

metod np. opatrunki gipsowe, stabilizatory Zespol). Jest to szczególnie widoczne w leczeniu złamań okołostawowych.

• Leczenie w większości przypadków przywraca pełne funkcje kończyny, które posiadała przed złamaniem.

• Stabilizatory zewnętrzne powinny charakteryzować się dużą sztywnością i małym ciężarem, co narzuca warunki na stosowane materiały.

Powstaje coraz więcej różnych metod operacyjnych i systemów leczenia oraz wiele rodzajów materiałów nowej generacji (np. wykorzystywanych w lotach kosmicznych) o właściwościach nadających się świetnie do stosowania również w stabilizacji zewnętrznej. Do przyszłości należy (prace są już rozpoczęte) konstrukcja stabilizatora z dynamizacją aktywną.

• The treatment in most of the cases fully restores functions the limb featured before fractured.

• External fixators should feature high rigidity and small weight what results in requirements for the applied materials.

There have been invented more and more operational methods and treatment systems as well as many kinds of materials of new generation (e.g. used in space flights) having properties perfectly fitting for application in the external fixation. Designing a fixator with active dynamisation is stored for the future (the works have already been undertaken).

Piśmiennictwo

[1] Bastini G., Aldegheri R.: "Dynamic Axial Fixation. A Rational Alternative for the External Fixation of Fractures", International Orthopaedics, Springer-Verlag 1986,

[2] Będziński R.: "Biomechanika inżynierska", Oficyna Wyd. Politechniki Wrocławskiej, Wrocław 1997

[3] Daab J. "Zaburzenia zrostu kości" - rozdział w monografii "Traumatologia Narządów Ruchu" pod red. D.Tylmana i A.Dziaka PZWL Warszawa 1985,

[4] Deszczyński J., Karpiński J.: "Stabilizatory DYNASTAB -DK - możliwości i oczekiwania", Chirurg. Narząd. Ruchu. i Ortop. Pol., 1994

[5] Granowski R.: "Zespol - nowa metoda osteosyntezy stabilnej", rozprawa habilitacyjna, AM Warszawa 1990,

[6] Ilizarow G.A.: "The tension - stress effect on the genesis and growth tissue. Part I. The influence of stability of fixation and soft tissue preservation. Clin. Orthop., 238, (1989), 249-262

[7] Ilizarow G.A.: "The tension - stress effect on the genesis and growth tissue. Part II, The influence of rate and frequency of distraction. Clin. Orthop., 239, (1989), 263-285

References

[8] Jasińska-Choromańska D.: " Modelowanie i symulacja w projektowaniu jednostronnych zewnętrznych stabilizatorów ortopedycznych", prace naukowe seria Mechanika, z. 186, Oficyna Wyd. PW, Warszawa 2001

[9] Kershaw C.J., Cunningham J.L., Kenwright J.: "Tibial External Fixation, Weight Bearing and Fracture Movement", Clinical Orthopaedics and Related Research, No 293, p. 28-36, 1993

[10] Lane J.M.: "Fracture Healing", Churchill Livingstone, New York, 1987

[11] Ramotowski W.: "Osteosynteza metodą ZESPOL - teoria i praktyka kliniczna", PZWL Warszawa 1988,

[12] Yamamoto N., Ohno K, Hayashi K., Kuriyama H., Yasuda K., Kaneda K.: "Effects of stress shielding on the mechanical properties of rabbit patellar tendon", Journal of Biomechanical Engineering, 115, (1993), 23-28

POZYSKIWANIE OSTEOBLASTÓW LUDZKICH DO BADAŃ BIOMATERIAŁÓW IN VITRO

DOROTA KUDELSKA-MAZUR*,
MAŁGORZATA LEWANDOWSKA-SZUMIEŁ*, GRZEGORZ BENKE**,
MARCIN KOWALSKI**, JANUSZ KOMENDER*.

*ZAKŁAD TRANSPLANTOLOGII I CENTRALNY BANK TKANEK,
CENTRUM BIOSTRUKTURY, AKADEMIA MEDYCZNA W WARSZAWIE

**KATEDRA I KLINIKA ORTOPEDII I TRAUMATOLOGII NARZĄDU
RUCHU, AKADEMIA MEDYCZNA W WARSZAWIE

Streszczenie

Niniejsza praca przedstawia metodę izolacji i określania fenotypu osteoblastów ludzkich. Zastosowano zmodyfikowaną metodę izolacji osteoblastów wykorzystującą samorzutne wydostawanie się komórek z kości. Odpowiednio przygotowane amputowane kawałki kości umieszczano w pożywce w naczyniu hodowlanym. Po upływie ok. 1-2 tygodni obserwowano

ISOLATION OF HUMAN PRIMARY OSTEOBLASTS FOR BIOMATERIALS INVESTIGATION IN VITRO

DOROTA KUDELSKA-MAZUR*,
MAŁGORZATA LEWANDOWSKA-SZUMIEŁ*,
GRZEGORZ BENKE**, MARCIN KOWALSKI**, JANUSZ KOMENDER*

*DEPARTMENT OF TRANSPLANTOLOGY AND CENTRAL TISSUE BANK,
CENTER OF BIOSTRUCTURE, MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW.

**DEPARTMENT OF ORTHOPAEDICS AND TRAUMATOLOGY OF THE
MUSCULOSKELETAL SYSTEM, MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW

Abstract

A method of human osteoblast isolation and evaluation of their phenotype have been described in this paper. The modified method of isolation using a bone chips culture was employed. Appropriately prepared amputated bone fragments were placed in culture dishes in culture medium. After approximately 1-2 weeks single cells or groups of cells adhering to the

pojedyncze komórki lub grupy komórek, przylegające do dna naczynia. Jednolitą warstwę osteoblastów uzyskiwano po 2-8 tygodniach. W celu sprawdzenia fenotypu komórek wyizolowanych z kości oznaczono poziom osteokalcyny, aktywność fosfatazy zasadowej - podstawową i w odpowiedzi na dihydroksycholekalcyferol, a także zdolność mineralizacji macierzy zewnątrzkomórkowej. Jako kontrolę przy badaniach fenotypu wykorzystano hodowle fibroblastów ludzkich izolowanych z amputowanych śródoperacyjnie fragmentów torebki stawowej.

Wstęp

Hodowle komórkowe stanowią dogodny model do badania interakcji biomateriał - tkanka kostna zachodzących na poziomie komórkowym. Badania *in vitro* stanowią obiecującą alternatywę dla testów biogodności materiałów implantacyjnych wymagających eksperymentów z użyciem zwierząt doświadczalnych. Wykorzystywane są linie komórkowe ustalone oraz komórki z hodowli pierwotnych, uzyskane z fragmentów amputowanych tkanek. Zastosowanie komórek izolowanych z kości ludzkich umożliwia testowanie substancji w kontakcie z komórkami ludzkimi już na etapie badań przedklinicznych. Uważa się, że komórkowe linie ustalone nie zawsze wykazują takie same cechy fenotypowe jak komórki *in situ*[5], dlatego komórki z hodowli pierwotnych mogą stanowić lepszy model doświadczalny do niektórych badań. Ze względu na tempo podziałów komórkowych, które zachodzą wolniej niż w komórkach transformowanych, hodowle pierwotne są szczególnie przydatne do eksperymentów długo trwających, w tym do badań biomateriałów *in vitro*, których celem jest zbadanie długoterminowej interakcji materiału z komórkami.

Istnieje także możliwość zastosowania wyizolowanych komórek do celów transplantacyjnych[32]. Komórki uzyskuje się z niewielkiego wycinka tkanki i namnaża w odpowiednich warunkach *in vitro*, w ciągu możliwie krótkiego czasu. Przeszczepy komórek autogennych, takich jak keratynocyty i komórki chrzęstne[8], są już stosowane w praktyce klinicznej, ale wydaje się, że nie ma przeszkód, aby przeszczepiać również inne komórki namnożone *in vitro*.

Opisano kilka sposobów uzyskiwania osteoblastów. Stosowane są metody polegające na kilkakrotnym trawieniu rozdrobnionej kości w kolagenazie [6,15,16,17,26]. Inne metody opierają się na zjawisku samorzutnego wydostawania się komórek z kości. Drobne fragmenty kostne umieszcza się w naczyniu z pożywką hodowlaną i po odpowiednim czasie uzyskuje się warstwę komórek przylegających do dna naczynia[1,13].

W niniejszej pracy zastosowano zmodyfikowaną metodę izolacji podobną do metody opisanej przez Mörike i współp.[13], wykorzystującą samorzutne wydostawanie się komórek z kości po uprzednim jej trawieniu. Procedura ta minimalizuje ryzyko zanieczyszczenia populacji komórek przez obecność fibroblastów i komórek szpiku.

Zróżnicowane osteoblasty posiadają kilka cech, które zostały powszechnie uznane za charakterystyczne dla ich fenotypu [2,3,4,6,7,13,15,16,17,18,20]. Komórki te wykazują aktywność fosfatazy alkalicznej zwiększającą się w odpowiedzi na $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, produkują osteokalcynę, w reakcji na parathormon zwiększają syntezę cAMP, wytwarzają kolagen typu I oraz zdolne są do mineralizacji macierzy zewnątrzkomórkowej *in vitro*. Przeprowadzenie odpowiednich testów pozwala stwierdzić czy wyizolowane komórki mają cechy osteoblastów.

bottom of culture dishes were observed. A monolayer of cells was obtained after 2-8 weeks. Osteocalcin level and alkaline phosphatase activity - basal and in reaction to dihydroxycholecalciferol ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) were measured and ability to mineralize extracellular matrix was estimated in order to check the phenotype of cells isolated from bone. Human fibroblasts cultures were isolated from joint fibrous capsule fragments amputated during surgery and served as control cells in osteoblast phenotype investigation.

Introduction

Cell cultures are a favorable model for investigation of interactions between biomaterial and bone tissue that occur on the cellular level. Experiments *in vitro* are a promising alternative to biocompatibility tests of implantable materials, in which laboratory animals are used. Both immortalized cell lines and primary cultures, derived from amputated tissues, are used. In experiments utilizing cells isolated from human bone it is possible to evaluate materials in contact with human cells before the beginning of clinical tests. It is considered that cell lines do not always express the same phenotype features as the cells *in situ*[5] and for this reason primary culture cells may provide a better model for certain experiments. Cell division rate in these cultures is slower than in transformed cells and because of this primary cultures are particularly useful for long lasting experiments, including biomaterial investigation *in vitro*, in which long-term interaction between biomaterial and cells is tested.

There is also a possibility of transplantation of cells isolated from the tissues [32]. Cells are obtained from small tissue fragments and are incubated *in vitro* in conditions promoting their highest growth in possibly short period of time. Transplantations of autogenic cells, like keratinocytes and chondrocytes[8], are also performed in clinical practice. It seems to be possible to transplant other cells grown *in vitro* as well.

A few ways of obtaining osteoblasts have been described. Among them there are methods consisting in digestion of small bone pieces in collagenase several times [6,15,16,17,26]. Other methods are based on the fact that osteoblasts tend to go out from the bone fragments and grow around them. Small pieces of bone are placed in culture dish, flooded with medium and after certain period of time a layer of cells adhering to the bottom of the dish appears [1,13].

A modified method of isolation, similar to the method described by Mörike et al. [13], was used in this work. The procedure is based on growing bone fragments, which are digested beforehand in order to minimize the risk of contamination of osteoblast population by the presence of fibroblasts and marrow cells.

A few features of differentiated osteoblasts are concerned to be characteristic ones for their phenotype [2,3,4,6,7,13,15,16,17,18,20]. These cells show alkaline phosphatase activity (ALP), that increases in response to $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, augmentation of cAMP synthesis in reaction to parathormon, production of osteocalcin and collagen type I, and mineralization of extracellular matrix *in vitro*. By means of appropriate tests it is possible to identify phenotype features of osteoblasts in isolated primary culture cells.

Uzyskiwanie osteoblastów

Komórki kostne wykorzystane do hodowli pozyskiwano z materiału amputowanego podczas zabiegów ortopedycznych przeprowadzonych w Klinice Ortopedii Akademii Medycznej w Warszawie. Materiał kostny pochodził z części szyjki kości udowej resekowanej przy wykonywaniu zabiegu całkowitej alloplastyki stawu biodrowego. Grubość warstwy kości korowej (zbitej) w tej lokalizacji anatomicznej wynosi od 2 do 4 mm. Po usunięciu w trakcie zabiegu części bliższego końca kości udowej, w zakresie niezbędnym do implantacji endoprotezy, opracowanie materiału przeprowadzano w warunkach sali operacyjnej. Polegało ono na odcięciu fragmentu szyjki kości udowej, oczyszczeniu z tkanek miękkich i usunięciu kości gąbczastej wraz z żółtym szpikiem kostnym. Materiał kostny cięto na fragmenty o wymiarach ok. 5x10 mm i po przepłukaniu płynem Ringera umieszczano w pojemnikach ze schłodzonym podłożem transportowym (Dulbecco's Modified Eagle's Medium z buforem HEPES, gentamycyną, anti-PPLO, penicyliną, streptomycyną i amfoterycyną B). Czas pomiędzy pobraniem kości a umieszczeniem w pojemnikach nie przekraczał 30 min.

Izolacja komórek była wykonywana w dniu pobrania materiału lub w dniu następnym. Materiał przechowywano w pożywce transportowej, w temperaturze +4°C.

Próbki kości oczyszczano z resztek tkanek miękkich i szpiku, a następnie intensywnie płukano w PBS. Kość cięto na kawałki wielkości ok. 1 - 2mm³ i poddawano trawieniu w kolagenazie (400U/ml DMEM). Supernatant usuwano. Po ponownym płukaniu w PBS fragmenty kostne przekładano do naczyń hodowlanych z pożywką (Dulbecco's Modified Eagle's Medium z dodatkiem 10% płodowej surowicy bydlęcej, L-glutaminy, kwasu L-askorbinowego (250μM), penicyliny, streptomycyny i amfoterycyny B) i umieszczano w inkubatorze w temperaturze 37°C, przy 95% wilgotności.

Po upływie ok. 1-2 tygodni obserwowano pojedyncze komórki lub grupy komórek, przylegające do dna naczynia hodowlanego. Jednolitą warstwę osteoblastów uzyskiwano po 2-8 tygodniach (RYS.1). Po otrzymaniu jednolitej warstwy komórek w hodowli pierwotnej usuwano z naczynia hodowlanego fragmenty kostne i przenoszono je do świeżego naczynia, zapoczątkowując kolejną hodowlę.

Izolacja fibroblastów

Do izolacji fibroblastów wykorzystywano fragmenty tkanek miękkich (torebki stawowej) amputowanych podczas zabiegów ortopedycznych. Wycinki tkanek płukano w PBS, cięto na kawałki wielkości ok. 1-2mm³, ponownie płukano w PBS, a następnie umieszczano w roztworze kolagenazy (400U/ml DMEM), na mieszadle magnetycznym w temperaturze 37°C. Uzyskaną zawiesinę filtrowano przez sito nylonowe i poddawano odwirowaniu przy prędkości 1000 obrotów/min. Komórki zawieszano w pożywce hodowlanej (Dulbecco's Modified Eagle's Medium z dodatkiem 10% płodowej surowicy bydlęcej, L-glutaminy, penicyliny, streptomycyny i amfoterycyny B), liczone w kamerze Bürker'a i wysiewano do butelek hodowlanych.



RYS. 1. Osteoblasty w hodowli pierwotnej.
FIG. 1. Osteoblasts in primary culture.

Isolation of osteoblasts

Osteoblasts were obtained from the bone material amputated during operations performed in the Orthopedic Department at the Medical University of Warsaw. During total hip arthroplasty a part of femoral neck was dissected. The thickness of cortical (dense) bone in this localization ranges from 2 to 4 mm. A proximal end of femur, necessary to be removed before implantation of the prosthesis, was amputated and cleansed of cancellous bone, marrow and soft tissue remnants. Bone was cut into pieces of approximately 5x10mm, rinsed with Ringer's solution and placed in flasks containing cooled transport medium (Dulbecco's Modified Eagle's Medium with HEPES buffer, gentamycin, anti-PPLO, penicillin, streptomycin and amphotericin B). The whole procedure from dissecting the bone to placing it in transport medium lasted no more than 30 minutes.

Isolation of cells took place on the same day or a day after harvesting the bone. In the meantime material was kept in transport medium, at +4°C.

After cleansing of the remains of soft tissue and marrow, bone fragments were intensively rinsed in PBS. Then they were cut into pieces of 1-2mm³ and digested in collagenase (400U/ml DMEM). The supernatant was subsequently discarded. The bone pieces were rinsed in PBS, put into culture dishes containing medium (DMEM with 10%FBS, L-glutamine, penicillin, streptomycin and amphotericin B) and placed in the incubator at 37°C and 95% humidity.

After 1-2 weeks single cells or groups of cells attached to the bottom of culture dishes were observed. When osteoblasts became confluent, after 2-8 weeks (FIG.1), the bone pieces were removed from the dish and transferred to a new one, giving rise to the next cell culture.

Isolation of fibroblasts

Fibroblasts were obtained from soft tissue fragments (joint fibrous capsule) amputated during orthopedic operations.

Tissue sections were rinsed in PBS, cut into pieces of approximately 1-2mm³, rinsed in PBS again and subsequently placed in collagenase solution (400U/ml DMEM) on magnetic stirrer at 37°C. Then the suspension obtained from digestion was filtered through a nylon mesh and centrifuged at 1000 rates/min. The cells were next suspended in culture medium (DMEM with 10%FBS, L-glutamine, penicillin, streptomycin and amphotericin B), counted using a hemocytometer and seeded into culture dishes.

Osteoblast phenotype identification and viability estimation

Phenotype of osteoblasts was identified by: estimation of ALP activity in a cell layer in the presence of dihydroxycholecalciferol (1,25(OH)₂D₃), osteocalcin concentration in supernatant and mineral production. Adherent primary culture osteoblasts were enzymatically released with collagenase solution (400U/ml) in DMEM and with trypsin (0,05%) - EDTA (0,02%) solution in PBS. After centrifuging osteoblasts were suspended in culture medium and seeded at a density of 12.000/well in 96-well plates. Fibroblasts were released with trypsin (0,05%) - EDTA (0,02%) solution in

Identyfikacja fenotypu i ocena żywotności osteoblastów

Fenotyp osteoblastów sprawdzono badając: aktywność fosfatazy alkalicznej w komórkach hodowanych w obecności dihydroksycholekalcyferolu ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$), stężenie osteokalcyny w supernatancie oraz wytwarzanie minerału. Osteoblasty z hodowli pierwotnej oddzielono od podłoża za pomocą roztworu kolagenazy (400U/ml) w DMEM oraz trypsyny (0,05%) z EDTA (0,02%) w PBS. Po odwirowaniu komórki zawieszono w pożywce hodowlanej i wysiano do płytek 96-studzienkowych w ilości 12 tys./studzienkę. Fibroblasty oderwano od podłoża za pomocą roztworu trypsyny (0,05%) z EDTA (0,02%) w PBS i wysiano do płytek 96 studzienkowych w ilości 10 tys./studzienkę.

Do pożywki hodowlanej dodano dihydroksycholekalcyferol ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) rozpuszczony w etanolu w stężeniu 10 lub 100nM. W przypadku fibroblastów zastosowano tylko jedno stężenie $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ - 10nM. Do studzienek kontrolnych dodano jedynie etanol. Komórki hodowano w obecności $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ przez 7 dni. Następnie oznaczono aktywność fosfatazy alkalicznej (ALP) w hydrolizacie komórek metodą kolorymetryczną, polegającą na enzymatycznej hydrolizie fosforanu p-nitrofenolu do p-nitrofenolu (zestaw odczynników firmy Sigma). Produkt reakcji ma barwę żółtą, absorbancję odczytuje się przy długości fali 405nm. Aktywność ALP obliczono z krzywej kalibracyjnej.

Równolegle wykonano test żywotności komórek XTT [25,27,28,29]. Jest to badanie stosowane do określania liczby i proliferacji komórek, polegające na redukcji soli tetrazolowej XTT przez dehydrogenazy obecne w komórkach [25,27,28,29]. Wynik testu zależy nie tylko od liczby komórek, lecz także od ich aktywności metabolicznej, więc odpowiedź w teście XTT dają tylko komórki żywe. Produkt reakcji jest rozpuszczalny, nie tworzy kryształów, co umożliwia wykonanie testu bez uszkodzenia błon komórkowych. Po 4h inkubacji z substratem odczytano absorbancję przy długości fali 450nm w czytniku płytek ELISA.

Poziom osteokalcyny w pożywce znad hodowli komórkowej oznaczono testem ELISA wykorzystującym dwa rodzaje przeciwciał monoklonalnych specyficznych dla osteokalcyny ludzkiej (A New Therapy Co., Ltd.) [33,34]. Jedno z przeciwciał, połączone z peroksydazą, wiąże się z regionem N-końcowym (aminokwasy od 1 do 19), drugie, połączone z biotyną, rozpoznaje środkowy region cząsteczki (aminokwasy od 20 do 43). Wartość stężenia osteokalcyny odczytuje się z krzywej kalibracyjnej.

Porównano wyniki oznaczeń poziomu osteokalcyny i aktywności ALP w odpowiedzi na $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ w hodowlach osteoblastów i fibroblastów ludzkich.

Mineralizację oceniono na podstawie pojawienia się złogów w obrębie macierzy zewnątrzkomórkowej w sąsiedztwie osteoblastów. W celu pobudzenia mineralizacji w hodowli osteoblasty hodowano w pożywce zawierającej dekсамetazon (10nM) oraz β -glicerofosforan (5mM β -GP). Proces mineralizacji oceniono po 2 tyg. barwiąc hodowlę na obecność depozytów wapnia za pomocą barwnika Alizarin Red S oraz metodą von Kossa, która pozwala wykryć fosforany wapnia [35].

PBS and cultured in 96-well plates at a density of 10.000/well.

$1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ was diluted in ethanol and added to culture medium at 10 or 100nM concentration. In the case of fibroblasts only one concentration of $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ was used - 10nM. Into control wells ethanol was added. The cells were cultured for 7 days in the presence of $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Subsequently ALP activity was measured in hydrolyzed cells with a colorimetric method based on enzymatic hydrolysis of para-nitrophenol phosphate to para-nitrophenol (Sigma kit). The product of the reaction was yellow and the absorbance was measured at 405nm. ALP activity was then calculated from the calibration curve.

In the same time a viability test XTT was performed [25,27,28,29]. This is a method used for assessment of cell number and proliferation, consisting in tetrazolium salt XTT reduction by cell dehydrogenase enzymes [25,27,28,29]. The result of the test depends not only on the number of cells but on their metabolic activity as well, so only living cells respond to the XTT test. Product of the reaction is soluble and does not form crystals, what enables to conduct the test without damage of cellular membranes. After 4 hours of incubation with substrate, the absorbance was measured at 450nm.

Osteocalcin level in supernatant from cell cultures was measured by means of ELISA test, in which two kinds of monoclonal antibodies against human osteocalcin were used (A New Therapy Co., Ltd.) [33,34]. One of the antibodies, conjugated with peroxidase, recognized the N-terminal region (amino acids 1-19), another antibody was biotinylated and detected the midregion (amino acids 20-43). Concentration of osteocalcin was calculated from the calibration curve.

The results of the measurements of osteocalcin level and ALP activity in reaction to $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in osteoblasts culture and fibroblast culture were compared.

Mineralization was assessed by identification of deposits that appeared in extracellular matrix in osteoblast culture. In order to induce mineralization in vitro, dexamethasone (10nM) and β -glycerophosphate (5nM β -GP) were added to culture medium. Mineralization process was evaluated after two weeks. Staining of calcium was performed using Alizarin Red S whereas calcium phosphates were detected by means of von Kossa method [35].

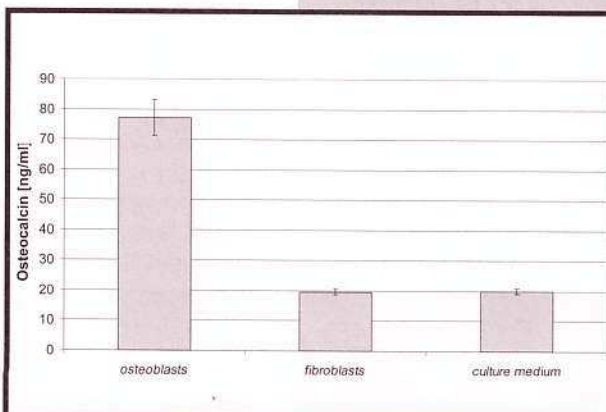
formed using Alizarin Red S whereas calcium phosphates were detected by means of von Kossa method [35].

Results

1-2 weeks after plating of bone fragments in culture medium, single spindle like cells and groups of cells adhering to the bottom of the dishes were observed. Osteoblasts became confluent after 2-8 weeks (FIG.1).

Osteocalcin level in the medium from bone-derived cell culture was higher than in the specimens from fibroblast culture. Concentration of osteocalcin in fibroblast culture was comparable with the one in culture medium (FIG.2).

Basal ALP activity in osteoblast culture without $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ was similar to the level measured in fibroblast



RYS. 2. Stężenie osteokalcyny w pożywce z hodowli osteoblastów (średnia z hodowli uzyskanych od dwóch dawców), fibroblastów oraz w pożywce hodowlanej.

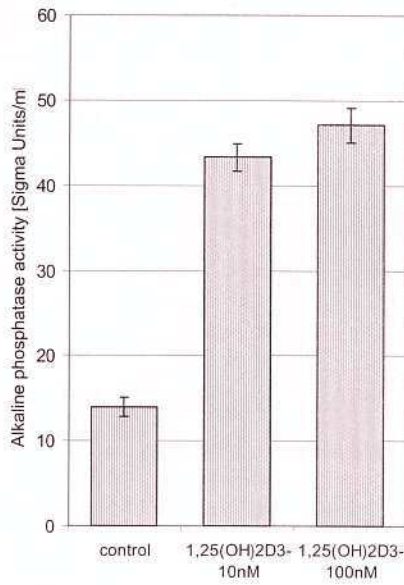
FIG. 2. Osteocalcin concentration in medium from osteoblast culture (an average value from cultures obtained from two donors), in medium from fibroblast culture and in culture medium alone.

Po upływie ok. 1-2 tygodni od umieszczenia fragmentów kostrych w pożywce hodowlanej obserwowano pojedyncze komórki o kształcie wrzecionowatym lub grupy komórek, przylegające do dna naczynia. Jedyną warstwę osteoblastów uzyskiwano po 2-8 tygodniach (RYS.1).

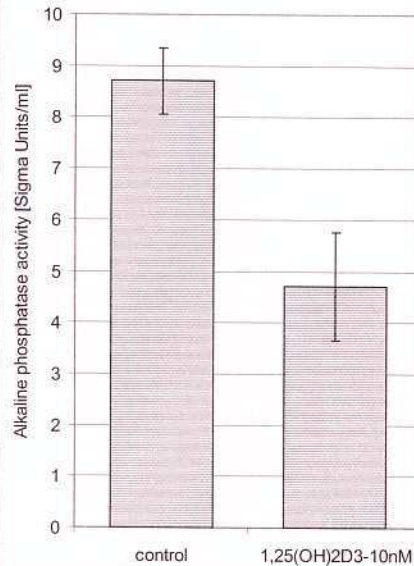
Poziom osteokalcyny w pożywce z hodowli komórek izolowanych z kości był wyższy niż w próbkach z hodowli fibroblastów. Stężenie osteokalcyny w hodowli fibroblastów odpowiadało stężeniu stwierdzonemu w samej pożywce hodowlanej (RYS. 2).

Podstawowa aktywność ALP w hodowli osteoblastów pozbawionej $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ pozostawała zbliżona do poziomu aktywności w hodowli fibroblastów (RYS.3a, 3b) i była niższa niż w obecności dihydroksycholekalcyferolu (RYS.3a). Wzrost aktywności fosfatazy zasadowej zaobserwowano już w obecności 10nmol $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Przy większym stężeniu $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ nie nastąpił dalszy wzrost aktywności ALP. W obecności $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ nie nastąpił wzrost aktywności ALP w hodowli fibroblastów (RYS.3b).

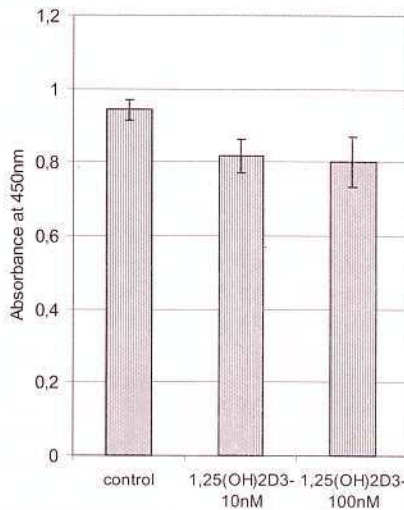
Żywność osteoblastów i fibroblastów oznaczona za pomocą testu XTT uległa niewielkiemu obniżeniu w obecności dihydroksycholekalcyferolu



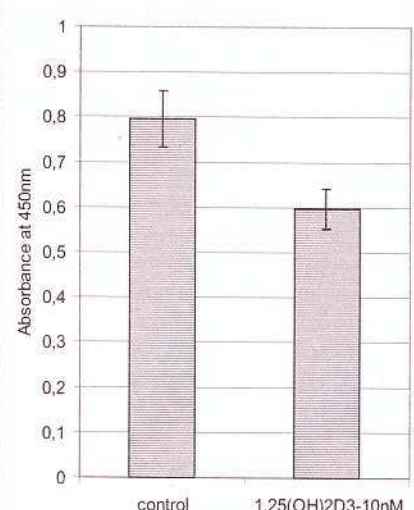
RYS. 3a. Aktywność fosfatazy zasadowej w hodowli osteoblastów ludzkich hodowanych przez 7 dni w pożywce bez $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (kontrola), w obecności 10nM lub 100nM $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$.
FIG. 3a. Alkaline phosphatase activity in human osteoblast culture incubated for 7 days in medium without $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (control) and in medium containing 10nM or 100nM $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$.



RYS. 3b. Aktywność fosfatazy zasadowej w hodowli fibroblastów ludzkich hodowanych przez 7 dni w pożywce bez $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (kontrola) lub w obecności 10nM $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$.
FIG. 3b. Alkaline phosphatase activity in human fibroblast culture incubated for 7 days in medium without $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (control) or in medium containing 10nM $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$.



RYS. 4a. Żywność osteoblastów ludzkich badana w teście XTT po 7 dniach hodowli w pożywce bez $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (kontrola) i w obecności 10nM lub 100nM $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$.
FIG. 4a. Human osteoblast viability assessed by means of XTT test after 7 days in culture in medium without $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (control) and in medium containing 10nM or 100nM $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$.



RYS. 4b. Żywność fibroblastów ludzkich badana w teście XTT po 7 dniach hodowli w pożywce bez $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (kontrola) i w obecności 10nM $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$.
FIG. 4b. Human fibroblast viability assessed by means of XTT test after 7 days in culture in medium without $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (control) and in medium containing 10nM $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$.

culture (FIG.3a,3b) and was lower than in the presence of $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (FIG.3a). ALP activity in osteoblast culture increased after adding 10nM of $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. At higher concentration of $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ no further growth of ALP activity was noticed. In fibroblast culture there was no increase of ALP activity in the presence of $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (FIG.3b).

As estimated by means of XTT test, viability of osteoblasts and fibroblasts was slightly lowered in the presence of $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (FIG.4a, 4b). At the higher concentration of $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ there was no further osteoblast viability decrease (FIG.4a).

In osteoblast cultures red colored deposits were observed after staining with Alizarin Red S (FIG.5) and dark deposits after von Kossa staining (FIG.6). No mineral deposits were observed in fibroblast cultures.

Bone fragments were plated in culture dish until osteoblasts reached confluence and then the fragments were transferred to a new dish. This was repeated several times and each time a new layer of cells was

(RYS.4a,4b). Zwiększenie stężenia $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ nie spowodowało dalszego spadku żywotności osteoblastów (RYS.4a).

Obserwacje mikroskopowe hodowli osteoblastów zabarwionych z użyciem Alizarin Red S wykazały obecność depozytów wybarwionych na kolor czerwony (RYS.5). Barwienie metodą von Kossa uwidocznilo ciemne złogi w hodowli osteoblastów (RYS.6). W hodowli fibroblastów nie stwierdzono obecności złogów mineralnych.

Kilkakrotnie powtarzano przedkładanie fragmentów kości z naczynia, w którym pojawiła się już warstwa komórek, do świeżego naczynia z pożywką. Za każdym razem otrzymywano kolejną hodowlę pierwotną komórek. Izolowane w ten sposób komórki wykazywały cechy fenotypowe osteoblastów.

Dyskusja

Opisana powyżej metoda izolacji komórek z fragmentów kości pozwala otrzymać komórki o fenotypie osteoblastów, które wykazują aktywność fosfatazy alkalicznej zwiększającą się w odpowiedzi na $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, produkują osteokalcynę i zdolne są do mineralizacji macierzy zewnątrzkomórkowej in vitro.

Podstawowa aktywność fosfatazy zasadowej w hodowlach osteoblastów jest dość niską [1]. W przypadku komórek badanych w tej pracy była ona tylko nieco wyższa niż w hodowli fibroblastów. Obecność dihydroksycholekalcyferolu w pożywce hodowlanej spowodowała wzrost aktywności ALP w hodowli osteoblastów, ale nie wywołała wzrostu aktywności ALP w hodowli fibroblastów (RYS.2). Osteoblasty nie są jedynymi komórkami, które produkują ALP, ale wzrost aktywności ALP w odpowiedzi na $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ to cecha uznawana za charakterystyczną dla fenotypu osteoblastów. Efekt ten występuje dzięki obecności receptorów dla $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ w komórkach osteoblastów.

Receptor dla $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ występuje również w komórkach hematopoetycznych, zrębu szpiku, w komórkach prekursorowych adipocytów i w niektórych liniach fibroblastów [10]. $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ może wywierać wpływ na wszystkie wymienione komórki. Jednak podwyższona aktywność ALP w odpowiedzi na $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ uważana jest za cechę charakterystyczną dla osteoblastów [1,12,13,31].

Jak wykazały testy XTT przeprowadzone równolegle do oznaczenia aktywności ALP, obecność 10nM $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ spowodowała niewielki spadek żywotności zarówno osteoblastów, jak i fibroblastów. Zwiększenie stężenia $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ nie wywołało dalszego zmniejszenia żywotności osteoblastów. Etanol, w którym został rozpuszczony $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ został dodany również do komórek w kontroli. Ponieważ w grupie kontrolnej nie stwierdzono obniżenia odczytu XTT, to prawdopodobnie czynnikiem, który wywołał spadek żywotności osteoblastów oraz fibroblastów nie

grown. Cells obtained by means of this method had phenotype features characteristic for osteoblasts.

Discussion

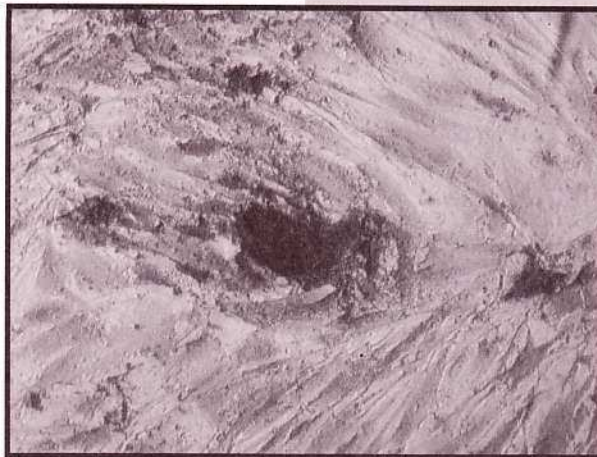
By means of the method presented in this paper it is possible to isolate cells showing osteoblastic phenotype: increasing ALP activity in reaction to $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, producing osteocalcin and able to mineralize extracellular matrix in vitro.

Basal ALP activity in osteoblast cultures is quite low [1] and in the case of the cells tested in this work, it was only slightly higher than in fibroblast culture. Presence of $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in culture medium caused increase of ALP activity in osteoblast culture but did not produce any growth of ALP activity in fibroblast culture (FIG.2). Osteoblasts are not the only cells that produce ALP, but increase of ALP activity in reaction to $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ is considered to be characteristic for osteoblastic phenotype. This effect is due to the expression of $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ receptors in osteoblasts. Some other cells, like hematopoietic cells, marrow stromal cells, adipocyte precursors and some fibroblast cell lines also have receptors for $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ [10]. However, increased ALP activity in response to $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ is considered to be a characteristic feature of osteoblasts [1,12,13,31]

XTT tests showed that the presence of 10nM of $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ caused a slight viability decrease of both: osteoblasts and fibroblasts. Augmentation of $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ concentration did not produce any further diminishment of osteoblast viability. $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ was diluted in ethanol and ethanol alone was added to control wells. Viability was not lowered in control cells, so probably ethanol was not the factor that induced decrease of XTT results in osteoblast and fibroblast cultures. It seems that the presence of $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ caused proliferation decrease in the investigated cultures and in the same time stimulated osteoblasts' differentiation manifested by ALP activity growth.

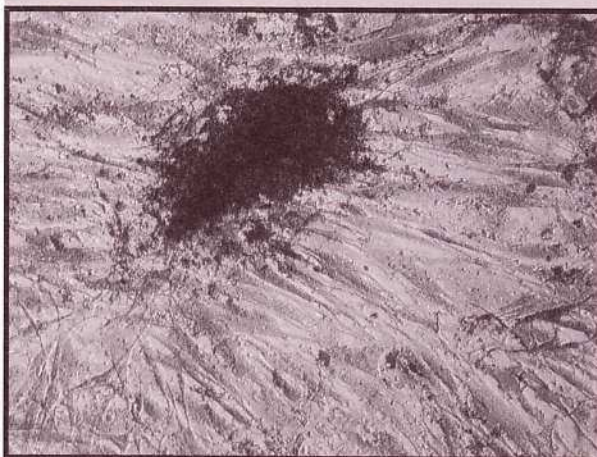
Cultures of cells isolated from bone according to the protocol presented above, showed high osteocalcin level confirming that they have osteoblastic features. This protein is synthesized by osteoblasts and is considered to be a marker of osteoblastic phenotype. Osteocalcin shows a strong affinity to calcium and it is a component of the bone matrix [14]. Its molecule has three sites containing gamma-carboxyglutamine acid. Fibroblasts do not produce this protein so they served as a negative control. No difference was noticed between osteocalcin concentration in fibroblast culture and in culture medium alone (FIG.2).

Osteoblasts in vitro isolated with various methods are able to mineralize extracellular matrix [1,11,21,24]. In osteoblast cultures obtained with the method presented in this



RYS. 5. Mineralizacja w hodowli osteoblastów. Barwienie Alizarin Red S.

FIG. 5. Mineralization in osteoblast culture. Alizarin Red S staining.



RYS. 6. Mineralizacja w hodowli osteoblastów. Barwienie metodą von Kossa.

FIG. 6. Mineralization in osteoblast culture. Staining with von Kossa method.

był etanol. Można więc przypuszczać, że to obecność $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ spowodowała zmniejszenie proliferacji w badanych hodowlach stymulując jednocześnie dojrzewanie osteoblastów, co przejawiało się poprzez zwiększenie aktywności ALP.

Wysoki poziom osteokalcyny w hodowlach wyizolowanych z kości według opisanej w niniejszej pracy metody potwierdza, że otrzymane komórki wykazują cechy osteoblastów. Białko to jest syntetyzowane przez osteoblasty i uznawane za marker ich fenotypu. Osteokalcyna wykazuje silne powinowactwo do wapnia, posiada trzy miejsca zawierające kwas gamma-karboksyglutaminowy i wchodzi skład macierzy kostnej [14]. Fibroblasty, które białka tego nie produkują stanowiły kontrolę negatywną. Stwierdzono brak różnicy pomiędzy stężeniem osteokalcyny w hodowli fibroblastów i w samej pożywce hodowlanej (RYS.2).

Osteoblasty w hodowli, pozyskiwane różnymi metodami, wykazują się zdolnością mineralizacji macierzy zewnątrzkomórkowej [1,11,21,24]. Również w hodowli komórek wyizolowanych z kości metodą opisaną w niniejszej pracy i hodowanych w obecności askorbinianu, glukokortykoidu (deksametazon) oraz fosforanu organicznego (b-GP) stwierdzono pojawienie się mineralizacji. Potwierdzono to wybarwiając złogi obecne w hodowlach Alizarinem RedS i metodą von Kossa. W obu tych metodach uzyskano wynik pozytywny, który wskazuje, że w macierzy zewnątrzkomórkowej, w obrębie złogów znajdowały się związki wapnia i fosforu (RYS.5, 6). Jest to kolejny czynnik, który potwierdza, że otrzymane przez autorów komórki wykazują cechy osteoblastów i tym samym świadczą o przydatności zastosowanej metody izolacji.

Należy podkreślić, że poziom osteokalcyny i aktywność ALP w poszczególnych hodowlach może być różna w zależności od wieku dawcy i miejsca pobrania [3] oraz od warunków hodowli. Na ekspresję cech fenotypowych ma także wpływ proces różnicowania komórek, którego mechanizmy podlegają w dalszym ciągu badaniom [6,9,15,19,22,23].

W przypadku tkanek ludzkich problem stanowi ograniczona ilość materiału do izolacji. Do celów doświadczalnych lub transplantacyjnych niezbędne jest otrzymanie odpowiednio dużej liczby komórek od jednego dawcy. Może to narażać na trudności, gdyż zwykle dysponuje się znikomą ilością tkanki. Z tego względu duże znaczenie ma wybór takiej metody, która pozwoli wyizolować w możliwie krótkim czasie jak największą liczbę osteoblastów. Sposób izolacji opisany w niniejszej pracy pozwala na dość efektywne wykorzystanie materiału kostnego, a wyizolowane z kości komórki hodowane w opisanych powyżej warunkach wykazują fenotyp osteoblastów. Dzięki wielokrotnemu przeniesieniu fragmentów kości do świeżych naczyń hodowlanych możliwe jest otrzymanie dużej liczby osteoblastów w hodowli pierwotnej, pochodzących od tego samego dawcy. W ten sposób niewielka ilość amputowanego materiału zostaje efektywnie wykorzystana. Osteoblasty z kolejnych hodowli izolowanych z tego samego materiału wykazują te same, charakterystyczne cechy fenotypowe. Wykorzystanie takiego sposobu izolacji jest szczególnie cenne w badaniach *in vitro*, gdy potrzeba dużej liczby komórek. Komórki te powinny pochodzić od tego samego osobnika, aby uniknąć różnic, które mogą występować pomiędzy hodowlami osteoblastów w zależności od wieku i stanu zdrowia dawcy oraz miejsca pobrania [3,5,30].

Komórki z hodowli pierwotnych dzielą się dosyć wolno, co może być wykorzystane w badaniach biomateriałów *in vitro*. Pozwala to na pełniejszą ocenę kontaktu komórek z materiałem, dając możliwość długotrwałej obserwacji układu doświadczalnego przy wolno zmieniającej się gęstości komórek przez jeden, dwa i więcej tygodni.

Na podstawie wykonanych badań: poziomu osteokalcyny, aktywności fosfatazy alkalicznej, reakcji na $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$

paper and grown in the presence of ascorbate, glucocorticoid (dexamethasone) and organic phosphate (β -GP) mineralization was also noticed. Alizarin Red S and Von Kossa staining of deposits that appeared in osteoblast cultures confirmed it. Both staining methods gave positive results (FIGS. 5,6). These indicate that there were compounds of phosphorus and calcium present in extracellular matrix within the deposits.

Level of osteocalcin and ALP activity in certain osteoblast cultures may differ depending on the donor's age and amputation site [3] as well as on culture conditions. Expression of phenotype features may also be modified by cellular differentiation process, which mechanisms are still under investigation [6,9,15,19,22,23].

In the case of human tissues the limited amount of material for isolation may be a problem. For experiments or transplantation it is necessary to obtain an appropriately great number of cells from a single donor. This may be difficult due to a small amount of tissue available. So it is important to choose a method that enables to isolate the highest number of cells in the shortest time. The way of isolation described in this paper makes the bone material utilization quite effective and the isolated cells grown in the conditions given above show osteoblastic features. Because bone fragments can be transferred several times to a new plate and give rise to a new culture, it is possible to obtain a great number of primary culture osteoblasts from the same donor. Small amount of amputated material may be effectively used in this way. Osteoblasts from following cultures isolated from the same bone material show the same, characteristic phenotype features. This method of isolation is particularly useful in experiments *in vitro*, in which big numbers of cells are needed. These cells should come from the same person in order to avoid differences among osteoblast cultures that may be related to the age and health condition of a donor [3,5,30].

Primary culture cells divide rather slowly and this feature may be very useful in biomaterial investigation *in vitro*. It allows evaluating interaction between cells and biomaterial more thoroughly, as there is a possibility of long term observation of an experimental model with slow changes in density of cells for one, two and more weeks.

On the basis of the tests performed: osteocalcin concentration, ALP activity, reaction to $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ and mineralization of extracellular matrix, it can be concluded that the cells isolated from bone by means of the procedure described in this paper show phenotype features that are characteristic for osteoblasts. Cells obtained in this way may be used in experiments *in vitro*, also in investigations of implantable materials biocompatibility.

i mineralizacji macierzy zewnątrzkomórkowej można stwierdzić, że komórki wyizolowane z kości przy użyciu opisanej wyżej procedury wykazują cechy fenotypowe charakterystyczne dla osteoblastów. Otrzymane w ten sposób komórki mogą być wykorzystywane do badań *in vitro*, między innymi do prac nad biogodnością materiałów wszczepialnych.

Piśmiennictwo

- [1] Gallagher J.A., Gundle R., and Beresford J.N.: Isolation and culture of bone-forming cells (osteoblasts) from human bone. From: *Methods in Molecular Medicine: Human Cell Culture Protocols*, (1996). Edited by: G.E. Jones Humana Press Inc., Totowa, NJ.
- [2] Lau K.-H.W., Nakade O., Barr B., Taylor A.K., Houchin K., and Baylink D.J.: Phenytoin increases markers of osteogenesis for the human species *in vitro* and *in vivo*. *J Clin Endocrinol Metab* 80 (1995), 2347-2353.
- [3] Martinez M.E., Medina S., Sanchez M., del Campo M.T., Esbrit P., Rodrigo A., Martinez P., Sanchez-Cabezudo M.J., Moreno I., Garces M.V., and Munuera L.: Influence of skeletal site of origin and donor age on 1,25(OH)₂D₃-induced response of various osteoblastic markers in human osteoblastic cells. *Bone* 24, 3 (1999), 203-209.
- [4] Slater M., Patava J., and Mason R.S.: Thrombospondin co-localises with TGF β and IGF-I in the extracellular matrix of human osteoblast-like cells and is modulated by 17 β estradiol. *Experientia* 51 (1995) 235-244.
- [5] Clover J. and Gowen M.: Are MG-63 and HOS TE85 human Osteosarcoma Cell Lines Representative Models of the Osteoblastic Phenotype?, *Bone* 15, 6 (1994) 585-591.
- [6] Hatano K., Inoue H., Kojo T., Matsunaga T., Tsujisawa T., Uchiyama C., and Uchida Y.: Effect of surface roughness on proliferation and alkaline phosphatase expression of rat calvarial cells cultured on polystyrene. *Bone* 25, 4 (1999), 439-445.
- [7] Kue R., Sohrabi A., Nagle D., Frondoza C., Hungerford D.: Enhanced proliferation and osteocalcin production by human osteoblast-like MG63 cells on silicon nitride ceramic discs. *Biomaterials* 20 (1999) 1195-1201.
- [8] Langer R., Vacanti J.P.: Tissue engineering. *Science* 260, 5110 (1993) 920-926.
- [9] Boyan B.D., Batzer R., Kieswetter K., Liu Y., Cochran D.L., Szmuckler-Moncler S., Dean D.D., Schwartz Z.: Titanium surface roughness alters responsiveness of MG63 osteoblast-like cells to 1 α ,25-(OH)₂D₃. *J Biomed Mater Res* 39 (1998) 77-85.
- [10] Gruber R., Czerwenka K., Wolf F., Ho G.-M., Willheim M., and Peterlik M.: Expression of the vitamin D receptor, of estrogen and thyroid hormone receptor α - and β - isoforms, and of the androgen receptor in cultures of native mouse bone marrow and of stromal/osteoblastic cells. *Bone* 24, 5 (1999) 465-473.
- [11] van Loon J.J.W.A., Bierkens J., Maes J., Schoeters G.E.R., Ooms Daniella., Zandieh Doulabi B., and Veldhuijzen J.P.: Polysulphone inhibits final differentiation steps of osteogenesis *in vitro*. *J Biomed Mater Res* 29 (1995) 1155-1163.
- [12] Beresford J.N., Joyner C.J., Devlin C. and Triffitt J.T.: The effects of dexamethasone and 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on osteogenic differentiation of human marrow stromal cells *in vitro*. *Archs oral Biol.* 39, 11 (1994) 941-947.
- [13] Mörike M., Schulz M., Brenner R.E., Bushart G.B., Teller W.M., and Vetter U.: *In vitro* expression of osteoblastic markers in cells isolated from normal fetal and postnatal human bone and from bone of patients with osteogenesis imperfecta. *J. Cell. Physiology* 157 (1993) 439-444.
- [14] Ingram R.T., Park J.-K., Clarke B.L., Fitzpatrick L.A.: Age- and gender-related changes in the distribution of osteocalcin in the extracellular matrix of normal male and female bone: Possible involvement of osteocalcin in bone remodelling. *J. Clin. Invest.* 93 (1994) 989-997.
- [15] Broess M., Riva A., and Gerstenfeld L.C.: Inhibitory effect of 1,25(OH)₂ vitamin D₃ on collagen type I, osteopontin, and osteocalcin gene expression in chicken osteoblasts. *J. Cell. Biochem.* 57 (1995) 440-451.
- [16] Gerstenfeld L.C., Chipman S.D., Glowacki J., and Lian J.B.: Expression of differentiated function by mineralizing cultures of chicken osteoblasts. *Developmental Biology* 122 (1987) 49-60.

References

- [17] Sammons R.L., El Haj A.J. and Marquis P.M.: Novel culture procedure permitting the synthesis of proteins by rat calvarial cells cultured on hydroxyapatite particles to be quantified. *Biomaterials* 15, 7 (1994) 536-542.
- [18] Takeuchi Y., Nakayama K., and Matsumo T.: Differentiation and cell surface expression of transforming growth factor- β receptors are regulated by interaction with matrix collagen in murine osteoblastic cells. *J Biol. Chemistry* 271, 7 (1996) 3938-3944.
- [19] Ahmad M., McCarthy M.B., Gronowicz G.: An *in vitro* model for mineralization of human osteoblast-like cells on implant materials. *Biomaterials* 20 (1999) 211-220.
- [20] Bismar H., Kloppinger T., Schuster E.M., Balbach S., Diel I., Ziegler R., and Pfeilschifter J.: Transforming growth factor- β (TGF- β) levels in the conditioned media of human bone cells: relationship to donor age, bone volume, and concentration of TGF- β in human bone matrix *in vivo*. *Bone* 24, 6 (1999) 565-569.
- [21] Park S.R., Oreffo R.O.C., and Triffitt J.T.: Interconversion potential of cloned human marrow adipocytes *in vitro*. *Bone* 24, 6 (1999) 549-554.
- [22] Donahue H.J.: Gap junctions and biophysical regulation of bone cell differentiation. *Bone* 26, 5 (2000) 417-422.
- [23] Coelho M.J., Trigo Cabral A., Fernandes M.H.: Human bone cell cultures in biocompatibility testing. Part I: osteoblastic differentiation of serially passaged human bone marrow cells cultured in α -MEM and in DMEM. *Biomaterials* 21 (2000) 1087-1094.
- [24] Coelho M.J., Fernandes M.H.: Human bone cell cultures in biocompatibility testing. Part II: effect of ascorbic acid, β -glycerophosphate and dexamethasone on osteoblastic differentiation.
- [25] Roehm N.W., Rodgers G.H., Hatfield S. M. and Glasebrook A.L.: An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT. *J. Immunol. Methods* 142 (1991) 257-265.
- [26] Maurin A.C., Chavassieux P.M., Frappart L., Delmas P.D., Serre C.M., and Meunier P.J.: Influence of mature adipocytes on osteoblast proliferation in human primary cocultures. *Bone* 26, 5 (2000) 485-489.
- [27] Scudiero D.A., Shoemaker R.H., Paull K.D., Monks A., Tierney S., Nofziger T.H., Currens M.J., Seniff D., and Boyd M.R.: Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Res.* 48, Sept.1 (1988) 4827-4833.
- [28] Holt P.S., Buckley S. and Deloach J.R.: Detection of the lethal effects of T-2 mycotoxin on cells using a rapid colorimetric viability assay. *Toxicology Letters* 39 (1987) 301-312.
- [29] Mosmann T.: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65 (1983) 55-63.
- [30] Katzburg S., Lieberherr M., Ornoy A., Klein B.Y., Hendel D., and Somjen D.: Isolation and hormonal responsiveness of primary cultures of bone-derived cells: gender and age differences. *Bone* 25 (1999), 667-673.
- [31] Lynch M.P., Stein J.L., Stein G.S., and Lian J.B.: The influence of type I collagen on the development and maintenance of the osteoblast phenotype in primary and passaged rat calvarial osteoblasts: modification of expression of genes supporting cell growth, adhesion, and extracellular matrix mineralization. *Experimental Cell Res.* 216 (1995) 35-45.
- [32] Lanza R.P., Langer R., Vacanti J.: *Principles of Tissue Engineering*; Academic Press (2000).
- [33] Rosenquist C., Qvist P., Bjarnason N., Christiansen C.: Measurement of a more-stable region of osteocalcin in serum by an ELISA with two monoclonal antibodies. *Clin Chem* (1995), 41/10.
- [34] Rosenquist C., Bonde M., Fledelius C., Qvist P.: A simple enzyme-linked immunosorbent assay of human osteocalcin. *Clin Chem* 40 (1994) 1258-1263.
- [35] Clark G.: *Staining Procedures Used by Biological Stain Commission*; by The Williams and Wilkins Co, Baltimore (1973).