

## مقایسه‌ی میزان تکثیر سلول‌های استئوبلاست انسانی در داربست‌های آلژینات و هیدروکسی آپاتیت - تری کلسیم فسفات

دکتر حسین صادقی<sup>۱</sup>، دکتر حمید بهرامیان<sup>۱</sup>، دکتر بتول هاشمی بنی<sup>۱</sup>،

دکتر ابراهیم اسفندیاری<sup>۲</sup>، فرشته علی اکبری<sup>۳</sup>

### خلاصه

**مقدمه:** به دنبال شکستگی‌های استخوانی در طی تصادفات، بسیاری بیماران از ترمیم نشدن ضایعات استخوانی و مشکلات زیبایی شناختی و روانی متعاقب آن رنج می‌برند. در این راستا، یافتن راه کارهای جدید و مؤثر برای تسهیل ترمیم نقایص استخوانی مهم است. یکی از راه‌های درمان، استفاده از سلول‌های استخوانی خود بیمار، کشت آن‌ها بر روی داربست مناسب و انتقال به محل ضایعه می‌باشد. هدف اصلی این مطالعه، مقایسه‌ی میزان تکثیر سلول‌های استئوبلاست بر روی دو داربست آلژینات و هیدروکسی آپاتیت - تری کلسیم فسفات (HA-TC) بود.

**روش‌ها:** نمونه‌های استخوانی از چهار بیمار، که در بیمارستان الزهراء (س) اصفهان تحت جراحی کرانیوتومی قرار گرفتند، به دست آمد. نمونه‌ها به قطعات کوچک تقسیم و در پلیت‌های محتوی محیط کشت به انکوباتور منتقل گردید. در روزهای ۱۲-۱۰ پس از انتقال، شروع خروج استئوبلاست از قطعات استخوانی مشاهده شد. این سلول‌ها به طور متوسط پس از ۲ هفته کف پلیت را پوشاندند. نسل اول این سلول‌ها با استفاده از Trypsin\_EDTA از کف پلیت جدا شد و به دو بخش تقسیم گردید. یک بخش به داربست HA-TC و بخش دیگر به ژل آلژینات اضافه شد. دو هفته بعد، اطلاعات جمع آوری و تجزیه و تحلیل شد.

**یافته‌ها:** با شمارش سلول‌ها میانگین تعداد سلول‌های موجود در ژل آلژینات و داربست هیدروکسی آپاتیت - تری کلسیم فسفات در روز ۱۴ نسبت به روز اول همان گروه اختلاف معنی‌داری را نشان داد ( $P < 0/001$ ). به علاوه، اختلاف میانگین تعداد سلول‌های موجود در ژل آلژینات و داربست هیدروکسی آپاتیت در روز ۱۴ معنی‌دار بود ( $P < 0/001$ ). در روز ۱۴، میانگین درصد سلول‌های زنده در گروه آلژینات به طور معنی‌داری بیشتر از گروه هیدروکسی آپاتیت - تری کلسیم فسفات بود ( $P < 0/001$ ). در روز ۱۴، در رنگ آمیزی Van kossa، وجود ماتریکس معدنی ثابت گردید؛ به این ترتیب که رسوبات کلسیم به رنگ سیاه و هسته سلول‌ها قرمز شد.

**نتیجه‌گیری:** بر اساس نتایج تحقیق حاضر، ژل آلژینات نسبت به داربست HA-TC، حمایت بهتری برای تکثیر و بقای استئوبلاست محسوب می‌شود. علت احتمالی این تفاوت را می‌توان در ویژگی‌های زیستی این ژل جستجو نمود؛ تخلخل ژل آلژینات شرایطی را فراهم می‌آورد که فعالیت‌های سلولی و متابولیکی در آن تسریع می‌گردد.

**واژگان کلیدی:** آلژینات، ترمیم استخوان، هیدروکسی آپاتیت - تری کلسیم فسفات، استئوبلاست.

### مقدمه

دنبال راه کارهای نوین برای ترمیم استخوان‌های آسیب دیده می‌باشد (۱). گرچه شکستگی‌های استخوان به لحاظ داشتن قدرت ترمیم بالا با درمان‌های ارتوپدی و حمایتی بهبود می‌یابد، ولی در بسیاری از موارد استخوان خرد شده قادر به ترمیم نبوده، بیماران دچار

امروزه با توجه به آمار بالای تصادفات و شکستگی‌هایی که منجر به نقایص استخوانی می‌شود و با توجه به محدودیت امکان پیوند مناسب استخوان و مشکلات عملکردی و روانی ناشی از این نقایص، محققان به

<sup>۱</sup> استادیار، گروه علوم تشریحی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

<sup>۲</sup> استاد، گروه علوم تشریحی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

<sup>۳</sup> دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم تشریحی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

نویسنده‌ی مسؤول: دکتر حسین صادقی، استادیار، گروه علوم تشریحی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

که انتشار مواد غذایی در داربست‌های آلژینات به غلظت آلژینات، pH، حرارت و روش‌های تهیه‌ی ژل مناسب بستگی دارد. ترکیبات منومریک، توالی ساختمانی و سرعت تشکیل ژل آلژینات بر میزان انتشار مواد، تخلخل، درصد تورم و استحکام و زیست سازگاری این ژل تأثیر دارد (۷-۹). Majmudar و همکاران موفق به کشت استئوبلاست‌های مشتق از کالواریای جنین مرغ در آلژینات شده، مدت زنده ماندن این سلول‌ها در ژل آلژینات را ۸ ماه گزارش دادند (۱۰). در تحقیق Liao و همکاران، سلول‌های استئوبلاست کشت داده شده بر روی ژل آلژینات، برای ترمیم نقص استخوان کرانیال خرگوش استفاده شد و مشاهده گردید که این ژل داربست مفیدی در ترمیم نقص می‌باشد (۱۱). در تحقیق دیگر توسط Alsberg و همکاران، سلول‌های استئوبلاست نمونه‌ی حیوانی، بر روی ژل آلژینات کشت داده شد و میزان کارایی آن در ترمیم استخوان را ارزیابی گردید. این گروه مشاهده نمودند که ژل آلژینات در زمینه‌ی ترمیم نقش بسزایی دارد (۱۲). در ایران کشت سلول‌های استخوانی توسط اسفندیاری و همکاران در دو محیط کشت تک لایه‌ای و سه بعدی (آلژینات) انجام پذیرفت؛ آن‌ها دریافتند که ژل آلژینات شرایط بهتری را جهت کشت استئوبلاست‌ها فراهم می‌آورد (۱۳).

ترکیبات کلسیم از اجزای بافت استخوانی می‌باشد 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

مشکلاتی از قبیل کوتاهی عضو و نیز مشکلات روحی- روانی ناشی از آن می‌شوند (۲). به همین دلیل، ضرورت تأمین یک منبع بافت استخوانی برای ترمیم ناحیه غیر قابل انکار است. 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 (اسکافولد) 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 (۴-۲).

آلژینات یک بیوپلیمر طبیعی است که به طور عمده از جلبک قهوه‌ای و به میزان کمتر از باکتری‌ها استخراج می‌شود. این ماده ۴۰ درصد وزن خشک جلبک‌ها را تشکیل می‌دهد (۵). در واقع، آلژینات در ماتریکس خارج سلولی این جلبک‌ها به صورت ترکیب با کاتیون‌های کلسیم، منیزیم و سدیم وجود دارد (۶). آلژینات می‌تواند به عنوان یک ماده‌ی زمینه‌ای خارج سلولی، بستری مناسب جهت رشد سلول‌ها فراهم کند. این ماده به شکل پودر خشک در دسترس بوده، در محیط آزمایشگاه به ژل آلژینات قابل تبدیل است. این ژل، داربستی سه بعدی را می‌سازد که از یک سو مساحت بیشتری برای تکثیر سلول‌ها در دسترس قرار می‌دهد و از سوی دیگر، انتشار مواد غذایی در محیط کشت را آسان نموده، سبب تسهیل رشد سلولی می‌شود. این ویژگی‌ها موجب شده است که این ماده به عنوان داربست مناسب در طراحی بافت به کار گرفته شود. وجود تخلخل در حالت ژل، انتشار ماکرومولکول‌ها را تسهیل می‌نماید. لازم به ذکر است

اکثر تحقیقات، هیدروکسی آپاتیت به همراه تری کلسیم فسفات (HA-TC) استفاده شده است (۱۵-۱۴). در تحقیق Kurashina و همکاران بر روی خرگوش، مشاهده شد که هیدروکسی آپاتیت به تنهایی، نقشی در القای استخوان سازی ندارد، اما به همراه تری کلسیم فسفات، باعث القای استخوان سازی می‌شود (۱۴). در تحقیق دیگری برای کشت سلول‌های استئوبلاستی در داربست ترکیبی HA-TC، طی سه روز اول کشت، جمعیت سلولی کاهش یافت ولی بعد از آن تا روز ۷ تعداد سلول‌ها به تدریج افزایش پیدا کرد. همچنین این داربست میزان فعالیت آکالین فسفاتازی را در سلول‌های استئوبلاست افزایش داد و باعث افزایش میزان پروتئین‌های مورفوژن استخوانی (BMPs) گردید (۱۶).

در تحقیقی دیگر، سلول‌های استئوبلاست استخوان ایلوم، پس از کشت بر روی داربست تری کلسیم فسفات، به همراه داربست (داربست/سلول)، به محل نقص در استخوان ماندیل منتقل شد و نتیجه گیری گردید که نوع داربست، عامل تعیین کننده‌ی اصلی در مهندسی بافت می‌باشد (۱۷). در یک بررسی دیگر، رشد سلول‌های مزانشیمی بر روی دو ترکیب داربستی PLGA/TCP و PLGA/TCP/HA/collagen و نتایج حاصل از انتقال مجموعه‌ی داربست/سلول، مقایسه شد. داربست اول (PLGA/TCP)، سطح کافی برای اتصال سلول‌ها نداشت و تکثیر سلولی اندکی مشاهده شد؛ این مورد به دلیل ویژگی هیدروفوبی داربست PLGA می‌باشد. در صورتی که داربست دوم (PLGA/TCP/HA/collagen)، داربست مناسب‌تری بود و ترمیم استخوان انجام گرفت؛ این یافته به دلیل داشتن هیدروکسی و کلاژن می‌باشد که هر دو از عناصر

اصلی ماتریکس استخوانی هستند و باعث ترمیم استخوان می‌شوند. بنابراین با اصلاح داربست می‌توان توانایی استئوژنیک سلول‌ها را بالا برد (۱۸). همچنان که بیان شد، هر دو داربست HA-TC و آلزینات قادر به فراهم نمودن شرایطی برای کشت سلول‌های استخوانی می‌باشند، اما در این مورد که کدامیک از این دو داربست توانایی بیشتری در این خصوص دارند، تاکنون مطالعه‌ای صورت نپذیرفته است؛ در این مطالعه، ما به مقایسه‌ی توانایی این دو داربست در کشت سلول‌های استئوبلاستی پرداختیم.

## روش‌ها

**تهیه‌ی نمونه:** تعداد ۴ نمونه‌ی استخوانی از بین بیماران کرانیوتومی بیمارستان الزهراء (س) اصفهان 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. این نمونه، که شامل قطعه‌ای از کالواریای بیمار بود، تحت بیهوشی عمومی و شرایط استریل کامل با ابعاد ۱ × ۱ سانتی‌متر، توسط جراح برداشته و در لوله‌های فالكون، ۵۰ سی‌سی محتوی Phosphate Buffered Saline (PBS) و ۱ درصد آنتی‌بیوتیک به آزمایشگاه کشت سلول گروه علوم تشریحی دانشکده‌ی پزشکی منتقل گردید. آماده سازی نمونه‌ها در آزمایشگاه جهت کشت اولیه به روش زیر انجام شد.

ابتدا نمونه‌ها چندین بار توسط PBS جهت خروج خون و بافت‌های اضافی شستشو گردید. سپس پریوست استخوان به صورت مکانیکی به وسیله‌ی تیغ جراحی جدا گردید. در مرحله‌ی بعد، نمونه‌ها به وسیله‌ی Bone cutter به قطعات ۱ میلی‌متری خرد

تکرار شد (پاساژ دوم). سلول‌های حاصل از این پاساژ، پس از تریپسینه شدن و جدایی از دیش، به مدت ۱۰ دقیقه با دور rpm ۱۴۰۰ سانتریفوژ شد. رسوب حاصل با محیط کشت Resuspend شد و پس از شمارش سلولی، به نسبت مساوی به دو ظرف کشت جداگانه منتقل گردید تا برای انتقال به دو داربست آماده باشد.

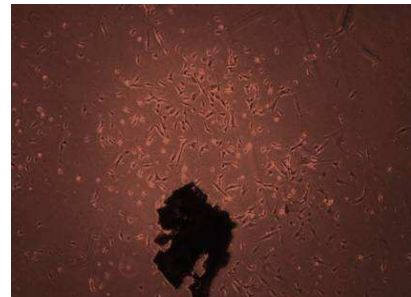


شکل ۲. سلول‌های استئوبلاست به دست آمده از استخوان کالواریای انسان پس از پاساژ دوم. این سلول‌ها به صورت جمعیت سلولی یکنواخت با مورفولوژی دوکی شکل قابل مشاهده است (بزرگ‌نمایی  $\times 40$ ).

#### تکثیر استئوبلاست بر روی داربست آلژینات:

جهت کشت استئوبلاست بر روی داربست آلژینات، حدود ۰/۴ میلی‌لیتر محلول آلژینات به رسوب سلولی حاصل از پاساژ دوم افزوده شد. پس از مخلوط کردن سلول‌ها با آلژینات (با Pipetting توسط سرنگ انسولین) محلول حاصل به صورت قطره قطره به محلول کلرید کلسیم ۱۰۵ میلی‌مولار اضافه گردید. طی مدت ۱۵ دقیقه، قطرات آلژینات-سلول در محلول کلرید کلسیم به حالت ژل در آمد و قطرات شکل ژله ماندی به خود گرفت، که از پس تحت عنوان دانه‌های آلژینات (Alginate beads) از آن‌ها یاد می‌شود. پس از تخلیه کلرید کلسیم، محلول کلرید سدیم ۰/۹ درصد به دانه‌های آلژینات اضافه شد (به مدت ۱۰ دقیقه). این عمل دو بار تکرار گردید. دانه‌ها

شد و شستشوی مجدد به وسیله PBS انجام گردید. بعد از این مرحله، قطعات استخوانی به پتری دیش ۱۰ سانتی‌متری محتوی ۱۰ میلی‌لیتر DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) حاوی Fetal Bovine Serum (FBS) به میزان ۱ سی‌سی، اسید آسکوربیک به مقدار ۳۴۰ میکرولیتر، بتا گلیسروفسفات به میزان ۰/۵ سی‌سی و پنی‌سیلین-استرپتومایسین به مقدار ۵۰۰ میکرولیتر انتقال داده شد. پتری دیش محتوی نمونه به انکوباتور دارای اتمسفر مرطوب، محتوی ۵ درصد دی‌اکسید کربن و دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد منتقل گردید. بعد از ۲ روز محیط رویی خارج و محیط DMEM تازه اضافه گردید. محیط سلول‌ها هر ۴-۳ روز یک بار به مدت دو هفته تعویض شد. روزانه، ظروف کشت از لحاظ میزان خروج سلول‌های استخوانی از قطعات موجود در دیش مورد بررسی قرار می‌گرفت (شکل ۱).



شکل ۱. قطعات استخوان کالواریای انسان که در دیش کشت قرار دارد و سلول‌های استئوبلاست در حال خروج از این قطعات. سلول‌ها به اشکال دوکی و شبه فیروبلستی در حال ازدیاد می‌باشند (بزرگ‌نمایی  $\times 40$ ).

زمانی که سلول‌ها سطح ظرف را به طور کامل پر نمودند (شکل ۲)، یعنی به حد Confluency رسیدند، با استفاده از مخلوط تریپسین-EDTA (۳ سی‌سی) از کف دیش جدا و به ظرف کشت جدید منتقل گردیدند (پاساژ اول). دو هفته پس از آن، بار دیگر این عمل

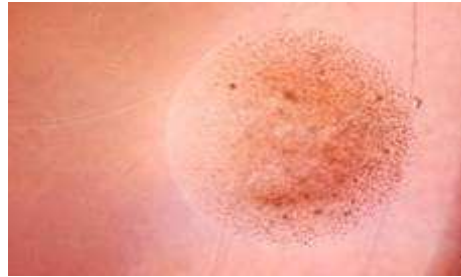
کمک میکروسکوپ نوری، ابتدا بلوک‌های دو بار با محلول PBS شستشو داده شد و به مدت ۱۵ ساعت در محلول EDTA گذاشته شد (برای نرم شدن بلوک). سپس بلوک‌ها به مدت ۲ ساعت در فرمالین فیکس شد و پس از انجام مراحل آب‌گیری و تهیه بلوک پارانینی، برش‌های ۵ میکرومتری تهیه گردید و لام‌های به دست آمده با استفاده از رنگ Van kossa رنگ‌آمیزی گردید. برای نمونه‌های آلژینات ابتدا پتری دیش‌ها از انکوباتور به زیر هود انتقال یافت و دو بار با PBS شستشو شد. مراحل آب‌گیری و قالب‌گیری و تهیه مقاطع با ضخامت ۵ میکرومتر انجام گرفت. این لام‌ها نیز با استفاده از رنگ Van kossa رنگ‌آمیزی شد.



شکل ۴. بلوک هیدروکسی آپاتیت- تری کلسیم فسفات. این بلوک مکعبی شکل، به ابعاد  $3 \times 3 \times 3$  میلی‌متر می‌باشد

**روش MTT** در این روش ابتدا بلوک‌های HA-TC دو بار با محلول PBS شستشو داده شد. سپس محیط 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 حذف گردید. محلول Dimethyl sulfoxide (DMSO) به میزان ۴۰۰ میکرولیتر سیگما به هر خانه پلیت اضافه و پس از پیت کردن، با استفاده از دستگاه Elisa reader در

(هر دانه شامل ۱۰۰۰۰ سلول می‌باشد) به دیش‌های کشت ۳ سانتی‌متری وارد شد. دیش‌ها به انکوباتور منتقل شده، محیط کشت آن‌ها، هر ۴-۳ روز تعویض گردید (شکل ۳).



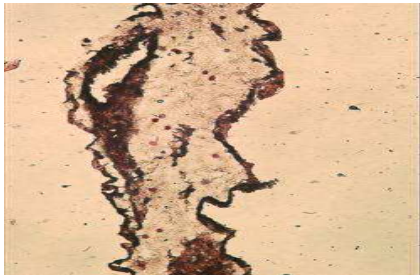
شکل ۳. قطره‌ی کروی شکل ژل آلژینات (Bead). سلول‌های استئوبلاست با مورفولوژی کروی شکل در منافذ ژل آلژینات قرار دارد (بزرگنمایی  $40 \times$ )

#### کشت سلول‌ها در داربست هیدروکسی آپاتیت:

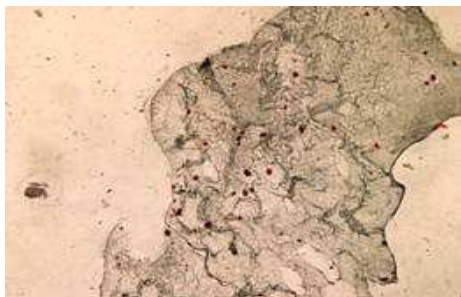
داربست آماده‌ی هیدروکسی آپاتیت (۰/۷۵ درصد) همراه با تری کلسیم فسفات (۰/۲۵ درصد) به شکل بلوک مکعبی در دسترس بود. تعدادی از این بلوک‌ها در زیر هود، به پلیت‌های ۶ خانه اضافه شد. پلیت‌ها پس از افزودن مقداری محیط کشت به آن‌ها، به مدت ۲ ساعت درون انکوباتور نگهداری گردید. این نگهداری به منظور نرم شدن بلوک‌ها انجام شد. سپس در زیر هود، محیط کشت پلیت‌ها تخلیه و نیمه‌ی دوم سوسپانسیون سلولی حاصل پاساژ دوم به آن‌ها اضافه شد (تعداد ۱۰ هزار سلول به ازای هر بلوک) و پلیت به مدت ۳ ساعت دیگر درون انکوباتور قرار گرفت (به منظور چسبیدن سلول‌ها به بلوک). سپس محیط کشت جدید درون پلیت ریخته و به مدت دو هفته در انکوباتور نگهداری شد. محیط کشت به فاصله‌ی هر ۴-۳ روز یک بار تعویض گردید (شکل ۴).

**رنگ آمیزی Van kossa.** برای مطالعه‌ی اثبات وجود ماتریکس معدنی درون بلوک‌های HA-TC به

به رنگ سیاه و هسته‌ی سلول‌ها قرمز رنگ ملاحظه شد (شکل ۵ و ۶).



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 می‌باشد (بزرگ‌نمایی  $\times 300$ )



شکل ۶. رنگ آمیزی Von kossa بر روی نمونه‌ی آلژینات. نتایج این رنگ آمیزی وجود هسته‌های قرمز رنگ را در سلول‌ها مشخص نموده است. وجود رسوب تیره رنگ نشان دهنده‌ی ماتریکس معدنی شده توسط سلول‌های استئوبلاست کشت یافته بر روی داربست آلژینات می‌باشد (بزرگ‌نمایی  $\times 300$ )

**شمارش سلولی:** با شمارش سلول‌ها میانگین تعداد سلول‌های موجود در ژل آلژینات و داربست هیدروکسی آپاتیت در روز ۱۴ نسبت به روز اول همان گروه، اختلاف معنی‌داری را نشان داد ( $P < 0/001$ ). به علاوه، اختلاف میانگین تعداد سلول‌های موجود در ژل آلژینات و داربست هیدروکسی آپاتیت در روز ۱۴ معنی‌دار بود ( $P < 0/001$ ) (جدول ۱).

طول موج ۵۴۰ نانومتر بر اساس فور مازان احیا شده خوانده شد. برای نمونه‌های آلژینات، ابتدا دانه‌ها با محلول PBS دو بار شستشو داده شد و مابقی مراحل کار مشابه داربست هیدروکسی آپاتیت در مرحله‌ی قبل صورت پذیرفت.

روش شمارش سلولی با لام نئوبار: ابتدا بلوک‌ها با محلول PBS دو بار شستشو داده شد. سپس به مدت ۴ ساعت در محلول EDTA گذاشته شد. پس از آن بلوک‌ها با همان محلول حل شد. سپس محلول حاصل سانتریفوژ گردید و مایع رویی تخلیه شد. در این مرحله، سلول‌ها توسط هموسایتومتر شمارش گردید. در داربست آلژینات، ابتدا دانه‌ها با سیترات سدیم حل شد؛ سپس به آن PBS اضافه گردید و این محلول سانتریفوژ و مایع رویی تخلیه شد. در این مرحله، سلول‌ها توسط هموسایتومتر شمارش شد.

### یافته‌ها

**کشت سلول‌های استئوبلاستی:** در کشت اولیه، سلول‌هایی با مورفولوژی چند ضلعی و دوکی مشاهده شد (شکل ۱). در پاساژ اول، این سلول‌ها با تشکیل کلونی شروع به ازدیاد کرد. در نهایت، تعداد سلول‌های دوکی در طی پاساژ سلولی افزایش یافت؛ به طوری که در پاساژ دوم سلول‌ها تمام سطح دیش را اشغال نمود (شکل ۲).

**رنگ آمیزی Van kossa:** در این مطالعه، رنگ آمیزی Van kossa بر روی دو گروه مورد آزمایش (آلژینات و هیدروکسی آپاتیت- تری کلسیم فسفات) در روز ۱۴ انجام شد و وجود ماتریکس معدنی در هر دو گروه ثابت گردید. به این ترتیب که رسوبات کلسیم

جدول ۱. مقایسه‌ی نتیجه‌ی شمارش تعداد سلول‌ها پس از زمان دو هفته در دو گروه

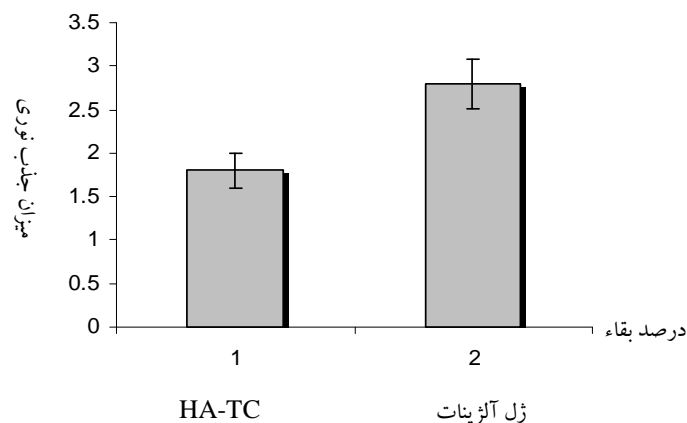
گروه	میانگین	انحراف معیار	P value
داربست HA-TC	۱۸۴۷۵	۳۸۴۳	< ۰/۰۰۱
ژل آلژینات	۵۹۹۲۱	۵۰۶۳	< ۰/۰۰۱

مقادیر به صورت  $Mean \pm SD$  ارائه شده است. شمارش به ازای هر ۱۰۰۰۰ سلول منتقل شده به هر دانه آلژینات یا بلوک هیدروکسی آپاتیت-تری کلسیم فسفات انجام شد.

جدول ۲. مقایسه‌ی درصد بقای سلول‌ها پس از زمان دو هفته در دو گروه

گروه	میانگین	انحراف معیار	P value
داربست HA-TC	۱/۸۰۶	۰/۲۰۵	< ۰/۰۰۱
ژل آلژینات	۲/۸۵۶	۰/۲۹۶	< ۰/۰۰۱

محاسبه‌ی درصد بقا به ازای هر ۱۰۰۰۰ سلول منتقل شده به هر دانه آلژینات یا بلوک HA-TC به توسط دستگاه Elisa reader انجام شد.



نمودار ۱. میانگین درصد بقای استئوبلاست در دو داربست آلژینات و HA-TC

### بحث

امروزه با مد نظر گرفتن درصد بالای شکستگی‌های استخوانی، توجه محققین به روش مهندسی بافت در جهت رفع آسیب‌ها و ترمیم نواقص بافت‌های گوناگون معطوف شده است. هدف از این روش، بهبود شرایط رشد آزمایشگاهی سلول‌های کشت شده برای جایگزینی یا ترمیم قسمت آسیب دیده می‌باشد تا بتوان به حداکثر سلول‌های استئوبلاستی در حداقل فاصله‌ی

نتایج *MTT* میانگین فعالیت سلول‌های زنده در داربست‌های آلژینات  $0/29 \pm 2/856$  و میانگین فعالیت سلول‌های زنده در داربست هیدروکسی آپاتیت-تری کلسیم فسفات  $0/205 \pm 1/806$  درصد بود. مقایسه‌ی این دو میانگین نشان می‌دهد که میزان فعالیت سلول‌های زنده به طور معنی‌داری در ژل آلژینات نسبت به داربست هیدروکسی آپاتیت-تری کلسیم فسفات بیشتر بود ( $P < 0/001$ ) (جدول ۲ و نمودار ۱).

کلسیم فسفات استفاده گردید؛ چرا که آلزینات از جمله داربست‌های هیدروژل و تری کلسیم فسفات از ترکیبات مشابه استخوانی محسوب می‌شوند.

در این مطالعه، سلول‌ها با روش Explant از استخوان کالواریا جدا شد و سلول‌ها بر روی دو داربست آلزینات و هیدروکسی آپاتیت- تری کلسیم فسفات به مدت دو هفته کشت داده شد. مقایسه‌ی نتایج به دست آمده با روش‌های مختلف نشان داد که میزان تکثیر و زنده ماندن سلول‌ها در داربست آلزینات نسبت به داربست هیدروکسی آپاتیت- تری کلسیم فسفات بیشتر و بهتر انجام گرفته است.

Abbah و همکاران با کشت سلول‌های بنیادی بافت چربی در آلزینات و تمایز آن به استئوبلاست نشان دادند که محیط این ژل، تکثیر و بقای استئوبلاست را تسهیل می‌کند (۲۵). این محقق و همکاران در سال ۲۰۰۸ نیز سلول‌های بنیادی حاصل از مغز استخوان را در ژل آلزینات کشت داده، آن را به استئوبلاست تمایز دادند و نتایج تحقیقات قبلی را در مورد ژل آلزینات بار دیگر تأیید نمودند (۲۶). در تحقیقی که در ایران در زمینه‌ی کشت سلول‌های استخوانی توسط اسفندیاری و همکاران در دو سیستم کشت تک لایه‌ای و آلزینات انجام پذیرفت، تعداد سلول‌های تکثیر یافته طی سه هفته بررسی گردید و میزان تکثیر در ژل آلزینات ۳ برابر میزان تکثیر در سیستم تک لایه‌ای گزارش شد. همچنین نتایج این تحقیق نشان داد که میزان تکثیر سلول‌های استئوبلاست مشتق از بافت استخوان کالواریا در ژل آلزینات بیشتر از سیستم تک لایه‌ای بوده است (۱۳). در حالی که در مطالعه‌ی ما میزان تکثیر در دو داربست آلزینات و هیدروکسی آپاتیت- تری کلسیم فسفات مورد بررسی قرار گرفت و مشاهده شد که

زمانی دست یافت (۱۹). از آن جا که استخوان کالواریا یک استخوان اسفنجی است و سلول‌ها زودتر از داخل این نوع استخوان خارج می‌شوند، در بیشتر تحقیقات از استخوان‌های اسفنجی استفاده شده است (۲۰-۲۱). در این مطالعه نیز از استخوان کالواریای انسانی استفاده گردید و با روش کشت Explant، سلول‌ها در مدت ۱۰-۱۲ روز از قطعات استخوانی خارج گردید.

Van Griensven و همکاران با مطالعه‌ی نمونه‌هایی که از سر استخوان فمور و استخوان ایلیاک بیماران تهیه کرده بودند، مدت زمان لازم برای خروج سلول‌ها از بافت استخوانی را ۱۲ روز گزارش کردند (۲۰). نتایج این تحقیق با مطالعه‌ی ما همخوانی دارد. در مطالعه‌ای دیگر، مدت زمان که سلول‌ها طی آن کف پتری دیش را به طور کامل می‌پوشاند، ۴-۵ هفته گزارش شده است (۲۱). این مدت زمان در مطالعه‌ی حاضر به طور متوسط ۲۰ روز بود که علت احتمالی این تفاوت‌ها، غلظت متفاوت ترکیبات مکمل از قبیل اسید آسکوربیک و بتا گلیسرو فسفات در محیط کشت در مطالعه‌ی ما می‌باشد.

جهت طراحی بافت، علاوه بر سلول به داربست مناسب که از ویژگی‌های عملکردی ارزشمندی برخوردار باشد، نیاز است. داربست‌ها باعث پیشبرد روند ترمیم و نوسازی بافت‌ها در بدن موجود زنده و شرایط آزمایشگاهی و همچنین موجب فراهم آمدن یک بستر مناسب جهت مهاجرت و چسبیدن و نیز جهت تکوین و تعیین شکل بافت جدید و پیوند آن به بدن موجود زنده می‌شوند. از طرفی، ساختار داربست باعث می‌شود که انتقال مولکول‌های تنظیم کننده و مواد مغذی به سلول‌ها و متابولیت‌ها از سلول به محیط آسان‌تر شود (۲۲-۲۴). بر اساس این ویژگی‌ها، در مطالعه‌ی ما از داربست‌های آلزینات و هیدروکسی آپاتیت- تری



میزان تکثیر سلولی در ژل آلژینات در مقایسه با داربست هیدروکسی آپاتیت-تری کلسیم فسفات بیشتر است. در تحقیق Liao و همکاران سلول‌های استئوبلاست بر روی ژل آلژینات کشت شد و برای ترمیم نقص استخوان مجسمه به کار رفت؛ مشاهده شد که پس از ۱۲ هفته، ترمیم به طور کامل صورت گرفت (۱۱). علاوه بر مطالعات انجام شده در *In vitro* در تحقیق دیگر، که توسط Alsberg و همکاران انجام گرفت، سلول‌های استئوبلاست حیوانی موش به همراه داربست آلژینات به محل نقص استخوانی پیوند زده شد و ترمیم استخوان طی ۱۰ هفته گزارش گردید (۱۲). از آن جایی که هیدروژل آلژینات فاقد استحکام مورد نیاز برای هماهنگی با بافت سخت استخوان است، بررسی تکثیر سلول‌های استئوبلاست در یک داربست دارای استحکام و مشابه با ماتریکس استخوانی ضروری به نظر می‌رسد؛ داربست هیدروکسی آپاتیت-تری کلسیم فسفات علاوه بر مشابهت با ماتریکس استخوان، خطر بروز واکنش التهابی را کاهش می‌دهد (۱۵).

در تحقیق Jianga و همکاران، آغاز رشد و تکثیر سلول‌های استئوبلاست نمونه‌ی حیوانی (سگ) بر روی داربست بتا تری کلسیم فسفات (بدون همراهی هیدروکسی آپاتیت) در روز ۵ تا ۹ مشاهده شد اما سرعت رشد بسیار کند بود. علت احتمالی این کندی رشد، حضور انحصاری تری کلسیم فسفات می‌باشد (۲۷). اما در مطالعه‌ی ما از ترکیب هیدروکسی آپاتیت-تری کلسیم فسفات استفاده شد و میزان رشد نسبت به مطالعه‌ی آنان بهتر صورت گرفت. احتمال می‌رود وجود هیدروکسی آپاتیت باعث رشد بهتر در مطالعه‌ی ما شده باشد.

در تحقیق دیگر با کشت استئوبلاست در ترکیب HA و TC (به نسبت ۰/۲۵ و ۰/۷۵)، جمعیت سلولی

طی سه روز اول کاهش یافت ولی بعد از آن تا روز ۷ به تدریج افزایش پیدا کرد (۱۶). در مطالعه‌ی حاضر با HA و TC به نسبت ۰/۷۵ و ۰/۲۵، میزان رشد سلولی نسبت به تحقیق قبلی بیشتر بود. علت این اختلاف شاید در نسبت به کار رفته از HA-TC می‌باشد؛ هر چه درصد HA بیشتر باشد، رشد سلول‌ها نیز بیشتر است (۱۶). در تحقیق Sahil و همکاران نیز استئوبلاست‌ها به خوبی بر روی HA و TC (به نسبت ۰/۶ و ۰/۴) تکثیر شد که تأییدی بر نقش مثبت غلظت بیشتر HA (نسبت به TC) در رشد سلولی است (۲۸).

در مطالعه‌ی حاضر، ژل آلژینات در مقایسه با TC-HA، تکثیر و بقای سلولی بیشتری را سبب شد. احتمال می‌رود علت این مسأله را بتوان به حالت هیدروژلی آلژینات و داشتن مقادیر فراوان آب نسبت داد؛ چرا که در این حالت، تبادل مواد غذایی و متابولیت‌ها با کارایی بهتری انجام می‌شود (۸). از طرف دیگر، آلژینات در دمای اتاق بدون نیاز به وجود حلال‌های آلی به راحتی به حالت ژله‌ای در می‌آید و نیازی به فعال کننده‌ی سمی ندارد (۹). این ویژگی باعث شده است که آلژینات داربست مناسب‌تری در طراحی بافت محسوب شود. اما TC-HA به دلیل فقدان مواد آلی و داشتن استحکام زیاد، فضای کافی برای تکثیر سلول‌ها فراهم نمی‌آورد. در پایان پیشنهاد می‌شود که در تحقیقات مهندسی بافت، جهت تکثیر بیشتر سلول، از ژل آلژینات استفاده گردد.

### تشکر و قدردانی

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

## References

1. Cancedda R, Dozin B, Giannoni P, Quarto R. Tissue engineering and cell therapy of cartilage and bone. *Matrix Biol* 2003; 22(1): 81-91.
2. 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): 776-783.
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. 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.
5. Freshney RI. *Culture of Animal Cells Set: CD-ROM and Culture of Animal Cells*. 4<sup>th</sup> ed. New Jersey: John Wiley & Sons; 2000.
6. Zhang Y, Song J, Shi B, Wang Y, Chen X, Huang C, et al. Combination of scaffold and adenovirus vectors expressing bone morphogenetic protein-7 for alveolar bone regeneration at dental implant defects. *Biomaterials* 2007; 28(31): 4635-42.
7. Martinsen A, Skjak-Braek G, Smidsrod O. Alginate as immobilization material: I. Correlation between chemical and physical properties of alginate gel beads. *Biotechnol Bioeng* 1989; 33(1): 79-89.
8. Stevens MM, Qanadilo HF, Langer R, Prasad SV. A rapid-curing alginate gel system: utility in periosteum-derived cartilage tissue engineering. *Biomaterials* 2004; 25(5): 887-94.
9. Stevens MM, Marini RP, Martin I, Langer R, Shastri P. FGF<sub>2</sub> enhances TGF- $\alpha$ 1-induced periosteal chondrogenesis. *J Orthop Res* 2004; 22(5): 1114-9.
10. Majmudar G, Bole D, Goldstein SA, Bonadio J. Bone cell culture in a three-dimensional polymer bead stabilizes the differentiated phenotype and provides evidence that osteoblastic cells synthesize type III collagen and fibronectin. *J Bone Miner Res* 1991; 6(8): 869-81.
11. Liao W, Yang Z, Deng L, Li X, Sun T, Luo J, et al. Morphological and biomechanical study on in vivo osteogenesis after repair of cranial defects with plastic engineered bone in rabbits. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi* 2005; 19(6): 460-3.
12. Alsberg E, Kong HJ, Hirano Y, Smith MK, Albeiruti A, Mooney DJ. Regulating bone formation via controlled scaffold degradation. *J Dent Res* 2003; 82(11): 903-8.
13. Sanai M. The Investigation for osteoblast proliferation in monolayer and Alginate scaffold for tissue engineering purposes. [MSc Thesis]. Isfahan: Isfahan University of Medical Sciences; 2008.
14. 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.
15. 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.
16. 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.
17. 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 Cerahi Derg* 2006; 12(4): 268-76.
18. Pang L, Hu Y, 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.
19. Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science* 1993; 260(5110): 920-6.
20. 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.
21. 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.
22. Turhani D, Weissenbock M, Watzinger E, Yerit K, Cvinkl B, Ewers R, et al. In vitro study of adherent mandibular osteoblast-like cells on carrier materials. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2005; 34(5): 543-50.
23. Tsuchiya K, Chen G, Matsuno T, Matsuno T, Tateishi T. The effect of coculture of chondrocytes with mesenchymal stem cells on their cartilaginous phenotype in vitro. *Mat Sci Eng* 2004; 24(3): 391-6.
24. 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.
25. 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.

26. 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.
27. Jianga XQ, Wanga SY, Zhao J, Zhang XL, Zhang ZY. Sequential Fluorescent labeling observation of maxillary sinus augmentation by a tissue-engineered bone complex in canine model. *J of oral Science* 2008; 1(1): 39-46.
28. Sahil J, Sarit B, Cuneyt T. In vitro testing of calcium phosphate whiskers. *J Inter Science* 2004; 10: 481-9.

## Comparison of Human Osteoblast Proliferation in Alginate and Hydroxyapatite-Tricalcium Phosphate Scaffolds

Hossain Sadeghi PhD<sup>1</sup>, Hamid Bahramian PhD<sup>1</sup>, Batool Hashemibeni PhD<sup>1</sup>,  
Ebrahim Esfandiary MD, PhD<sup>2</sup>, Fereshteh Aliakbari<sup>3</sup>

### Abstract

**Background:** After bone fractures from traffic trauma, many patients suffer from non-healing bone defects and its cosmetic and psychological complications. So, it is important to identify modern and effective methods to improve healing of bone defects. One of these is using bone cells from the patient, culturing these cells on appropriate scaffold, and finally transferring them to injured area. The main objective of this study was to compare the rate of osteoblast proliferation in alginate beads, and hydroxyapatite-tricalcium phosphate (HA-TC) scaffold.

**Methods:** Bone tissue specimens were obtained from 4 patients undergoing craniotomy surgery operations in Alzahra teaching hospital, Isfahan. Bone specimens were cut in to small pieces and put in Petri dishes having culture medium and transferred to the incubator. The mean interval of osteoblast out-growth from bone pieces was observed to be 10-12 days, later on. The cell cultures reached confluence, averagely after 2 weeks time. First passage cells were detached from Petri dishes using Trypsin\_EDTA and were divided in two portions. One portion was used for hydroxyapatite-tricalcium phosphate scaffold, and the other was added to alginate gel. After a 2-weeks period, the data were collected and analyzed.

**Findings:** The osteoblasts in hydroxyapatite-tricalcium phosphate scaffold and alginate gel had round morphology. Van kossa staining demonstrated mineralized matrix in both groups. The number of harvested cells in 2 weeks after culture was significantly higher in Alginate group ( $P < 0.001$ ). In addition, MTT assay showed significant difference in the mean of viability rates between both groups in day 14 ( $P < 0.001$ ).

**Conclusion:** This study showed that Alginate gel support better proliferation and viability of osteoblasts in comparison with the hydroxyapatite-tricalcium phosphate scaffold. The probable cause of these differences can be searched in Alginate bioproperties. Porosity of Alginate gel provides conditions in which cellular and metabolic activities could be accelerated.

**Key words:** Alginate, Bone healing, Hydroxyapatite-Calcium phosphate, Osteoblast.

<sup>1</sup> Associate Professor, Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.

<sup>2</sup> Professor, Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.

<sup>3</sup> Postgraduate Student, Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.

**Corresponding Author:** Hossain Sadeghi PhD, Email: [hossain\\_sadeghy@yahoo.com](mailto:hossain_sadeghy@yahoo.com)