Archive of SID

Available online: www.jnmr.ir/papers
مجله تحقیقات مواد نانوکامپوزیتی: ۶:۲ (۱۳۸۹) ۱۱۲-۱۰۵

Journal of
مجله تحقیقات مواد نانوکامپوزیتی
Nanocomposite Materials Research

مقایسه تاثیر فلوروهیدروکسی آپاتیت و هیدروکسی آپاتیت بر رفتار سلول‌های بنیادی مزانشیمال چربی و استئوبلاست انسانی

لیلا منتظری[۲،۱]، محمدعلی شکرگزار[۲،*]، جعفر جوادپور[۱]، شاهین بنکدار[۲] و محسن ربانی[۳]

۱- تهران، نارمک، دانشکده مواد و متالورژی دانشگاه علم و صنعت ایران
۲- انستیتو پاستور ایران، بانک سلولی
۳- مرکز تحقیقات نانوتکنولوژی پزشکی و مهندسی بافت

تاریخ ثبت اولیه: ۱۳۸۹/۰۷/۱۹، تاریخ دریافت نسخه اصلاح شده: ۱۳۸۹/۰۹/۱۷، تاریخ پذیرش قطعی: ۱۳۸۹/۱۲/۰۱

چکیده

استفاده از بیومتریال‌های مصنوعی در ترمیم ضایعات بافت‌های سخت استخوانی و دندانی مورد توجه عده زیادی قرار دارد. از جمله این بیومتریال‌ها باید به هیدروکسی آپاتیت و سایر ترکیبات مشتق شده از آن نظیر فلوروهیدروکسی آپاتیت اشاره نمود. در این تحقیق هیدروکسی‌آپاتیت و فلوروهیدروکسی آپاتیت به روش هیدروترمال سنتز شدند و مورفولوژی آنها به کمک میکروسکوپ نیروی اتمی بررسی شد. سپس پاسخ بیولوژیکی سلول‌های استئوبلاست و بنیادی مزانشیمال جداسازی شده انسانی در تماس با این مواد ارزیابی گردید. میزان تکثیر سلولی (MTT)، مقدار ترشح آنزیم آلکالین فسفاتاز و بیان ژنی کلاژن نوع I و آلکالین فسفاتاز به عنوان معیار سنجش فعالیت زیستی این مواد در نظر گرفته شد. نتایج نشان دادند که حضور فلوراید باعث افزایش تکثیر سلول‌های استئوبلاست و افزایش بیان ژنی در این سلول‌ها گردید. در حالیکه تفاوت معنی‌داری بین تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمالی در دو نوع نمونه هیدروکسی آپاتیت و فلوروهیدروکسی آپاتیت مشاهده نشد. علاوه براین میزان ترشح آلکالین فسفاتاز و بیان ژنی در سلول‌های استئوبلاست بیش از سلول‌های مزانشیمالی دیده شد.

***واژه‌های کلیدی*: هیدروکسی آپاتیت، فلوروهیدروکسی آپاتیت، سلول بنیادی مزانشیمال، سلول استئوبلاست.**

۱- مقدمه

هیدروکسی آپاتیت به طور وسیعی به سبب داشتن ترکیب شبیه استخوان به عنوان جایگزین استخوان استفاده می‌شود [۱]. تحقیقات اخیر نشان داده است که مقادیر کم فلوراید می‌تواند تشکیل استخوان را در داخل بدن ترغیب کند. از طرف دیگر فلوراید می‌تواند مانع از پوسیدگی دندان شود و به همین جهت نیز در کاشتنی‌های دندانی

* **عهده‌دار مکاتبات:** محمدعلی شکرگزار
نشانی: تهران، انستیتو پاستور ایران، بانک سلولی
تلفن: ۷۷۲۴۰۲۷۴-۰۲۱، **دورنگار:** ۷۷۲۴۰۲۷۶-۰۲۱، **پست‌الکترونیکی:** mashokrgozar@yahoo.com

www.SID.ir

Archive of SID

مورد توجه قرار گرفته است [۲]. بنابراین فلوروهیدروکسی آپاتیت (FHA) که در آن یون F^- جایگزین تعدادی از یون‌های -OH در هیدروکسی آپاتیت (HA) شده است، یک بیومتریال ارزشمند به شمار می‌رود. زیرا این ساختار می‌تواند بدون تجمع غیر ضروری فلوراید در بدن، باعث رشد بهتر استخوان شود [۳،۴]. این جایگزینی خصوصیات اصلی ساختاری هیدروکسی آپاتیت را تغییر نمی‌دهد، بلکه خصوصیات مکانیکی، حلالیت و توانایی برقراری پیوند با استخوان طبیعی را تغییر می‌دهد [۵]. ضمنا باید در نظر داشت که غلظت‌های بالای فلوراید در استخوان به تعبیری ترکیبات نزدیکتر به فلوروآپاتیت که محتوای فلورایدش خیلی بیشتر از استخوان طبیعی است، می‌تواند منجر به اثرات نامطلوبی مثل نرمی استخوان شود. بنابراین لازم است که میزان فلوراید در فلوروهیدروکسی آپاتیت برای رسیدن به بیشترین میزان بیواکتیویتی بهینه شود [۶].

ضمن اینکه تحقیقات نشان داده است که علاوه بر این اندازه و شکل ذرات کلسیم فسفاتی نیز در میزان افزایش فعالیت زیستی آنها مؤثر هستند [۷]. بررسی‌های انجام شده نشان می‌دهد وجود یون فلوراید در داخل محیط کشت باعث تحریک سلول‌های استئوبلاست و افزایش تکثیر و تمایز آنها می‌شود. میزان فلوراید آزاد شده از فلوروهیدروکسی آپاتیت را می‌توان با تنظیم مقدار فلوراید جایگزین شده در فلوروهیدروکسی آپاتیت کنترل کرد، که هرچه میزان جایگزینی بیشتر باشد میزان رهایش نیز بیشتر خواهد بود [۸]. با توجه به اینکه تهیه سلول‌های استئوبلاست از خود شخص بیمار نیازمند یک جراحی جداگانه و سخت است، لزوم توجه به سایر منابع سلولی که بتواند به نوعی نقش استئوبلاست را ایفا نماید، احساس می‌شود. علاوه بر این در اشخاص مسن نیز توانایی تکثیر سلول‌های بالغ جداسازی شده کاهش بسیاری یافته است. بنابراین بحث استفاده از سلول‌های بنیادی مزانشیمالی مطرح شده که در این زمینه می‌توان از سلول‌های بنیادی بافت چربی بهره برد. این سلول‌ها تحت تأثیر عوامل شیمیایی به خوبی به سلول‌های استئوبلاست متمایز می‌شوند [۹،۱۰].

در این تحقیق رشد، تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمال چربی و سلول‌های استئوبلاست جداسازی شده از انسان در مجاورت محلول حاوی نانوذرات هیدروکسی آپاتیت و فلوروهیدروکسی آپاتیت مورد ارزیابی قرار می‌گیرد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد

آمونیوم هیدروژن فسفات ($(NH_4)_2HPO_4$) و هیدروکسید کلسیم ($Ca(OH)_2$) از شرکت مرک و سدیم فلوراید (NaF) از شرکت Labachemie، India تهیه شدند. محیط کشت شامل Dulbecco's Modified Eagle's Medium و Hams F12 محصول شرکت (GIBCO, Scotland) و سرم جنینی گاو (FBS, Seromed,Germany) استفاده شد.

۲-۲- سنتز پودر HAp و FHA

فرآیند سنتز مطابق با شرایط ارائه شده در گزارش قبلی انجام پذیرفت [۱۱]. به‌طور خلاصه در ابتدا محلول فسفاتی و سوسپانسیون کلسیمی با نسبت مولی ۱/۶۷ تهیه گردید. سپس محلول فلورایدی با نسبت مولی ۰/۲ برای رسیدن به ترکیب $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_{0.8}F_{1.2}$ به محلول فسفاتی افزوده شد. مخلوط محلول‌های فسفاتی و فلورایدی به صورت قطره قطره به سوسپانسیون کلسیمی در حال هم زدن اضافه شدند و ضمن آن مقدار pH نهایی در حدود ۷ معین شد. پس از اتمام ورود محلول‌های فسفاتی و فلورایدی، مخلوط به مدت ۱۰ دقیقه تحت همزدن قرار گرفت و سپس به کمک دستگاه هیدروترمال (Clave، High pressure Techniques، Iran) وارد شد. مخلوط در این دستگاه در معرض فشار ۱۵/۲ اتمسفر و دمای ۲۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۸ ساعت بود. پس از این مرحله، سه مرتبه با آب مقطر شستشو داده شد تا یون‌های اضافی خارج گردند و سپس در خشک کن در دمای ۸۰ °C به مدت ۲۴ ساعت خشک گردید. به‌طور مشابه نیز پودر HAp مطابق با روش فوق بدون استفاده از محلول فلورایدی تهیه گردید. پودرهای تهیه شده به کمک دستگاه میکروسکوپ نیروی اتمی (AFM) مدل Dualscope/ Rasterscope C26, DME, Denmark و کانتیلور مدل DualScope™ DS 95-200/50 انجام شد.

www.SID.ir

Archive of SID

۲-۳- جداسازی سلول استئوبلاست

از قطعه استخوانی جدا شده از استخوان ران انسان، برای جداسازی سلول‌های استئوبلاست استفاده شد. قطعه استخوان جدا شده در حین عمل جراحی بلافاصله در داخل نرمال سالین استریل قرار داده شد. به منظور جداسازی بافت استخوانی از سلول‌های بافت همبند و خونی، بافت موردنظر چندین بار با محلول بافر سالین شستشو شد و سپس در محیط کشت DMEM/Hams F12 قرار گرفت.

بعد از این مرحله قطعات استخوان در معرض آنزیم کلاژناز نوع I با غلظت ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به مدت ۲ ساعت و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوباتور با غلظت دی‌اکسید کربن ۵٪، در فلاسک مخصوص قرار گرفتند. سپس تکه‌های استخوانی با استفاده از محلول بافر سالین (pH=۷/۴)، چندین بار شستشو داده شد و پس از آن در فلاسک ۱۲۵ میلی‌لیتری حاوی محیط کشت (DMEM/F12، ۱۰٪ FBS، ۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر پنی‌سیلین، ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر استرپتومایسین، ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر اسید اسکوربیک)، در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد وغلظت دی اکسید کربن ۵٪ قرار داده شدند. لازم به ذکر است که محیط کشت هر ۵-۴ روز تعویض گردید.

۲-۴- جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمال چربی انسان

بافت چربی در طی عمل جراحی و از اطراف ضایعه غضروفی ایجاد شده در یک بیمار مرد ۲۳ ساله جدا شد و به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در معرض آنزیم کلاژناز نوع I (Sigma) با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر قرار داده شد. پس از هضم بافت چربی محیط کشت Hams F12/DMEM حاوی ۱۰ درصد FBS به محلول افزوده شد و با سرعت ۱۰۰۰ دور در دقیقه به مدت شش دقیقه سانتریفوژ گردید. مایع رویی خارج شد و پلت بازشده از فیلتر ۱۵۰ میکرومتر عبور داده شده و مجددا فرآیند سانتریفوژ انجام گردید. پلت نهایی بدست آمده باز شد و به فلاسک کشت سلولی منتقل گردید. جهت بررسی تمایز این سلول‌ها به سلول‌های استخوانی از اسید اسکوربیک (۰/۰۵ میلی‌مولار، سیگما)، بتا گلیسرول فسفات (۱۰ میلی‌مولار، سیگما) و دگزامتازون (۱ میکرومولار، سیگما) در محیط کشت بهره برده شد.

۲-۵- فرآیند عصاره گیری

به منظور بررسی سمیت پودرها و تأثیر آنها بر رشد و تکثیر سلول‌ها، فرآیند عصاره‌گیری براساس استاندارد ایزو ۱۰۹۹۳-۱۲ انجام شد که طی آن به هر نمونه به وزن ۰/۱ گرم استریل شده توسط اتوکلاو، مقدار یک میلی‌لیتر محیط کشت افزوده گردید و به انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد منتقل شد. سپس در فواصل زمانی مشخص از محیط خارج و به سلول‌ها افزوده شد. مقدار مشخصی محیط کشت نیز به عنوان شاهد (control) در نظر گرفته شد.

۲-۶- آزمون کمی سمیت سلولی MTT

جهت بررسی میزان تکثیر سلولی از آزمون دی متیل تیازل دی‌فنیل تترازولیوم بروماید (MTT) استفاده شد. بدین ترتیب که ابتدا ۱۵۰۰۰ سلول درون پلیت کشت سلولی ۹۶ چاهکی اضافه شد و سپس به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت تا سلول‌ها به کف پلیت بچسبند. سپس عصاره گرفته شده از هر نمونه به چاهک کشت افزوده شد و سلول‌ها برای مدت ۲۴ ساعت دیگر در مجاورت این عصاره‌ها قرار گرفتند. پس از آن از محیط کشت خارج شد و ۱۰۰ میکرولیتر MTT با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به هر چاهک وارد شد. پس از گذشت ۴ ساعت محلول روی سلول‌ها خارج شد و دی‌متیل سولفوکساید به آن‌ها اضافه گردید.

مقدار جذب نوری هر چاهک ظرف کشت سلولی به کمک دستگاه Eliza Reader, (Stat sat 2100, USA) در طول موج ۵۴۵ نانومتر تعیین گردید. میانگین مقدار جذب نوری بیشتر برای هر نمونه، نشانه تعداد سلول بالاتر در آن چاهک بود. مقایسه میانگین جذب هر نمونه نسبت به شاهد و بیان آن به درصد مبین میزان زیست‌پذیری (viability) آن نمونه است.

www.SID.ir

Archive of SID

این ارزیابی برروی هر دو نوع سلول استئوبلاست (OS) و سلول بنیادی مزانشیمال (MSC) و هر دو نوع پودر هیدروکسی آپاتیت (HA) و فلوروهیدروکسی آپاتیت (FHA) انجام شد.

۲-۷- تعیین میزان ترشح آلکالین فسفاتاز

میزان ترشح آلکالین فسفاتاز از سلول‌ها در محیط کشت توسط کیت شرکت پارس آزمون و مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده ارزیابی شد. برای این آزمایش ابتدا در پلیت کشت ۲۴ خانه تعداد ۱۰۰۰۰ سلول کشت داده شد. پس از ۲۴ ساعت محیط کشت روی سلول‌ها خارج شد و مقدار ۳۰۰ میکرولیتر عصاره نانوذرات حاوی ۱۰ درصد FBS به هر چاهک افزوده شد. این کار هر سه روز انجام شد و در انتهای روز دهم مقدار آلکالین فسفاتاز ترشح شده از سلول‌ها در مجاورت عصاره نانوذرات به کمک دستگاه UV Spectrophotometer در طول موج ۳۶۵ نانومتر ارزیابی شد.

۲-۸- جداسازی RNA و تهیه cDNA

سلول‌های استئوبلاست و مزانشیمال جداسازی شده انسانی در محیط کشت DMEM/Hams F12 حاوی ۱۰ درصد سرم جنینی گاو به تعداد $۵*۱۰^{۴}$ سلول درون ظرف کشت ۶ خانه کشت داده شدند. پس از ۲۴ ساعت محیط کشت خارج شد و عصاره گرفته شده از نمونه‌ها حاوی ۱۰ درصد سرم جنینی گاو برروی سلول‌ها ریخته شد. هر سه روز این کار تکرار شد و در پایان روز دهم برای بررسی بیان ژنی، RNA سلول‌ها جداسازی گردید.

جداسازی RNA از سلول‌های کشت داده شده به کمک RNeasy Minikit 74104 شرکت QIAGEN براساس دستورالعمل شرکت سازنده انجام پذیرفت. غلظت RNA سلول‌ها به کمک دستگاه اسپکتروفوتومتر UV/Vis (Eppendorf, Germany) در طول موج ۲۶۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

تهیه cDNA به کمک مخلوط ۱ میکروگرم RNA، ۴ میکرولیتر PCR buffer 15X، ۲ میکرولیتر dNTP 20mm (Roche, Germany)، ۱ میکرولیتر Random Hexamer (Roche, Germany) ۱۰ pmol/µl، ۲ میکرولیتر (µl) آب دیونیزه استریل و ۱ میکرولیتر Reverse Transcriptase (200 U/µl; Fermentase, Russia) تهیه شد. در انتها نیز مخلوط به مدت ۴۵ دقیقه در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

۲-۹- آنالیز کمی به کمک Real time PCR

توالی ژنی پرایمرهای تهیه شده از شرکت سیناژن در جدول ۱ آورده شده است. فرآیند Real time PCR به کمک دستگاه ABI 7300 (Applied Biosystems) و مخلوط SYBR Green PCR master mix محصول شرکت (Applied Biosystems) انجام شد.

۳- نتایج و بحث

در شکل ۱ تصاویر میکروسکوپ نیرو اتمی (AFM) مربوط به پودرهای سنتز شده مشاهده می شود. بر این اساس ابعاد پودر فلوروهیدروکسی آپاتیت در مقایسه با ابعاد هیدروکسی آپاتیت سنتز شده، کوچکتر به نظر می‌رسد.

در شکل ۲ تصاویر میکروسکوپ نوری از سلول‌های استئوبلاست و مزانشیمال چربی انسانی در مجاورت عصاره نمونه‌ها آورده شده است که بیانگر عدم تأثیر سمی نمونه‌ها برروی سلول‌ها است.

۳-۱- ارزیابی تکثیر سلولی به کمک MTT

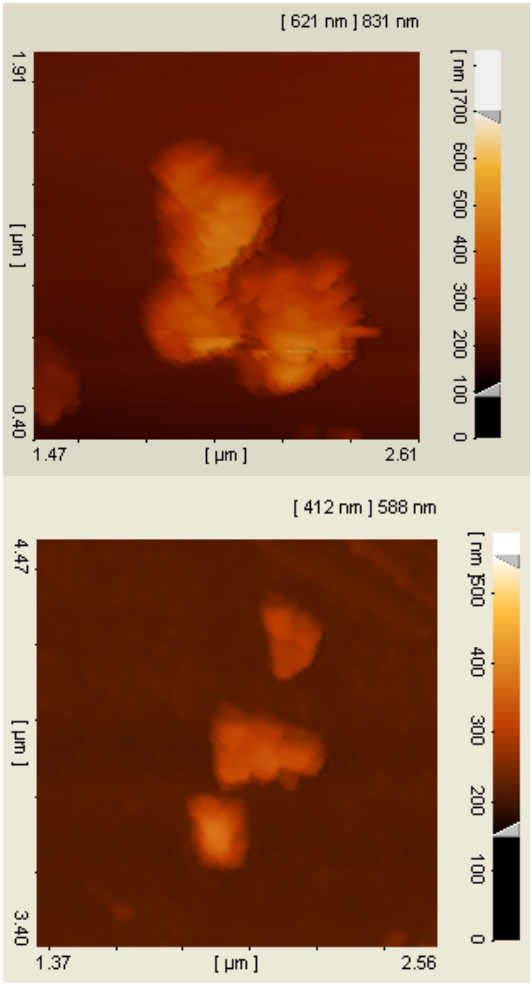
نتایج آزمایش MTT در شکل ۳ آورده شده است. تمامی نمونه‌ها درصد زیست‌پذیری بالاتر از ۹۰ درصد را نسبت به شاهد نشان دادند که نشانگر عدم تأثیر سمی برروی سلول‌ها است. با این‌حال به دلیل نزدیک بودن مقدار آنها نمی‌توان ارتباط بین نوع پودر و تأثیر آن بر تکثیر سلول‌ها را به طور دقیق بیان نمود. اما به نظر می‌رسد که فلوروهیدروکسی آپاتیت (FHA) نسبت به نمونه هیدروکسی آپاتیت (HA) باعث افزایش تکثیر سلول‌ها شده است.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱: پرایمرهای مورد استفاده در آنالیز Real time PCR.

Gene Name	Forward Primer (5' to 3')	Reverse Primer (5' to 3')
β-actin	CAGCACAATGAAGATCAAGATCATT	GGACAGCGAGGCCAGGAT
Collagen I	GCCAAGACGAAGACATCCCA	CCACACGTCTCGGTCATGG
ALP	TGGAGCTTCAGAAGCTCAACAC	TGGAGACACCCATCCCATCT



شکل ۱: تصاویر AFM پودرهای سنتز شده که به نظر می‌رسد HA ابعاد کوچکتری در مقایسه با FHA دارد.

۳-۲- ارزیابی ترشح آلکالین فسفاتاز

فعالیت سلول‌های استئوبلاست تکثیر شده به کمک ارزیابی کمی میزان ترشح ALP قابل مقایسه است. همانطورکه در شکل ۴ مشاهده می‌شود میزان ترشح آلکالین فسفاتاز در نمونه‌های استئوبلاست بالاتر از سلول‌های بنیادی بوده و نیز حضور فلوراید (F_2) در ترکیب هیدروکسی آپاتیت باعث افزایش ترشح آلکالین فسفاتاز در سلول‌های استئوبلاست در تماس با فلوراید شده است.

۳-۳- بررسی بیان ژنی

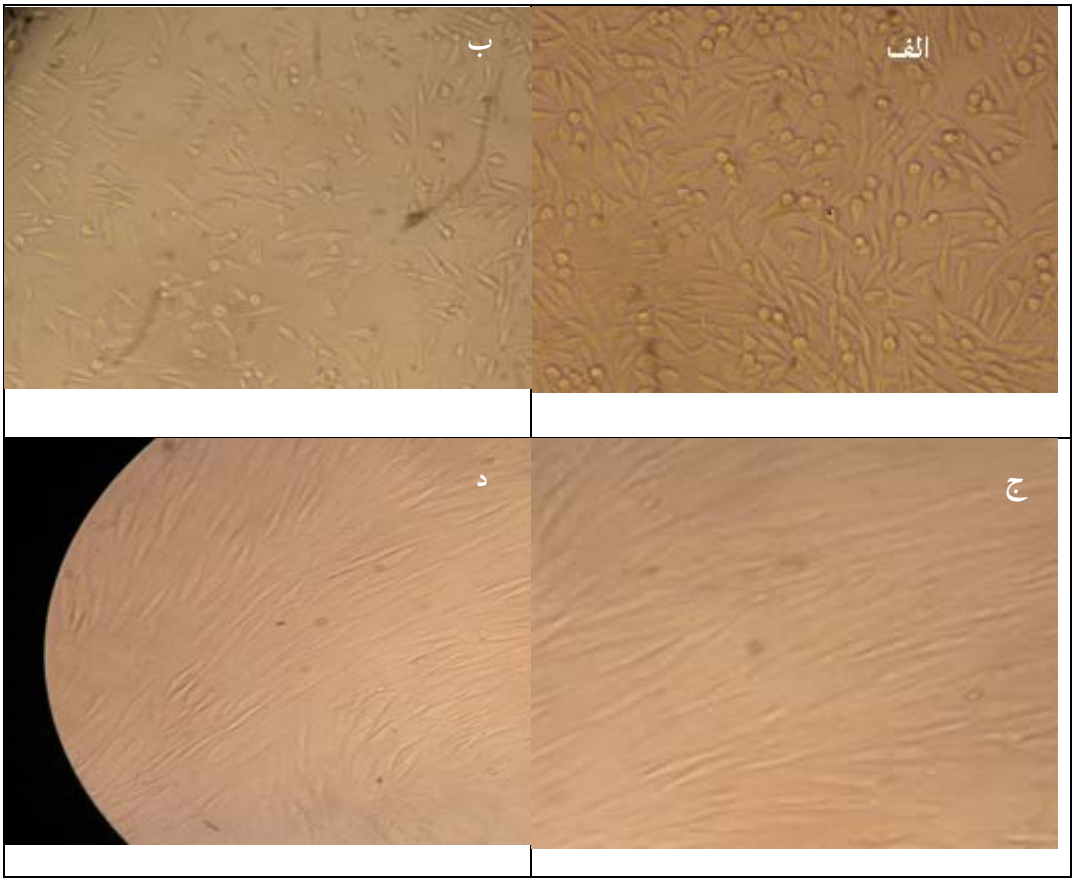
شکل ۵ میزان ترشح ژن‌های کلاژن نوع I و آلکالین فسفاتاز نرمالیزه شده نسبت به ژن β-Actin را در دو نوع سلول استئوبلاست و مزانشیمال بنیادی در تماس با هیدروکسی آپاتیت و فلوروهیدروکسی آپاتیت با یکدیگر مقایسه نموده است.

بر این اساس میزان ترشح کلاژن و آلکالین فسفاتاز در سلول‌های استئوبلاست بیش از سلول‌های بنیادی بوده و حضور یون فلوراید در ترکیب هیدروکسی آپاتیت (HAp) باعث افزایش ترشحات سلول‌های استئوبلاست در مواجهه با این نمونه شده است، در حالیکه این مسئله در خصوص سلول بنیادی مزانشیمال متفاوت است. دلیل این امر احتمالا به دلیل عدم توانایی این سلول‌ها در ترشح فاکتورهای اختصاصی استخوانی باشد. ضمن اینکه می‌توان تأثیر فلوراید را بر سلول‌های بالغ تشخیص داد. بررسی‌های بیولوژیکی برروی حضور یون فلوراید در ساختار هیدروکسی آپاتیت نتایج مختلفی را به همراه داشته است. به نظر می‌رسد که میزان فلوراید جایگزین شده در ساختار فلوروهیدروکسی آپاتیت برروی آزادسازی یون‌های کلسیم و فسفات در محیط و در نتیجه پاسخ بیولوژیکی مؤثر بوده است [۱۱]. به همین جهت انتخاب مقدار غلظت مؤثر و پاسخ بیولوژیکی متناسب با کاربرد اهمیت زیادی یافته است. در این تحقیق براساس یافته‌های سایر محققان مقدار جانشینی ۰/۶۷ فلوراید انتخاب گردید [۱۲].

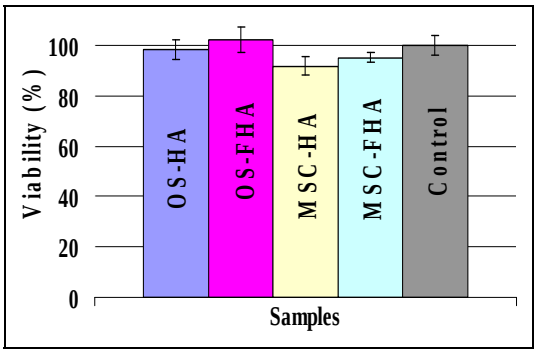
به عنوان مثال پوشش‌دهی فلوروآپاتیت در مقایسه با هیدروکسی آپاتیت می‌تواند باعث کاهش حلالیت و تثبیت توپوگرافی سطحی در مجاورت سلول‌ها شود [۱۳].

www.SID.ir

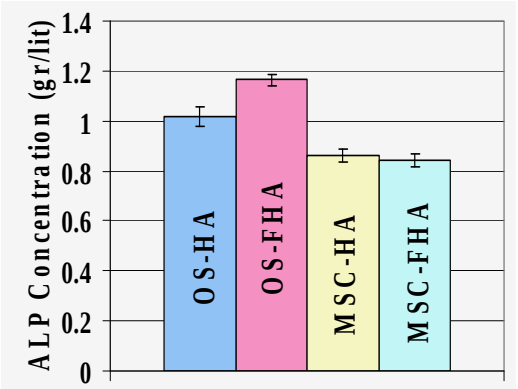
Archive of SID



شکل ۲: تصاویر میکروسکوپ نوری از سلول‌های الف) استئوبلاست انسانی در مجاورت عصاره FHA، ب) استئوبلاست انسانی در مجاورت عصاره HA، ج) مزانشیمال در مجاورت عصاره FHA و د) مزانشیمال در مجاورت عصاره HA.



شکل ۳: نتایج آزمایش MTT برروی نمونه‌ها و مقایسه آن با نمونه شاهد.



شکل ۴: میزان ترشح آلکالین فسفاتاز از سلول‌های استئوبلاست و بنیادی مزانشیمال انسانی پس از هفت روز قرارگیری در مجاورت عصاره HA و FHA.

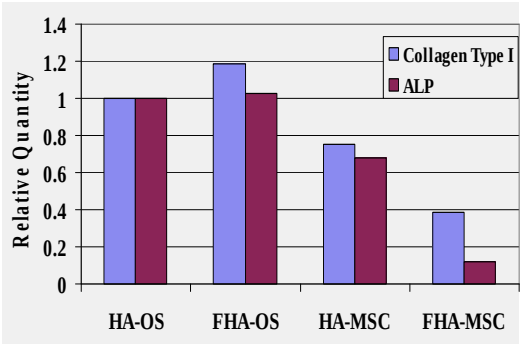
کیو (Qu) و همکارانش در گزارش خود افزایش چسبندگی و تکثیر سلول‌های استئوبلاست در مجاورت دیسک‌های فلوروهیدروکسی آپاتیت نسبت به هیدروکسی آپاتیت سنتز شده را اعلام نموده‌اند [۱۴].

سایر محققان نیز افزایش تکثیر سلولی به کمک آزمون MTT را برای پوشش‌های فلوروهیدروکسی آپاتیت گزارش

www.SID.ir

Archive of SID

کرده‌اند [۱۲]. در تحقیق دیگری استفاده از فلوروآپاتیت در ساختار یک کامپوزیت استخوانی بهترین خواص زیستی را از نظر تکثیر سلولی و تمایز سلولی نشان داده است [۱۵].



شکل ۵: مقایسه بیان ژن‌های کلاژن نوع I و آلکالین فسفاتاز سلول‌های استئوبلاست و مزانشیمال قرارگرفته در معرض عصاره HA و FHA.

نتایج تحقیق فارلی و همکارانش جزء اولین تحقیقات در زمینه تأثیر یون فلوراید بر تکثیر و ترشح آلکالین فسفاتاز سلول‌های استخوانی محسوب می‌شود که البته آنها برای تأمین فلوراید از سدیم فلوراید استفاده کردند [۱۶]. اما امروزه بحث استفاده توأمان از اثرات مطلوب فلوراید و خاصیت بیواکتیویته هیدروکسی‌آپاتیت مطرح است و از آنجا که مقادیر بالای فلوراید نتیجه معکوس دارد، مسئله قابل توجه میزان ورود فلوراید به داخل ساختار هیدروکسی‌آپاتیت برای رسیدن به یک ساختار ایده‌آل است. کیم (Kim) و همکارانش تکثیر سلولی مشابهی را در دو ساختار هیدروکسی آپاتیتی و فلوروهیدروکسی آپاتیتی بیان نمود. ولی میزان تولید آلکالین فسفاتاز و استئوکلسین بیشتری در سلول‌های استئوبلاست مجاور فلوروهیدروکسی آپاتیت مشاهده شد [۱۷]. در این تحقیق نیز میزان ترشح آلکالین فسفاتاز و کلاژن نوع I بیشتری در حضور فلوروهیدروکسی آپاتیت مشاهده شده است. در مجموع می‌توان مسئله تأثیر فلوراید بر شکل‌گیری استخوان توسط سلول‌های بنیادی جنینی را مورد ارزیابی قرار داد. همچنین اگر بیان ژن‌های دیگری نظیر استئوکلسین و استئونکتین علاوه بر کلاژن نوع I و آلکالین فسفاتاز بررسی شود، به نظر می‌رسد تأثیر فلوراید بر سلول‌های استئوبلاست بالغ بیش از تأثیر آن بر سلول‌های مزانشیمالی بوده است.

۴- نتیجه‌گیری

در این تحقیق فلوروهیدروکسی آپاتیت و هیدروکسی آپاتیت به عنوان بیومتریال‌های مورد استفاده در ترمیم بافت سخت سنتز گردید و پاسخ سلولی آنها نسبت به سلول‌های استئوبلاست و سلول‌های مزانشیمال بنیادی جداسازی شده از انسان مقایسه شد. نتایج نشان دادند که حضور مقادیر معینی از فلوراید در ترکیب هیدروکسی آپاتیت سبب افزایش تکثیر استئوبلاست‌ها و ترشح ژن‌های اختصاصی این سلول‌ها نظیر کلاژن نوع I و آلکالین فسفاتاز می‌شود. در خصوص سلول‌های بنیادی مزانشیمال، نتایج، اختلاف چندانی بین مقدار تکثیر سلولی یا بیان ژنی در دو گروه فلوروهیدروکسی آپاتیت و هیدروکسی آپاتیت نشان ندادند. بنابراین می‌توان چنین نتیجه‌گیری نمود که ترکیب فلوروهیدروکسی آپاتیت برای سلول‌های استئوبلاست نقش محرک داشته و در مورد سلول‌های مزانشیمالی بنیادی تأثیر محرکی در بیان ژن‌های کلاژن نوع I آلکالین فسفاتاز نداشته است.

مراجع

[1] Y. Chen, X. Miao, *Biomaterials*, **26**, 2005 1205.
[2] A.E.W. Miles, "*Structure and Chemical Organization of Teeth*", New York: Academic, 1967, 267–269.
[3] H. Qu, A.L.Vasiliev, M. Aindow, M. Wei, *Materials in Medicine*, **16**, 2005, 447.
[4] H.G. Zhang, Q. Zhu, Z.H. Xie, *Materials Research Bulletin*, **40**, 2005, 1326.
[5] M. Wei, J H Evans, T. Bostrom, L. Grondahl, *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, **14**, 2003, 311.
[6] Y. Chen, X. Miao, *Ceramics International*, **30**, 2004, 1961.
[7] J.L.B. Karen, S. Porter, J.F. Kellam, *Biomaterials*, **21**, 2000, 2347.
[8] H. Qu, M. Wei, *Acta Biomaterials*, **2**, 2006, 113.
[9] H. Hattori, K. Masuoka, M. Sato, M. Ishihara, T. Asazuma, B. Takase, M. Kikuchi, K. Nemoto, M. Ishihara, *J. Biomed. Mater. Res. Part B: Appl. Biomater.*, **76B**, 2006, 230.
[10] F.M. Gregoire, C.M. Smas, H.S. Sul, *Physiol Rev.*, **78**, 1998; 783.
[11] L. Montazeri, J. Javadpour, M.A. Shokrgozar, S. Bonakdar S. Javadian, *Biomed. Mater.*, **5**, 2010, 045004.
[12] K. Cheng, W. Wenga, H. Wang, S. Zhang, *Biomaterials*, **26**, 2005, 6288.
[13] K.B. Karlis, A. Gross, *Biomaterials*, **25**, 2004, 4935.
[14] H. Qu, M. Wei, *Acta Biomaterialia*, **2**, 2006, 113.
[15] B. Ho Yoon, H.W. Kim, S.H. Lee, C.J. Bae, Y.H. Koh,Y.M. Kong, H.E. Kim, *Biomaterials*, **26**, 2005, 2957.

www.SID.ir

Archive of SID

[16] R. John, J. Farley, E. Wergedal, D. Baylink, *Science, New Series*, **222**, 1983, 330.

[17] H.W. Kim, E.J. Lee, H.E. Kim, V. Salih, J.C. Knowles, *Biomaterials*, **26**, 2005, 4395.

www.SID.ir