بررسی امکان رشد سلولهای استخوانی(Saos-2) روی داربستهای پوشش دار شده با نانوذرات کیتوزان-آلژینات

حوری نصیرنیا[1*]، محمدرضا قلمبران[2]، امیر میمندی پور[3] و منصور بیات[1]

[1] تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، گروه زیست شناسی

[2] تهران، دانشگاه شهید بهشتی، دانشکده علوم زیستی، گروه زیست شناسی

[3] تهران، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری

تاریخ دریافت: ۹۳/۷/۶ تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۱/۲۵

چکیده

در سالهای اخیر در کشور ایران هرساله حدود ۲۲۰۰۰ مرگ و ۷۰۰۰۰ مجروح به علت حوادث رانندگی اتفاق می افتد، که تقریبا ۹۲ درصد از مجروحین دارای شکستگیهای استخوانی هستند و جهت ترمیم آسیبهای استخوانی به ارتوپدی مراجعه می کنند. طی گزارشات منتشر شده از دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، حدود ۸۵ درصد از پیوندهای مغز استخوان به علت تهاجم باکتریها و قارچها ناموفق بوده اند. تکنیک استفاده از داربستها به عنوان بستر مناسبی برای تکثیر و رشد سلولها و بافتها از جمله راهکارهای ترمیم بافتهای صدمه دیده می باشد. با این وجود استفاده از داربستهای زیست سازگار به منظور درمان نقایص استخوانی همواره با چالشهای زیادی از جمله عدم استحکام، زیست سازگاری پایین، طول عمر پایین سلولهای روی داربست به علت تهاجم باکتریها و قارچها روبرو بوده است. در این راستا از مهم ترین اهداف این تحقیق، بررسی خواص سیتوتوکسیسیتی داربستهای پوشش دار شده با نانوذرات کیتوزان - آلژینات، بررسی امکان رشد و حیات سلولهای استخوانی روی داربستهای بدون پوشش و پوشش دار شده با نانوذرات بودند. نتایج به دست آمده نشان داد که سلولها بر روی داربستهای پوشش دار شده با نانوذرات در مقایسه با داربستهای بدون پوشش به طور طبیعی رشد کردند. همچنین میزان چسبندگی سلولهای استخوانی پس از ۷۲ ساعت در این داربستها به شکل نرمال صورت گرفت. از طرفی دیگر بررسی ساختار داربستها با میکروسکوپ الکترونی نشان داد که داربستهای پوشش دار شده با نانوذرات کیتوزان- آلژینات دارای خلل و فرج کافی برای رشد سلولهای استئوبلاست می‌باشند.

واژه های کلیدی: داربست، نانوذرات، سلول استئوبلاست، ضدباکتریایی، پوشش دار

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۳۵۲۲۸۸۵۸۱ ، پست الکترونیکی: Houri_nassirnia@yahoo.co.uk

مقدمه

استفاده از داربستها در ترمیم بافتهای آسیب دیده از مهمترین روشهای مورد استفاده در جراحی اعضای بدن، شکستگیها و نقایص استخوانی محسوب می گردد. داربستهای ساخته شده از ترکیبات زیست سازگار بستر مناسبی را برای رشد سلولها و مولکولهای زیستی فراهم می کنند و به عنوان بافتهای مصنوعی برای انتقال و رشد سلولها در محلهای آسیب دیده بدن مورد استفاده قرار می گیرند (۶، ۱۱ و ۱۳). داربستها محل استقرار سلولها هستند. محیط رشد سلولها بایستی عاری از هر گونه آلودگیهای باکتریایی و قارچی باشند تا سلولها رشد کامل داشته و بافت آسیب دیده را ترمیم نمایند. با توجه به اینکه دو عامل مهم در این آلودگیها نقش دارند: ۱) تهاجم عوامل

بیماریزا از محیط خارج به داخل. ۲) وجود ترکیبات رشد دهنده باکتریها در داربست مانند نشاسته، ژلاتین و غیره، و داربستها در محیط و شرایط آزمایشگاهی ساخته می شوند، احتمال تهاجم باکتریها و قارچها در طول ساخت داربست وجود دارد. همچنین این نوع آلودگیها در حین تصادفات و باز بودن زخم و جراحات ایجاد می گردند و در صورت انتقال بافتهای مصنوعی و یا پیوند بافتهای طبیعی می توانند موجب عدم موفقیت پیوند بافت گردند. برای نمونه نتایج گزارشات نشان داده است پیوند کلیه و یا پوست پس از سالها دچار اختلال و پس زدگی بافت شده است (۱، ۴ و ۱۰). بررسیهای تحقیقاتی بر روی داربستهایی که توسط محققین پیشین ساخته شده بود، نشان داد که از علل اصلی عدم موفقیت رشد سلولها روی داربستها و بعد پس زدگی پیوند بافتها، مناسب بودن محیط و جنس داربستها برای رشد باکتریها و قارچهاست. امروزه می توان به منظور افزایش توانایی داربستها در کنترل رشد باکتریها و قارچها از پوششهای نانوذرات استفاده کرد. اما این ترکیبات به دلیل داشتن ویژگیهای ضد باکتریایی ممکن است برای رشد سلولهای هدف موجب استرس و یا مانع رشد طبیعی و نهایتاً باعث مرگ سلول گردند. بنابراین طرح تحقیقاتی به منظور بررسی اثرات نانوذرات زیستی کیتوزان – آلژینات به عنوان لایه های پوششی روی سطوح داربستهای ساخته شده از ژلاتین – نشاسته برای کشت و رشد سلولهای استخوانی؛ در مرکز تحقیقات نانوتکنولوژی پزشکی و مهندسی بافت بیمارستان طالقانی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی و دانشکده علوم زیستی دانشگاه شهید بهشتی اجرا گردید.

مواد و روشها

مواد: مواد مورد استفاده در ساخت داربست ژلاتین – نشاسته درجدول ۱ نشان داده شده است.

ساخت داربست: جهت ساخت داربست ژلاتین- نشاسته مطابق روش محققین پیشین همراه با اعمال تغییراتی عمل شد. برای ساخت داربست ژلاتین – نشاسته به نسبت ۷۵:۲۵، ابتدا ۰/۷۵ گرم ژلاتین در ۷/۵ میلی لیتر آب دیونیزه در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد حل شد، سپس ۰/۲۵ گرم نشاسته را به طور جداگانه در ۲/۵ میلی لیتر آب دیونیزه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد حل کرده و در مرحله بعد هر دو محلول را با هم مخلوط و درانتها ۵ برابر وزن کل NaCl اضافه گردید، برای به دست آوردن مخلوط همگن، به مدت ۲ساعت هم زده شد تا آب محلول کاملاً تبخیر شد، در نهایت پس از ۲۴ ساعت جهت ایجاد اتصال عرضی از محلول استن و EDC استفاده گردید. در انتها جهت حذف عامل شبکه کننده، داربستها به مدت ۴۸ ساعت در آب مقطر قرار داده و پس از آن برای خشک کردن داربستها، به روش Freez drying خشک گردید (۱ و ۱۲).

جدول ۱- مواد مورد استفاده در ساخت داربست

مواد/ محلول	کشور سازنده
Starch from potato	Sigma-Aldrich
Gelatin type A from Porcine skin	Sigma-Aldrich
(EDC)N-(3-Dimethylaminopropyl)-N-ethylcarbodiimide hydrochloride	Sigma-Aldrich
NaCl	Merck
Aceton	Merck

سنتز نانوذرات: مواد مورد نیاز جهت سنتز نانوذرات کیتوزان – آلژینات در جدول ۲ نشان داده شده است.

جدول ۲- مواد و محلولهای مورد استفاده در ساخت نانوذرات

مواد/ محلول	کشور سازنده
Chitosan	Sigma-Aldrich
Alginate	Sigma-Aldrich
Acetic acid	Merck
(TPP)Penta-sodium triphosphate	Merck
NaOH	Merck

جهت ساخت نانوذرات کیتوزان- آلژینات ابتدا مقدار ۲۰ میلی گرم پودر کیتوزان را در ۱۰ میلی لیتر اسید استیک ۱ درصد حل کرده و به مدت ۱ ساعت همراه با حرارت هم زده، سپس محلول TPP با غلظت ۱ میلی گرم در میلی لیتر

آب مقطر ساخته شد. در مرحله بعد ۴۵ میلی گرم پودر آلژینات در ۱۰ میلی لیتر آب مقطر حل کرده و دو محلول آلژینات و TPP به یک نسبت مشخص با همدیگر مخلوط گردید، محلول آلژینات/ TPP به کیتوزان با نسبت ۱:۳ اضافه و در انتها سونیکیت شد (۷ و ۱۴).

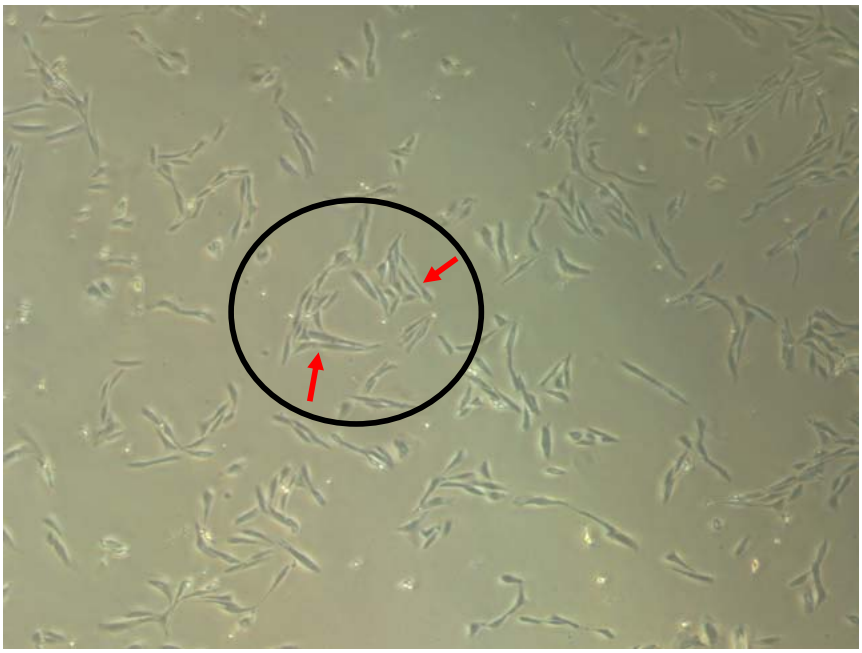
پوشش دار کردن داربستها با نانوذرات کیتوزان-آلژینات: به منظور پوشش دار کردن داربستها، پس از ساخت داربست، به روش CPT (Co Precipitation Test) داربستها پوشش دار گردیدند (۵).

کشت سلول: مواد مورد نیاز جهت کشت سلولهای استخوانی در جدول (۳) مشاهده می شود.

جدول۳- مواد مورد استفاده در کشت سلول

مواد/ محلول	کشور سازنده
RPMI(1640)	Biowest
Fetal bovine serum (FBS)	Biowest
Phosphate buffered saline (PBS)	Biowest
Trypsin	Biosera
Antibiotics(penicillin, streptomycin)	Gibco
Dimethyl sulfoxide (DMS)	Gibco
(MTT)3-(4,5-dimethyl ethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide	Gibco
Glutaraldehyde	Gibco
Trypan blue	Sigma- Aldrich

جهت کشت سلول، ابتدا سلولهای استخوانی از انستیتو پاستور ایران خریداری شدند، (تصویر۱- سلولهای Saos-2) . محیط کشت سلول حاوی، RPMI 1640 , ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (FBS) و ۱۰۰ mg/ml آنتی بیوتیک پنی سیلین- استرپتومایسین بود.



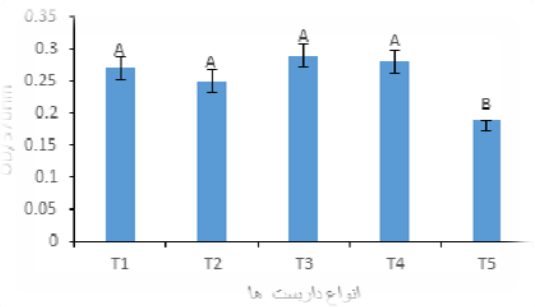
تصویر ۱- سلولهای استئوبلاست (Saos-2)

سلولها در فلاسکهای فیلتردار کشت و هر دو روز یک بار پاساژ داده شدند، این مرحله چندین بار تکرار شد تا مقدار معینی سلول به دست آمد. پس از اینکه داربستهای ژلاتین – نشاسته برای کشت سلول آماده سازی شدند، به مدت ۴۸ساعت در اتانول ۷۰ درصد قرار گرفته و با محلول PBS شستشو داده شدند. در انتها شمارش سلولی با محلول تریپان بلو (۰/۴ گرم پودر تریپان بلو در ۱۰۰ میلی لیتر محلول PBS) انجام گرفت و مقدار ۳×۱۰^{۵} سلول روی هر داربست ریخته شد(۹). پس از ۳ روز رشد سلولهای استخوانی بر روی داربست، تستهای مربوطه انجام گرفت.

نتایج

سنجش چسبندگی و رشد سلول با آزمون MTT: ابتدا داربستهای حاوی سلول با محلول PBS شستشو داده و به خانه های جدید در پلیت ۶ خانه انتقال داده شد، بر روی هر داربست ۴۵۰ میکرولیتر محیط کشت RPMI 1640 و ۵۰ میکرولیتر معرف MTT ریخته و به مدت ۴ ساعت انکوبه شدند و در مرحله بعدی به منظور حل کردن بلورهای فرمازان محلول قبلی خارج گردید و به هر یک از نمونه ها ۵۰۰ میکرولیتر محلول DMSO اضافه گردید. سپس نمونه ها در طول موج ۵۷۰nm توسط دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت گردیدند (۸ و ۱۵). البته با توجه به جذب مقداری از رنگ فورمازان توسط داربستها این تست به طور رایج صورت نمی گیرد. اما اختلاف رنگ بین داربستهای حاوی سلول با داربست شاهد قابل مشاهده است. نمودار۱ نتایج آزمون MTT سلولهای سه روزه را نشان می دهد.

مشاهده مورفولوژی سلول با میکروسکوپ الکترونی (SEM): پس از گذشت ۳ روز از رشد سلولها، جهت تثبیت داربست حاوی سلول و آماده سازی برای عکسبرداری SEM ابتدا داربستها توسط محلول PBS دو بار شستشو شدند و در محلول گلوتارآلدهید ۲/۵ درصد به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفتند، سپس با محلول PBS شستشو گردیدند و پس از تثبیت سلولی، داربستها در محلول اتانول با غلظتها مختلف (۳۰، ۵۰، ۷۰، ۸۰، ۹۰، ۱۰۰ درصد) هر کدام به مدت ۲۰ دقیقه قرار گرفته و دهیدراته شدند (۱۷). سپس نمونه ها در محیط قرار گرفتند تا کاملاً خشک شوند. بعد از خشک شدن کامل با طلا پوشش دار شده سپس با استفاده از دستگاه SEM، مورفولوژی و رفتار آنها مشاهده شد (تصویرهای ۲ و ۳).

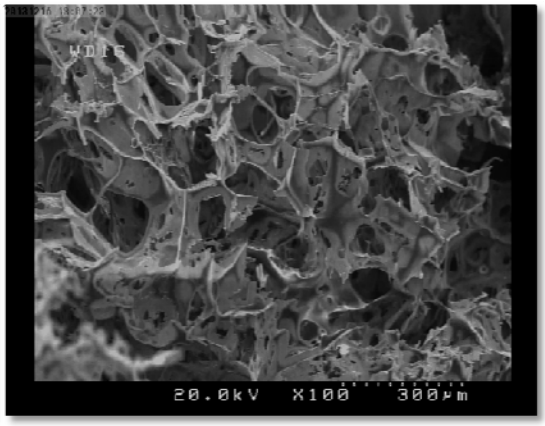


نمودار ۱- نمودار آزمون MTT سلولهای ۳ روزه. T1: داربست ژلاتین – نشاسته (بدون پوشش)، T2: داربست با پوشش کیتوزان، T3: داربست با پوشش کیتوزان – آلژینات، T4: داربست با پوشش آلژینات، T5: داربست کیتوزان آلژینات. حروف الفبای انگلیسی بیانگر مقادیر واریانس خطای آزمایش برای هر تیمار به طور جداگانه در آزمون LSD می باشد. عدم مشابهت حروف برای تیمارها نشاندهنده اختلاف معنی دار در سطح ۹۹ درصد می باشد. سلولها در حضور نانوذرات(T2-T4)، در مقایسه با داربست بدون پوشش(T1) دارای رشد و تکثیر طبیعی هستند.

بحث

توسعه داربستهای زیستی به عنوان بستر های مناسب جهت رشد و انتقال مولکولهای زیستی و سلولهای حیاتی از مهم ترین نیازهای مهندسی بافت می باشد. داربستها به طور موفقیت آمیز در زمینه های مختلف مهندسی بافت استفاده شده اند. از جمله این موارد می توان به تشکیل استخوان، بازسازی دندان، اصلاح ناهنجاریهای گوش و بینی، گسترش غضروف، قرنیه مصنوعی، دریچه های قلب، اصلاح تاندون، جایگزینی رباط و تومورها اشاره کرد. آنها همچنین در التهاب مهره، دیابت، بیماریهای قلبی و پانسمان

زخمها استفاده می شوند. داربستها می توانند جهت ارائه سیگنالهای مناسب به سلولها، القاء و حفظ آنها در مرحله تمایز و حفظ بقاء و رشدشان مورد استفاده قرار گیرند (۴ و ۱۵). نتایج تحقیق حاضر نشان داد که داربستهای پوشش دار با نانوذرات سنتز شده از پلیمرهای زیست سازگار با ویژگی ضد باکتریایی بستر مناسبی جهت رشد و تکثیر سلولها در مقایسه با داربستهای بدون پوشش می باشند. با این حال هنوز این تکنیک احتیاج به تحقیقات و آزمایشات بیشتری دارد.



تصویر۲- داربست ژلاتین- نشاسته فاقد سلول

تصویر ۳- سلول Saos-2 بر روی داربست پوشش دار شده با نانوذرات

تاثیر نانوذرات بر حیات سلولهای روی داربست: فاکتورهای مهمی مبنی بر پاسخ سلول به داربست و حیات مطلوب سلول بر روی داربستهای زیستی وجود دارد. حیات سلول روی داربست به عوامل متعددی بستگی دارد، مانند: ۱) مواد مورد استفاده در ساخت داربست، نقش ویژه ای در جذب پروتئین دارند بدین صورت که، وقتی سلول به سطح مواد داربست می چسبد، به یکسری از پروتئینهای سیتوپلاسمی، پروتئینهای داخل غشایی و پروتئینهای خارج سلولی نیازمند است، ۲) زیست سازگاری داربستهای سلولی، در صورتی که داربستهای سلولی دارای زیست سازگاری مطلوبی نباشد، علاوه بر ایجاد سمیت برای سلولها باعث می‌شود رفتار ثانویه سلول نیز تحت تأثیر قرار گیرد و پاسخ آلرژیک در سلولها ایجاد نماید، ۳) آب گریزی سطوح داربستها به عنوان یک فاکتور کلیدی بر پاسخ سلول شناخته شده است، سطح آب دوستی مواد داربست، چسبندگی سلولی بیشتری را در سطوح ایجاد می کند (۲ و ۳). یا اینکه ممکن است لایه پروتئینی چسبناکی بر روی سطح داربست متخلخل پلیمری جذب شود و موجب افزایش رشد سلول گردد، ۴) pH محیط، به طوری که سلول در pH تقریبی ۷ دارای رشد نرمال است بدین منظور محلول نانوذرات ساخته شده جهت پوشش دار کردن داربستها، با این شرایط سازگار گردیدند.۵) دما .

در این مطالعه رفتار سلولهای استئو بلاست بر روی داربستهای پوشش دار شده با نانوذرات کیتوزان – آلژینات بررسی شد و به منظور بررسی تغییرات چسبندگی سلولها استخوانی (Saos-2) پس از ۳روز، عکسبرداری (SEM) صورت گرفت و مشاهده شد سلولها در خلل و فرج داخل داربستها (پوشش دار و بدون پوشش) به طور طبیعی جایگزین شده و رشد مطلوب داشتند. هیچ گونه تغییرات مورفولوژی در داربستهای پوشش دار شده در مقایسه با داربستهای بدون پوشش مشاهده نشد. تصاویر SEM مربوط به داربست پو شش دار شده فاقد سلول و حاوی سلول که در تصویر ۲و ۳ قابل مشاهده است و نشان دهنده

این است که این داربستها محیطی خوب و مناسبی برای رشد سلولهای استئوبلاست فراهم نموده اند. با توجه به نتایج آزمونMTT صورت گرفته بر روی داربستها، درصد رشد و حیات سلولها بر روی هر یک از داربست بدون پوشش ژلاتین - نشاسته و داربست با پوشش کیتوزان - آلژینات قابل قبول بوده است. با نظر به اینکه سلولها در حضور نانوذرات زیستی با خاصیت ضد باکتریایی، دارای رشد و تکثیر طبیعی بوده، علاوه براین نانوذرات فاقد سمیت احتمالی برای سلولها هستند. با تحقیقاتی که تاکنون انجام گرفته است، داربستهای پوشش دار شده با نانوذرات زیستی که دارای خاصیت ضد باکتریایی هستند در کشت سلولهای بنیادی استفاده نشده است بدین جهت در این زمینه نیاز به آزمایشات و تحقیقات بیشتری است و به طور خلاصه این نتایج نشان دهنده تخلخل مناسب، عدم سمیت، زیست سازگاری و خواص فیزیکی- شیمیایی مناسب مواد مورد استفاده در ساخت داربست و نانوذراتی که به عنوان پوشش ضد باکتریایی بر روی داربستها استفاده شده اند، است و این داربستها کاندید مناسبی جهت کاربرد در مهندسی بافت استخوان هستند.

تشکر و قدردانی

پژوهش حاضر در مرکز تحقیقات نانوتکنولوژی پزشکی و مهندسی بافت بیمارستان طالقانی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی انجام یافته است، نگارندگان بدین وسیله از سرکار خانم صدف مهبودی، جناب آقای مهندس محسن جانملکی و جناب آقای دکتر حبیب اله پیروی به خاطر همکاری بی دریغشان کمال تشکر و امتنان را دارد.

منابع

۱- مهبودی، صدف. (۱۳۹۰). بررسی رشد سلولهای فیبروبلاست بر روی داربست ساخته شده از ژلاتین- نشاسته. پایان نامه کارشناسی ارشد زیست شناسی- سلولی مولکولی. دانشکده علوم پایه. دانشگاه آزاد اسلامی. واحد علوم تحقیقات.

2- Armentano, I., Dottori, M., Fortunati, E., Mattioli, S., & Kenny, J. M. (2010). Biodegradable polymer matrix nanocomposites for tissue engineering: a review. Polymer degradation and stability, 95(11), 2126-2146.

3- Chang, H. I., & Wang, Y. (2011). Cell responses to surface and architecture of tissue engineering scaffolds. Regenerative Medicine and Tissue Engineering—Cells and Biomaterials, InTech: Rijeka, Croatia, 569-588.

4- Costa-Pinto, A. R., Reis, R. L., & Neves, N. M. (2011). Scaffolds based bone tissue engineering: the role of chitosan. Tissue Engineering Part B: Reviews, 17(5), 331-347.

5- Ding, Y., Jiang, Y., Xu, F., Yin, J., Ren, H., Zhuo, Q., ... & Zhang, P. (2010). Preparation of nano-structured LiFePO< sub> 4</sub>/graphene composites by co-precipitation method. Electrochemistry Communications, 12(1), 10-13.

6- Garg, T., Singh, O., Arora, S., & Murthy, R. S. R. (2012). Scaffold: a novel carrier for cell and drug delivery. Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems, 29(1).

7- Goycoolea, F. M., Lollo, G., Remunan-Lopez, C., Quaglia, F., & Alonso, M. J. (2009). Chitosan-alginate blended nanoparticles as carriers for the transmucosal delivery of macromolecules. Biomacromolecules, 10(7), 1736-1743.

8- Gupta, S. K., Dinda, A. K., Potdar, P. D., & Mishra, N. C. (2013). Modification of decellularized goat-lung scaffold with chitosan/nanohydroxyapatite composite for bone tissue engineering applications. BioMed research international, 2013.

9- He, B., Leung, M., & Zhang, M. Optimizing creation and degradation of chitosan-alginate scaffolds for in vitro cell culture.

10- Hutmacher, D. W. (2000). Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. Biomaterials, 21(24), 2529-2543.

11- Lanza, R., Langer, R., & Vacanti, J. P. (Eds.). (2011). Principles of tissue engineering. Academic press.

12- Lee, S. B., Kim, Y. H., Chong, M. S., Hong, S. H., & Lee, Y. M. (2005). Study of gelatin-containing artificial skin V: fabrication of

gelatin scaffolds using a salt-leaching method. Biomaterials, 26(14), 1961-1968.

13- Liu, S. Q. (2007). Bioregenerative engineering: principles and applications. John Wiley & Sons.

14- Li, P., Dai, Y. N., Zhang, J. P., Wang, A. Q., & Wei, Q. (2008). Chitosan-Alginate nanoparticles as a novel drug delivery system for nifedipine. International journal of biomedical science: IJBS, 4(3), 221.

15- Mansourizadeh, F., Asadi, A., Oryan, S., Nematollahzadeh, A., Dodel, M., & Asghari-Vostakolaei, M. (2013). PLLA/HA Nano composite scaffolds for stem cell proliferation and differentiation in tissue engineering. Molecular Biology Research Communications, 2(1), 1-10.

16- Nerem, R. M., & Sambanis, A. (1995). Tissue engineering: from biology to biological substitutes. Tissue Engineering, 1(1), 3-13.

17- Peter, M., Binulal, N. S., Nair, S. V., Selvamurugan, N., Tamura, H., & Jayakumar, R. (2010). Novel biodegradable chitosan–gelatin/nano-bioactive glass ceramic composite scaffolds for alveolar bone tissue engineering. Chemical Engineering Journal, 158(2), 353-361.

The possibility of bone cell growth (Saos-2) on the coated scaffolds with Chitosan- alginate nanoparticles

Nassirnia H.[1] Ghalamboran M.R.[2] Meimandi Pour A.[3] and Bayat M.[1]

[1] Biology Group, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, I.R. of Iran

[2] Biology Group, Shahid Beheshti University, School of Biological Sciences, Tehran, I.R. of Iran

3 National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, I.R. of Iran

Abstract

In recent years in Iran about 22,000 deaths and 70,000 injured due to traffic accidents happen, almost 92% of bone fractures and retriever has to refer to the restoration of bony orthopedic pathologies. Based on report from Shahid Beheshti University of medical sciences, about 85% of the bone marrow grafting due to the invasion of bacteria and fungi have been unsuccessful. As the use of scaffolding techniques suitable for reproduction and growth of cells and tissues, including strategies for restoration of the damaged tissue. However, the use of eco-compatible scaffolds in order to treat bone defects with a lot of challenges including a poor biocompatibility, low strength, low life expectancy of scaffolds cells due to invasion of bacteria and fungi have been met. In this regard, the main objectives of this research, investigating of cytotoxicity properties of coated scaffolds with chitosan–alginate nanoparticles, review and compare the possibility of growth and life (viability) of bone cells on the scaffold without coating and coated with nanoparticles. Results obtained showed that the bone cells growth on the coated scaffolds with nanoparticles compared with uncoated scaffolds had a normal growth. As well as the amount of bone cells adhesion after 72 hours in normal shape to this scaffolds. Of the other hand, study on scaffolds structure with electron microscopic showed that coated scaffolds with chitosan-alginate nanoparticles has a suitable size and porosity for the growth of osteoblast cells.

Key words: Scaffold, nanoparticles, anti bacterial, osteoblasts cells