Original Article

مشکلات احتمالی استخراج استئوبلاست‌های دهانی جدا شده از پریوست و استخوان آلوئول در سگ

سورنا وهبی[1*]، رسول مفید[1]، لیلا جباره[2]، مریم آقالو[3]

۱- بخش پریودانتیکس، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.
۳- گروه پریودانتیکس، دانشکده دندانپزشکی مشهد، مشهد، ایران.
۴- گروه پریودانتیکس، بخش بین الملل دانشکده دندانپزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۲/۰۳/۱۲ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۲/۱۲/۱۱

چکیده

زمینه و هدف: ضایعات استخوان فکی، مشکلات زیادی را در جراحی‌های فک و صورت ایجاد کرده است. برای غلبه بر مشکلات پیوند استخوان خودی، مهندسی بافت از سلول‌های فرد همراه با داربستهای صناعی استفاده می‌کند. هدف این مطالعه بررسی مشکلات احتمالی استخراج استئوبلاستها از پریوست فکی و استخوان آلوئول و مقایسه کمی آن در صورت استخراج بود.

مواد و روش‌ها: قطعات استخوان و پریوست از ۴ سگ ابتدا از ناحیه استخوان بین دندانی و رتروملر تهیه شدند که به دلیل عدم رشد سلولی در نمونه‌گیری مجدد استخوان از ریج بی‌دندانی و پریوست از استخوان باکال فک پایین تهیه شد. به علت عدم استخراج سلول در مرحله بعد از ناحیه باکالی دندانهای پرمولر فک بالا نمونه‌ها جدا شده و در محیط کشت اختصاصی قرار گرفتند. با این روش نمونه‌برداری پس از دو هفته که سلول‌های پریوست تقریباً ۸۰ درصد کف پلیت را پر کردند پاساژ داده شدند.

نتایج: با وجود رشد خوب سلول‌های نمونه پریوست هر ۴ سگ در P0 با گذشت ۱ هفته از پاساژ اول رشد سلول‌ها متوقف و سلول‌ها به مرور دچار پیری شدند.

نتیجه‌گیری: مشکل اساسی در رابطه با کشت سلولی، پیر شدن یا de-differentiation آنهاست که در نتیجه آن سلول‌ها توانایی خود را برای تکثیر از دست می‌دهند. از عوامل احتمالی عدم موفقیت در کشت سلولی، آسیب حرارتی سلول‌ها، آلودگی محیط کشت با سلول‌های فیبروبلاست، عدم هماهنگی محتویات محیط کشت با نیازهای تغذیه‌ای سلول، آسیب ناشی از آنزیم‌های مورد استفاده جهت پاساژ سلول‌ها و سن بالای دهنده‌ها را می‌توان عنوان کرد.

کلمات کلیدی: استئوبلاست، پریوست، استخوان آلوئول، کشت سلول

مقدمه

ضایعات استخوانی ثانویه به تومورها، تروما، بیماری‌های مادرزادی یا بیماری‌های پریودنتال مشکلات زیادی را در جراحی دهان، فک و صورت و ارتوپدی ایجاد کرده است (۱). بعد از انتقال خون و فراورده‌های خونی، پیوند استخوان رایج‌ترین نوع پیوند در انسان است، به طوری که بیش از ۲۵۰۰۰۰ پیوند استخوان به صورت سالیانه در آمریکا انجام می‌شود (۲). نگهداری و ترمیم ریج آلوئول اهمیت زیادی داشته و یکی از مشکلات علم کاشت دندان است (۳). معمولاً پیوند استخوان از خود فرد یک استاندارد طلایی برای جایگزینی استخوان بوده و برای بازسازی نقایص استخوانی تحت شرایط مشکوک بسیار موثر است (۴). اما مقدار استخوانی که با این روش می‌تواند جدا شود محدود می‌باشد (۵). با وجود پیشرفت‌های بسیار در تصویربرداری‌های تشخیصی، بی‌هوشی و

* نویسنده مسئول: سورنا وهبی ، بخش پریودانتیکس، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.. تلفن: ۰۲۱-۲۹۹۰۲۳۱۴، Email: ivsure1@gmail.com

Downloaded from journal.fums.ac.ir at 15:07 +0330 on Thursday November 15th 2018

Downloaded from journal.fums.ac.ir at 15:07 +0330 on Thursday November 15th 2018

تکنیک‌های جراحی، بیماران نیازمند بازسازی‌های اسکلتی با پیوند استخوان خودی[1] هنوز در محل دهنده، درجاتی از ناراحتی[2] را تجربه می‌کنند (۶). محدودیت‌های استخوان خودی در ۱۰ تا ۳۰ درصد بیماران مشکلات جدی ایجاد می‌کند (۵). بنابراین تمایل کنونی در بازسازی اسکلت صورتی به سمت روش‌های رژنراسیون است تا از پیوند استخوان خودی اجتناب شود (۷). تکنولوژی مهندسی بافت، برای غلبه بر مشکلات پیوند استخوان خودی گسترش پیدا کرد که شامل تشکیل بافت جدید از سلول‌های مجزا و پلیمرهای زیست تخریب‌پذیر است (۸).

روش‌های مهندسی بافت برای بازسازی‌های اسکلتی، نتایج را از نظر ساختاری[3] و عملکرد[4] بهبود بخشیده و در عین حال، مشکلات محل دهنده را محدود می‌کند (۶). تاکنون، گزارش مواردی از استفاده موفق از مهندسی بافت در ترمیم ضایعات آلوئول عنوان شده است (۹). فاکتورهای حیاتی در بازسازی[5] بافت شامل منبع سلولی، ساختار داربست[6]، قرار دادن سلول روی داربست و ترکیب محیط کشت است (۱۰). برای تامین سلول‌های استخوان ساز در مهندسی بافت، پریوست به عنوان منبع ایجاد سلول‌های مجزا در نظر گرفته شده است . Uematsu، عنوان می‌کند که در درمان‌های پریودنتال بازسازی کننده، ترمیم موفق استخوان آلوئول، با استفاده از قطعات پریوست رخ داده است (۱۱). Cicconett، سلول‌های پریوست فکی و سلول‌های مغز استخوان توبروزیته را به عنوان سلول‌های پیش‌ساز به عنوان منابع مناسب سلول برای مهندسی بافت استخوان و جایگزین مناسبی برای مغز استخوان از کرست ایلیاک معرفی کرد (۱۲). Park، با بررسی فنوتیپ استئوژنیک و میزالیزاسیون سلول‌های پریوست انسانی به دست آمده از پریوست مندیبل، نتیجه گرفت که سلول‌های پریوست، پتانسیل استخوان سازی داشته و می‌توانند کاندید مناسبی برای مهندسی بافت در ترمیم ضایعات استخوانی در ناحیهٔ فک و صورت باشند (۱۳). با وجود پیشرفت در مهندسی بافت، ترمیم ضایعاتی که بخشی از فک پایین را درگیر می‌کند، به عنوان یکی از مشکلات مهم در جراحی فک و صورت باقی مانده است (۵ و ۱۴). کشت سلول‌های پریوست فک به عنوان منبع سلولهای استخوان ساز[7]، به علت سادگی روند جراحی و ایجاد حداقل میزان ناراحتی، جذاب است (۱۵)؛ ازطرفی دسترسی راحت‌تری به پریوست، در مقایسه با مغز استخوان، وجود دارد به‌طوریکه ضمن جراحی‌های معمول می‌توان به آن دست یافت (۱۶). Zhu، نشان داد که سلول‌های پریوست و سلول‌های استئوبلاست جدا شده از قطعات استخوان آلوئول، در محیط کشت، داربست معدنی شده[8] را تولید و تشکیل استخوان را تحریک می‌کنند (۱۷). در این‌جا، مشکل کشت سلول و تعداد کافی سلول در ارتباط با سلول‌های خودی وجود دارد (۱۰ و ۱۸). این روند علاوه بر نیاز به یک مرکز کشت سلولی تمیز برای جلوگیری از آلودگی و زمان‌بر بودن، همواره با احتمال آلودگی با عفونت‌های ویروسی که از طریق FCS[9] (منبع تغذیهٔ معمول در کشت سلولی) منتقل می‌شود، همراه است (۱۰).

تحقیقات زیادی در زمینه جدا سازی و ارزیابی ویژگی‌های سلول‌های استئوبلاست از منابع مختلف صورت گرفته، اما تاکنون مقایسه‌ای بین تعداد سلول‌های جدا شده از منابع سلولی مختلف انجام نشده است. با وجود اهمیت زیادی که رسیدن به تعداد سلول کافی در یک زمان محدود و مشخص دارد و با توجه به اینکه روش‌های متنوع و متعددی در زمینه استخراج سلولی به کار می‌روند که هر یک می‌توانند اثرات و نتایج متفاوتی را به همراه داشته باشند، هدف از این تحقیق بررسی مشکلات احتمالی استخراج استئوبلاست‌ها از منابع دهانی پریوست و استخوان آلوئول و مقایسه کمی آن در صورت استخراج بود.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری از استخوان و پریوست: ۴ قلاده سگ نر mongrel با سن یک سال و متوسط وزنی ۲۵- ۳۵ کیلوگرم و فاقد بیماری خاص، برای این کار در نظر گرفته شدند. حیوانات، ابتدا به مدت یک هفته جهت خو گرفتن با شرایط آزمایشگاه و انجام واکسیناسیون و دریافت داروی ضد انگل در آزمایشگاه نگهداری

1. Autogen
2. Morbidity
3. Morphologic
4. Functional
5. Regeneration
6. Scaffold
7. Osteogenic
8. Mineralized matrix
9. Fetal Calf Serum

Downloaded from journal.fums.ac.ir at 15:07 +0330 on Thursday November 15th 2018

شدند. بعد از بیهوشی عمومی از طریق تزریق داخل عضلانی Xylazine hydrochloride 2% (0.1 mg/kg) و تزریق وریدی کتامین (5 mg/kg)، دهان حیوان به وسیله کلرهگزیدین ۰/۲ درصد شستشو داده شد. تزریق موضعی لیدوکائین در فک صورت گرفت و در دیستال آخرین دندان در ناحیه Retro molar برش کرستال داده شد. فلپ به صورت Partial thickness کنار زده شد. از این ناحیه، پریوست با ابعاد ۱ سانتیمتر مربع جدا شده و در لوله فالکون حاوی محیط کشت، شامل نسبت مساوی از Dulbecco's Modified Eagle Minimum (DMEM, Gibco, USA) ، F-12 و ۱ درصد Penicillin/Streptomycin (Gibco, USA) قرار گرفت. در ادامه، بوسیله رانژور کرست استخوان بین دندانی، جدا و در لوله‌های جدا حاوی محیط کشت، به آزمایشگاه انستیتو پاستور منتقل شد.

استخراج سلول‌های استئوبلاست وکشت آن‌ها در آزمایشگاه: در آزمایشگاه، ابتدا نمونه‌ها به وسیله PBS[10]، سه بار شستشو داده شدند. سپس، استخوان به قطعات کوچک‌تر شکسته شد تا سلول‌ها به صورت مکانیکی از هم جدا شوند. به دنبال آن، سلول‌ها در ظروف کشت سلول ۲۴ خانه حاوی نسبت مساوی از DMEM و F-12 به همراه ۱۰ درصد FBS و ۱ درصد Penicillin/Streptomycin قرار داده شده و در شرایط استاندارد (دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، CO2 ۵ درصد و رطوبت ۹۵ درصد) انکوبه شدند. پریوست نیز به قطعات کوچکتر تقسیم شد و در همان محیط کشت سلولی در شرایط استاندارد قرار گرفت. بعد از گذشت ۶ هفته هیچ سلولی در محیط کشت مشاهده نشد.

در نمونه‌گیری مجدد، سگ‌ها طبق روش قبلی بیهوش شدند. قطعات پریوست به ابعاد ۱ سانتی متر مربع از کورتکس باکال فک پایین جدا شد و نمونه‌های استخوانی به وسیلهٔ فرز ترفاین و شستشوی فراوان با نرمال سالین، با ابعاد ۱ سانتی متر مکعب از ریج مندیبل جدا شد. نمونه‌ها در فالکون حاوی محیط کشت DMEM و ۱ درصد پنی‌سیلین قرار گرفتند و بلافاصله به آزمایشگاه منتقل شدند. در آزمایشگاه، این بار از روش هضم آنزیماتیک جهت کشت سلولی استفاده شد؛ به این ترتیب که نمونه‌ها پس از سه بار شستشو با PBS، به مدت نیم ساعت تحت تاثیر آنزیم کلاژناز Type I (Sigma, USA) قرار گرفته، به محیط کشت منتقل و تحت شرایط استاندارد انکوبه شدند. اما باز هم پس از گذشت ۷هفته به جز یکی از نمونه‌های پریوست که حاوی تعداد کمی سلول بود و بعد از گذشت ۱ هفته از مشاهده اولین سلول، رشد آن متوقف شد. از سایر نمونه‌ها سلولی استخراج نشد.

در این مرحله، مجدداً نمونه‌گیری انجام گرفت و محل نمونه-برداری به فک بالا منتقل شد. پریوست از استخوان ناحیهٔ دندان-های پرمولر بالا جدا شد و نمونه‌های استخوان نیز از همین محل و به کمک تیغ جراحی به صورت chips (به منظور پیشگیری از ایجاد حرارت و آسیب سلولی) جدا شد. سلول‌ها، مجدداً طبق روش اول کشت داده شدند. پس از دو هفته، سلول‌ها با کمک Trypsin/EDTA از محیط کشت جدا و با محلول تریپان بلو ۰/۴ درصد شمارش شدند. سپس با دانسیته‌های یکسان در فلاسک کشت سلول کشت داده و در شرایط استاندارد انکوبه شدند. محیط کشت سلول‌ها هر ۳ تا ۴ روز یک‌بار تعویض شد.

این مطالعه با تبعیت از کلیه پروتکل های پذیرفته شده توسط کمیته حمایت و استفاده عملی از حیوانات[11] طراحی گردید.

نتایج

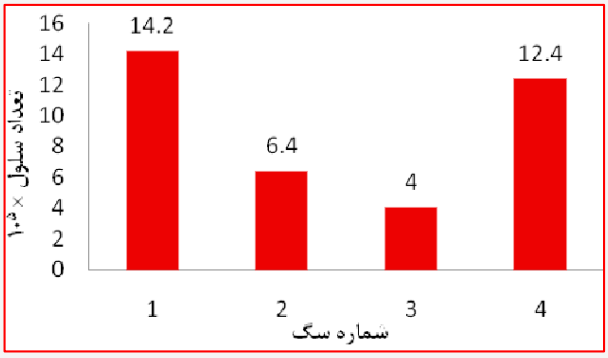
سلول‌های پریوست جدا شده به روش سوم از هر ۴ سگ، از روز ششم و هفتم شروع به رشد کردند. ابتدا خروج سلول‌ها از پریوست کند بود ولی بعد از گذشت دو هفته زیاد شدند؛ به طوری که کف پلیت کشت را پر کرده بودند. در تمام نمونه‌ها، سلول‌ها مورفولوژی دوکی و کشیده[12] داشتند که در بعضی مناطق پلیت، کلنی‌های چند لایه[13] تشکیل داده بودند. این در حالی است که نمونه‌های استخوانی، فاقد سلول بودند. تعداد سلول‌های استخراج شده از پریوست هر یک از سگ‌ها در پاساژ صفر (P0) در نمودار ۱ نشان داده شده است.

با وجود رشد خوب در پاساژ صفر با گذشت ۱ هفته از پاساژ اول، رشد سلول‌ها متوقف و سلول‌ها به مرور دچار پیری سلولی[14] شدند. به منظور افزایش توانایی تکثیر سلول‌های باقی

[10]. Phosphate Buffer Salin
[11]. IACUS (institutional animal care use committee)
[12]. Fibroblast like
[13]. Swirls
[14]. Senescence

Downloaded from journal.fums.ac.ir at 15:07 +0330 on Thursday November 15th 2018

مانده، درصد FBS موجود در محیط کشت افزایش پیدا کرد اما پس از مدتی تعداد سلول‌ها در حدی کاهش یافت که امکان تکثیر آن‌ها وجود نداشت.



نمودار ۱: تعداد سلول استخراج شده از هر سگ P0

بحث و نتیجه گیری

یکی از جنبه‌های مهم مهندسی بافت، تکثیر سلول‌های اولیه در محیط in vitro است. این کار اجازه می‌دهد تا تعداد زیادی سلول از حداقل ماده اولیه بدست آید. کشت سلولی تحت تاثیر متغیرهای زیادی از جمله شرایط محیطی و تغذیه‌ای سلول‌ها (مثل دمای مناسب، سطح مناسب برای اتصال و محیط کشت متناسب با سلول) و متغیرهای مربوط به دهنده بافت (مثل سن و شرایط سیستمیک) قرار دارد. مشکل اساسی این است که سلول‌ها طی تکثیر، پیر شده یا دچار[15] عدم تمایز می‌شوند و در نتیجه توانایی خود را برای تکثیر از دست می‌دهند (۱۹).

Mayer، در سال ۲۰۰۴ با مطالعه بر روی سلول‌های استخوانی انسان نشان داد که بین سلول‌های استخراج شده از افراد مختلف، تفاوت‌های ظاهری زیادی می‌توان یافت (۲۰). در تحقیق فعلی، بررسی میکروسکوپ نوری نشان داد که شکل ظاهری سلول‌های پریوست استخراج شده در تمام نمونه‌ها، نمای مشابه فیبروبلاست[16] داشتند. این مسئله شاید به علت تعداد محدود نمونه‌ها در این تحقیق باشد. با این وجود، با افزایش تعداد نمونه‌ها می‌توان این تفاوت‌های ظاهری را با میکروسکوپ نوری مشاهده کرد.

طبق نتایج برخی مطالعات، افزایش سن دهنده می‌تواند روی فعالیت استئوژنیک سلول‌ها موثر باشد و آن‌ها را نسبت به شرایط محیط کشت، حساس‌تر کند (۱۶). به طوری که سلول‌های جدا شده، به شدت به شرایط تغذیه‌ای و درصد FBS موجود در محیط، حساس می‌شوند (۲۱). طبق مطالعه Bertram، افزایش سن می‌تواند روی درصد شکست در استخراج سلول از استخوان موثر باشد (۲۲). در این مطالعه، از پنج سگ که همگی در محدوده سنی یکسانی قرار داشتند، به عنوان دهنده استفاده شد. از غلظت ۱۰ درصد FBS با توجه به مقالات موجود استفاده گردید. پس از جدا سازی اولیه، سلول‌ها در پاساژ اول رشد لازم را نداشتند، به طوری که امکان پاساژ دادن آن‌ها وجود نداشت. با توجه به این‌که با افزایش سن، احتمال کاهش توانایی بافت‌های بالغ برای تکثیر در محیط کشت وجود دارد، به نظر می‌رسد در این مطالعه نیز عدم رشد سلول‌ها تا حدی نتیجه سن نامناسب سگ‌ها و عدم هماهنگی شرایط تغذیه‌ای محیط کشت با نیازهای سلولی آن‌ها بوده باشد. از طرفی، با افزایش سن، ضخامت پریوست فکی تمایل به کاهش دارد و جدا کردن لایه فیبروبلاست آن دشوار می‌شود (۲۳). بنابراین، با افزایش سن، احتمال آلودگی محیط سلول‌های پیش‌ساز پریوست با فیبروبلاست‌های حاضر در لایه خارجی آن افزایش پیدا می‌کند (۱۵). پس این احتمال وجود دارد که محیط کشت پریوست با سلول‌های فیبروبلاست که سرعت تکثیر بالاتری دارند، آلوده شده باشد و چون محیط کشت مورد استفاده در این تحقیق برای رشد فیبروبلاست‌ها مناسب نبوده، بنابراین در پاساژهای بعدی، سلول‌ها قادر به ادامه رشد نبودند.

طبق مطالعه Eriksson، آسیب‌های مکانیکی و حرارت بالا، یکی از علل شکست در استخراج سلول است (۲۴). با توجه به این‌که در این مطالعه از فرز ترفاین همراه با شستشوی فراوان برای جداسازی قطعات استخوان استفاده شده است، یکی از دلایل شکست در استخراج سلول را می‌توان آسیب حرارتی سلول‌ها عنوان کرد.

Hefley، در سال ۱۹۸۱ عنوان کرد که سلول‌ها در اثر تماس با آنزیم آسیب می‌بینند (۲۵). Owen، در سال ۱۹۹۰ نشان داد که تکثیر و تمایز، دو پدیده مرتبط با یکدیگرند که طی پاساژ

[15]. De-differentiation
[16]. Fibroblast like

Downloaded from journal.fums.ac.ir at 15:07 +0330 on Thursday November 15th 2018

سلولی در این سلول‌های آسیب دیده، از سر گرفته می‌شوند (۲۶). در این مطالعه، جهت پاساژ سلول‌ها، از تریپسین/EDTA با غلظت ۰/۲۵ درصد/ ۱ میلی مولار استفاده شد که طبق مقالات برای استئوبلاست‌های انسانی مناسب می‌باشد و می‌تواند دلیل آسیب سلول‌های استئوبلاست سگ باشد.

دکتر ظفرمند با مطالعه بر روی سلول‌های بنیادی پالپ دندان عقل، یکی از دلایل عدم موفقیت در استخراج سلول را آلودگی‌های میکروبی عنوان کرد (۲۷). در تحقیق فعلی نیز یکی از دلایل شکست می‌تواند آلودگی‌های میکروبی تشخیص داده نشده باشد.

تحقیقات بسیاری اثر فاکتورهای رشدی مختلف را بر سرعت میتوز و تمایز سلول‌های مختلف بررسی کرده‌اند که برخی، اثر این فاکتورها را در افزایش میتوز مثبت (۲۸) و برخی دیگر، آن‌ها را موثر بر تمایز و در نتیجه از دست دادن قدرت تکثیر می‌دانند (۲۹). با توجه به نتایج متناقض حاصل از این مطالعات، بررسی اثر فاکتورهای رشدی بر تکثیر سلول‌ها پیشنهاد می‌شود.

به نظر می‌رسد که حساسیت تکنیکی و دقت عمل جراحی، حتی در مطالعات حیوانی، نیز تاثیر گذار باشد. هر چند در این مطالعه سعی شده تا با استفاده از متخصصین این رشته تا حدی از خطاهای این جنس کاسته شود ولی به هر حال، سختی و تراکم فوق‌العاده فک سگ‌های مورد مطالعه و تفاوت سختی و تراکم استخوان در هر سگ و زمان‌بر بودن کار، خواه ناخواه، بر نحوه اجرای تحقیق تاثیر گذار می‌باشد. به این عامل در مطالعات مختلف چندان توجهی نشده و میزان تاثیرگذاری این فاکتور در روند و نتایج مطالعه به دقت مشخص نیست.

کشت سلولی دارای متغیرها و فاکتورهای مداخله‌گر زیادی است که امکان کنترل، حذف یا یکسان‌سازی تمام آن‌ها وجود ندارد و تمامی آن‌ها می‌توانند بر روی عدم دستیابی به نتایج مورد انتظار موثر باشند. با توجه به اینکه مراحل کشت سلولی در این تحقیق توسط دانشجوی سال آخر رشته دندانپزشکی و مطابق با دستورالعمل‌های موجود و زیر نظر متخصصین مربوطه انجام گرفته است، حصول این نتیجه می‌تواند در اثر حساسیت تکنیکی مراحل کشت سلولی و عدم تجربه کافی عمل کننده در این زمینه باشد.

در مجموع ارزیابی‌های متفاوت، خطای عامل، تکنیک جراحی و لابراتواری، نژادهای مختلف سگ و تفاوت در دانسیته استخوان در هر یک از آن‌ها، می‌تواند تا حدی مسئول نتایج متفاوت بین تحقیقات گوناگون باشد.

یافته‌های این تحقیق نشان می‌دهد که تحت شرایط آزمایش ما، در ناحیه فکی صورتی، اگر چه جداسازی سلول‌های پریوست ممکن شد، اما امکان ادامه رشد و تکثیر آن‌ها در حد قابل قبول وجود نداشت. بنابراین، استخراج سلول‌های استئوبلاست از پریوست یا استخوان آلوئول و فراهم کردن شرایط رشدی مناسب برای آن‌ها در محیط in vitro، نیازمند مطالعات بیشتری است.

References

1. Li Z, Li ZB. Repair of mandibular defect with tissue engineering bone in rabbits. ANZ J Surg. 2005;75(11):1017-21.
2. Henkel KO, Gerber T, Dorfling P, Gundlach K, Bienengraber V. Repair of bone defects by applying biomatrices with or without autologous osteoblasts. J CranioMaxillofac Surg. 2005;33(1):45-49.
3. Hao H, Amizuka N, Oda K, Fujii N, Ohnishi H, Okada A, et al. A histological evaluation on self setting α-tricalcium phosphate applied in the rat bone cavity. Biomaterials. 2004;25(3):431-442.
4. Keneser U, Stangenberg L, Ohnolz J, Buettner O, Stern-Stracter J, Mobest D, et al. Evaluation of processed bovine cancellous bone matrix seeded with syngenic osteoblast in a critical size calvarial defect rat model. J Cell Mol Med. 2006;10(3):695-707.
5. Meijer GJ, de Bruijn JD, Koole R, Van Blitterswijk CA. Cell-based bone tissue engineering. Plos Medicine. 2007;4(2): 260-264.
6. Abukawa H, Shin M, Williams WB, Vacanti JP, Kaban LB, Troulis MJ. Reconstruction of mandibular defects with autologous tissue-engineering bone. J Oral Maxillofac Surg. 2004;62(5):601-606.
7. Jafarian M, Eslaminejad MB, Khojaste A, Mashhadi Abbas F, Dehghan MM, Hassanizadeh R, et al. Marrow-derived mesenchaymal stem cells-derived bone regeneration in the dog mandible: a comparison between biphasic calcium phosphate and natural bone mineral. J

Downloaded from journal.fums.ac.ir at 15:07 +0330 on Thursday November 15th 2018

Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2008;105(5): 14-24.
8. Weng Y, Cao Y, Silva CA, Vacanti MP, Vacanti CA. Tissue-engineered composites of bone and cartilage for mandible condylar reconstruction. J Oral Maxillofac Surg. 2001;59(2):185- 190.
9. Wang S, Zhang Z, Zhao J, Zhang X, Sun X, Xia L, et al. Vertical alveolar ridge augmentation with β-tricalcium phosphate and autologous osteoblasts in canine mandible. Biomaterials. 2009;30(13):2489-98.
10. Ikada Y. Challenges in tissue engineering. J R Soc Interface. 2006;3(10):589-601.
11. Uematsu K, Kawase T, Nagata M, Suzuki K, Okuda K, Yoshie H, et al. Tissue culture of human alveolar periosteal sheets using a stem-cell culture medium (Mesen PRO-RS™): In vitro expansion of CD146-positive cells and concomitant upregulation of osteogenic potential in vivo. Stem Cell Research. 2013;10(1):1-19.
12. Cicconetti A, Sacchetti B, Bartoli A, Michienzi S, Corsi A, Funari A, et al. Human maxillary tuberosity and jaw periosteum as sources of osteoprogenitor cells for tissue engineering. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2007;104(5):612-8.
13. Park B-W, Hah Y-S, Kim DR, Kim J-R, Byun J-H. Osteogenic phenotypes and mineralization of cultured human periosteal- derived cells. Arch Oral Bio. 2007;52(10):983- 989.
14. Wu W, Chen X, Mao T, Chen F, Feng X. Bone marrow-derived osteoblasts seeded in to porous beta-tricalcium phosphate to repair segmental defect in canine's mandibula. Ulus Travma Acil Cerrahi Derg. 2006;12(4):268-276.
15. Jaquiery C, Schaeren S, Farhadi J, Mainil-Varlet P, Kunz C, Zeilhofer HF, et al. In vitro osteogenic differentiation and in vivo bone-forming capacity of isogenic jaw periosteal cells and bone marrow Stromal cells. Ann Surg. 2005;242(6):859-868.
16. Agata H, Asahina I, Yamazaki Y, Uchida M, Shinohara Y, Honda MJ, et al. Effective bone engineering with periosteum derived cells. J Dent Res. 2007;86(1):79-83.
17. Zhu SJ, Choi BH, Huh JY, Jung JH, Kim BY, Lee SH, et al. A comparative qualitative histological analysis of tissue-engineered bone Using bone marrow mesenchaymal stem cells, alveolar bone cells, and periosteal cells. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2006;101(2):164-9. 18. Fodor WL. Tissue engineering and cell based therapies, from bench to the clinic: The Potential to replace, repair and regenerate. Reprod Boil Endocrinol. 2003;39(1):1-6.
19. Ng AM, Saim AB, Tan KK, Tan GH, Mokhtar SA, Rose IM, et al. comparison of bioengineered human bone construct from four sources of osteogenic cells. J Orthop Sci. 2005;10(2):192-199.
20. Mayer H. Properties of human trabecular bone cells from elderly women: implications for cell-based bone engraftment. Cells Tissues Organs. 2004;177(2):57- 67.
21. Termine DJ. Cellular activity, matrix proteins, and aging bone. Exp Gerontol. 1990;25(3-4):217-221.
22. Bertram H, Mayer H, Schliephake H. Effect of donor characteristics, technique of harvesting and in vitro processing on culturing of human marrow stromal cells for tissue engineered growth of bone. Clin Oral Implants Res. 2005;16(5):524- 531.
23. Marini RP, Stevens MM, Longer R, Shastri VP. Hydraulic elevation of the periosteum: a novel technique for periosteal harvest. J Invest Surg. 2004;17(4):229- 233.
24. Smith SE, Roukis TS. Bone and wound healing augmentation with platelet-rich plasma. Clin Podiatr Med Surg. 2009;26(4):559-88.
25. Hefley T, Cushing J, Brand JS. Enzymatic isolation of cells from bone: cytotoxic enzymes of bacterial collagenase. Am J Physiol. 1981;240(5):234- 238.
26. Owen TA, Aronow M, Shalhoub V, Baron LM, Wilming L, Tassinari MS, et al. Progressive development of the rat osteoblast in vitro: reciprocal relationships in expression of genes associated in osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix. J Cell Physiol. 1990;143:420-430.
27. Zafarmand AH, Mashhdi abbas F, Abrishamkar H. Isolation and characterization of postnatal (Stro 1 positive) stem cells from human dental pulp: Thesis submitted in partial fulfillment of the degree of DDS. Shahid Beheshti University of Medical Sciences School of Dentistry; 2009.
28. Tanaka H, Ogasa H, Barnes J, Laing CT. Actions of bFGF on mitogenic activity and lineage expression in rat osteoprogenitor cells: effect of age. Mol Cell Endocrinol. 1999;150(1-2):1-10.
29. Shimoaka T, Ogasavara T, Yonamine A, Chikazu D, Kawano H, Nakamura K, et al. Regulation of osteoblast, chondrocyte and osteoclast functions by bFGF-18 in comparison whit FGF-2 and FGF-10. J Biol Chem. 2002;277(9):7493-7500.

Original Article

Downloaded from journal.fums.ac.ir at 15:07 +0330 on Thursday November 15th 2018

Probable Limitations of Osteoblasts Isolation from the Periosteum and Alveolar Bone in a Dog Model

Vahabi S[1*], Mofeed R[1], Jabbareh L[2], Aghalou M[3]

1- Periodontics Unit, Dental School, Shahid Beheshti Medical University, Tehran, Iran.
2- Periodontics Unit, Mashhad Dental Faculty, Mashhad, Iran.
3- Periodontics Unit, Qazvin dental school, Qazvin, Iran.

Received: 02 Jun 2013 Accepted: 02 Mar 2013

Abstract

***Background & Objective*:** Bone defects in jaws create major problems for oral and maxillofacial surgery. To overcome the limitations of Autografts tissue engineering uses autogenus cells and synthetic scaffolds. Type of cells or cell sources have an important effect on the construction which is produced. The aim of this study was to evaluate the feasibility and probable limitations of osteoblast isolation from the periosteum and alveolar bone in an animal model and to compare their probable results quantitatively.

Materials & Methods: Bone and periosteal samples were harvested from interdental septum and retromolar area of 4 dogs. Because no cell was grown new samples were harvested from edentulous ridge and buccal mandibular periosteum. Since no cell was isolated in next step samples were harvested from buccal area of maxillary premolars and explants in cell culture medium. After 2 weeks adherent cells reaching 80% confluent; cells were counted and passaged in cell culture flasks.

Results: Despite first good proliferation of periosteal cells of all dogs in P0, their growth was stopped and they become senescence after one week.

Conclusion: The key problems in culture techniques are cell senescence and de-differentiation leading to lose the ability of proliferation. It seems there are probable reasons for isolating of osteoblasts including thermal damage of cells, contamination of culture with fibroblasts, inconsistency of medium and cell requirements, enzymatic damage from enzymes used for cell passage and high donor ages.

Keywords: **Osteoblast, periosteum, alveolar bone, cell culturing.**

***Corresponding author: Vahabi Surena,** Periodontics Unit, Dental School, Shahid Beheshti Medical University, Tehran, Iran.
Tel: +98 2129902314
Email: ivsure1@gmail.com