



## 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 علمی دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد، ایران.  
• یاماشیتا کیکوجی، بخش آناتومی دانشکده دندانپزشکی دانشگاه توکوشیما - ژاپن.

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

### چکیده

امروزه فلز تیتانیوم به خاطر خصوصیات فیزیکی و شیمیایی 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 فلز تیتانیوم 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 می باشد. 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 اتصال 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 (MCM3T3-E1) در شرایط استریل به روی این فلز کشت داده و با قرار دادن آنها در انکوباتور CO<sub>2</sub> در شرایط لازم جهت تزیاد و تشکیل رشته های کلاژن برای سلولها فراهم گردید، در روزهای ۱، ۲، ۳، ۵، ۷ و ۱۵ فلزهای تیتانیوم هر دو گروه از انکوباتور خارج شده و با چسبهای کاغذی سلولها از سطح فلز جدا شد سپس سطح فلز با 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 می کردند که در گروه تحت آزمایش این رشته ها به سختی به محل رسوبات کلسیم متصل می شدند (ساختمان لنگری) اما در گروه شاهد که تیتانیوم فاقد رسوب کلسیم بود رشته های کلاژن به فلز متصل نمی شدند. با افزایش زمان کشت به علت افزایش میزان تولید کلاژن چسبندگی زیاد آنها به فلز، جدا کردن سلولها از سطح فلز تیتانیوم در روز ۷ و ۱۵ امکان پذیر نبود که علت آن افزایش سطح اتصال سلولها با رشته های کلاژن و سطح فلز تیتانیوم می باشد، پس نتیجه می گیریم 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 می توان با استفاده از فلز تیتانیوم به همراه رسوب کلسیم و رشته کلاژن اتصال محکمی ما بین فلز تیتانیوم و بافت استخوان در محل کارگزاری ایجاد کرد.

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

**Study of collagen fiber production by osteoblast cells cultured on titanium plates using SEM.**

By: Raji A.R. , Department of Anatomy ,Faculty of veterinary

Medicinc,Ferdowsi Uni.Mashhad,Iran ; Yamashita K.,Department of Anatomy.Faculty of Dentistry,Tokushima Uni.Tokushima, Japan

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 ( $CO_2$ ,  $37^\circ C$ ), 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  $Ca^{2+}$  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-maxillo facial.

**Key Words:** Collagen fiber, Osteoblast, Titanium, SEM**مقدمه**

امروزه فلز تیتانیوم به عنوان فلزی که دارای خصوصیات فیزیکی و شیمیایی 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 بر روی 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 رسید که بعد از ۱۲ هفته در نمونه های که از رسوبات کلسیم استفاده شده بود پاسخ بافت استخوان کامل تر و ترمیم خیلی سریعتر انجام می گرفت (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

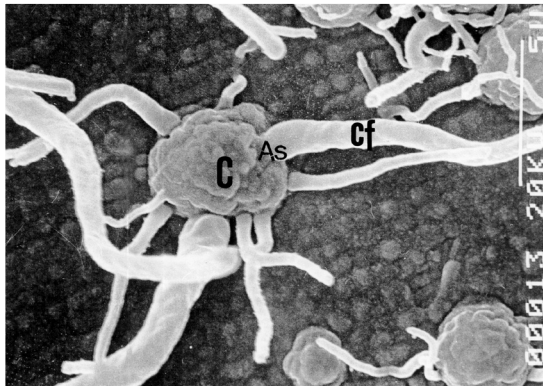
تیتانیوم استفاده کرد، او متوجه شد که بعد از کشت سلولهای استئوبلاست هیچ تفاوت معنی داری در میزان اتصال رشته های کلاژن با اندازه کریستالها وجود نداشت (۳).

Fan با استفاده از غلظتهای مختلف از کندروتین سولفات (CSA)A در محیط کشت استئوبلاست بر روی تیتانیوم مشاهده کرد که تولید سلولهای استئوبلاست و میزان رسوب کلسیم با CSA افزایش می یابد (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 می باشد) میزان استئوکلسین و فعالیت آنزیم بیشتر است (۸).

Best و همکارانش نیز به دنبال ترکیبی بودند که باعث اتصال کلاژن به فلز تیتانیوم می شوند (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 ۳: اتصال رشته های کلاژن به محل رسوبات کلسیم در گروه تحن آزمایش (۱) ، ظروف در بعد از کشت). C: رسوبات کلسیم Cf: رشته کلاژن AS: ساختمان لنگری ، ۴۰۰۰X

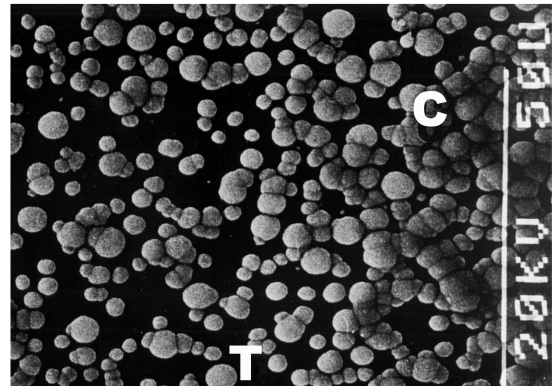
محلول با فیلتر استریل شد) در داخل ظرف کشت اضافه گردید (۱)، ظروف در داخل انکوباتور  $Co_2$  دار قرار می گرفت و بعد از یک هفته با استفاده از آنزیم *Tripsin-EDTA* (۱۰ میلی لیتر) سلولها از جدار ظروف کشت جدا شده و با افزودن *Filtron* از عمل آنزیم جلوگیری می شد، سپس مایع حاوی سلولها در سانتریفوژ سرد با دور ۱۵۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ می شد، سلولها از قست انتهایی 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 می گرفت و ظروف کشت به انکوباتور  $Co_2$  دار منتقل می گردید (تمام عملیات ذکر شده در زیر هود لامینار و در شرایط استریل انجام می گرفت).

در روزهای ۱، ۲، ۳، ۵، ۷، ۱۵ بعد از کشت نمونه 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* آلومینیومی قرار می گرفت، بعد از قرار دادن نمونه به مدت ۵ دقیقه در دستگاه (*Gold Coating*) و پوشیده شدن سطح نمونه با یک لایه نازک از طلا، نمونه ها را با میکروسکوپ الکترونی اسکینینگ فیلپس مدل EM ۴۳۰ بررسی و نگاتیو تهیه شد و بعد از ثبوت و ظهور نگاتیوها تصاویر مورد مطالعه قرار گرفت.

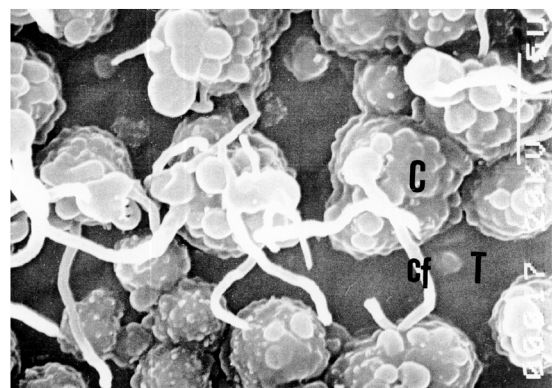
### نتایج

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 محللای رسوبات کلسیم به روی فلز تیتانیوم در گروه تحت آزمایش متصل شدند (شکل ۲ تا ۵). با مطالعه تصاویر حاصله از میکروسکوپ الکترونی اسکینینگ در گروه تحت آزمایش در روزهای ۱ و ۲ هیچگونه رشته کلاژنی در سطح فلز تیتانیوم مشاهده نشد (شکل ۱). در نمونه های روز ۳ اولین رشته های کلاژن ایجاد شده به محل رسوبات کلسیم متصل می شدند که این طریق اتصال را ساختمان لنگری (*Anchor Structure*) می نامند (شکل ۲ و ۳).

در روز ۵ بعد از کشت رشته های کلاژن افزایش یافته و سلولها هنوز از سطح فلز جدا می شدند (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 نمی کردند و به راحتی رشته ها و سلول از سطح فلز جدا می شد که احتمالاً علت آن عدم



تصویر ۱: فلز تیتانیوم به همراه رسوبات کلسیم در گروه تحت آزمایش (۱) و ۲ روز بعد از کشت سلول، C: رسوبات کلسیم T: فلز تیتانیوم ، ۱۰۰۰۰X

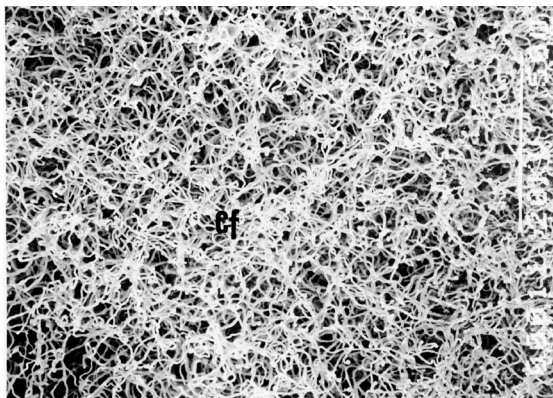


تصویر ۲: اتصال رشته های کلاژن به محل رسوبات کلسیم در گروه تحت آزمایش (۳) روز بعد از کشت). C: رسوبات کلسیم T: فلز تیتانیوم Cf: رشته کلاژن ، ۳۰۰۰X

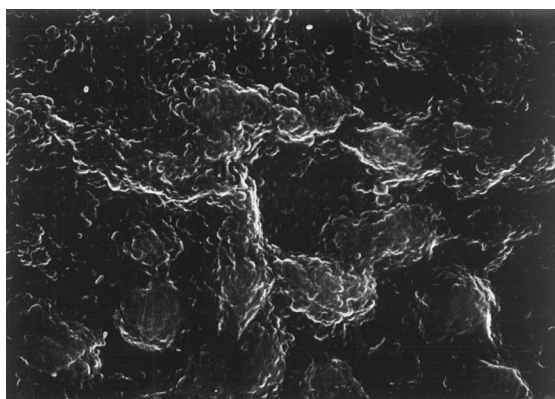
### روش کار

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 می گرفت تمام قطعات را در شش مرحله صیقل دادیم، به این صورت که هر قطعه را صد بار با دست از روی سنباده 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، در این مرحله نمونه ها به دو گروه تقسیم شد، گروه تحت آزمایش که بر روی فلز تیتانیوم رسوب کلسیم را پوشانیدیم 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 ( $MCM^3T3-E1$ ) 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* max ۱، ۱٪ پنی سیلین استریپتومایسین و ۱۰ میلی لیتر سرم خون گاو یا *Filtron* اضافه و

- 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 hydroxyapatite coated implant surfaces in vitro.Int J. oral Maxillofacial implants .Mar-A2
- 4-Fan H ,2003; On culture osteoblast ,Sichuan 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 ۵: افزایش رشته های کلاژن در گروه تحت آزمایش به طوری که سطح فلز تیتانیوم قابل مشاهده نیست (۵ روز بعد از کشت) Cf: رشته کلاژن ، ۱۰۰۰۰X



تصویر ۶: سطح سلولهای استوبلاست در گروه پنجم و ششم قابل مشاهده می باشد که با افزایش زمان کشت (۷ تا ۱۵ روز بعد از کشت) و ایجاد چسبندگی مابین سلولها از سطح فلز جدا نشده اند Os: استوبلاست ، ۲۰۰۰۰X

حضور رسوبات 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 رسوبات جدا نمی شدند یعنی رسوبات کلسیم شبیه به یک پل ما بین فلز تیتانیوم و رشته های کلاژن تولید شده بوسیله سلولهای استوبلاست عمل می کنند و می توان از این خاصیت در اتصال محکم این رشته ها به فلز تیتانیوم استفاده کرد و سطح آن را با این رشته ها پوشاند و سپس آنرا در محل استخوان کارگزاری کرد.

### بحث

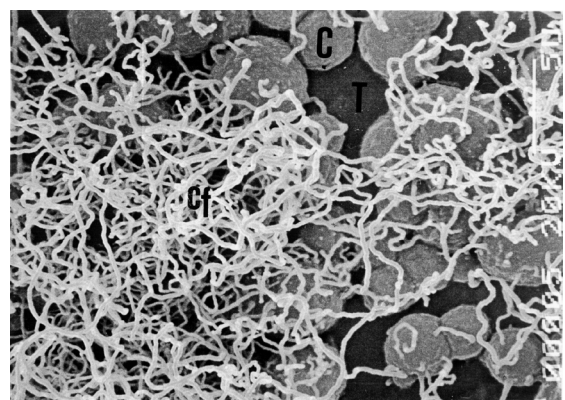
تزیاد سلولها بر روی فلز تیتانیوم نشان دهنده کامل بودن محیط کشت از لحاظ مواد مورد نیاز این سلولها برای رشد، تکثیر و ساختن رشته های کلاژن بود. تولید رشته ها در روز ۳ در محیط کشت شروع شد و در ابتدا این سلولها کم و به علت اتصال قوی رشته های کلاژن به رسوبات کلسیم براحتی سلولهای استوبلاست از رشته های کلاژن جدا می شدند که نشان دهنده تمایل رشته های کلاژن به اتصال با رسوبات کلسیم می باشد اما با گذشت زمان بعد از روز ۷ با افزایش تعداد رشته های کلاژن ، اتصال آنها به همدیگر و به فلز تیتانیوم و سلولهای استوبلاست ، جدا کردن سلولها مشکلتر می شد بطوری که اینکار در روز ۷ و بعد از آن تا روز ۱۵ امکان پذیر نبود . لذا حضور رسوبات کلسیم باعث محکم شدن اتصال رشته های کلاژن به سطح فلز تیتانیوم می شود و بهترین زمان برای جدا کردن سلولها روز ۷-۵ بعد از کشت می باشد 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 استفاده از هیدروکسی آپاتایت در محیط کشت استوبلاست بر روی فلز تیتانیوم به افزایش فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز و افزایش رشته های کلاژن بر خورد(۷).

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

### منابع مورد استفاده

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



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