پژوهش درپزشکی (مجله پژوهشی دانشکده پزشکی)
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی
دوره ۳۵، شماره ۱، بهار ۱۳۹۰، صفحات ۳۸ تا ۴۲

مقاله اصلی
(Original Article)

مقایسه تاثیرمواد پیوندی Totudent و Bio-oss بر روی فعالیت میتوکندری وآلکالین فسفاتازی سلول‌های شبه استئوبلاست saos-2

طاهره فروتن*[۱]، نادر ایوبیان[۲]، مایسا ملاحی[۲]، نریمان مصفا[۳]

[۱] گروه زیست شناسی، دانشگاه تربیت معلم
[۲] گروه پریودنتولوژی، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی تهران
[۳] گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

چکیده

سابقه و هدف: *عامل مهم تعیین کننده در موفقیت انواع مواد جایگزین استخوان (Bone Substitute Material [BSM])، رفتار بیولوژیک و هیستولوژیک این مواد می‌باشد که به صورت ارزیابی مورفولوژی، نرخ بقا و میزان پرولیفراسیون و همچنین میزان فعالیت‌های استخوانی سلول‌های استئوژنی دندان مورد توجه قرار می‌گیرد. این تحقیق با هدف بررسی و مقایسه تاثیر دو ماده Totudent و Bio-oss بر نرخ بقا و تکثیر و همچنین فعالیت آلکالین فسفاتازی سلول‌های شبه استخوانی Saos-2 بصورت in vitro انجام شد.*

روش بررسی: *این تحقیق به روش تجربی و بصورت in vitro بر روی اثر دو نوع ماده پیوند استخوان Totudent و Bio-oss بر رده سلول‌های شبه استخوان saos-2 انجام شد. سه گروه شامل دو گروه تجربی و گروه شاهد بررسی شدند که از هر گروه ۱۲ تکرار انتخاب گردید. در روز ۱۵ کشت اقدام به تعیین نرخ بقای سلولی با تست MTT و بررسی فعالیت آنزیمی آلکالین فسفاتاز گردید.*

یافته‌ها: *در مورد نرخ بقای سلولی، میزان آن در گروه‌های Bio-oss و Totudent در مقایسه با گروه شاهد به طور معنی‌داری کاهش پیدا کرده بود. این میزان در Totudent به طور معنی‌داری بالاتر از Bio-oss بود .از لحاظ مورفولوژی کروی شکل، بیشترین تعداد در نمونه‌های Bio-oss و سپس به ترتیب در شاهد و Totudent مشاهده شد که این اختلاف به لحاظ آماری معنی‌دار بود ($p<0/001$). میزان فعالیت آلکالین فسفاتاز گروه Totudent از دو گروه دیگر بیشتر بود.*

نتیجه‌گیری: *سلول‌های شبه استخوانی Saos-2 نتایج سلولی و مولکولی بهتری را درمحیط کشت در واکنش با ماده پیوند استخوان Totudent در مقایسه با Bio-oss از خود نشان داده و از خواص بیولوژیکی مناسب‌تری برخوردار هستند.*

واژگان کلیدی: *مواد جایگزین استخوان، رده سلولی saos-2 ، نرخ بقا، آلکالین فسفاتاز.*

مقدمه

پیوندهای استخوانی به طور معمول در جراحی‌های ارتوپدیک، دهانی و فکی- صورتی مورد استفاده قرار می‌گیرند. در دهه اخیر استفاده از استخوان اسفنجی و کورتیکال به صورت پیوند اتوژن به عنوان موادی با بیشترین سازگاری بافتی در جراحی‌های بالینی قابل قبول بود. گرچه پیوندهای استخوانی اتوژن به لحاظ خصوصیات استئوژنی ایده‌آل‌ترین حالت محسوب می‌گردند، اما مشکلاتی مثل مرگ و میر سایت دهنده و از کار انداختن عضو پیوند شده اتوژن، استفاده از این روش را با محدودیت‌هایی مواجه می‌کند (۱). امروزه گزارشات مختلفی در مورد کاربرد بالینی انواع مواد جایگزین استخوان منتشر شده است که نشان دهنده موفقیت کاربرد بالینی این مواد در علم دندانپزشکی می‌باشد (۴-

آدرس نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه تربیت معلم، گروه زیست شناسی، طاهره فروتن
(**e-mail:** Taherforoutan546@gmail.com)
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۹/۶/۲
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۸۹/۹/۲۹

۲). این گرافت‌های استخوانی می‌توانند مشتق از انسان، گاو، گیاهان (بیولوژیک) و یا مواد کاملا سنتتیک باشند (۲، ۳، ۵، ۶). موفقیت در کاربرد BSM بستگی به خواص فیزیکی و شیمیایی این مواد داشته که به صورت مورفولوژی و تکثیر و نرخ بقای سلول‌های استئوژنیک ارزیابی می شود (۱، ۱۰-۷). مواد جایگزین استخوان از نظر خواص فیزیکی و شیمیایی به خوبی توصیف شده‌اند، ولی به لحاظ رشد سلول‌های استخوانی در هنگام مواجهه با آنها، Biocompatibility و همچنین مقایسه مواد مختلف با هم کمتر مورد بررسی قرار گرفته‌اند. تاکنون مطالعات مختلف محیطی در رابطه با رفتار بیولوژیکی انواع BSM صورت پذیرفته و نتایج متفاوتی هم گزارش شده است (۱۱-۷).

Osseintegration مواد جایگزین استخوان بستگی به فعالیت سلول‌های پیرامونی آنها دارد. به طور کلی مهاجرت و پرولیفراسیون سلول‌های زنده استخوانی به طور اساسی تحت تاثیر روابط متقابل بین سلول‌های فوق و BSM می‌باشد (۷).

این تحقیق با هدف مقایسه تاثیر مواد Totudent و Bio-oss بر روی سلول‌های شبه استخوانی saos-2 انجام شد.

مواد و روشها

تحقیق با طراحی تجربی از نوع in vitro انجام گرفت. دو نوع بیومتریال به همراه سلول‌های شبه استئوبلاست انسانی saos-2 در این مطالعه استفاده شدند. مواد مورد مطالعه از نوع Xenografts بودند که در افزایش ساخت استخوان و بازسازی بافت سخت از دست رفته درجراحی‌های فکی- صورتی یا ضایعات استخوانی استفاده می‌شوند. این مواد شامل Bio-oss (Bio-oss® ,Geistlich Bio-Materials,Switzerland) و Tutodent (Tutodent ® Microchips-Tutogen Medical Gmbh,Germany) بودند.

سلول‌های شبه استئوبلاست انسانی saos-2 در ۳۷ درجه سانتی-گراد در اتمسفر مرطوب (۹۵ درصد هوا و ۵ درصد Co2) اینکوبه شدند که محیط کشت شامل DMEM (Dulbecco 's Medium (Gibco) stereptomycin- (Gibco)(Modified Eagle penicilin100µg/ml, و10%FBS (Gibco) بود. محیط‌های کشت ۳ بار در هفته تعویض شدند. این سلول‌ها پس ازتکثیر سلولی در سومین پاساژ ازسلول‌های کشت داده شده توسط محلول استریل Trypcin-EDTA از محیط کشت جدا شدند و با دانسیته ۲×۱۰^{۴} cell/well داخل انکوباتور قرار گرفتند. پس از ۷۲ ساعت، ۳۰ میلی‌گرم از هر ماده گرافت استخوانی به داخل هر خانه اضافه شد. سلول‌های saos-2 که هیچ‌یک از دو ماده پیوندی به آنها اضافه نشده بود به عنوان گروه شاهد در نظر گرفته شدند. برای سنجش نرخ بقا از تست MTT (Methil Tiazole Tetrazolium) استفاده شد. تست MTT براساس روش رنگ-سنجی طراحی و برپایه احیا و شکسته شدن ماده متیل تیازول تترازولیوم توسط انزیم سوکسینات دهیدروژنازمیتوکندری درسلول زنده وفعال استواراست .حاصل این فرایندتولید بلورابی رنگ فورمازان در سیتوپلاسم سلول میباشد.حساسیت این روش بالای ۹۸ درصد می‌باشد. پس از اتمام انکوباسیون در روز ۱۵، تست MTT انجام شد. ۱۰۰ میکرولیتر محیط حاوی (SIGMA-Lot num: 06H070632,SIGMA-Aldrich®,USA) MTT به هرخانه اضافه شد و به مدت ۴ ساعت در انکوباتور حاوی CO2 در ۳۷ درجه سانتی گراد قرارداده شد. بعد از ۴ ساعت مایع رویی برداشته شد و ۱۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول اسید ۰/۴ درصد به هر خانه اضافه شد. انکوباسیون در حرارت اتاق و دور از نور به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. در نهایت، جذب نوری محلول به دست آمده در ۶۲۰nm به عنوان طول موج reference و 492nm به عنوان طول موج measurement در دستگاه Elisa Reader Anthos 2020 ver1.8,Anthos Lab Tec (Instruments®,Austria) به ثبت رسانده شد. فعالیت آلکالین فسفاتاز به عنوان یک پارامتر برای فعالیت استئوبلاستی مطرح می باشد. برای این منظور ازکیت آلکالین فسفاتاز استفاده شد.

برای تحلیل آماری از روش‌های one- way ANOVA و Post Hoc استفاده گردید.

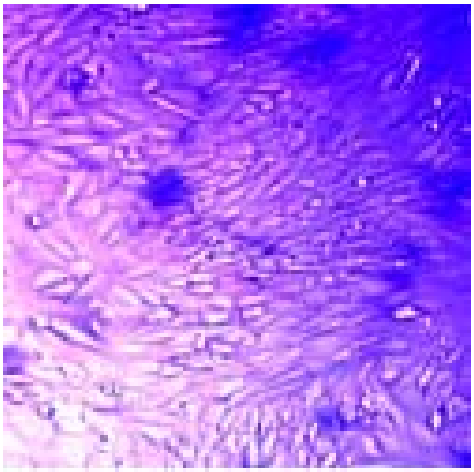
یافته‌ها

تحقیق بر روی ۳۶ نمونه در سه گروه ۱۲ تایی انجام گرفت. شکل ۱ سلول‌های saos-2 و مواد پیوند استخوان را سه روز پس از کشت نشان می‌دهد. میزان فعالیت میتوکندری در سلول‌های شبه استخوانی که در سه گروه مورد مطالعه در جدول ۱ ارائه شده است و نشان می‌دهد که فعالیت گروه شاهد بیشتر از گروه توتودنت می‌باشد، در ضمن سلول‌ها در گروه توتودنت فعالیت میتوکندریایی بیشتری از سلول‌های گروه بایو- اس از خود نشان می‌دهند. آزمون ANOVA نشان داد که این اختلافات به لحاظ آماری معنی‌دار بود ($p<۰/۰۰۱$). به دلیل اینکه پراکندگی داده‌ها درگروه‌های مختلف با یکدیگر اختلاف معنی‌داری داشت، از آزمون Post Hoc استفاده شد. این آزمون، معنی‌دار بودن اختلاف در بین دو گروه شاهد و توتودنت ($p<۰/۰۳$)، شاهد و بایو – اس ($p<۰/۰۰۲$) و توتودنتو بایو- اس ($p<۰/۰۰۱$) را تایید نمود.

جدول ۱- میزان فعالیت میتوکندری به تفکیک گروه‌ها(برحسب دانسیته اپتیک)

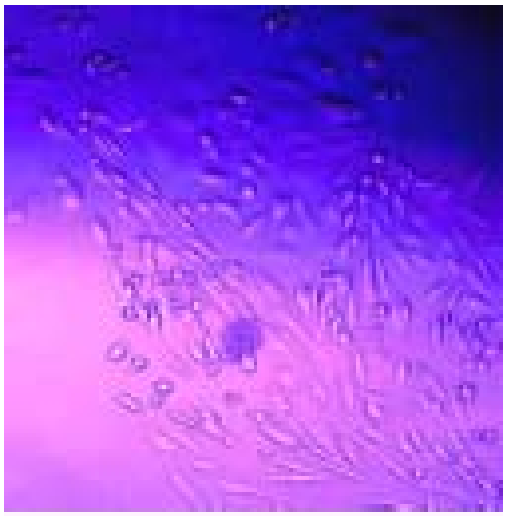
	میانگین ± خطای معیار	ضریب تغییرات
Tutodent	۰/۳۴۸±۰/۰۲۶	۷/۵
Bio-oss	۰/۲۲۲±۰/۰۴۰	۱۸
شاهد	۰/۵۲۸±۰/۰۴۹	۹/۳

در رنگ‌آمیزی آلکالین فسفاتاز، در برخی مناطق پلیت‌های کشت سلولی، توده‌های ارغوانی مایل به قرمز مشاهده می‌شود که بیانگر واکنش مثبت سلول‌های شبه استخوان نسبت به آنزیم است (شکل ۲). این توده‌ها در هر سه گروه مشاهده شدند. نمودار ۲ نشان می دهد که قطعات قرمز رنگ موجود در Totudent نسبت به هر دو گروه شاهد و Bio-oss افزایش معنی‌داری را از خود نشان می‌دهد. ضمن اینکه افزایش فعالیت آنزیم فوق، در گروه Totudent نسبت به Bio-oss به طور معنی‌داری افزایش یافته بود ($p<۰/۰۰۱$).



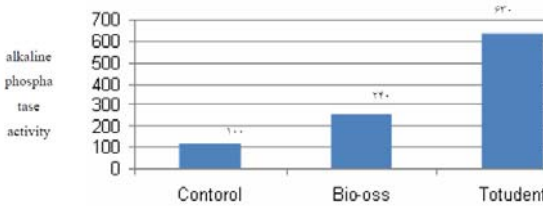
الف

ب

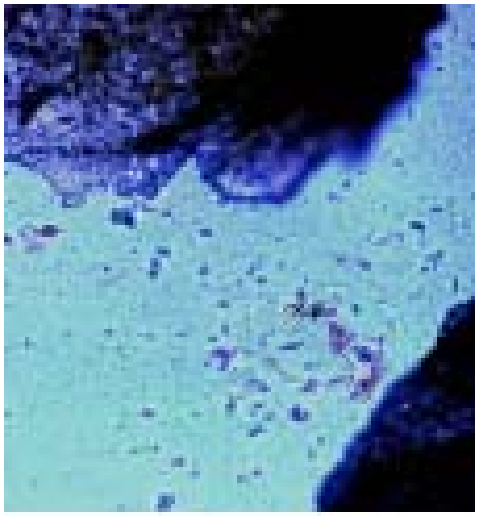


ج

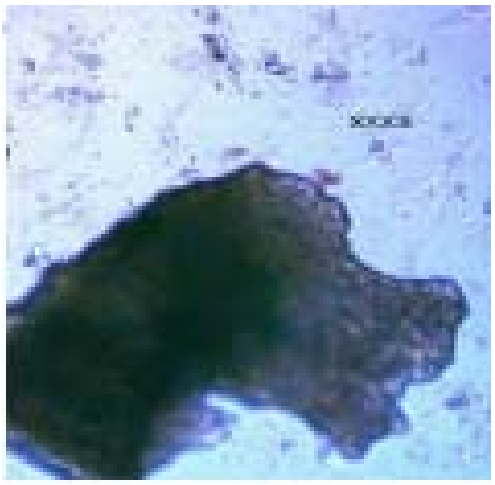
شکل ۱- سلول‌های شبه استخوانی Saos-2 که سه روز پس از کشت، بون گرفت به آن افزوده شده است. گرافت به رنگ تیره دیده می‌شود. بزرگنمایی 25X. الف: Totudent، ب: Bio0oss، ج: شاهد.



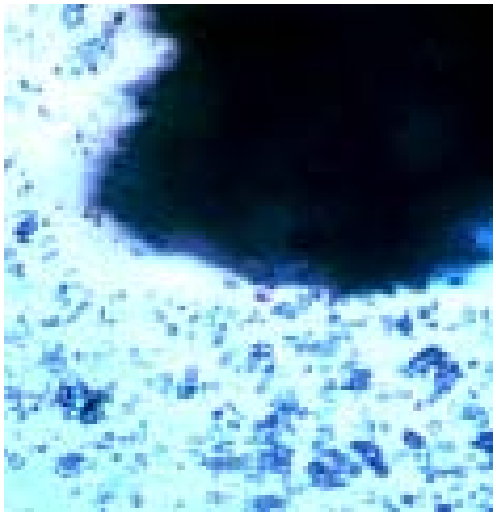
نمودار ۱- توزیع نمونه‌ها بر حسب فعالیت آلکالین فسفاتازی به تفکیک گروه‌ها



الف



ب



ج

شکل ۲- تشکیل توده‌های قرمز رنگ (**) نشان دهنده فعالیت آلکالین فسفاتاز. بزرگنمایی 100X. الف: Totudent، ب: Bio-oss، شاهد

بحث

درمطالعه حاضر نتایج حاصل از سنجش نرخ بقای سلولی (cell viability) نشان داد که بالاترین سرعت تکثیر سلولی در گروه شاهد است، در حالی که سرعت تکثیر سلولی در بیومتریالهای Bio-oss و Totudent به طور معنی‌داری پایین‌تر بود. در این میان نرخ بقای سلولی در نمونه‌های حاوی Totudent به طور معنی‌داری بیشتر از Bio-oss بود. به نظر می‌رسد که Totudent و Bio-oss علی‌رغم اثر القایی خوب برای استخوان سازی فعالیت آلکالین فسفاتازی، میزان نرخ بقا و پرولیفراسیون سلولهای Saos-2 را کاهش دهد که این اثر در مورد Bio-oss بیشتر بود. این نتیجه در راستای نظر برخی دیگر از تحقیقات است (۷). Herten etal در بررسی مشابهی در مورد Bio-oss و Totudent نشان دادند که نرخ بقای سلولی در گروه Totudent بالاتر از گروه شاهد بود و نمونه-های حاوی Bio-oss پایین‌ترین نرخ بقای سلولی را داشتند. آنها نتیجه گیری کردند که ترکیبات گرانولر هیدروکسی آپاتایت و همچنین ترکیبات بتا و آلفا- TCP پرولیفراسیون سلولی را در محیط کشت سلولی In-Vitro حمایت می‌کنند. Trentz و همکاران (۱۳) نشان دادند که از لحاظ نرخ بقای سلولی تفاوت معنی داری بین دو نوع SDCB xenogenic و allogenic وجود ندارد. همچنین برخلاف یافته‌های تحقیق حاضر، آنها نشان دادند که میزان Cell viability سلول‌های استئوبلاست در مجاورت مواد پیوندی فوق تفاوت معنی‌داری با گروه شاهد ندارد.

Kubler و همکاران (۸) نشان دادند که میزان پرولیفراسیون و نرخ بقای سلولی سلول‌های استئوبلاست انسانی در محیط کشت حاوی pepGen p-15 از گروه شاهد بالاتر بود، در حالی که Bio-Oss پایین‌ترین میزان نرخ بقا سلولی را در بین نمونه-های مورد بررسی دارا بود.

Wiedman Al Ahmad (۱۴) سلول‌های شبه استئوبلاست انسانی را روی ۱۶ نوع بیومتریال مختلف کشت دادند. در تحقیق آنها میزان رشد سلول‌ها در مورد Bio-oss از همه کمتر بود. برخلاف یافته‌های تحقیق حاضر وتحقیقات ذکر شده، تحقیقات دیگر نتایج خوبی را در محیط‌های کشت سلولی از نظر cell viability، برای bio-oss ذکر کرده‌اند (۱۶،۱۵). اختلاف در نتایج فوق به دلیل اختلاف درپروتکل و روش تحقیق می‌باشد. به طور مثال درتحقیق Acyl و همکاران (۱۵)، از مواد پیوند استخوانی (BSM) به صورت block و نه گرانولر استفاده شده بود، تراکم استخوانی استئوبلاست در محیط کشت بالاتر بود و نتایج بعد از۴هفته بررسی شد، در حالی که در تحقیق ما و تحقیقات دیگر حداکثر ۲۱ روز زمان کشت سلولی بود.

یکی از مارکرهای مطرح در فرآیند استخوان‌سازی بیان ژن آلکالین فسفاتاز می‌باشد. تشکیل فراوان‌تر ندول‌های صورتی رنگ آلکالین فسفاتاز در گروه Totudent در مقایسه با گروه شاهد و Bio-oss می‌تواند نشان دهنده روند تمایزی بیشتر در اثر خاصیت القایی این ماده باشد.

Kubler و همکاران (۸) در رابطه با میزان فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز (ALP) گزارش کردند که گروه شاهد بدون هیچ نوع ماده پیوندی بیشترین میزان سطح آنزیم ALP را دارا بود. گروه حاوی pepGemn-p15 بیشترین سطح مناسب آنزیم

ALP و Bio-Oss پایین‌ترین میزان فعالیت آنزیم فوق را نشان دادند. به طور کلی می‌توان نتیجه‌گیری کرد که سلول‌های شبه استخوانی Saos-2 نتایج سلولی و مولکولی بهتری را درمحیط کشت در واکنش با ماده پیوند استخوانTotudent در مقایسه با Bio-oss از خود نشان داده و از خواص بیولوژیکی مناسب‌تری برخوردار هستند.

REFERENCES

1. Schmitt SC, Wiedmann-Al-Ahmad M, Kuschnierz J, Al-Ahmad A, Huebner U, Schmelzeisen R, et al. Comparative in vitro study of the proliferation and growth of ovine osteoblast-like cells on various alloplastic biomaterials manufactured for augmentation and reconstruction of tissue or bone defects. J Mater Sci Mater Med 2008; 19: 1441-50.
2. Buser D, Dula K, Belser U, Hirt HP. Localized ridge augmentation using guided bone regeneration. 1. surgical procedure in the maxilla . Int J periodontics Restorative Dent 1993; 13: 29-45.
3. Froum SJ, Tarnow DP, Wallace SS, Roher MD. Sinus floor elevation using Anorganic bovine bone matrix (Osteograft/N) with and with out autogenous bone: a clinical, histologic, radiographic and histomorphometric analysis-part 2 of an ongoing prospective study. Int J Periodontics Restorative Dent 1998; 18: 528-43.
4. Fugazzotto PA, Shanaman R, Manos T. Guided bone regeneration around titanium implants: report of treatment of 1,503 sites with clinical reentries. Int J Periodontics Restorative Dent 1997; 17: 292-99.
5. Callan DP, Salkeld SL ,Scarborough N. Histologic analysis of implant sites after grafting with demineralized bone matrix putty and sheets. Implant Dent 2000; 9: 36-44.
6. Watzinger F, Luksch J, Millesi W, Schopper C. Guided bone regeneration with titanium membranes: a clinical study. Br J Oral Maxillofac Surg 2000; 38: 312-15.
7. Herten M, Rothamel D, Schwarz F, Friesen K, Koegler G, Becker J. Surface- and nonsurface- dependent in vitro effects of bone substitutes on cell viability. Clin Oral Investig 2009; 13: 149-55.
8. Kubler A, Neugebauer J, Oh JH, Scheer ME, Zoller J. Growth and proliferation of human osteoblasts on different bone graft substitutes. Implant Dent 2004; 13: 171-79.
9. Mayr-Wohlfart U, Fiedler J, Gunther KP, Puhl W, Kessler S. Proliferation and differentiation rates of a human osteoblast-like cell line (SaOS-2) in contact with different bone substitute materials. J Biomed Mater Res 2001; 57: 132-39.
10. Alcaide M, Serrano MC, Pagani R, Sanchez-Salcedo S, Vallet-Regi M, Portoles MT. Biocompatibility markers for the study of interactions between osteoblasts and composite biomaterials. J Biomaterials 2009; 30: 45-51.
11. Wang X, Fan H, Xiao Y, Xingdorg Z. Fabrication and characterization of porous hydroxyapatite/β-tricalcium phosphate ceramics by microwave sintering. Mater Left 2006; 60: 455-58.
12. Fleckenstein KB, Cuenin MF, Peokock ME, Billman MA. Effect of hydroxyapatite tricalcium phosphate alloplast on osseous repair in the rat clavarium. J periodontal 2006; 77: 39-45.
13. Knabe C, Gildenhaar R, Berger G, Ostapowicz W, Fitzner R, Radlanski RJ, et al. Morphological evaluation of osteoblasts cultured on different calcium phosphate ceramics. Biomaterials 1997; 18: 1339-47.
14. Trentz OA, Platz A, Helmy N, Trents O. Response of osteoblastic cultures to titanium,steel and hydroxyapatite implants. Swiss Surg 1998; 4: 203-209.
15. Wiedman-Al-Ahmad M, Gutwald R, Gellrich NC, Hubner U. Search for ideal biomaterials to cultivate human osteoblast-like cells for reconstructive surgery. J Master Sci Mater Med 2005; 16: 57-66.
16. Acil Y, Springer IN, Broek V, Jepsen S. Effect of bone morphogenetic protein-7 stimulation on osteoblasts cultured on different biomaterials. J Cell Biochem 2002; 86: 90-98.