

کشت سه بعدی سلول‌های استخوانی فک انسان در داربست PLLA/HA

جواد فاریابی^{۱،۲*}، سیدنورالدین نعمت‌اللهی^۳، پروین صالحی‌نژاد^۴، محبوبه شاهرخی^۱، محمدتقی خراسانی^۲

خلاصه

مقدمه: تولید بافت استخوانی جدید با سلول و ماتریکس‌های خارج سلولی سنتتیک (داربست‌ها) روشی جدید برای بازسازی بافت‌های معدنی و استخوان می‌باشد. این مطالعه به منظور بررسی قابلیت انجام کشت سه بعدی سلول‌های استئوبلاست در داربست‌های PLLA/HA (poly L-Lactic acid/hydroxyl apatite) انجام شد. روش: در این مطالعه سه نمونه استخوانی از محل جراحی دندان‌های عقل نهفته افراد داوطلب برداشته شد. سلول‌های استئوبلاست با استفاده از دو آنزیم تریپسین و کلاژناز از نمونه‌ها استحصال و تا پاساژ چهارم به صورت تک لایه کشت داده شده و سپس به تعداد یک میلیون سلول در میلی‌لیتر به داربست PLLA/HA منتقل شدند و بعد از ۲۱ روز داربست‌ها توسط رنگ آمیزی‌های H&E، Von kossa، Hoechst و میکروسکوپ الکترونی بررسی شدند. یافته‌ها: نتایج حاصل از مقایسه دو آنزیم تریپسین و کلاژناز نشان داد که سرعت رشد سلولی در سلول‌های جدا شده با کلاژناز بیشتر بود. بررسی میکروسکوپ الکترونی هم چسبندگی و تکثیر سلولی را در داربست‌ها نشان داد. رنگ آمیزی H&E، Von kossa و Hoechst نیز حضور سلول‌ها در داربست‌ها را تأیید کرد. نتیجه‌گیری: این یافته‌ها تأیید می‌کنند که سلول‌های استئوبلاست می‌توانند در شرایط آزمایشگاهی در داربست‌های PLLA/HA رشد کنند.

واژه‌های کلیدی: استئوبلاست، مهندسی بافت، پلیمر PLLA، هیدروکسی آپاتیت، داربست بافتی

- ۱- دانشیار جراحی دهان، فک و صورت، گروه جراحی دهان، فک و صورت دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، ۲- عضو مرکز تحقیقات بیماری‌های دهان و دندان، دانشگاه علوم پزشکی کرمان ۳- استاد آناتومی، گروه علوم تشریحی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان ۴- عضو مرکز تحقیقات فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان ۵- دکترای بیوتکنولوژی پزشکی، گروه آناتومی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان ۶- دندانپزشک، دانشگاه علوم پزشکی جیرفت ۷- دکترای بیوماتریال‌های پلی مری، انستیتو پلیمر ایران

* نویسنده مسؤول، آدرس پست الکترونیک: jfr @ kmu.ac.ir

پذیرش مقاله: ۱۳۹۱/۱۲/۲۳

دریافت مقاله اصلاح شده: ۱۳۹۱/۱۲/۱۴

دریافت مقاله: ۱۳۹۱/۵/۱۳

مقدمه

روش‌های بازسازی استخوان شامل پیوندهای استخوانی، درمان‌های پروتزی و بازسازی توسط جراحی است که در بسیاری از موارد مؤثرند. در سال‌های اخیر پیشرفت‌های عمده‌ای در روش‌های بازسازی استخوان برای درمان بافت یا عضو از دست رفته صورت گرفته است. با این حال موانع مرتبط با این درمان‌ها (نیاز به ناحیه دوم جراحی، اندازه و شکل ناکافی پیوند، خون‌رسانی ناکافی و نقصان مربوط به محل دهنده پیوند) منجر به توجه بیشتر به روش‌های جدید درمانی از جمله مهندسی بافت (tissue engineering) با استفاده از سلول و داربست شده است (۱،۲). تولید استخوان به وسیله ترکیب سلول‌های اتوزن با داربست سه بعدی (3D-Scaffold) یکی از روش‌های نوید بخش در جراحی‌های جمجمه‌ای - صورتی (canio-facial) می‌باشد. این روش شامل جداسازی سلول‌ها از فرد و رشد آنها در داربست سه بعدی تحت شرایط لازم برای ایجاد بافت‌های دارای عملکرد می‌باشد. سپس ساختار داربست و بافت در بدن بیمار کاشته شده، داربست به تدریج جذب می‌گردد و فقط بافت طبیعی در بدن باقی می‌ماند. بدین ترتیب این روند درمانی که در آن بافت مصنوعی از لحاظ ساختاری و عملکردی با بدن یکی می‌شود کامل می‌گردد (۳).

در مطالعات مختلف انجام شده در زمینه کشت سلول‌های استخوانی به صورت سه بعدی و داخل داربست موضوعات متعددی بررسی شده است؛ مثلاً در یکی از پژوهش‌ها از داربست‌هایی از جنس BioSS و Tricalcium phosphate برای کشت دادن سلول‌های استخوانی استفاده شده و نشان داده‌اند که سلول‌های مزانشیمی برداشته شده از فک انسان توانایی رشد در این داربست‌ها را دارند (۴). در تحقیق بارون (Barron) و همکاران به حیات سلول‌های استخوانی در مرکز داربست‌های سه بعدی اشاره شده و پرفیوژن مناسب محیط کشت برای حفظ حیات سلول‌ها مورد بررسی قرار گرفته است (۵). در پژوهشی دیگر با

استفاده از سیستم Continuous flow bioreactor به جریان یافتن مداوم مواد مغذی در داربست‌های سه بعدی توجه شده که نتیجه آن حفظ بیشتر سلول‌های استخوانی و افزایش تعداد آنها در داربست با این روش بوده است (۶). در مجموع در همه این تحقیقات و سایر تحقیق‌های مشابه به قابل انجام بودن کشت سه بعدی سلول‌های استخوانی اشاره شده و هر کدام به قسمتی از روش‌های بهبود و پیشبرد این امر کمک نموده‌اند.

مهندسی بافت دارای معایب و مزایایی است که از جمله مزایای آن ایمن تر بودن نسبت به سایر روش‌ها، هزینه کمتر، نیاز کمتر به بافت دهنده و مهم‌تر از همه حذف مشکل سرکوب سیستم ایمنی می‌باشد. از معایب آن می‌توان به زمان بر بودن و دسترسی محدود به سلول‌های اتوزن اشاره کرد. لذا ما طی انجام دو پژوهش جداگانه به کشت سلول‌های استخوان فک مبادرت نمودیم. در پژوهش اول که قبلاً نتایج آن در همین مجله چاپ شده، سلول‌های استئوبلاست به صورت تک لایه در فلاسک آزمایشگاهی رشد داده شد (۷) اما به منظور دستیابی به شرایط انجام این تحقیق به صورت بالینی نیاز به تحقیق بر روی کشت آنها به صورت سه بعدی بود که نتایج آن در مقاله حاضر گزارش می‌شود. با توجه به انجام موفقیت آمیز کشت سلول‌های استخوانی فک انسان به صورت سه بعدی در آزمایشگاه می‌توان از نتایج آن برای بازسازی نقائص ناحیه فک و صورت استفاده نمود.

روش بررسی

در این مطالعه از سه نفر از بیماران داوطلب مراجعه کننده به بخش جراحی دانشکده دندانپزشکی کرمان استفاده شد. این بیماران مبتلا به هیچ نوع بیماری استخوانی نبوده و سابقه مصرف دارویی خاص را نداشتند. سن آنها در محدوده ۲۵-۲۰ سال و داوطلب جراحی دندان عقل نهفته در فک بودند. کلیه جراحی‌ها تحت بی‌حسی موضعی انجام و بلوکی

روش بررسی کشت سلول‌های استئوبلاست در حالت تک لایه فلاسک‌های حاوی سلول‌ها در انکوباتور CO₂ و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری و میزان رشد سلول‌ها به کمک میکروسکوپ معکوس روزانه بررسی شد. پس از پوشش سلولی در حد ۹۵-۹۰ درصدی در کف فلاسک، سلول‌ها به کمک تریپسین ۰/۲۵ درصد از کف فلاسک جدا و بعد از خنثی کردن تریپسین با سرم جنین گاوی و سانتریفیوژ کردن به فلاسک‌های جدید انتقال و تا پاساژ ۴ کشت داده شدند.

انتقال سلول‌ها به داربست

در پاساژ چهارم پس از تریپسین‌دهی، سانتریفیوژ و دور ریختن مایع رویی سلول‌ها یک میلی‌لیتر محیط کشت کامل به آنها اضافه و تعداد سلول‌ها توسط لام نئوبار شمرده شد. سپس به تعداد یک میلیون سلول در هر میلی‌لیتر از آنها به داربست سه بعدی (داربست پلی مری سرامیکی تهیه شده از مؤسسه پلیمر - پتروشیمی ایران) که در پلیت ۲۴ خانه قرار داده شده بود منتقل شد و داربست حدود ۱۰ دقیقه در انکوباتور قرار گرفته و یک میلی‌لیتر محیط کشت مخصوص به آن اضافه شد. محیط کشت داربست هر دو روز یک بار تعویض و بعد از ۲۱ روز داربست از محیط کشت خارج، توسط بافر نمکی فسفات شسته، به چهار قسمت تقسیم شده و توسط پارافرمالدهید ۴ درصد فیکس شد. سپس وجود سلول‌های استئوبلاست در پاساژهای تک‌لایه‌ای و داربست‌های سه بعدی توسط رنگ آمیزی‌های Wst1, Von kossa, Hoechst, H&E و میکروسکوپ الکترونی بررسی شد. داربست‌ها به منظور بررسی چسبندگی و انتشار سلولی توسط میکروسکوپ الکترونی، در پارافرمالدهید ۴٪ فیکس شدند، پس از آب‌گیری در اتانول با غلظت‌های ۳۰٪، ۵۰٪، ۷۰٪، ۸۰٪، ۹۰٪ نمونه توسط طلا پوشیده شد (gold coating) و توسط میکروسکوپ الکترونی (cam scan MV2300) بررسی شد.

از استخوان فک با اندازه تقریبی (۵×۵×۵) میلی‌متر تحت شرایط استریل و توسط فرز ظریف همراه با شستشوی فراوان، یا توسط استئوتوم ظریف و یا رانژور (Rangeur) جدا شده و در تیوب‌های محتوی محیط Hanks برای انتقال به آزمایشگاه کشت سلولی دانشکده پزشکی افضلی‌پور، قرار داده شد.

پس از انتقال بلوک‌های استخوانی به آزمایشگاه، به کمک تیغ جراحی استخوان به قطعات حدود ۱ میلی‌متر خرد و پس از شستشو با بافر نمکی فسفات قطعات به دو گروه مساوی تقسیم شدند. یک گروه به پلیت حاوی ۱۰-۵ میلی‌لیتر آنزیم تریپسین ۱/۲۵ درصد منتقل و پلیت به مدت ۳۰ دقیقه در انکوباتور CO₂ پنج درصد در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و هر چند دقیقه یک بار پلیت حاوی قطعات استخوان تکان داده شد. پس از پایان ۳۰ دقیقه، ۵۰۰-۳۰۰ میلی‌لیتر سرم جنین گاوی جهت خنثی شدن آنزیم به پلیت اضافه شد. محلول حاوی سلول‌ها به کمک سمپلر به لوله استریل منتقل و بادور ۱۵۰۰ بار در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس مایع رویی خالی و سلول‌های چسبیده به ته لوله سانتریفیوژ، با ۱ میلی‌لیتر محیط کشت کامل مخلوط و به فلاسک ۲۵ سانتی‌متر مربعی منتقل گردید.

در گروه دوم ۱۰-۵ میلی‌متر آنزیم کلاژناز اضافه و پلیت در انکوباتور CO₂ با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ ساعت قرار گرفته و هر ۱۵ دقیقه تکان داده شد. پس از گذشت ۴ ساعت و هضم قطعات استخوانی محتویات پلیت به لوله استریل منتقل گردیده و آنگاه با دور ۱۵۰۰ بار در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. محلول رویی تخلیه و سلول‌های آزاد شده بعد از اضافه کردن محیط کشت کامل به فلاسک ۲۵ سانتی‌متر مربعی منتقل گردید

نتایج

نمونه اول: متعلق به خانمی ۲۰ ساله بود که از فک پایین سمت چپ، ناحیه دندان عقل، شامل استخوان اسفنجی برداشته و طبق شرایط ذکر شده در روش اجرا به محیط کشت منتقل و در انکوباتور قرار داده شد. در مدت ۱۳ روز از شروع کشت اولیه به تدریج تعدادی سلول با نمای شبیه به فیبروبلاست و دارای زواید سیتوپلاسمی متعدد رشد کرده و سطح پلیت را پوشاندند. این سلول‌ها رشد قابل توجهی در پلیت داشتند. سلول‌های به دست آمده با کمک تریپسین و EDTA از پلیت جدا و به فلاسک منتقل شدند. سلول‌های پاساژهای مختلف روزانه با میکروسکوپ معکوس، از لحاظ مورفولوژی، تقسیم سلولی و چگونگی رشد در محیط کشت بررسی شدند. در مراحل اولیه سلول‌های شبه فیبروبلاستی با زواید سیتوپلاسمی مشاهده می‌شد که به مرور زمان سلول‌ها تشکیل کلونی‌های سلولی می‌دادند (تصویر شماره ۱-A).

زمانی که این سلول‌ها حدود ۹۰ درصد کف فلاسک را پوشاندند تعدادی سلول برای بررسی سلول‌های آلكالین فسفاتاز مثبت روی لام کشت داده شدند. بر اساس نتایج حاصل از رنگ آمیزی ALP و شمارش سلولی، در کشت اولیه ۱۰٪ سلول‌ها آلكالین فسفاتاز مثبت بودند. روش شمارش به این صورت بود که در هر لام ۲۰۰ عدد سلول با درشت نمایی ۴۰۰ شمارش و تعداد سلول‌های به رنگ قهوه‌ای که نشانه آلكالین فسفاتاز مثبت می‌باشند نسبت به کل سلول‌ها محاسبه شد (تصویر شماره ۱-B).

پاساژ چهارم به تعداد پانصد هزار سلول در میلی‌لیتر شدند. برای انجماد سلول‌ها از محلول DMSO به نسبت ۱ به ۱۰ با محیط کشت استفاده شد و در دمای 20°C - نگهداری شدند و در زمان استفاده، از فریزر خارج و دمای آن به دمای اتاق رسانده می‌شد. این سلول‌ها در رنگ آمیزی ALP به میزان ۶۰٪ آلكالین فسفاتاز مثبت بودند (تصویر شماره ۱-C).

انتقال سلول‌ها به داربست HA-PLLA

سلول‌ها پس از خارج کردن از انجماد به فلاسک منتقل و در همان شرایط قبلی کشت داده شدند و پس از پوشش بیش از ۹۰٪ کف فلاسک، با تریپسین کردن از کف فلاسک جدا و سانتریفیوژ شدند و سپس به تعداد یک میلیون سلول به داربست سلولی منتقل گردیدند و همزمان تعدادی سلول برای رنگ آمیزی آلكالین فسفاتاز روی لام کشت داده شدند. در رنگ آمیزی حدود ۶۰٪ درصد سلول‌ها آلكالین فسفاتاز مثبت بودند. در بررسی میکروسکوپ الکترونی سلول‌ها با مورفولوژی مسطح (flattened morphology) که بیانگر انتشار مناسب سلولی بود، دیده شدند (تصویر ۱-D).

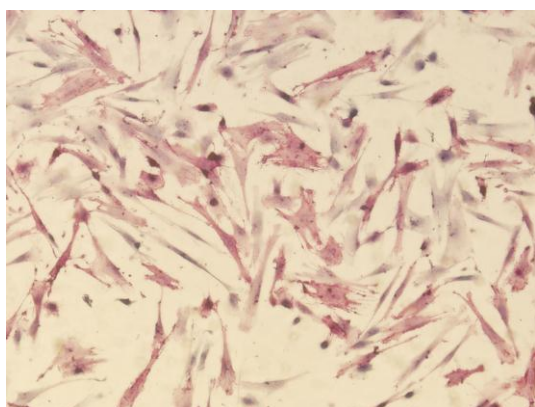
رنگ آمیزی H&E و Von kossa حضور سلول‌ها در داربست را تأیید کردند؛ با این حال در رنگ آمیزی Von Kossa بلورهای هیدروکسی آپاتیت دیده نشد (تصویر ۱-E,F).

نمونه دوم: متعلق به خانمی ۲۸ ساله بود که از فک بالا سمت راست، ناحیه دندان عقل برداشته شد. در این نمونه در مدت ۲۰ روز پس از شروع کشت اولیه به تدریج تعدادی سلول با نمای شبه فیبروبلاستی و دارای زواید سیتوپلاسمی متعدد رشد کرده و سطح پلیت را پوشاندند (تصویر ۲-A)، سلول‌های پاساژ چهارم با تعداد یک میلیون سلول در میلی‌لیتر به داربست منتقل شدند. در رنگ آمیزی ALP سلول‌های پاساژ چهارم، ۶۷٪ درصد آنها آلكالین فسفاتاز مثبت بودند (تصویر ۲-B). در رنگ آمیزی Von kossa و H&E سلول‌های متعددی به صورت یکنواخت سطوح داربست را پوشانده بودند (تصویر ۲-C,D).

نمونه سوم: متعلق به خانمی ۲۶ ساله بود که از فک پایین سمت راست، ناحیه دندان عقل برداشته شد. در مدت ۱۴ روز پس از شروع کشت اولیه سلول‌ها دارای رشد قابل توجهی بودند. در رنگ آمیزی آلكالین فسفاتاز در پاساژ

در داربست تأیید کرد. رنگ آمیزی von kossa در حالت تک لایه نیز بیانگر حضور بلورهای هیدروکسی آپاتیت بود (تصویر 3-G).

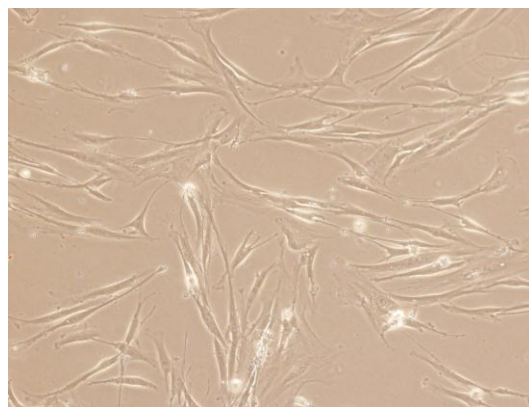
برای تأیید مراحل رنگ آمیزی von kossa دو مقطع از سیست اپیدرموئید رنگ آمیزی شدند که یکی از مقاطع به عنوان کنترل منفی توسط اسید فرمیک ۱۰٪ دکلسیفیه شد. مراحل رنگ آمیزی به طور همزمان انجام شد. نقاط سیاه رنگ (→) در تصویر 4-A بیانگر بلورهای هیدروکسی آپاتیت می باشد که این مناطق در مقطع دکلسیفیه 4-B دیده نمی شود و این نتایج بیانگر صحت مراحل رنگ آمیزی بود. نتایج حاصل از رنگ آمیزی Hoechst نیز حضور سلولها را در داربست تأیید کرد (تصویر 5-A, B).



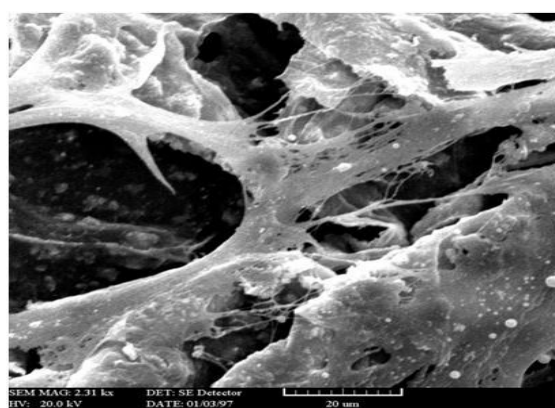
تصویر 1-B. رنگ آمیزی آلکالین فسفاتاز پاساژ سوم نمونه اول (سلول آلکالین فسفاتاز مثبت →)

سوم، ۶۰٪ سلولها آلکالین فسفاتاز مثبت بودند (تصویر 3-A, B).

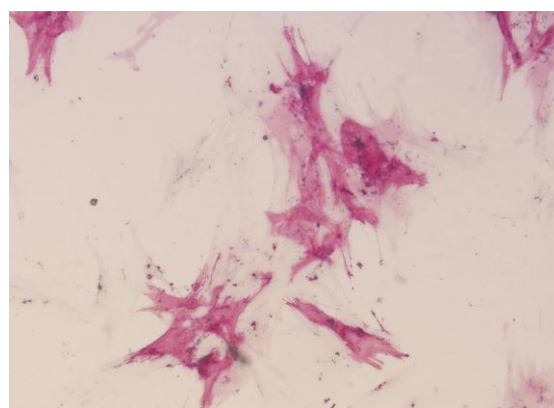
سلولهای پاساژ چهارم به تعداد یک میلیون سلول در میلی لیتر به داربست منتقل شد. تکثیر سلولی داربست توسط رنگ آمیزی wst1 بررسی شد که در این رنگ آمیزی مناطقی از داربست دارای تغییر رنگ قهوه ای بودند که بیانگر تکثیر و انتشار سلولی در این مناطق بود (تصویر 3-C). در بررسی توسط میکروسکوپ الکترونی چسبندگی و تکثیر سلولها با مورفولوژی گرد دیده شد، سلولها به تدریج تکثیر و انتشار پیدا کرده و سطوح داربست را پوشانده بودند (تصویر 3-D). رنگ آمیزی H&E (تصویر 3-E) و Von kossa (تصویر 3-F) حضور سلولها را



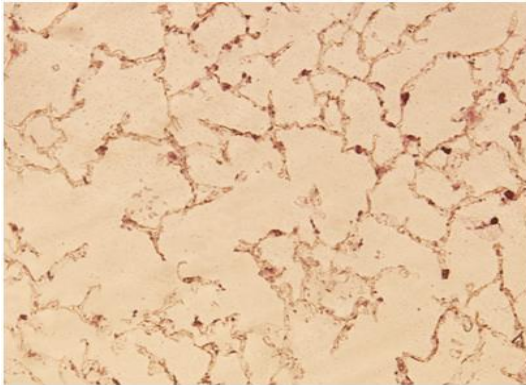
تصویر 1-A. نمای میکروسکوپی پاساژ چهارم (200X)



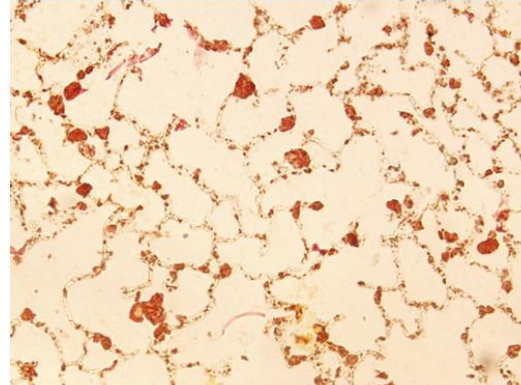
تصویر 1-D. نمای میکروسکوپ الکترونی داربست نمونه اول (2300X)



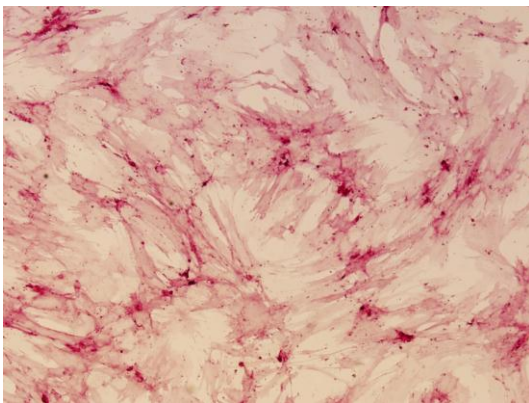
تصویر 1-C. رنگ آمیزی آلکالین فسفاتاز سلولهای نمونه اول در پاساژ چهارم



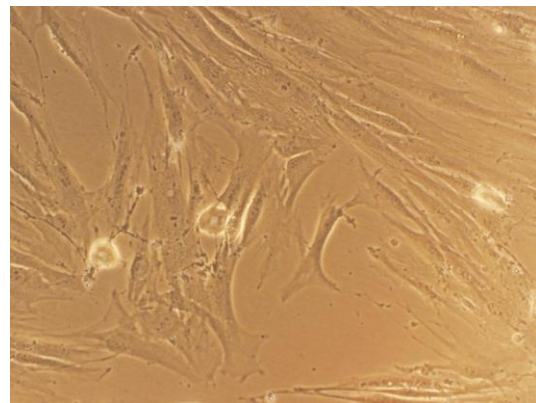
تصویر 1-F. رنگ آمیزی H&E (400X) نمونه اول



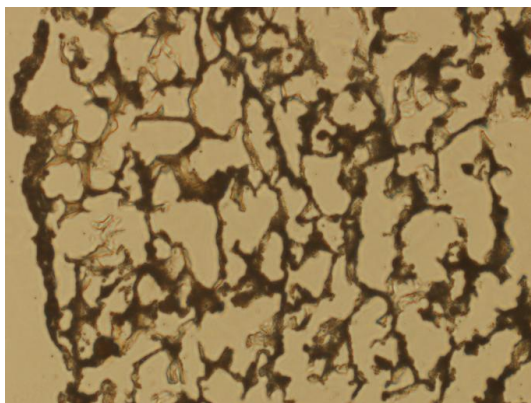
تصویر 1-E: رنگ آمیزی Vonkossa (400X) نمونه اول



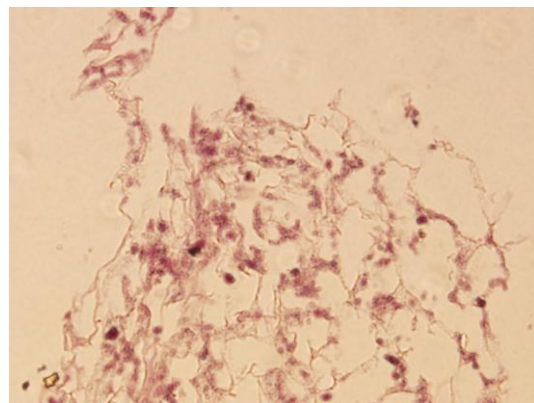
تصویر 2-B. رنگ آمیزی ALP پاساژ چهارم نمونه دوم (100X)



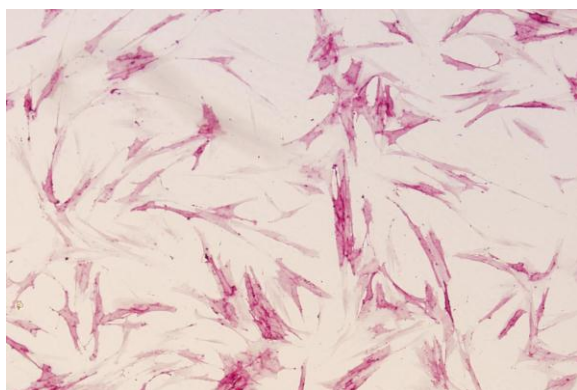
تصویر 2-A. نمای میکروسکوپی پاساژ چهارم نمونه دوم



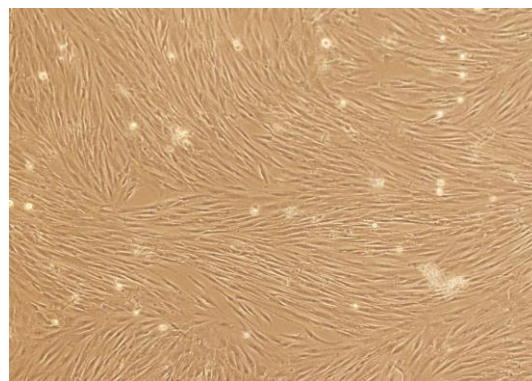
تصویر 2-D. رنگ آمیزی H-E (400X) نمونه دوم



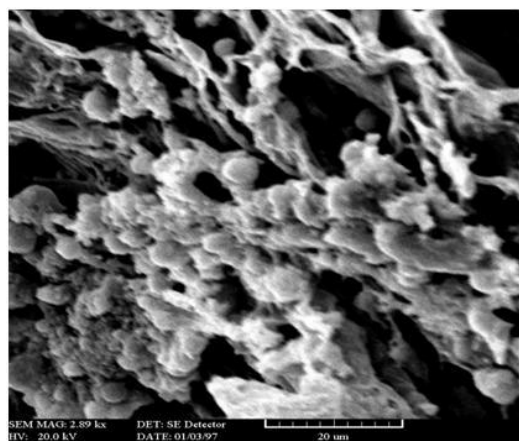
تصویر 2-C. رنگ آمیزی Von kossa نمونه دوم



تصویر 3-B: رنگ آمیزی آلكالين فسفاتناز پاساژ چهارم نمونه سوم (100X)



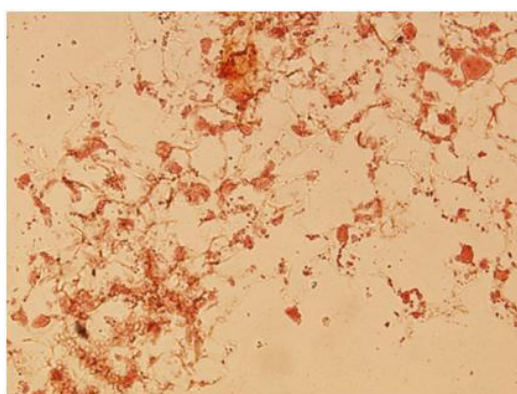
تصویر 3-A: نمای میکروسکوپی پاساژ چهارم نمونه سوم پس از ۱۴ روز



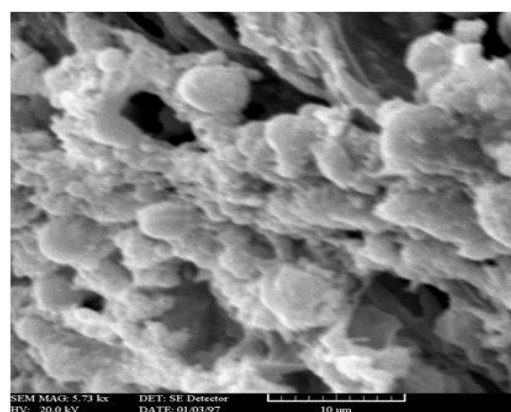
تصویر 3-D: نمای میکروسکوپ الکترونی نمونه سوم (2800x)



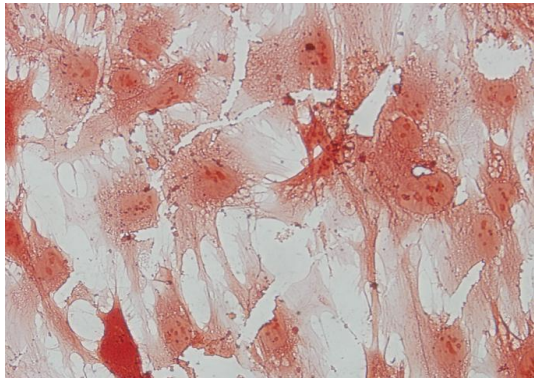
تصویر 3-C: رنگ آمیزی WST1 نمونه سوم



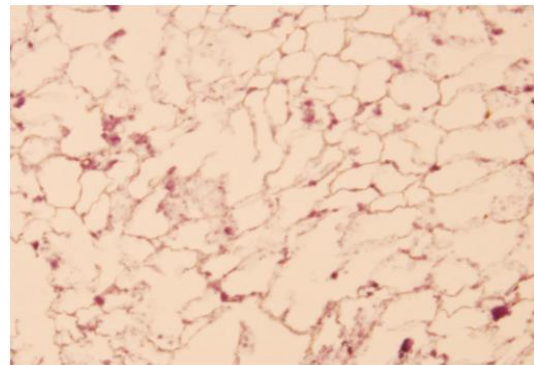
تصویر 3-F: رنگ آمیزی von kossa (400X) نمونه سوم



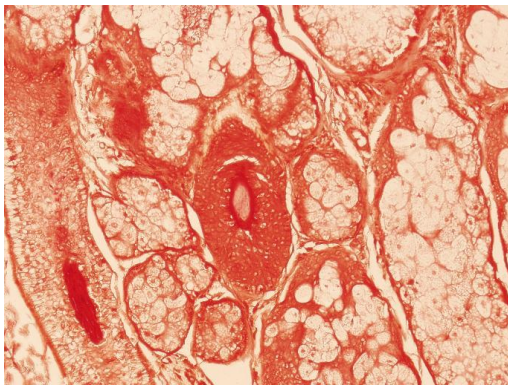
تصویر 3-E: نمای میکروسکوپ الکترونی نمونه سوم (5800x)



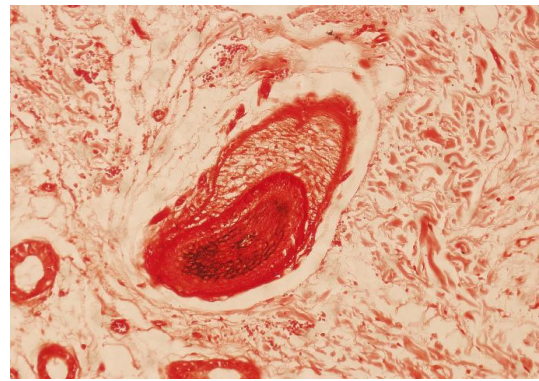
تصویر 3-H: بلورهای هیدروکسی آپاتیت در نمونه سوم در حالت تک لایه (600x) (→ نشان‌دهنده بلورهای هیدروکسی آپاتیت می باشد)



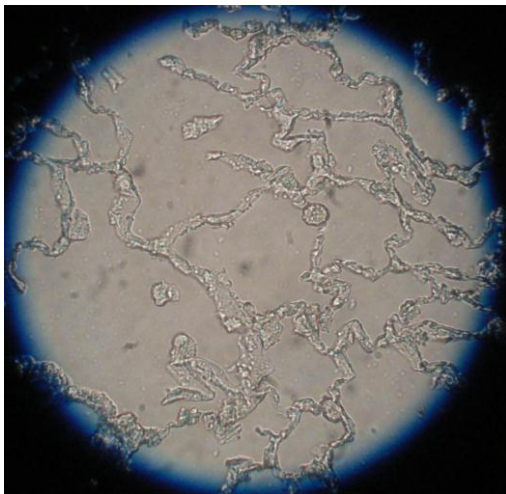
تصویر 3-G: رنگ آمیزی (H-E) 400X نمونه سوم



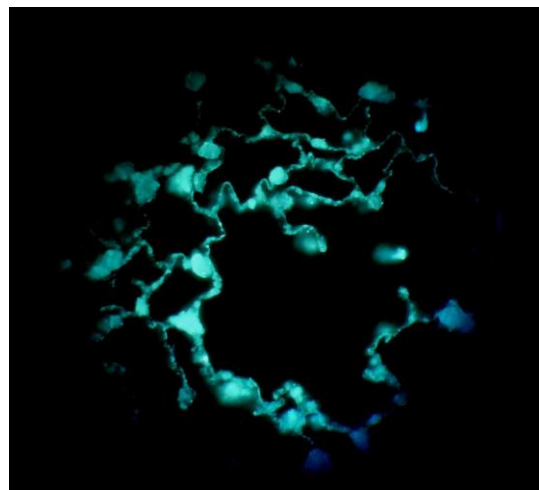
تصویر 4-B: مقطع دکلسیفیه شده سیست اپیدرموئید (200x)



تصویر 4-A: رنگ آمیزی Von kossa سیست اپیدرموئید (200x)



تصویر 5-B: رنگ آمیزی Hoechst داربست



تصویر 5-A: رنگ آمیزی Hoechst داربست

بحث و نتیجه گیری

تاکنون برای تحقیق بر روی سلول‌های استئوبلاست از سلول‌های بنیادی جنینی (۸) فک فوقانی (۹،۷)، سلول‌های مغز استخوان (۱۴-۱۰)، رده‌های استئوژنیک MC3T3-E1 (۱۵)، رده‌های سلولی استئوسارکوم انسان (۱۶) و سلول‌های استئوبلاست سر ران (۱۷) استفاده شده است. در مطالعه حاضر، از سلول‌های استئوبلاست استخوان اسفنجی و کورتیکال فک انسان، استفاده شده است.

ما برای جداسازی سلول‌های استئوبلاست از قطعات استخوانی، از دو آنزیم تریپسین ۱/۲۵٪ و کلاژناز با غلظت ۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر استفاده کردیم. در تحقیق شیمینگ (Schimming) و همکاران نیز برای جداسازی استئوبلاست‌ها از کلاژناز CLSIII (333U/ML) استفاده شده است (۱۸). در تحقیق مشابه دیگری علاوه بر کلاژناز از هیالورونیداز نیز برای کمک به هضم بهتر نمونه‌های استخوانی فمور و تیبیا استفاده شده است (۱۷). در تحقیق دیگری از یکی از نویسندگان حاضر برای آماده‌سازی نمونه‌های استخوانی نیز از کلاژناز استفاده شده است که در مقایسه با نمونه‌های بدون کلاژناز، رشد بهتر و سریع‌تر سلول‌ها مشاهده شده است (۹).

در مطالعات مشابه به منظور جداسازی سلول‌های استئوبلاست از کلاژناز Type IV با غلظت ۲ mg/ml به مدت ۲ ساعت و یا از تریپسین ۰/۵٪ درصد و کلاژناز ۰/۰۲ درصد به مدت ۷۰ دقیقه استفاده شده است (۱۹،۲۰).

لازم به توضیح است استفاده طولانی مدت از کلاژناز با هدف جداسازی سلول‌های استئوبلاست از نمونه‌ها، باعث آزاد شدن تعداد زیادی فیروبلاست به همراه استئوبلاست می‌شود که خود در ادامه روند کشت استئوبلاست‌ها مشکل جدی ایجاد می‌کند (۱۳).

در این مطالعه فاصله زمانی بین کاشت اولیه سلول‌ها پس از جداسازی تا رسیدن به تراکم ۸۰٪ به‌طور متوسط ۱۴ روز بود. در حالیکه در تحقیقات مشابه ۱۲ روز (۱۳)، ۱۰ روز

(۲۱)، ۲۳ روز (۹) و ۴-۵ هفته (۸) گزارش شده است. علت تفاوت در مدت زمان مذکور، احتمالاً استفاده از مواد مکمل مختلف در محیط‌های کشت مثل اسید اسکوریک، دگزامتازون، بتاگلیسروفسفات، و یا غلظت‌های مختلف و یا تفاوت در روش جداسازی سلول‌های استئوبلاستی می‌باشد. در پژوهش حاضر تنها از اسید اسکوریک به‌عنوان ماده‌ی مکمل استفاده شد.

در این مطالعه برای تأیید وجود سلول‌های استئوبلاست از تست آلکالین فسفاتاز استفاده شد و یافته‌ها نشان می‌دهد که میزان سلول‌های استئوبلاستی در مقایسه با سایر سلول‌ها در پاساژهای بالاتر افزایش می‌یابد. به‌طوری که در پاساژ چهارم درصد سلول‌های آلکالین فسفاتاز مثبت ($60 \pm 3/4$ ٪) بود. در تحقیق ریفاز (Rifase) و همکاران که بر روی سلول‌های استئوبلاست به دست آمده از مغز استخوان دنده انسان انجام شده، درصد سلول‌های آلکالین فسفاتاز مثبت $9/2 \pm 80/1$ ٪ گزارش شده که به نتایج مطالعه حاضر نزدیک می‌باشد (۱۹). لازم به ذکر است به‌طور کلی در حالت کشت تک لایه، سلول‌ها سطوح پایینی از آلکالین فسفاتاز را نشان می‌دهند و اگر کشت به صورت تک لایه ادامه یابد حداکثر میزان فعالیت آلکالین فسفاتاز در هفته سوم کشت می‌باشد و بعد از آن کاهش می‌یابد (۲۰). این موضوع در تحقیق دیگری نیز مورد تأیید قرار گرفته و بیان شده که فعالیت آلکالین فسفاتاز سلول‌های استئوبلاست با افزایش زمان کشت افزایش یافته و حداکثر این افزایش در روز ۲۱ پس از شروع کشت سلولی می‌باشد (۲۲).

ترکیب پلیمرها با هیدروکسی آپاتیت خواص آنها را بهبود می‌بخشد و منجر به شکل‌گیری سریع استخوان و ترکیب تدریجی استخوان با داربست می‌شود (۲۳).

ما (Ma) و همکاران نیز نشان دادند که انتشار سلول‌های استئوبلاست در داربست‌های PLLA-HA نسبت به داربست‌های PLLA خالص یکنواخت‌تر است. در پژوهش مذکور سلول‌های استئوبلاست در داربست‌های PLLA-HA با

در مطالعه حاضر مدت زمان کشت سه بعدی سلول‌ها در داربست ۲۱ روز بود. در سایر مطالعات این مدت زمان شامل ۳ هفته (۲۷)، ۴ هفته (۲۹) و ۶ هفته (۱۲) بوده است.

چسبندگی، انتشار و تمایز سلولی در داربست‌ها در مطالعه حاضر توسط Scanning electron microscope بررسی و تأیید شد که با نتایج سایر تحقیقات مشابه هم خوانی دارد. مثلاً در یکی از پژوهش‌های پیشین کشت سلول‌های استئوبلاست انسانی در داربست‌های سرامیک/پلیمر با پلیت‌های استاندارد کشت مقایسه و آنالیز میکروسکوپ الکترونی بیانگر چسبندگی استئوبلاست‌ها روی سطوح داربست بوده و استئوبلاست‌ها سطح چند لایه‌ای همراه با فیبریل‌های شبه کلاژن را درون داربست ایجاد کرده بودند (۲۱).

وانگ (wang) و همکاران در تحقیق خود سلول‌های مغز استخوان خرگوش را به داربست‌های PLA (poly lactic acid) و PHB (poly 3-hydroxybutyrate) و PHBHHX (poly3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) تلقیح کردند و بررسی کشت انجام شده با میکروسکوپ الکترونی نشان داد که داربست‌های PHBHHX سطح مناسب تری برای چسبندگی و تکثیر سلولی در مقایسه با PLA و PHB داشته و سلول‌ها در این داربست فنوتیپ استئوبلاست‌ها (سلول‌های گرد با فعالیت آلکالین فسفاتاز بالا) را نشان می‌دادند (۳۰).

در یک بررسی دیگر رشد و چسبندگی سلول‌های استئوژنیک در داربست‌های OPLA (نام تجاری PLA از کارخانه Biosciences می‌باشد) توسط میکروسکوپ الکترونی بررسی شده و رشد وسیع توده‌های سلولی که کاملاً داربست را پوشانده بودند نشان داده شده است. در مطالعه مذکور رشد سلول‌های استئوژنیک یک هفته بعد از کشت در داربست دیده شد و پس از چهار هفته ندول‌های

انتشار یکنواخت به مرکز داربست نفوذ پیدا کرده بودند ولی در داربست‌های PLLA سلول‌های استئوبلاست به صورت پراکنده در نواحی مرکزی دیده می‌شدند (۲۳).

داربست‌های مورد استفاده در بررسی حاضر دارای تخلخل‌های به اندازه ۲۰۰-۵۰ میکرومتر بودند. البته لازم به توضیح است که اندازه مناسب تخلخل‌های داربست در مطالعات مختلف دقیقاً تعریف نشده است و محققان ترجیحاً اندازه تخلخل‌هایی را که در آن شکل‌گیری استخوان دیده شده ذکر کرده‌اند. مثلاً در تحقیق هولبرت (Hulbert SF) و همکاران حداقل اندازه منافذ داربست توصیه شده ۱۰۰ میکرومتر می‌باشد (۲۴) و در سایر مطالعات منافذ بزرگ‌تر از ۳۵۰ میکرومتر نیز برای استخوان‌سازی پیشنهاد شده‌اند (۲۵،۲۶).

همچنین برخی محققان میکروکانال‌های در حد ۵۰۰ میکرون (۲۴) و بعضی هم اندازه تخلخل‌های بین ۲۰۰-۴۰۰ میکرومتر را جهت ایجاد پاسخ سلولی مناسب استئوبلاست‌ها مناسب می‌دانند (۷) که با توجه به ذکر اعداد مختلف جهت اندازه تخلخل‌ها و رشد سلول‌های استئوبلاست، به تحقیقات بیشتری برای دستیابی به اندازه مناسب تخلخل‌های داربست‌ها نیاز می‌باشد.

در این مطالعه سلول‌های استئوبلاست با تعداد یک میلیون سلول در میلی‌لیتر به داربست منتقل شدند. که مشابه تحقیق دیگری در سال ۲۰۰۴ می‌باشد (۷). اما در تحقیقات دیگر از تعداد سلول کمتر یا بیشتری استفاده شده است. مثلاً تروجانی (Trojani) و همکاران از دویست هزار سلول در یک ونیم میلی‌لیتر برای کشت سه بعدی در هیدروژل استفاده نموده‌اند (۲۷) در حالی که کیم (kim) و همکاران و شلیفاک (Schliephake) و همکاران پنج میلیون سلول در میلی‌لیتر برای این امر استفاده نموده‌اند که این اختلاف در تعداد سلول‌ها در شرایط کشت و محیط‌های آزمایشگاهی مختلف متفاوت ذکر شده است (۱۲،۲۸).

فاسینا (Fassina) و همکاران برای بررسی بافتی داربست‌های poly urethane از رنگ آمیزی H&E و Van kossa استفاده کردند که در رنگ آمیزی H&E سلول‌ها به صورت یکنواخت سطوح Poly urethane را در چند لایه پوشیده و در رنگ آمیزی van kossa نیز حضور داربست حاوی بلورهای هیدروکسی آپاتیت به رنگ قهوه‌ای نشان داده شد (۳۲).

مطالعه حاضر نشان داد که در شرایط مناسب می‌توان سلول‌های استئوبلاستی انسان را از قطعات استخوان فک به دست آورد. سلول‌های به دست آمده در محیط کشت به خوبی رشد کرده و فنوتیپ سلول‌های استخوانی را دارند. مخلوط سلولی اولیه به تدریج در کشت‌های بعدی خالص تر شده و میزان سلول‌های استئوبلاستی آن افزایش می‌یابد. این سلول‌ها علاوه بر قابلیت کشت به صورت تک لایه، قادرند در محیط سه بعدی رشد کنند و به داربست سه بعدی متصل شوند. پس از گذشت حدود سه هفته از شروع کشت سه بعدی، تعدادی از سلول‌ها به داربست متصل شده و رشد می‌کنند. تولید داربست‌های هیدروکسی آپاتیت که سلول‌های استئوبلاستی روی آن کشت داده شده باشند، روش مناسبی برای تهیه داربست‌های قابل جذب برای ترمیم نقص‌های استخوانی در ناحیه فک و صورت می‌باشد. پس از کشت سلول‌های استئوبلاست بیمار در این داربست‌ها می‌توان آنها را به منظور بازسازی نواحی مورد نظر، در بدن بیمار کاشت.

هر چند در تحقیق حاضر ما توانستیم با موفقیت سلول‌های استئوبلاستی فک انسان را در داربست سه بعدی کشت دهیم، لیکن هنوز تا کاربردی شدن آن در انسان تحقیقات بیشتری بایستی انجام شود و تحقیق در موارد زیر می‌تواند راهگشای کاربردهای آتی یافته‌های سودمند تحقیق حاضر باشد:

۱. بررسی تأثیر اندازه منافذ داربست‌ها در میزان تکثیر و رشد سلول‌ها در آنها.

کوچک استخوانی در ماتریکس خارج سلولی دیده می‌شدند (۷).

اندرز (Enders) و همکاران سلول‌های پیش‌ساز مزانشیمال polycaprolactone- PCL-HA را به داربست‌های (hydroxyapatite) PCL و (polycaprolactone) منتقل کردند. در بررسی با میکروسکوپ الکترونی اتصال سلول‌ها به فیبرهای PCL و PCL-HA دیده شد که بعد از دو هفته ماتریکس خارج سلولی توسط سلول‌ها در تخریب‌ها تولید شد و در پایان هفته سوم تمام ساختار داربست از سلول و ماتریکس خارج سلولی پر شد (۳۱).

در تحقیق سنت پیر (St-Pierre) و همکاران تکثیر سلول‌های پراستئوبلاست MC3T3E1 در داربست‌های تیتانیومی توسط میکروسکوپ الکترونی تأیید شد و در نتیجه پیشرفت تکثیر سلولی، سلول‌ها به صورت سه بعدی منتشر و به تدریج فضای تخلخل‌ها را پر کردند (۱۵).

برای بررسی ساختار بافتی داربست از رنگ آمیزی Van kossa, hoechst و H & E استفاده شد. در رنگ آمیزی Van kossa املاح فسفات قابل تشخیص می‌شوند و مثبت بودن آن حاکی از تشکیل بلورهای هیدروکسی آپاتیت است. این رنگ آمیزی‌ها وجود سلول‌ها را در داربست تأیید کردند اما رنگ آمیزی von kossa نشان‌دهنده عدم تشکیل بلورهای هیدروکسی آپاتیت توسط سلول‌ها در داربست بود که می‌تواند ناشی از کوتاه بودن زمان کشت برای تشکیل بلورهای معدنی و تعداد ناکافی سلول‌های استئوبلاست باشد. Ma و همکاران با رنگ آمیزی van kossa داربست‌های PLLA و PLLA-HA، نفوذ و انتشار سلولی در این دو نوع داربست نشان دادند. در داربست‌های PLLA-HA تعداد بیشتری از استئوبلاست‌ها با انتشار یکنواخت به نواحی عمقی داربست نفوذ کرده بودند در حالی که در داربست‌های PLLA استئوبلاست‌ها به صورت پراکنده در نواحی مرکزی دیده می‌شدند (۲۳).

۶. بررسی خواص بیو فیزیکی داربست حاوی سلول.

سپاسگزاری

این مقاله حاصل طرح پژوهشی شماره ۸۷/۸۵ می‌باشد که توسط معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی کرمان تصویب و حمایت مالی شده است که بدین جهت از معاونت مذکور صمیمانه قدردانی می‌شود.

۲. بررسی قابلیت سلول‌های استئوبلاست با منشاء متفاوت در اتصال به داربست.

۳. بررسی تأثیر درصد هیدروکسی آپاتیت بر چسبندگی و تکثیر سلولی.

۴. بررسی قابلیت انواع داربست‌های پلیمر/سرامیکی در ایجاد داربست سلولی.

۵. مطالعه واکنش بافت میزبان نسبت به این داربست‌ها و بررسی روند تجزیه آنها در بدن میزبان.

References

- Vacanti JP, Langer R. Tissue engineering: The design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation. *Lancet* 1999; 354: S32-S34.
- Langer R, Vacanti J.P. Tissue engineering science 1993; 260(5110): 920-6.
- Wiesmann H.P., Joos U, Meyer U, Biological and biophysical principles in extracorporeal bone tissue engineering. Part III. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2004; 33 (7): 523-30.
- Lohberger B, Payer M, Rinner B, Bartmann C, Stadelmeyer E, Traunwieser E, et al. Human intraoral harvested mesenchymal stem cells: characterization, multilineage differentiation analysis, and 3-dimensional migration of natural bone mineral and tricalcium phosphate scaffolds. *J Oral Maxillofac Surg* 2012; 70(10): 2309-15.
- Barron MJ, Goldman J, Tsai CJ, Donahue SW. Perfusion Flow Enhances Osteogenic Gene Expression And the Infiltration of Osteoblasts and Endothelial Cells into three-dimensional Calcium Phosphate Scaffolds. *Int J Biomater* 2012; doi: 10.1155/2012/915620. E pub 2012 Sep. 4.
- Rath SN, Strobel LA, Arkudas A. Beier JP, Maier AK, Greil P, et al. Osteoinduction and survival of osteoblasts and bone-marrow Stromal cells in 3D biphasic calcium phosphate scaffolds under Static and dynamic culture conditions *J Cell Mol Med* 2012; 16(10): 2350-61.
- Faryabi J, Nematollahi Mahani SN, malekpoor Afshar R, Nematipoor A, Fardisi S. A laboratory study on human jaw osteoblastic stem cells culturing, *J Kerman Univ Med Sci* 2006; 13(2): 57-66 [In Persian].
- Ghaudhry G.R, Yao D, Smith A, Hussain A. Osteogenic cells derived from embryonic stem cells produced bone nodules in three dimensional scaffolds. *J Biomed Biothechnol* 2004; 4:203-10.
- 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.
- 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.

11. Chen F, Feng X, Wu w, Ouyang H, Gao z, Cheng x, et al. segmental bone tissue engineering by seeding osteoblast precursor cells into titanium mesh-coral composite scaffolds. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2007; 36(9): 822-7.
12. Kim H.J, Kim U.J, Kim H.S, Li C, Wada M, Leisk GG, Kaplan DL. Bone tissue engineering with premineralized silk scaffolds. *Bone* 2008; 42 (6): 1226-34.
13. 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.
14. Mauney J.R, Jaquiere C, Volloch V, Heberer M, Martin I, Kaplan DL. *In vitro* and *in vivo* evaluation of differentially demineralized cancellous bone scaffolds combined with human bone marrow stromal cells for tissue engineering. *Biomaterials* 2005; 26 (16) :3173-85.
15. St-pierre J.P, Guathier M, Lefebvre L.P, Tabrizian M. Three dimensional growth of differentiating MC3T3-E1 pre- osteoblasts on porous titanium scaffolds. *Biomaterials* 2005; 26 (35): 7319-28.
16. Ferrera D, Poggi S, Biassoni C, Dickson GR, Astigiano S, et al.. Three-dimensional culture of normal human osteoblast: proliferation and differentiation in vitro and upon ectopic implantation in nude mice. *Bone* 2002; 30 (5):718-25.
17. Sanchez C, Deberg M.A, Piccardi N, Msika P, Reginster JY, Henrotin YE. Osteoblasts from sclerotic subchondral bone downregulate aggrecan but upregulate metalloproteinases expression by chondrocytes 2005; 13(11): 979-87.
18. Schimming R, Schmelzeisen R. This effect is mimicked by interleukin -6-1-beta and oncostatin M pre-treated non-sclerotic osteoblasts. *Osteoarthritis Tissue-engineered bone for maxillary sinus augmentation. J Oral Maxillofac Surg* 2004; 62 (6): 724-9.
19. Rifas L, Halstead L.R, Peck W.A, Avioli L.V, Welgus H.G: Human osteoblasts In vitro secrete tissue inhibitor of metalloproteinases and gelatinase but not interstitial collagenase as major cellular products. *J Clin Invest* 1989; 84 (2): 686-94.
20. Gerber I, Gwynn I. Differentiation of rat osteoblast-like cells in monolayer and micromass cultures. *Eur cell and mater* 2002; 30 (3): 19-30.
21. Hagewald S, Pischon N, Jower P, Bernimoulin JP, Zimmermann B. Effect 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.
22. Yefang Z, Hutmacher D.W, Varawan S.L, Meng L.T. Comparison of human alveolar osteoblasts cultured on polymer-ceramic composite scaffolds and tissue culture plates. *Int J Oral Maxillofac Surge* 2007; 36 (2):137-45.
23. Ma P.X, Zhang R, Xiao G, Franceschi R. Engineering new bone tissue *In vitro* on highly porous poly (α -hydroxyl acids)/hydroxyapatite composite scaffolds. *J Biomed Mater Res* 2001;54 (2): 284-93.
24. Hulbert SF, Young F.A, Mathews R.S, Klawitter JJ, Talbert CD, Stelling F.H. Potential of ceramic materials as permanently implantable skeletal prostheses. *J Biomed mater Res* 1970; 4(3): 433-56.

25. Karageorgiou V, Kaplan D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials* 2005; 26(27): 5474-91.
26. Buckley CT, O'Kelly KU. Fabrication and characterization of a porous multidomain hydroxyapatite scaffold for bone tissue engineering investigations. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2010; 93(2): 459-67.
27. 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.
28. Schliephake H, Zghoul N, Jager V, Griensven M, Zeichen J, Gelinsky M, et al. Effect of seeding technique and scaffold material on bone formation in tissue-engineered constructs. *J Biomed Mater Res* 2009; 90 (2): 429-37.
29. Service RF. Tissue engineers Build new bone. *Science* 2000; 289(5484): 1498-500.
30. Wang YW, Wu Q, Chen GQ. Attachment, proliferation and differentiation of osteoblasts on random biopolyester poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) scaffolds. *Biomaterials* 2004; 25 (4):669-75.
31. Endres M, Hutmacher D.W, Salgado A.J, Kaps C, Ringe J, Reis R.L, et al. Osteogenic Induction of Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Progenitor Cells in Novel Synthetic Polymer-Hydrogel Matrices. *Tissue Eng* 2003; 9(4): 689-702.
32. Fassina L, Visai L, DeAngelis MG, Benazzo F, Magenes G. Surface modification of porous polyurethane through a culture of human osteoblasts and an electromagnetic bioreactor. *Technol Health Care* 2007; 15(1): 33-45.

Three Dimensional Culturing of Human Jaw Osteoblasts in PLLA/HA Scaffold

Faryabi J., D.D.S.^{1,2*}, Nematollahi S.N., Ph.D.^{3,4}, Salehinijad P., Ph.D.⁵, Shahrokhi M., D.D.S.⁶, Khorasani M.T., Ph.D.⁷

1. Associate Professor of Mxillofacial Surgery, School of Dentistry, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran
2. Research Center for Oral and Dental Diseases, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran
3. Professor of Anatomy, Afzalipour School of Medicine, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran
4. Physiology Research Center, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran
5. Medical Biotechnologist, Afzalipour School of Medicine, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran
6. Dentist, Jiroft University of Medical Sciences, Jiroft, Iran
7. Iran Polymer Institute, Tehran, Iran

* Corresponding author; e-mail: jfr@kmu.ac.ir

(Received: 4 August 2012 Accepted: 4 March 2013)

Abstract

Background & Aims: Tissue engineering using somatic cells and synthetic extracellular matrix (scaffold) represents a new approach for regeneration of mineralized tissue and bone. This study was carried out to investigate the ability of a PLLA/HA scaffold to culture osteoblast cells in a three dimensional milieu.

Method: Three bony samples were taken from extraction sites during surgical extraction of wisdom teeth. Osteoblasts were obtained from specimens by using trypsin and collagenase and were cultured in monolayer up to passage four. Cells were seeded on PLLA/HA scaffolds at density of 10^6 cells/ml and then incubated for 21 days. The seeded cells were evaluated by Hoechst, von kossa and H&E stainings and scanning electron microscopy.

Results: Cellular growth was more pronounced when isolation was carried out by collagenase. According to scanning electron microscopy, osteoblast cells had been proliferated and attached to the scaffolds. H&E, Hoechst and von kossa stainings confirmed the presence of the harvested cells in the scaffold too.

Conclusion: Our findings suggest that osteoblast cells can grow onto PLLA/HA scaffold *in vitro*.

Keywords: Osteoblasts, Tissue engineering, PLLA Polymer, Hydroxyapatite, Tissue scaffolds