمانی که سلول‌ها سطح ظرف را به طور کامل اشغال نمود، با استفاده از مخلوط تریپسین EDTA سلول‌ها از کف دیش جدا و پس از شمارش، به نسبت مساوی به دو ظرف کشت جداگانه منتقل گردید.

بررسی روزانه کشت‌ها با میکروسکوپ: پتری دیش‌های کشت، هر روز با استفاده از میکروسکوپ معکوس از نظر مهاجرت سلول‌ها از درون قطعات استخوانی، رشد سلولی و آلودگی محیط کشت مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۱).



شکل ۱. در این شکل قطعه‌ای از استخوان کالواریای انسان نشان داده شده است؛ سلول‌های استئوبلاست در حال خروج از این قطعات می‌باشند. سلول‌ها به فرم دوکی و شبه فیبروبلاستی مشاهده می‌شوند (بزرگ‌نمایی ×۴۰).

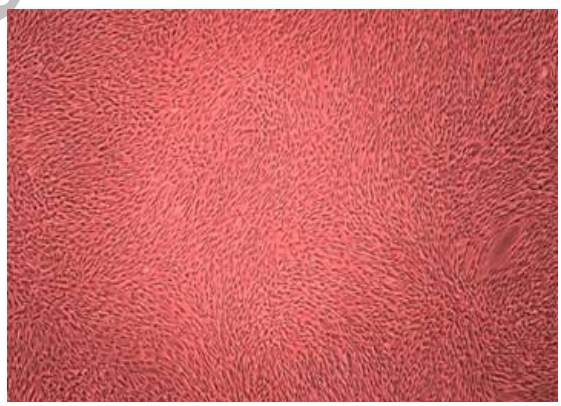
کشت سلول‌ها در داربست هیدروکسی آپاتیت: داربست آماده‌ی هیدروکسی آپاتیت (۰/۷۵) همراه با تری کلسیم فسفات (۰/۲۵) (سیگما) تهیه شد (شکل ۲) که به صورت بلوک‌های مکعبی شکل به ابعاد ۳ × ۳ × ۳ میلی‌متر و قطر منافذ ۵۰۰ میکرومتر هستند. سپس، تعدادی از بلوک‌های HA-TC به پلیت‌های ۶ خانه منتقل گردید و مقداری مدیوم درون هر پلیت ریخته شد و درون انکوباتور به مدت ۲ ساعت قرار گرفت. سوسپانسیون سلولی پس از تریپسینه و سانتریفوژ کردن تهیه گردید. بار دیگر، داربست از انکوباتور به زیر هود آورده شد و مدیوم آن خارج گردید. تعداد ۱۰ هزار سلول به روی داربست HA-TC منتقل گردید و پلیت به مدت ۳ ساعت دیگر درون انکوباتور به منظور چسبیدن سلول‌ها قرار داده شد. آن گاه، مدیوم استئوژنز درون پلیت ریخته شد و به مدت دو هفته در این داربست و انکوباتور نگهداری گردید. محیط کشت به فاصله‌ی هر ۴-۳ روز یک بار تعویض شد (شکل ۳).

شکل ۲. یک بلوک هیدروکسی آپاتیت- تری کلسیم فسفات؛ این بلوک مکعبی شکل به ابعاد ۳ × ۳ × ۳ میلی‌متر و قطر منافذ ۵۰۰ میکرومتر می‌باشد.

رنگ آمیزی Van kossa: برای مطالعه‌ی اثبات وجود ماتریکس معدنی درون داربست HA-TC به کمک میکروسکوپ نوری، ابتدا بلوک‌های HA-TC دو بار با محلول PBS شستشو داده شد و به مدت ۵ ساعت در محلول اسید نیتریک قرار گرفت. سپس به

www.SID.ir

مدت ۲ ساعت در فرمالین فیکس شد و پس از انجام مراحل آب‌گیری و تهیه‌ی بلوک پارافینی، برش‌های ۵ میکرومتری تهیه گردید و لام‌های به دست آمده با استفاده از رنگ Van kossa رنگ آمیزی شد. برای کشت تک لایه‌ای، پتری دیش‌ها از انکوباتور به زیر هود انتقال یافت و دو بار با PBS شستشو داده شد. پس از فیکس کردن سلول‌ها با پارافرمالدئید ۴ درصد، مراحل رنگ آمیزی Van kossa بر روی پتری دیش‌ها انجام گرفت. بدین منظور، ابتدا نمونه‌ها در نیترات نقره ۵ درصد به مدت ۱ ساعت قرار داده شد و پس از آن به ترتیب در پیروگالل ۱ درصد به مدت ۳ دقیقه، سدیم تیوسولفات ۲/۵ درصد به مدت ۵ دقیقه و نوکلئار فاست رد قرار گرفت و پس از شستشو، با میکروسکوپ نوری مشاهده گردید.



شکل ۳. نمایی از سلول‌های استئوبلاست جدا شده از استخوان کالواریا در پاساژ ثانویه با مورفولوژی دوکی شکل در حال تکثیر و ازدیاد مشخص می‌باشند (بزرگ‌نمایی ×۴۰).

روش MTT: در این روش، ابتدا بلوک‌های HA-TC با محلول PBS دو بار شستشو داده شد. سپس مدیوم بر روی بلوک‌های درون پلیت اضافه شد و بعد محلول MTT (۴۰ میکرولیتر، سیگما) بر روی بلوک‌های هیدروکسی اضافه گردید. سپس پلیت‌ها به مدت ۴ ساعت در داخل انکوباتور گذاشته شد. پس از اتمام زمان انکوباسیون، محیط کشت به آرامی تخلیه گردید. محلول DMSO (۴۰۰ میکرولیتر، سیگما) به هر خانه‌ی پلیت اضافه و پس از پیپت کردن با استفاده از دستگاه الیزا خوان (ELISA Reader) در طول موج ۵۴۰ نانومتر بر اساس فور مازان احیاء شده، شدت جذب نوری خوانده شد.

کشت تک لایه‌ای سلول‌ها: برای کشت تک لایه‌ای، ابتدا پتری دیش‌ها با محلول PBS دو بار شستشو شد و مابقی مراحل کار مشابه داربست HA-TC مرحله‌ی قبل صورت پذیرفت.

روش شمارش سلولی با لام نئوبار: ابتدا بلوک‌های HA-TC با محلول PBS دو بار شستشو داده شد. سپس به مدت ۲ ساعت در محلول اسید نیتریک قرار گرفت. پس از حل شدن، محلول حاصل سانتریفوژ گردید، مایع رویی تخلیه شد و سپس سلول‌ها توسط هموسایتومتر شمارش گردید.

در کشت تک لایه‌ای، پتری دیش‌ها، پس از تخلیه‌ی مدیوم، توسط PBS شستشو شد و با اضافه کردن آنزیم، سلول‌ها از کف دیش جدا گردید و محلول حاصل سانتریفوژ و مایع رویی تخلیه گردید. در این مرحله سلول‌ها توسط هموسایتومتر شمارش شد.

روش رنگ آمیزی آلکالین فسفاتاز: ابتدا پتری دیش‌ها در زیر انکوباتور با محلول PBS دو بار شستشو داده شد. بعد به مدت ۳۰ ثانیه فیکساتیو اضافه گردید. سپس به مدت ۴۵ ثانیه با آب دیونیزه شستشو انجام گرفت و آب دیونیزه خارج گردید. در ادامه، محلول نمک دیازونیوم به مدت ۳۰ دقیقه اضافه و سپس با آب دیونیزه به مدت ۲ دقیقه شستشو داده شد.

Archive of SID
www.SID.ir

بعد از خارج کردن آب، به مدت ۱۰ دقیقه هماتوکسیلین اضافه شد و سپس با میکروسکوپ معکوس فعالیت آلکالین فسفاتازی مشاهده گردید.

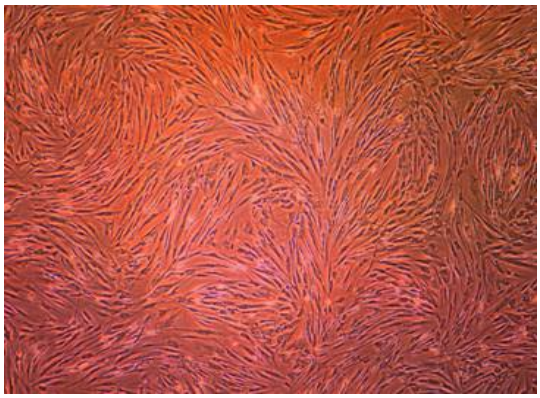
تکنیک فلوسایتومتری: سلول‌های کشت یافته در پاساژ دوم با روش تریپسینه نمودن از کف دیش جدا گردید و سوسپانسیون سلولی با دور rpm ۱۴۰۰ و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد و سپس سلول‌ها در لوله‌های فلوسیتومتر ریخته شد. در مرحله‌ی بعد، حدود ۳ میکرولیتر آنتی‌بادی اولیه‌ی آلکالین فسفاتاز به هر یک از لوله‌ها افزوده شد. سلول‌ها در آنتی‌بادی اولیه به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی انکوبه شدند. پس از شستشو با بافر، بار دیگر سلول‌ها با آنتی‌بادی ثانویه کنژوگه با FITC به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شد و پس از شستشوی مجدد با بافر و سانتریفوژ، رسوب سلولی در ۵۰۰ میکرولیتر بافر سوسپانسیون گردید و با دستگاه فلوسایتومتر BD شمارش سلول‌های نشان‌دار به انجام رسید.

تجزیه و تحلیل داده‌ها: با استفاده از آزمون T-test آنالیز اطلاعات انجام گرفت.

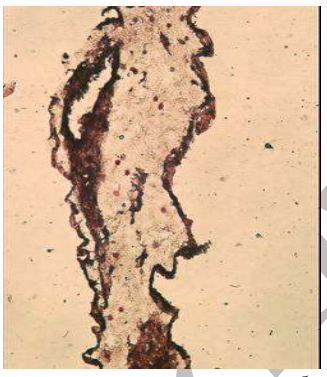
یافته‌ها

کشت سلول‌های استئوبلاستی: در کشت اولیه، سلول‌هایی با مورفولوژی چند ضلعی و دوکی مشاهده شد. در پاساژ اول این سلول‌ها با تشکیل کلنی شروع به ازدیاد کردند (شکل ۴). در نهایت، تعداد سلول‌های دوکی با انجام پاساژ سلولی افزایش یافت؛ به طوری که در پاساژ دوم سلول‌ها تمام سطح دیش را اشغال کردند (شکل ۳).

رنگ آمیزی Van kossa: رنگ آمیزی Van kossa جهت اثبات وجود ماتریکس معدنی استفاده شد. در این مطالعه، دو گروه مورد آزمایش (تک لایه‌ای و هیدروکسی آپاتیت– تری کلسیم فسفات) در روز ۱۴، تشکیل رسوب تیره رنگ وجود ماتریکس معدنی را ثابت کرد. به این ترتیب، رسوبات کلسیم به رنگ سیاه و هسته‌ی سلول‌ها قرمز شدند (شکل‌های ۵ و ۶).



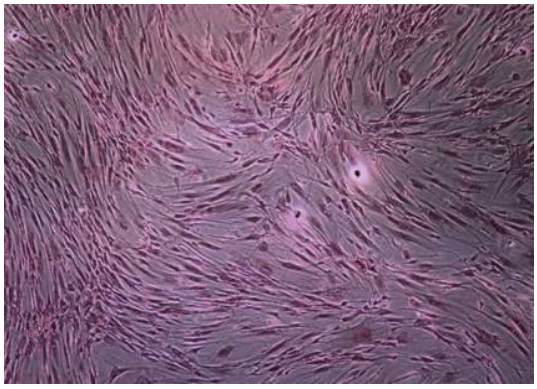
شکل ۴. سلول‌های استئوبلاست به دست آمده از قطعه‌ی استخوانی پس از پاساژ اول که به صورت جمعیت سلولی یکنواخت با مورفولوژی دوکی شکل قابل مشاهده هستند (بزرگ‌نمایی ×۴۰).



شکل ۵. رنگ آمیزی Von kossa بر روی نمونه‌ی هیدروکسی آپاتیت- تری کلسیم فسفات؛ نتایج این رنگ آمیزی وجود هسته‌های قرمز رنگ را در سلول‌ها مشخص نموده است. وجود رسوب تیره رنگ، نشان دهنده‌ی ماتریکس معدنی تولید شده توسط سلول‌های استئوبلاست کشت یافته بر روی داربست هیدروکسی آپاتیت- تری کلسیم فسفات است (بزرگ‌نمایی ×۳۰۰)

شمارش سلولی: با شمارش سلول‌ها مشخص گردید که میانگین میزان تکثیر سلولی در داربست HA-TC (۳۸۴۳ ± ۱۸۴۷۵) نسبت به میانگین میزان تکثیر سلولی در داربست تک لایه‌ای (۱۲۰۵ ± ۱۴۷۰۰) به طور معنی‌داری بیشتر است ($P < ۰/۰۰۱$).

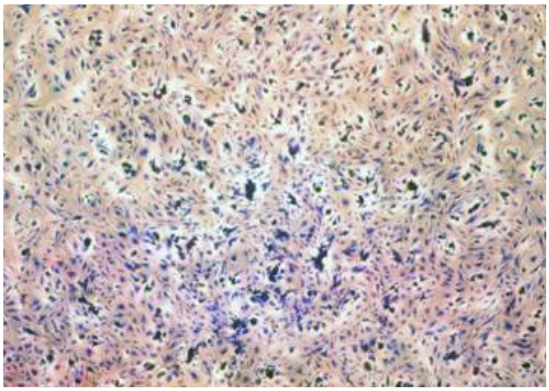
Archive of SID
www.SID.ir



شکل ۶. رنگ آمیزی Von kossa بر روی کشت تک لایه‌ای؛ وجود رسوب تیره رنگ نشان دهنده‌ی ماتریکس معدنی تولید شده توسط سلول‌های استئوبلاست در کشت تک لایه‌ای است (بزرگ‌نمایی ×۳۰)

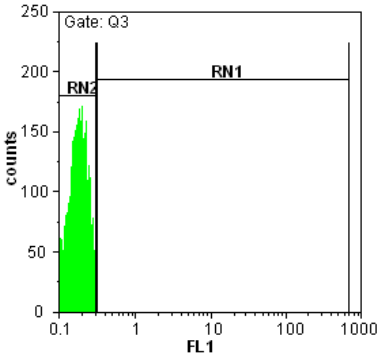
بررسی میانگین فعالیت سلول‌های زنده ***(MTT Assay)***: میانگین فعالیت سلول‌های زنده در داربست HA-TC (۰/۲۹ ± ۱/۸۵۶ درصد) به طور معنی‌داری نسبت به میانگین فعالیت سلول‌های زنده در کشت تک لایه‌ای (۰/۲۰۵ ± ۱/۳۰۶ درصد) بیشتر بود ($P < ۰/۰۰۱$).

رنگ آمیزی آلکالین فسفاتاز: رنگ آمیزی با آلکالین فسفاتاز بر روی سلول‌های استئوبلاست وجود گرانول‌های آبی رنگ رادر این سلول‌ها به اثبات رسانید؛ به این ترتیب که گرانول‌های آلکالین فسفاتاز مثبت به رنگ آبی در سلول‌ها مشاهده شد (شکل ۷).

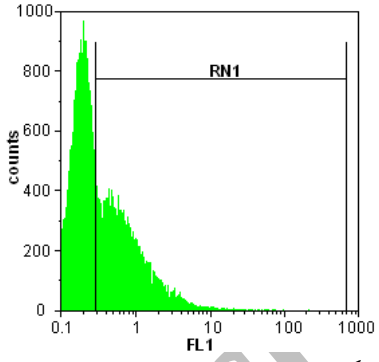


شکل ۷. رنگ آمیزی آلکالین فسفاتاز بر روی سلول‌های استئوبلاستی؛ نواحی آبی رنگ در این تصویر بیانگر فعالیت آلکالین فسفاتازی توسط سلول‌ها می‌باشد (بزرگ‌نمایی ×۴۰).

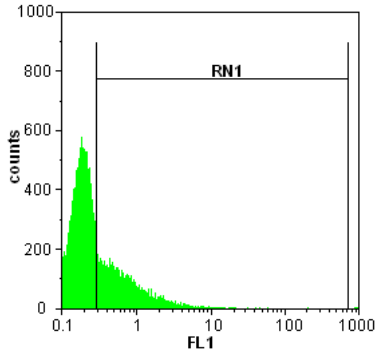
فلوسایتومتری: نتایج حاصل از تکنیک فلوسایتومتری نشان داد که ۵۷ درصد از سلول‌های استئوبلاست در کشت اولیه دارای مارکر آلکالین فسفاتاز هستند و در پاساژ سوم این میزان به ۵ درصد کاهش یافت (نمودارهای هیستوگرام ۳-۱).



نمودار هیستوگرام ۱. شمارش سلولی از طریق فلوسایتومتری در گروه شاهد



نمودار هیستوگرام ۲. شمارش سلولی از طریق فلوسایتومتری: مارکر آلکالین فسفاتاز در ۵۷ درصد سلول‌های جدا شده از استخوان کالواریای انسان در کشت اولیه (پاساژ صفر) مشخص گردید.



نمودار هیستوگرام ۳. شمارش سلولی از طریق فلوسایتومتری: مارکر آلکالین فسفاتاز در ۵ درصد سلول‌های جدا شده از استخوان کالواریای انسان در پاساژ سوم مشخص گردید..

Archive of SID
www.SID.ir

بحث

تا کنون مطالعات زیادی در جهت کشت سلول‌های استخوان ساز انجام گرفته است و محققان از مواد مختلفی به عنوان داربست سلولی استفاده نموده‌اند (۱۵). در این تحقیق ما بر آن شدیم تا به مطالعه‌ی قابلیت کشت سلول‌های استئوبلاست مشتق از استخوان کالواریا بر روی داربست HA-TC پرداخته، رفتار این سلول‌ها را در داربست HA-TC در مقایسه با کشت تک لایه‌ای مورد بررسی قرار دهیم. استخوان کالواریا یک استخوان اسفنجی است و در بیشتر تحقیقات جهت کشت به روش Explantation استخوان‌های اسفنجی استفاده می‌شود؛ چرا که سلول‌ها زودتر از داخل استخوان خارج می‌شوند (۱۵). Van Griensven و همکاران با مطالعه‌ی نمونه‌هایی که از استخوان ایلیاک بیماران تهیه کرده بودند، مدت زمان لازم برای خروج سلول‌ها از بافت استخوانی را ۱۲ روز گزارش کردند (۱۶). این مدت زمان در مطالعه‌ی ما به طور متوسط ۱۲-۱۰ روز بود که با مطالعه‌ی آنان هم‌خوانی دارد. Wiedmann-Al-Ahmad و همکاران مدت زمانی را که سلول‌ها کف پتری دیش را به طور کامل می‌پوشاند، ۵-۴ هفته گزارش دادند (۶). این مدت زمان در مطالعه‌ی حاضر به طور متوسط ۲۰ روز بود که شاید علت این تفاوت اضافه کردن ترکیبات مختلف از قبیل اسید آسکوربیک و بتا گلیسرو فسفات با غلظت‌های مختلف به محیط کشت در مطالعه‌ی ما باشد؛ چرا که در مطالعه‌ی آنان از هیچیک از مواد فوق استفاده نشده است (۶). از طرف دیگر باید گفت که 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 (۱۷).در مطالعه‌ی Van Griensven و همکاران (۱۶) از محیط کشت BGJb و در مطالعه‌ی Wiedmann-Al-Ahmad و همکاران (۶) از محیط کشت αMEM استفاده شده است؛ در حالی که در مطالعه‌ی ما از محیط کشت DMEM به عنوان محیط کشت پایه استفاده گردید. اکثر مطالعات نشان داده است که داربست‌هایی برای پیشرفت روند ترمیم و نوسازی بافت‌ها در بدن موجود زنده و شرایط آزمایشگاهی ضروری و اساسی می‌باشند که به عنوان یک بستر مناسب جهت مهاجرت و چسبیدن و نیز جهت تکوین و تعیین شکل بافت جدید و پیوند آن به بدن موجود زنده عمل می‌کنند؛ به علاوه، ساختار داربست باید به گونه‌ای باشد که انتقال ملکول‌های تنظیم کننده و مواد مغذی به سلول‌ها و متابولیت‌ها از سلول به محیط را تسهیل نماید (۱۹-۱۸). همچنین داربست به کار گرفته شده نباید موجب واکنش التهابی یا تولید سم در بدن شود و خصوصیات مکانیکی متناسب با بافت را نیز باید دارا باشد (۲۰). به همین دلیل، در مطالعه‌ی حاضر از داربست HA-TC استفاده شد؛ چرا که داربست HA-TC از چنین ویژگی برخوردار است. داربست HA-TC دارای ترکیباتی مشابه ترکیبات معدنی ماتریکس استخوانی نیز می‌باشد (۱۱). در تحقیقی که توسط Jiang و همکاران صورت گرفت، سلول‌های استئوبلاست را از نمونه‌ی حیوانی (سگ) به دست آورده، بر روی داربست β-TCP منتقل کردند. ملاحظه شد که طی روزهای ۵ تا ۹ سلول‌ها شروع به رشد و تکثیر نمودند اما سرعت رشد بسیار کند بود. علت احتمالی این سرعت رشد کم می‌توانست این باشد که در تحقیق آنان فقط از داربست β-TCP استفاده شد (۲۱). اما در مطالعه‌ی حاضر از β-TCP به

Archive of SID
www.SID.ir

همراه هیدروکسی آپاتیت استفاده گردید و میزان رشد نسبت به مطالعه‌ی Jiang و همکاران (۲۱) بهتر بود. در تحقیقی دیگر، برای کشت سلول‌های استئوبلاستی از هیدروکسی آپاتیت (۰/۲۵) و تری‌کلسیم فسفات (۰/۷۵) هم‌زمان استفاده شد و مشاهده گردید که طی سه روز اول، جمعیت سلولی کاهش یافت ولی بعد از آن تا روز ۷ جمعیت سلولی کم‌کم افزایش پیدا کرد. علت این اختلاف، شاید در نسبت درصدهای به کار رفته‌ی HA-TC باشد؛ چرا که هر چه درصد هیدروکسی بیشتر شود، رشد سلول‌ها نیز بیشتر خواهد شد (۱۲). در داربست مورد استفاده در مطالعه‌ی حاضر درصد هیدروکسی آپاتیت و تری کلسیم فسفات به ترتیب ۷۵ و ۲۵ درصد بود و نسبت به تحقیق قبلی بیشتر است. در پژوهش Jalota و همکاران، سلول‌های استئوبلاست بر روی داربست β-TCP (۴۰ درصد) به همراه هیدروکسی آپاتیت (۶۰ درصد) منتقل شد؛ سلول‌ها به خوبی به داربست چسبید و تکثیر سلولی انجام گرفت. این عقیده که هرچه درصد هیدروکسی آپاتیت بیشتر باشد، رشد سلولی نیز بیشتر است را تأیید کرد (۲۲).

در مطالعات مختلف از رنگ آمیزی Van kossa جهت اثبات وجود ماتریکس معدنی استفاده شده است (۲۳). در این مطالعه، نتایج حاصل از رنگ آمیزی Van kossa بر روی دو گروه مورد آزمایش (تک لایه‌ای و HA-TC) در روز ۱۴، وجود مواد معدنی در ماتریکس را نشان داد؛ این نتیجه با یافته‌های Abbah و همکاران، که برای اثبات وجود ماتریکس معدنی نیز از رنگ آمیزی Van kossa استفاده کرده بودند (۲۴)، هم‌خوانی داشت.

نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد که سلول‌های استئوبلاست مشتق از بافت استخوان کالواریا در داربست HA-TC، در مقایسه با کشت تک لایه‌ای، میزان تکثیر بیشتری دارند و نیز درصد سلول‌های زنده در داربست HA-TC نسبت به گروه تک لایه‌ای به طور معنی‌داری بیشتر است. علت احتمالی این مسأله آن است که داربست هیدروکسی آپاتیت– تری کلسیم فسفات که یکی از داربست‌های سه بعدی در زمینه‌ی کشت سلولی به شمار می‌رود، دارای کلسیم و اجزای ساختمانی مشابه ماتریکس معدنی استخوان می‌باشد و خصوصیات مکانیکی این داربست مشابه با بافت طبیعی است. به علاوه از ویژگی زیست سازگاری مناسب برخوردار بوده، موجب واکنش التهابی در بدن نمی‌شود.

تشکر و قدردانی

با تشکر و قدردانی از زحمات پرسنل محترم آزمایشگاه کشت سلولی دانشکده‌ی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان و سرکار خانم زهرا شفیعی که ما را در این تحقیق یاری نمودند.

References

1. Cai X, Lin Y, Ou G, Luo E, Man Y, Yuan Q, et al. Ectopic osteogenesis and chondrogenesis of bone marrow stromal stem cells in alginate system. Cell Biol Int 2007; 31(8): 776-83.
2. Cancedda R, Dozina B, Giannonia P, Quartob R. Tissue engineering and cell therapy of cartilage and bone. Matrix Biology 2003; 22(1): 81-91.
3. 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.
4. Aronow MA, Gerstenfeld LC, Owen TA, Tassinari MS, Stein GS, Lian JB. Factors that promote progressive development of the osteoblast phenotype in cultured fetal rat calvaria cells. J Cell Physiol 1990; 143(2): 213-21.
5. Awad HA, Wickham MQ, Leddy HA, Gimble JM, Guilak F. Chondrogenic differentiation of

Archive of SID
www.SID.ir

adipose-derived adult stem cells in agarose, alginate, and gelatin scaffolds. Biomaterials 2004; 25(16): 3211-22.
6. 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.
7. 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.
8. George J, Onodera J, Miyata T. Biodegradable honeycomb collagen scaffold for dermal tissue engineering. J Biomed Mater Res A 2008; 87(4): 1103-11.
9. Morris VJ. Gelation of polysaccharides. In: Mitchell JR, Ledward DA, Editors. Functional properties of food macromolecules. New York: Elsevier Applied Science Publishers; 1986. p. 121-8.
10. Kurashina K, Kurita H, Wu Q, Ohtsuka A, Kobayashi H. Ectopic osteogenesis with biphasic ceramics of hydroxyapatite and tricalcium phosphate in rabbits. Biomaterials 2002; 23(2): 407-12.
11. Alam MI, Asahina I, Ohmamiuda K, Takahashi K, Yokota S, Enomoto S. Evaluation of ceramics composed of different hydroxyapatite to tricalcium phosphate ratios as carriers for rhBMP-2. Biomaterials 2001; 22(12): 1643-51.
12. Sun JS, Tsuang YH, Liao CJ, Liu HC, Hang YS, Lin FH. The effects of calcium phosphate particles on the growth of osteoblasts. J Biomed Mater Res 1997; 37(3): 324-34.
13. Wu W, Chen X, Mao T, Chen F, Feng X. Bone marrow-derived osteoblasts seeded into porous beta-tricalcium phosphate to repair segmental defect in canine's mandibula. Ulus Travma Acil Cerrahi Derg 2006; 12(4): 268-76.
14. Pang L, Yun H, Yan Yong N, Liu L, Xiong Z, Wei Y. Repair of rabbit segmental defects with the hybrid rp scaffold. J of US_China Medical Science 2007; 4(2): 1548-60.
15. Li Z, Ramay HR, Hauch KD, Xiao D, Zhang M. Chitosan-alginate hybrid scaffolds for bone tissue engineering. Biomaterials 2005; 26(18): 3919-28.
16. 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.
17. 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.
18. 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.
19. Yamamoto M, Tabata Y, Kawasaki H, Ikada Y. Promotion of fibrovascular tissue ingrowth into porous sponges by basic fibroblast growth factor. J Mater Sci Mater Med 2000; 11(4): 213-8.
20. Quong D, Neufeld RJ, Skjak-Braek G, Poncelet D. External versus internal source of calcium during the gelation of alginate beads for DNA encapsulation. Biotechnol Bioeng 1998; 57(4): 438-46.
21. Jiang XQ, Wang SY, Zhao J, Zhang XL, Zhang ZY. Sequential fluorescent labeling observation of maxillary sinus augmentation by a tissue-engineered bone complex in canine model. Int J Oral Sci 2009; 1(1): 39-46.
22. Jalota S, Bhaduri SB, Tas AC. In vitro testing of calcium phosphate (HA, TCP, and biphasic HA-TCP) whiskers. J Biomed Mater Res A 2006; 78(3): 481-90.
23. 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.
24. 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.

Archive of SID

www.SID.ir

Journal of Isfahan Medical School **Original Article**

Vol 28, No 119, 3rd week, February 2011 Received: 24.11.2010 Accepted: 23.1.2011

The Comparison of Characteristics of Human Osteoblast Cells in Two Methods, Monolayer Culture and Hydroxyapatite-Tricalcium Phosphate Scafold

Batool Hashemibeni PhD[1], Fereshteh Ali Akbari[2], Farzaneh Sadeghi MSc[3], Ebrahim Esfandiary MD PhD[4], Hamid Bahramian PhD[5], Hosein Sadeghi PhD[1],

Abstract

Background: Bone diseases and injuries, including bone fractures during accidents and trauma, in all communities are prevalent and in most cases, crushed bone is not able to repair; various treatment ways including tissue graft from an allograft or autograft have risks and lead to problems. One method for treatment of bone fractures is using outologous osteoblasts with culturing on suitable scaffolds and then implant of cells to defect region. In this study, we cultured osteoblast cells on monolayer and calcium phosphate hydroxyapatite (HA-TC) scaffolds and the behavior of these two types of cells in different cultures were analyzed.

Methods: During the craniotomy operation in Alzahra hospital in five individual, bone samples were obtained and in sterile condition were sent to the laboratory. Each sample after washing with PBS was cut into small pieces and plates containing the medium culture were transferred to the incubator. After 10-12 days, the cells have started to leave the bones covering the floor plate and after using the enzyme Trypsin_EDTA isolated from plate divided into two groups. One group was cultured in HA-TC scaffold and other as monolayer culture. Van kossa staining, flow cytometry, alkaline phosphatase assay and MTT method were used to investigate the characteristics of osteoblasts.

Finding: Osteoblasts in monolayer culture were observed as fibroblast- like cells. Van kossa staining determined the mineral deposits in the two groups. The cell proliferation increased in cellular scaffolding HA-TC more than monolayer ($P < 0.001$). Results of MTT showed more activity items on living cells in scaffold HA-TC than monolayer ($P < 0.001$). In alkaline phosphatase staining, blue granules were observed; in the flow cytometry, 57 percent of primary cultured cells and 5 percent in the third passage cells showed alkaline phosphatase marker.

Conclusion: According to the results of this study, the hydroxyapatite scaffold is better than monolayer culture for osteoblast cells. This could be because of having more calcium and similar elements to bone matrix that facilitate feeding cultured cells.

Keywords: Monolayer culture, Bone regeneration, Hydroxyapatite-calcium phosphate, Osteoblast.

Archive of SID

[1] Assistant Professor, Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.
[2] PhD Student, Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
[3] Msc of Anatomical Sciences, Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.
[4] Professor, Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.
[5] Associate Professor, Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.
Corresponding Author: Batool Hashemibeni PhD, Email: hashemibeni@med.mui.ac.ir

www.SID.ir