مطالعه آزمایشگاهی کشت سلولهای استئوبلاست بر روی فلز تیتانیوم و مشاهده روند ایجاد رشته‌های کلاژن با استفاده از میکروسکوپ الکترونی اسکنینگ(SEM)

• **احمدرضا راجی**، عضو هیأت علمی‌دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد،ایران.
• **یاماشیتا کیکوجی**، بخش آناتومی‌دانشکده دندانپزشکی دانشگاه توکوشیما – ژاپن.

تاریخ دریافت : آبان ماه ۱۳۸۲ تاریخ پذیرش: اردیبهشت ماه ۱۳۸۳

چکیده

امروزه فلز تیتانیوم به خاطر خصوصیات فیزیکی و شیمیائی خاص (سبک ، محکم و غیر قابل فرسایش)کاربرد زیادی در دندانپزشکی ،ارتوپدی و جراحی فک و صورت دارد به همین علت مطالعات زیادی بر روی این فلز انجام گرفته است تا بتوان راهی پیدا کرد که فلز کارگزاری شده در بافت استخوان بیشترین استحکام و چسبندگی را به بافت استخوان پیدا کند به همین علت لازم است که شرایط مشابه بدن (استخوان) را برای این فلز فراهم کرده و مکانیسم ساخته شدن رشته کلاژن را بر روی Hk بررسی کنیم ، یکی از این مطالعات کشت سلولهای استئوبلاست به روی فلز تیتانیوم در شرایط آزمایشگاهی و مطالعه چگونگی ساخته شدن رشته های کلاژن بر روی آنها می‌باشد. در این تحقیق به مطالعه کشت سلولهای استئوبلاست (بعنوان سلولهای تولید کننده رشته کلاژن)به روی فلز تیتانیوم پرداختیم و روند ساخته شدن رشته های کلاژن و چگونگی اتصا ل آنرا به وسیله میکروسکوپ الکترونی اسکنینگ بررسی کردیم. ابتدا ۱۲۰ قطعه فلز تیتانیوم تهیه شد و به ۲ گروه مساوی تقسیم گردید(شاهد و تحت آزمایش) بعد از صیقل دادن سطح تیتانیوم آنها را استریل کرده و تنها در گروه تحت آزمایش رسوب کلسیم بر روی آنها پوشانده شد، سپس سلولهای استئوبلاست استخوان خرگوش (MCM۳T۳-E۱) در شرایط استریل به روی این فلز کشت داده و با قرار دادن آنها در انکوباتور CO_2 دار شرایط لازم جهت تزاید و تشکیل رشته های کلاژن برای سلولها فراهم گردید ، در روزهای ۱، ۲، ۳، ۵، ۷و ۱۵ فلزهای تیتانیوم هر دو گروه از انکوباتور خارج شده و با چسبهای کاغذی سلولها ازسطح فلز جدا شد سپس سطح فلزبا لایه نازکی از فلز طلا (به وسیله دستگاه Gold coating) پوشانده شد و با میکروسکوپ الکترونی اسکنینگ بررسی گردید، نتایج نشان داد که سلولها به خوبی در محیط کشت رشد کردند و این سلولها از روز ۳ بعد از کشت رشته های کلاژن را تولید می‌کردندکه در گروه تحت آزمایش این رشته ها به سختی به محل رسوبات کلسیم متصل می‌شدند(ساختمان لنگری) اما در گروه شاهد که تیتانیوم فاقد رسوب کلسیم بود رشته های کلاژن به فلز متصل نمی‌شدند. با افزایش زمان کشت به علت افزایش میزان تولید کلاژن چسبندگی زیاد آنها به فلز، جدا کردن سلولها از سطح فلز تیتانیوم در روز۷ و ۱۵ امکان پذیر نبود که علت آن افزایش سطح اتصال سلولها با رشته های کلاژن و سطح فلز تیتانیوم می‌باشد ،پس نتیجه می‌گیریم که استفاده از رسوبات کلسیم به همراه فلز تیتانیوم به میزان زیادی در ایجاد چسبندگی مابین رشته های کلاژن و فلز تیتانیوم نقش دارد و می‌توان با استفاده از فلز تیتانیوم به همراه رسوب کلسیم و رشته کلاژن اتصال محکمی‌ما بین فلز تیتانیوم و بافت استخوان در محل کارگزاری ایجاد کرد.

کلمات کلیدی: رشته کلاژن، استئوبلاست، تیتانیوم، میکروسکوپ الکترونی اسکنینگ.

Pajouhesh & Sazandegi No:63 pp:80-83

Study of Collagen fiber production by Osteoblast cells Cultured on titanium plates using SEm

By:Raji A.R. , Department of Anatomy ,Faculty of Veterinary Medicine,Ferdowsi Uni.Mashhad,Iran ;Yamashita K.,Department of Anatomy,Faculty of Dentistry,Tokushima Uni.Tokushima;Japan

Titanium is one of the non-erodible biomaterials more frequently used in odontology , orthopaedy and cranio-maxillofacial surgery for its physical and chemical properties that allow an exellent tissue integration. This study was about the culture of osteoblast cell in titanium with calcium deposition. At the first we choose 120 particle titanium and polished and Ca deposit over them , then osteoblast cell (MCM3T3-E1) culture (one million cell) in 2 ml culture medium over titanium and put sample in incubatore(with CO_2) for 1, 2, 3, 5, 7, 15 days , after this time cell separated by paper tape and the surface of titanium and paper tape study by scaning electron microscope (SEM).We observed that osteoblast start to produced collagen fiber after 3days until 15days and this Cf attached only to the Ca deposit .We concluded that implant of titanium with Ca deposit is better than titanium without Ca deposit because Ca is a bridge between titanium and Cf.Study of collagen fiber production by osteoblast cells cultured on titanium plates using SEM. Osteoblast cells were cultured on media (N = 60) containing polished titanium plates deposited with Ca^{2+}. The plates in the control group (n = 60) were not deposited with Ca^{2+}. Following 1, 2, 3, 5, 7 and 15 days of incubation (CO2, 37C), the cells were detached from the plates, the plate surfaces were coated with gold and studied with SEM. Collagen fibers could be observed only on Ca2+ deposited plates from day 3 onward. The production of the fibers were time dependently increasing to day 15, hence it was not possible to detach the cells from the plates following 7 days of incubation. It is concluded that Ca^{2+} is essential for collagen binding to titanium surface and this may be used in surgical implantation of titanium in orthopedics, odontology and cranio-maxillofacial.

Key Words:Collagen Fiber ,Osteoblast , Titanium, SEM.

مقدمه

امروزه فلز تیتانیوم به عنوان فلزی که دارای خصوصیات فیزیکی و شیمیائی خاص (سبک ،محکم ، غیر قابل فرسایش) کاربرد زیادی در دندانپزشکی ، ارتوپدی و جراحی فک و صورت دارد به همین علت مطالعات زیادی بر روی این فلز انجام گرفته است تا بتوان راهی پیدا کرد که فلز کارگزاری شده در بافت استخوان بیشترین استحکام و چسبندگی را به بافت استخوان پیدا کند لذا در مطالعات آزمایشگاهی لازم است که شرایط مشابه بدن (استخوان) را برای فلز فراهم کنیم تا بتوان مکانیسم ساخته شدن رشته کلاژن را برروی این فلز مطالعه کرد،یکی از این مطالعات کشت سلولهای استئوبلاست بر روی فلز تیتانیوم در شرایط آزمایشگاهی و مطالعه چگونگی ساخته شدن کلاژن بر روی آن می باشد.

Leeuwenburgh با پوشانده سطح دیسکهای تیتانیوم از کلسیم ، فسفات ، منیزیم و کربنات و کشت سلولهای استئوکلاست مغز استخوان موش بر روی آنها متوجه شد که بعد از ۷ روز این سلولها بسیار فعال شده و سطح فسفات کلسیم در اثر عمل این سلولها نامنظم شده بود (۶).

Hayakawa با کارگزاری فلز تیتانیوم که به وسیله رسوبات کلسیم و فسفر پوشیده شده بود به جای کندیل استخوان ران و دیافیز استخوان درشت نی خرگوش در مطالعات بافتی به این نتیجه رسیدکه بعد از ۱۲ هفته در نمونه های که از رسوبات کلسیم استفاده شده بود پاسخ بافت استخوان کامل تر و ترمیم خیلی سریعتر انجام می‌گرفت (۵).

Ramires به کشت سلولهای استئوبلاست MG۶۳ انسانی بر روی فلز تیتانیوم با و بدون پوشش هیدروکسی آپاتایت پرداخت و به این نتیجه رسید که در مواردی که بر روی فلز تیتانیوم از هیدروکسی آپاتایت استفاده شده بود فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز بیشتر و تولید رشته های کلاژن به مراتب بیشتر از مورد شاهد بود(۷).

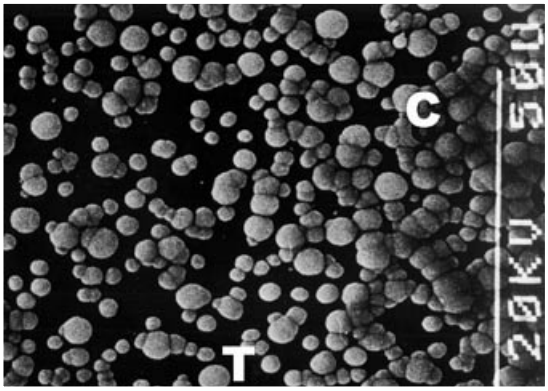
Chang در تحقیقی از کریستالهای هیدروکسی آپاتایت به اندازه های مختلف (کوچک ، متوسط و بزرگ) بر روی فلز تیتانیوم استفاده کرد ،او متوجه شد که بعد از کشت سلولهای استئوبلاست هیچ تفاوت معنی داری در میزان اتصال رشته های کلاژن با اندازه کریستالها وجود نداشت (۳).

Fan با استفاده از غلظتهای مختلف از کندروتین سولفات A(CSA) در محیط کشت استئوبلاست بر روی تیتانیوم مشاهده کرد که تزاید سلولهای استئوبلاست و میزان رسوب کلسیم با CSA افزایش می‌یابد(۴).

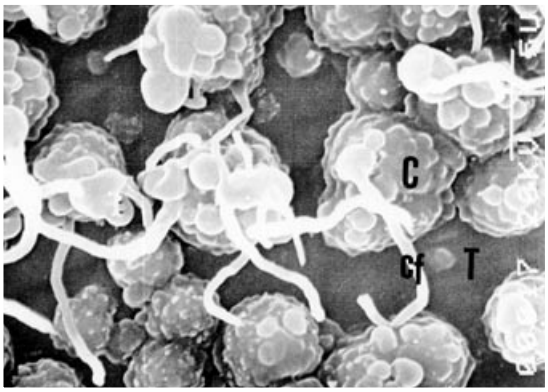
Wang با مطالعه استئوکلسین و آنزیم فسفاتاز در محیط کشت استئوبلاست بر روی فلز تیتانیوم و هیدروکسی آپاتایت (HA) به این نتیجه رسید که در اطراف HA که شامل ترکیبات کلسیم و فسفر می‌باشد) میزان استئو کلسین و فعالیت آنزیم بیشتر است (۸).

Best و همکارانش نیز به دنبال ترکیبی بودندکه باعث اتصال کلاژن به فلز تیتانیوم می‌شوند(۲).

در این تحقیق نیز ما به دنبال شناخت شکل و چگونگی اتصال رشته های کلاژن تولید شده به وسیله سلولهای استئوبلاست کشت داده شده در سطح فلز تیتانیوم بودیم .



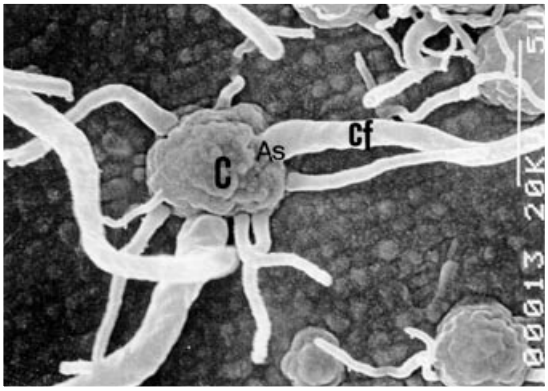
تصویر ۱ : فلز تیتانیوم به همراه رسوبات کلسیم در گروه تحت آزمایش(۱و۲ روز بعد از کشت سلول)، C :رسوبات کلسیم T: فلز تیتانیوم ، ۱۰۰۰۰x



تصویر۲ : اتصال رشته های کلاژن به محل رسوبات کلسیم در گروه تحت آزمایش (۳ روز بعد از کشت)، C:رسوبات کلسیم T : فلز تیتانیوم Cf : رشته کلاژن ،۳۰۰۰۰x

روش کار

ابتدا ۱۲۰ قطعه فلز تیتانیوم(دارای استاندارد صنعتی ژاپن) به ابعاد ۱-۰/۵ سانتی متر و ضخامت ۲ میلی متر را برش زده ، به علت اینکه کشت بر روی فلزهای صیقل داده شده بهتر انجام می‌گرفت تمام قطعات را در شش مرحله صیقل دادیم ، به این صورت که هر قطعه را صد بار با دست از روی سمباده های کاغذی با زبری ۲۴۰ . ۶۰۰ . ۱۶۰۰ . ۲۴۰۰ . ۴۰۰۰ عبور داده ، قطعات را در آب مقطر شسته و استریل کردن قطعات در انکوباتور انجام گرفت، دراین مرحله نمو نه ها به دو گروه تقسیم شد ، گروه تحت آزمایش که بر روی فلز تیتانیوم رسوب کلسیم را پوشاندیم و گروه شاهد که از فلز تیتانیوم بدون پوشش کلسیم استفاده کردیم ،برای پوشاندن سطح قطعات فلز با کلسیم ،نمونه را به مدت ۳ هفته در محیط Culture medium (پودر آلفا را به اندازه یک بسته در ۱۰۰۰ سی سی آب مقطر حل و سپس آن را با فیلتر استریل کردیم) قرار دادیم تا رسوب Ca به روی فلز قرار بگیرد.در مرحله بعد سلولهای استئوبلاست استخوان خرگوش (MCM۳T۳-E۱) به صورت منجمد تهیه شد و به محیطهای کشت (یک بسته پودر آلفا را در ۲ لیتر آب مقطر حل کرده سپس به آن ۱٪ اسید اسکوربیک ،۱٪ Gluteal max۱ ٪ پنی سیلین استرپتومایسین و ۱۰ میلی لیتر سرم خون گاوی یا Filtron اضافه



تصویر ۳: اتصال رشته های کلاژن به محل رسوبات کلسیم در گروه تحن آزمایش(۳ روز بعد از کشت)، C : رسوبات کلسیم Cf : رشته کلاژن As : ساختمان لنگری ،۴۰۰۰۰x

و محلول با فیلتر استریل شد)در داخل ظرف کشت اضافه گردید،ظروف در داخل انکوباتور Co_2 دار قرار می‌گرفت و بعد از یک هفته با استفاده از آنزیم Tripsin-EDTA (۱۰ میلی لیتر) سلولها از جدار ظروف کشت جدا شده و با افزودن Filtron از عمل آنزیم جلوگیری می‌شد ، سپس مایع حاوی سلولها در سانتریفوژ سرد با دور ۱۵۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ می‌شد ، سلولها از قست انتهای لوله ها جدا و بعد از شمارش سلولی با لام نئوبار در روی هر کدام از فلز های تیتانیوم (در ظروف کشت مجزا) ۲ میلی لیتر محیط کشت به همراه یک میلیون سلول استئوبلاست قرار می‌گرفت و ظروف کشت به انکوباتور Co_2 دار منتقل می‌گردید (تمام عملیات ذکر شده در زیر هود لامینار و در شرایط استریل انجام می‌گرفت).

در روزهای ۱ ، ۲ ،۳ ، ۵ ، ۷ ، ۱۵ بعد از کشت نمو نه های هر گروه را از انکوباتور خارج کرده و به وسیله چسبهای کاغذی ، سلولها از سطح فلز جدا شده و فلز تیتانیوم به روی Stamp آلومینیومی‌قرار می‌گرفت ، بعد از قرار دادن نمونه به مدت ۵ دقیقه در دستگاه (Gold Coating) و پوشیده شدن سطح نمونه با یک لایه نازک از طلا ، نمو نه ها را با میکروسکوپ الکترونی اسکنینگ فیلیپس مدل EM ۴۳۰ بررسی و نگاتیو تهیه شد و بعد از ثبوت و ظهور نگاتیو ها تصاویر مورد مطالعه قرار گرفت .

نتایج

کشت سلولهای استئوبلاست به روی فلز تیتانیوم با موفقیت انجام گرفت و رشته های کلاژن به وسیله این سلولها در هر دو گروه ایجاد شد ولی تنها به محلهای رسوبات کلسیم به روی فلز تیتانیوم در گروه تحت آزمایش متصل شدند (شکل ۲ تا ۵). با مطالعه تصاویر حاصله از میکروسکوپ الکترونی اسکنینگ در گروه تحت آزمایش در روزهای ۱و ۲ هیچگونه رشته کلاژنی در سطح فلز تیتانیوم مشاهده نشد(شکل ۱) . درنمو نه های روز ۳ اولین رشته های کلاژن ایجاد شده به محل رسو بات کلسیم متصل می‌شدند که این طریق اتصال را ساختمان لنگری(Anchor Structure) می‌نامند (شکل ۲و ۳).

در روز ۵ بعد از کشت رشته های کلاژن افزایش یافته و سلولها هنوز از سطح فلز جدا می‌شدند (شکل ۴ و ۵). در روز ۷ و ۱۵ بعد از کشت اکثر سلولها به رسوبات کلسیم چسبیده بودند و امکان جدا کردن سلولها از سطح کلسیم به روشهای قبلی وجود نداشت (شکل ۶). مطالعه تصاویر در گروه شاهد نشان داد که رشته های کلاژن به سطح فلز تیتانیوم اتصال پیدا نمی‌کردند و به راحتی رشته ها و سلول از سطح فلز جدا می‌شد که احتمالاًعلت آن عدم

حضور رســوبات کلسیم در روی تیتانیوم بود. نتیجه این که رشته های کلاژن تنها به محل رسوبات کلسیم به سختی اتصال یافته و همراه با جدا شده سلولها از رســوبات جدا نمی‌شــدند یعنی رسوبات کلسیم شبیه به یک پل ما بین فلز تیتانیوم و رشــته های کلاژن تولید شــده بوسیله سلولهای استئوبلاست عمل می‌کنند و می‌توان از این خاصیت در اتصال محکم این رشته ها به فلز تیتانیوم استفاده کردو سطح آن را با این رشته ها پوشاند وسپس آنرا در محل استخوان کارگزاری کرد.

بحث

تزاید ســلولها بر روی فلز تیتانیوم نشــان دهنده کامل بودن محیط کشت از لحاظ مواد مورد نیاز این ســلولها برای رشــد،تکثیر و ســاختن رشته های کلاژن بود. تولید رشته ها در روز ۳ در محیط کشت شروع شد و در ابتدا این سلولها کم و به علت اتصال قوی رشته های کلاژن به رسوبات کلسیم براحتی سلولهای استئوبلاست از رشته های کلاژن جدا می‌شدند که نشان دهنده تمایل رشته های کلاژن به اتصال با رسوبات کلسیم می‌باشد اما با گذشت زمان بعد از روز ۷ با افزایش تعداد رشــته های کلاژن ، اتصال آنها به همدیگر و به فلز تیتانیوم و سلولهای استئو بلاست ،جدا کردن سلولها مشکلتر می‌شد بطوری که اینکار در روز ۷ و بعد از آن تا روز۱۵ امکان پذیر نبود . لذا حضور رســوبات کلسیم باعث محکم شدن اتصال رشته های کلاژن به سطح فلز تیتانیوم می‌شود و بهترین زمان برای جدا کردن سلولها روز ۷– ۵ بعد از کشت می‌باشد چون هم تعداد رشته های کلاژن زیاد بوده و هم چسبندگی سلولها به رشته کلاژن کم بود و امکان جدا کردن سلولها وجود داشت .

Ramires هم در تحقیقات خود با اســتفاده از هیدروکســی آپاتایت در محیط کشت استئوبلاست بر روی فلز تیتانیوم به افزایش فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز و افزایش رشته های کلاژن بر خورد(۷).

امید اســت در آینده نزدیک بتوان با استفاده از محیطهای کشت کاملتر و روشهای جدید از فلز تیتانیوم به بهترین شکل در جراحی و کار گزاری این فلز در بافت استخوان بهره گرفت .

منابع مورد استفاده

1-Ahmad M,Mccarthy MB:1999; An in vitro modle for mineralization of human osteoblast-like cell on implant materials.1999.Biomaterials , Feb;20(3):211-20

2-Best, Joseph A :2000; Molecular biology of osteoblast adhesion to titanium and hydroxy apatite.2000. University of Rochester Medical Center .(Research overview)

3- Change YL,1999;Osteoblast cell attachment to hydroxyapatrite coated implant surfaces in vitro.Int J. oral Maxillofaface implants .Mar-A2

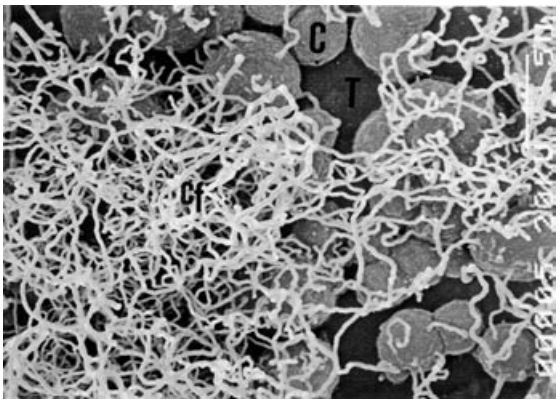
4-Fan H ,2003; On culture osteoblast ,Sichvan Daxue Ban.2003.jul ;34(3);501-3,506

5- Hayakawa T, Yoshinari M:2000;Effect of coating on the implant bone response.Clin Oral Implants , Aug ; 11(4) : 296-304

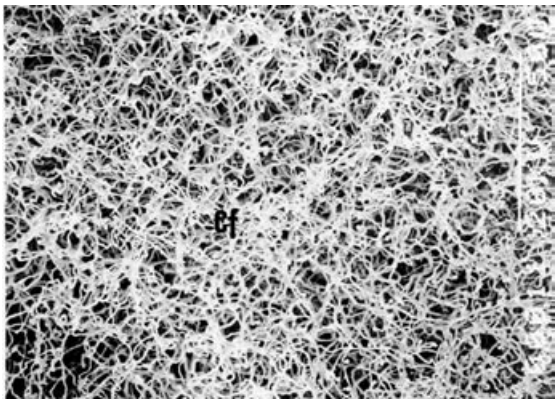
6-Leeuweberg S,Layrolle P.2001;Osteoblast resorption of biomimetic calcium phosphate coating in vitro.J.Biomed Mater Res.Aug;56(2)

7- Ramires DA, Romito A.2001; The influence of titanium /hydroxyapatite composite coating on in vitro osteoblasts behaviour.2001.Biomaterial , Jun ;29120: 1467-74

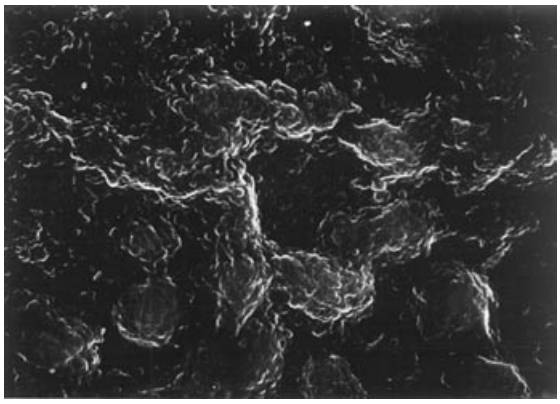
8- Wang Yi.2002;Osteoblast culture on the surface of hydroxy apatite coating in vitro .American academy of orthopedic surgenous. (Scientific program)



تصویر ۴ : افزایش تعداد رشته های کلاژن با افزایش زمان کشت درگروه تحت آزمایش (۵ روز بعد از کشت) Cf : رشته کلاژن C : رسوبات کلسیم T : فلز تیتانیوم، ۲۵۰۰۰x



تصویر ۵ : افزایش رشته های کلاژن درگروه تحت آزمایش به طوری که سطح فلز تیتانیوم قابل مشاهده نیست (۵ روز بعد از کشت) Cf : رشته کلاژن ، ۱۰۰۰۰x



تصویر۶ : سطح سلولهای استئوبلاست در گروه پنجم و ششم قابل مشاهده می‌باشدکه با افزایش زمان کشت (۷ تا ۱۵ روز بعد از کشت) و ایجاد چسبندگی مابین سلولها از سطح فلز جدا نشده اند Os : استئوبلاست، ۲۰۰۰۰x