دانشگاه صنعتی امیرکبیر

(*پلی‌تکنیک تهران*)

دانشکده مهندسی پلیمر

پایان‌نامه کارشناسی ارشد

طراحی و ساخت بسترهای کامپوزیتی پلیمر- سرامیک نانوساختار زیست‌تخریب‌پذیر به منظور تمایز سلول‌های بنیادی به سلول‌های استخوان‌ساز

نگارش: سید شهروز زرگریان

استاد راهنما:

دکتر وحید حدادی اصل

اساتید مشاور

دکتر مسعود سلیمانی

دکتر یوسف محمدی

پاییز ۱۳۸۷

دانشگاه صنعتی امیرکبیر
(پلی‌تکنیک تهران)

بسمه تعالی

فرم اطلاعات پایان‌نامه
کارشناسی- ارشد و دکترا

تاریخ: ۱۳۸۷/۱۰/۱۴
شماره:

معاونت پژوهشی
فرم پروژه تحصیلات تکمیلی ۷

مشخصات دانشجو:

نام و نام خانوادگی: **سید شهروز زرگریان** دانشجوی آزاد ● بورسیه ○ معادل ○

شماره دانشجوئی: **۸۵۱۳۲۰۲۳** دانشکده: **مهندسی پلیمر** رشته تحصیلی: **مهندسی پلیمر- صنایع پلیمر** گروه: **پلیمر**

مشخصات استاد راهنما:

نام و نام خانوادگی: **دکتر وحید حدادی اصل** درجه و رتبه: **استاد**

نام و نام خانوادگی: -------- درجه و رتبه: --------

مشخصات استاد مشاور:

نام و نام خانوادگی: **مسعود سلیمانی** درجه و رتبه: **استادیار**

نام و نام خانوادگی: **یوسف محمدی** درجه و رتبه: **دکترای بایومتریال**

عنوان پایان‌نامه به فارسی: فارسی: طراحی و ساخت بسترهای کامپوزیتی پلیمر-سرامیک نانوساختار زیست‌تخریب‌پذیر به منظور تمایز سلول‌های بنیادی به سلول‌های استخوان‌ساز

عنوان پایان‌نامه به انگلیسی:

Design and fabrication of nonostructural biodegradable polymer-ceramic composite matrices for the ostegenic differentiation of stem cells.

نوع پروژه: کارشناسی ○ ارشد ● دکترا ○ سال تحصیلی: ۱۳۸۴ تا ۱۳۸۷

کاربردی ● بنیادی ● توسعه‌ای ○ نظری ○

تاریخ شروع : **تیر ۱۳۸۶** تاریخ خاتمه : **۳۰ آذر ۱۳۸۷** تعداد واحد : **۹** سازمان تأمین کننده اعتبار: شرکت فناوری بن یاخته

واژه‌های کلیدی به فارسی: زیست تخریب پذیری، بایوپلیمر، بازسازی استخوان، سرامیک، ساختار نانو، سلول بنیادی

واژه‌های کلیدی به انگلیسی:

Biodegradation, Biopolymer, Bone regeneration, Ceramic, Nanostructure stem cell

مشخصات ظاهری	تعداد صفحات **۱۴۹**	تصویر **۱۰** جدول **۱۳** نمودار **۷۵** نقشه **۰** واژه‌نامه **۰**				تعداد مراجع **۱۲۷**	تعداد صفحات ضمائم **۰**
زبان متن	فارسی ●	انگلیسی ○	چکیده	فارسی ●	انگلیسی ●		
یادداشت							

نظرها و پیشنهادها به منظور بهبود فعالیت‌های پژوهشی دانشگاه

استاد:

دانشجو: انجام پروژه‌های دوره دکتری و کارشناسی ارشد به‌صورت طرح‌های مشترک با صنعت ویا مراکز تحقیقاتی نیمه‌صنعتی

امضاء استاد راهنما: **تاریخ:**

نسخه۱: ارائه به معاونت پژوهشی به همراه یک نسخه الکترونیکی از پایان‌نامه و فرم اطلاعات پایان‌نامه بصورت PDF همراه چاپ چکیده (فارسی انگلیسی) و فرم اطلاعات پایان‌نامه
نسخه۲: ارائه به کتابخانه دانشکده (به همراه نسخه الکترونیکی فرم و دو جلد پایان‌نامه و لوح فشرده طبق نمونه اعلام شده در صفحه خانگی کتابخانه مرکزی مرکزی)

تقدیم به

پدر و مادر عزیزم

به پاس

محبت و ایثارشان

چکیده

امروزه عمده‌ترین روش‌پیوندزنی استخوان، پیوندزنی آلوپیوند[1] و اتوپیوند[2] است که در صدمات و جراحت‌های ناشی از تصادفات و نقص‌های ژنتیکی بسیار مورد استفاده قرار می‌گیرد. با این حال، روش‌های مذکور خطرات مختلفی از جمله فساد مراکز دهنده[3]، ناهنجاری‌های تغذیه بافت پیوندزده شده[4]، صدمات و عوارض جانبی و ناراحتی و رنج مریض را با خود به همراه دارد. در این میان مهندسی بافت استخوان با بهره‌گیری از داربست‌های زیست‌سازگار زیست‌تخریب‌پذیر متصل به سامانه یاخته‌ای و عوامل تمایزی به عنوان یکی از بهترین جایگزین‌های پیوندزنی معمول استخوان شناخته می‌شود. در نوشته حاضر، چگونگی ساخت داربست مذکور آورده شده است. این داربست شامل سه قسمت پلیمری مجزا و یک بخش معدنی (نانوذره) است. روش الکتروریسی برای ساخت داربست و به منظور شبیه‌سازی بافت طبیعی استخوان مورد استفاده قرار گرفت. تأثیر پارامترهای فرآیندی مختلف بر مورفولوژی داربست، قطر الیاف، میزان تخلخل، میزان بلورینگی و استحکام نهایی بررسی شد. مورفولوژی داربست با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی مشاهده شده و همچنین توزیع قطر الیاف با استفاده از نرم‌افزار ایمیج‌جی[5] ترسیم گردید و کل فرآیند با استعانت از بازخورد حاصل از بررسی عکس‌ها و دیاگرام‌های توزیع قطر اصلاح گردید. میزان چسبندگی، رشد، تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی توسط RTPCR و کیت‌های مخصوص تشخیص پروتئین تخمین زده شد. با وجود اینکه تمامی داربست‌ها از تکثیر و تمایز سلول‌ها حمایت کردند، داربست‌های کامپوزیتی رخ‌مانه مؤثرتری از بافت استخوانی را حاصل ساختند. با توجه به نتایج حاصله می‌توان نتیجه گرفت که نانوذرات هیدروکسی‌آپاتیت در هدایت استخوانی و فاز کیتوسان در تمایز موثر و زود هنگام سلول‌های بنیادی، نقش ویژه‌ای را به عهده دارند. داربست نانوالیافی کامپوزیتی طراحی شده در این پروژه، توانایی کاربرد در مهندسی بافت استخوان را داراست.

[1] Allograft
[2] Autograft
[3] Site Donor Morbidity
[4] Harvesting Of The Grafted Tissue
[5] ImageJ Software

فهرست

فصل اول: ساختارشناسی و مهندسی بافت استخوان..... ۱
۱-۱- ساختار استخوان ۲
۱-۲- سلول‌های استخوانی ۵
۱-۲-۱- اوستئوبلاست‌ها ۵
۱-۲-۲- اوستئوسیت‌ها ۶
۱-۲-۳- سلول‌های استخوانی خطی پیوندی ۶
۱-۲-۴- اوستئوکلاست‌ها ۶
۱-۳- اجزای استخوان ۷
۱-۳-۱- کلاژن نوع یک ۷
۱-۳-۲- پروتئین‌های غیرکلاژنی ۸
۱-۳-۲-۱- عامل متصل‌کننده هسته ۱ ..... ۸
۱-۳-۲-۲- اوستئوکلسین ۹
۱-۳-۲-۳- اوستئونکتین ۹
۱-۳-۲-۴- اوستئوپونتین ۱۰
۱-۳-۲-۵- سیالوپروتئین استخوانی (بی‌اس‌پی۲) ۱۰
۱-۳-۲-۶- فسفاتازآلکالین (ای‌ال‌پی) ۱۰
۱-۳-۳- هیدروکسی‌آپاتیت ۱۲
۱-۴- راهبردهای رایج درمان بافت استخوانی ۱۲
۱-۴-۱- اتوپیوند ۱۳
۱-۴-۲- آلوپیوند ۱۳
۱-۴-۳- جایگزین‌های پیوند استخوانی ۱۴
۱-۵- مهندسی بافت استخوان ۱۵
۱-۵-۱- داربست‌های مهندسی بافت استخوان ۱۵
۱-۵-۱-۱- هدایت استخوانی ۱۵
۱-۵-۱-۲- القای استخوانی ۱۶
۱-۵-۱-۳- یکپارچگی استخوانی ۱۶
۱-۵-۱-۴- استخوان‌زایی ۱۶
۱-۵-۱-۵- زیست‌سازگاری ۱۶
۱-۵-۱-۶-خواص مکانیکی قابل انطباق ۱۷

۱-۵-۲- داربست‌های کامپوزیتی مهندسی بافت ۱۷
۱-۵-۳- مواد به کار رفته در داربست‌های مهندسی بافت ۱۷
۱-۵-۳-۱- پلیمرهای طبیعی ۱۸
۱-۵-۳-۱-۱- کلاژن ۱۸
۱-۵-۳-۱-۲- اسید هیالورونیک ۱۸
۱-۵-۳-۱-۳- کیتوسان ۱۹
۱-۵-۳-۲- پلیمرهای سنتزی ۱۹
۱-۵-۳-۲-۱- پلی(هیدروکسی‌آلکانوآت) ۲۰
۱-۵-۳-۲-۲- پلی(انیدرید) ۲۰
۱-۵-۳-۲-۳- پلی(آلفا-هیدروکسی‌استر) ۲۱
فصل دوم: نانوفناوری و نانوالیاف ۲۳
۲-۱- داربست‌های نانوالیاف ۲۵
۲-۲- روش‌های تولید نانوالیاف ۲۷
۲-۲-۱- دیدگاه پایین به بالا ۲۷
۲-۲-۲- دیدگاه بالا به پایین ۲۸
۲-۲-۲-۱- کشش ۲۸
۲-۲-۲-۲- سنتز با الگوی ساختاری ۲۸
۲-۲-۲-۳- جدایی فازی ۲۹
۲-۲-۲-۴- الکتروریسی ۲۹
۲-۳- کلیات فرآیند الکتروریسی ۲۹
۲-۳-۱- شاخص‌های کنترل‌کننده فرآیند الکتروریسی ۳۳
۲-۳-۱-۱- خواص محلول پلیمری ۳۳
۲-۳-۱-۱-۱- ویسکوزیته محلول ۳۳
۲-۳-۱-۱-۲- وزن مولکولی و ویسکوزیته پلیمر ۳۳
۲-۳-۱-۱-۳- غلظت محلول و ویسکوزیته پلیمر ۳۴
۲-۳-۱-۱-۴- کشش سطحی ۳۵
۲-۳-۱-۱-۵- هدایت محلول ۳۵
۲-۳-۱-۱-۶- تأثیر دی‌الکتریک حلال ۳۶
۲-۳-۱-۲- عوامل فرآیندی ۳۶
۲-۳-۱-۲-۱- ولتاژ ۳۶
۲-۳-۱-۲-۲- فاصله نازل تا جمع‌کننده ۳۷

۲-۳-۱-۲-۳- دبی ۳۷
۲-۳-۱-۲-۴- قطر نازل ۳۸
۲-۳-۱-۲-۵- نوع جمع‌کننده ۳۸
۲-۳-۱-۳- عوامل محیطی ۳۹
۲-۳-۱-۳-۱- رطوبت ۳۹
۲-۳-۱-۳-۲- فشار ۳۹
۲-۳-۱-۳-۳- طبیعت اتمسفر ۳۹
۲-۴- جمع‌بندی ٤۰
فصل سوم: بهینه‌سازی فرآیند الکتروریسی؛ مواد، تجهیزات، روش‌ها و نتایج ۴۳
۳-۱- مواد و روش‌ها ٤٤
۳-۲- تجهیزات و دستگاه‌ها ٥۰
۳-۲-۱- تامین‌کننده ولتاژ بالا ٥۰
۳-۲-۲- چینش الکتروریسی ٥۰
۳-۲-۳- سرنگ پمپ و لوله اتصال ٥۲
۳-۲-۴- جمع‌کننده ٥٤
۳-۲-۵- دستگاه ویسکومتر ٥٤
۳-۲-۶- هدایت‌سنج ٥٦
۳-۲-۷- همزن فراصوت ٥٦
۳-۲-۸- میکروسکوپ نوری ٥۷
۳-۲-۹- میکروسکوپ الکترونی ٥۸
۳-۲-۱۰- دستگاه اندازه‌گیری pH ٥۸
۳-۲-۱۱- ترازوی دیجیتالی الکتریکی ٥۹
۳-۲-۱۲- دستگاه کشش ٥۹
۳-۳- بحث و نتایج ٥۹
۳-۳-۱- ویسکومتری و هدایت‌سنجی ٦۱
۳-۳-۲- بهینه‌سازی فرآیند الکتروریسی ٦۱
۳-۳-۲-۱- بهینه‌سازی فرآیند الکتروریسی پلی(وینیل‌الکل) ٦۱
۳-۳-۲-۱-۱- تأثیر ولتاژ بر الکتروریسی پلی(وینیل‌الکل) (۷ درصد وزنی) ٦۲
۳-۳-۲-۱-۲- تأثیر TCD بر الکتروریسی پلی(وینیل‌الکل) (۷ درصد وزنی) ٦٥
۳-۳-۲-۱-۳- تأثیر ولتاژ بر الکتروریسی پلی(وینیل‌الکل) (۸ درصد وزنی) ٦۷
۳-۳-۲-۱-۴- تأثیر TCD بر الکتروریسی پلی(وینیل‌الکل) (۸ درصد وزنی) ۷۰

۳-۳-۲-۱-۴- جمع‌بندی نتایج بهینه‌سازی فرآیند الکتروریسی محلول پلی(وینیل‌الکل) ۷۱
۳-۳-۲-۲- بهینه‌سازی فرآیند الکتروریسی پلی(وینیل‌الکل)/کیتوسان ۷۲
۳-۳-۲-۲-۱- تأثیر ولتاژ بر فرآیند الکتروریسی پلی(وینیل‌الکل)/کیتوسان ۷۳
۳-۳-۲-۲-۲- تأثیر TCD بر فرآیند الکتروریسی پلی(وینیل‌الکل)/کیتوسان ۷۷
۳-۳-۲-۲-۳- جمع‌بندی نتایج بهینه‌سازی فرآیند الکتروریسی محلول پلی(وینیل‌الکل)/کیتوسان ۸۰
۳-۳-۲-۳- بهینه‌سازی فرآیند الکتروریسی پلی(کاپرولاکتون) ۸۱
۳-۳-۲-۳-۱- تأثیر ترکیب درصد سامانه حلالی و غلظت محلول بر الکتروریسی PCL ۸۲
۳-۳-۲-۳-۲- تأثیر ولتاژ بر فرآیند الکتروریسی پلی(کاپرولاکتون) ۸۸
۳-۳-۲-۳-۳- تأثیر TCD بر فرآیند الکتروریسی پلی(کاپرولاکتون) ۸۹
۳-۳-۲-۳-۴- جمع‌بندی نتایج حاصله از آزمایشات بهینه‌سازی فرآیند الکتروریسی PCL ۹۰
۳-۳-۲-۴- الکتروریسی محلول PCL- هیدروکسی‌آپاتیت ۹۲
۳-۳-۳- الکتروریسی سامانه نهایی ۹۶
فصل چهارم: بررسی‌های برون‌تنی داربست‌های نانوساختار ۱۰۱
۴-۱- مواد، تجهیزات و روش‌ها ۱۰۳
۴-۱-۱- طراحی و ساخت داربست‌ها ۱۰۳
۴-۱-۲- جداسازی و کاشت سلول ۱۰۳
۴-۱-۳- چینش آزمایشگاهی ۱۰۴
۴-۱-۳-۱- آزمون تکثیر سلولی ۱۰۴
۴-۱-۳-۲- میکروسکوپ الکترونی روبشی ۱۰۴
۴-۱-۳-۳- آزمون ALP ۱۰۵
۴-۱-۳-۴- آزمون OCN ۱۰۵
۴-۱-۳-۵- رونوشت معکوس واکنش زنجیری پلیمراز (RTPCR) ۱۰۶
۴-۱-۳-۶- داده‌های آماری ۱۰۷
۴-۲- نتایج ۱۰۷
۴-۲-۱- تخمین میزان تکثیر سلول ۱۰۷
۴-۲-۲- میکروسکوپ الکترونی روبشی ۱۰۸
۴-۲-۳- تخمین میزان ALP ۱۰۹
۴-۲-۴- تخمین میزان اوستئوکلسین ۱۱۱
۴-۳- آزمون Real Time ۱۱۳
۴-۳-۱- آلکالین‌فسفاتاز ۱۱۳
۴-۳-۲- اوستئوکلسین ۱۱۳

۴-۳-۳- کلاژن نوع ۱ ..... ۱۱۴
۴-۳-۴- سیالوپروتئین استخوانی ۱۱۴
۴-۳-۵- اوستئوپونتین ۱۱۵
۴-۳-۶- اوستئونکتین ۱۱۶
۴-۳-۷- عامل متصل‌کننده هسته ۱ ..... ۱۱۷
۴-۴- بررسی نتایج حاصله از آزمون‌های میزان بیان ژن ۱۱۸
۴-۵- جمع‌بندی ۱۲۳
فصل پنجم: نتیجه‌گیری و پیشنهادات **۱۲۶**
۵-۱- مراحل انجام پروژه ۱۲۷
۵-۱-۱- هدف پروژه ۱۲۷
۵-۱-۲- بهینه‌سازی داربست نهایی ۱۲۷
۵-۱-۳- آزمون‌های درون‌تنی ۱۲۷
۵-۲- پیشنهادات ۱۲۸
۵-۲-۱- داربست‌های سه بعدی ۱۲۸
۵-۲-۲- بایوراکتورها ۱۲۸
۵-۲-۳- اضافه‌سازی عوامل رشد و تمایز به بستر ۱۲۹
۵-۲-۴- بررسی نرخ تخریب ۱۲۹
۵-۲-۵- بررسی‌های درون‌تنی ۱۲۹
مراجع ۱۳۱

فصل اول:

ساختارشناسی

و مهندسی بافت

استخوان

مقدمه

امروزه ترمیم صدمات وارد شده به استخوان ناشی از تصادفات و سوانح رانندگی به یکی از بزرگترین مشکلاتی تبدیل شده است که بیمارستان‌ها و کلینیک‌های کل جهان با آن مواجه‌اند. همچنین نقص مادرزادی و یا از بین رفتن استخوان توسط بیماری‌های مختلف، به ابعاد این مشکل می‌افزاید. علارغم پیشرفت فناوری‌های دارویی و پزشکی، تعداد نواقص و مریضی‌های مربوط به بافت استخوانی به دلیل کاهش عمر متوسط افراد، افزایش روزافزون جمعیت، آلودگی‌های زیست محیطی و تنش‌های ناشی از زندگی ماشینی، کاهش چندانی نداشته است [۱]. نگاه تاریخی نیز بر این مطلب صحه می‌گذارد، تنها در دهه ۱۹۹۰ رشد جمعیت در آمریکا به مرض ۳۲/۷ ملیون نفر رسیده است که از تمام دهه‌های قرن ۲۰ بیشتر است. با توجه به پدیده پیرشدگی جمعیت[1]، پیشگیری‌ها و درمان‌ها مخصوصاً در زمینه اورتوپدی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار شده است [۲]. به عنوان مثال در ایالات متحده و در سال ۲۰۰۲ در حدود ششصد هزار جراحی پیوند استخوانی انجام پذیرفته است که این میزان جراحی در حدود ۲/۵ ملیون دلار ارزش‌گذاری شده است. از این روست که بودجه پژوهشی ویژه‌ای در زمینه درمان‌های مربوط به اورتوپدی از طرف کنگره پزشکی آمریکا در نظر گرفته شده است [۳].

۱-۱- ساختار استخوان

استخوان گونه‌ای اختصاصی از بافت مرتبط و متخلخل است که از نانوالیاف کلاژن و گرانول‌های پروتئوگلیسین تشکیل شده است [٤]. ساختار کلاژنی چینش منظمی از الیاف کلاژن در حد نانومتری و با ساختار کلی سه بعدی را دربردارد [٥]. وظیفه استخوان حفاظت از اجزای داخلی، ایجاد کردن استحکام مکانیکی و ذخیره یون‌های معدنی همانند کلسیم است [٦].

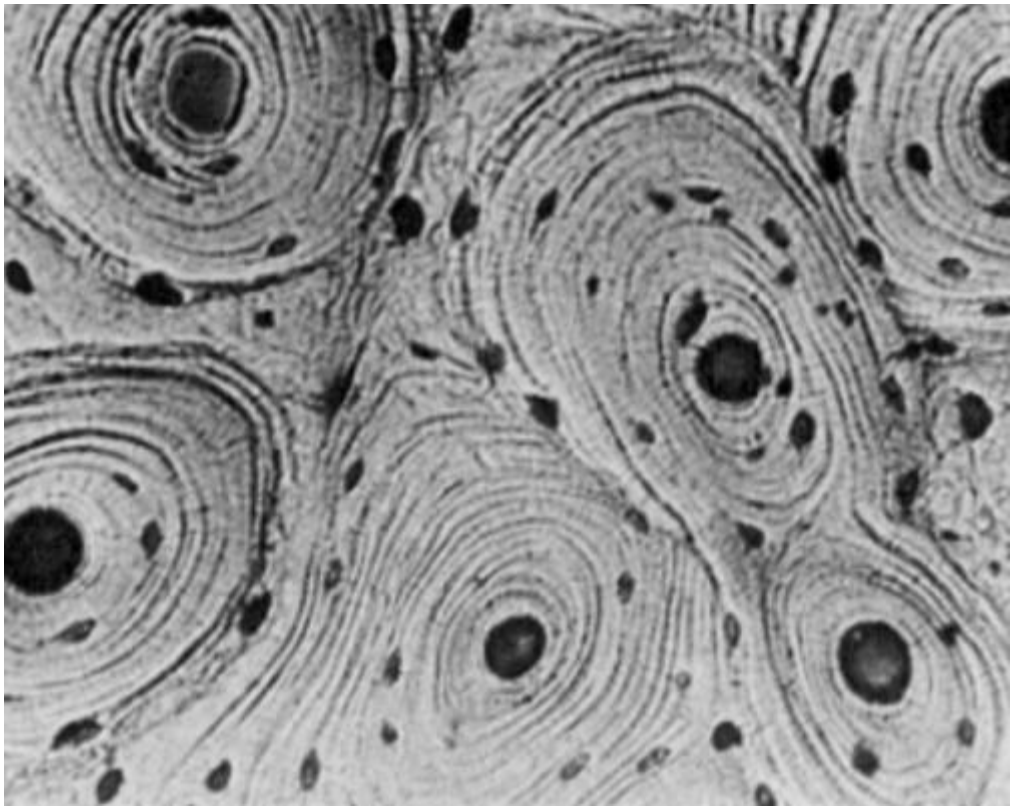
استخوان از لحاظ مورفولوژی به دو دسته کورتیکال[2](فشرده و سخت) و کنسلوس[3](اسفنجی و نرم) تقسیم می‌شود. استخوان‌های پهن شانه و استخوانه‌های دراز نمونه‌های از استخوان کورتیکال هستند [۷] (شکل ۱-۱).

[1] Population Aging
[2] Cortical
[3] Cancellous

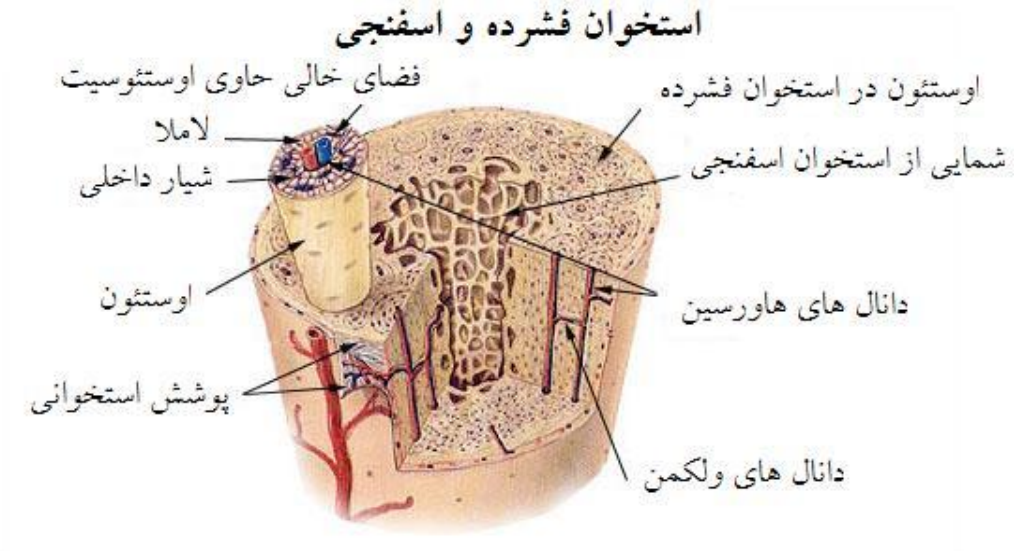
شکل ۱-۱: استخوان‌های کورتیکال و اسفنجی

الیاف کلاژن در استخوان کورتیکال فشرده‌اند. دوایر نزدیک به‌هم الیافی کلاژنی استخوان‌های کورتیکال را لاملا[1] نامند. رگ‌های خونی و شبکه عصبی از میان لاملاها به بافت‌های درونی استخوان راه می‌یابند (شکل ۱-۲). دانال‌های حاصله از کنار هم قرار گرفتن لاملاها، هاورسین[2] نام دارد. دانال‌های ولکمن[3] و دانال‌های هاورسین به صورت متقاطع با یکدیگر برخورد می‌کنند و به این صورت تمامی دانال‌ها به یکدیگر راه پیدا می‌کنند (شکل ۱-۳). کانال‌های مذکور راه‌گاه‌های اصلی ورود مواد مغذی، راه‌گاه‌های اصلی خروج مواد زائد و درگاه‌های اصلی ورود وخروج پیام‌های شبکه عصبی هستند. لایه بیرونی استخوان کورتیکال توسط غشای سختی به نام پیرستیوم[4] پوشانده شده است. شبکه‌های خونی و عصبی که وظیفه تغذیه، اکسیژن رسانی، خروج مواد زائد و ارسال پیغام‌های عصبی به استخوان را دارند، غشای پیرستیوم را شکل می‌دهند [۸].

[1] Lamellae
[2] Haversian
[3] Volkmann
[4] Periosteum



شکل ۱-۲: لاملاهای متمرکز در استخوان کورتیکال



شکل ۱-۳: ساختارهای اسفنجی استخوان

استخوان‌های کنسلوس یا همان استخوان‌های اسفنجی ساختار ماتریسی غیر پیوسته‌ای را شبیه‌سازی می‌کنند و از طبیعت فوق‌العاده متخلخلی برخوردارند.

اختلاف اصلی مابین استخوان‌های اسفنجی و کورتیکال، به نوع ساختار و خواص عملکردی آنها مربوط می‌شود. وظیفه استخوان‌های کورتیکال حفاظت اجزای داخلی از تنش‌های خارجی و تامین استحکام مکانیکی است و این در حالی است که استخوان‌های اسفنجی عملکردهای متابولیک استخوان را به عهده دارند [۸].

۱-۲- سلول‌های استخوانی

اوستئوبلاست‌ها[1]، اوستئوکلاست‌ها[2]، اوستئوسیت‌ها[3] که به ساختار معدنی داخلی بافت نفوذ می‌کنند و سلول‌های استخوانی خطی پیوندی[4] که سطح استخوان را می‌پوشانند، چهار دسته اصلی سلول‌های استخوانی هستند. تمامی این سلول‌ها به نوعی مسئول عملکردهای ساختاری و متابولیکی استخوان هستند.

۱-۲-۱- اوستئوبلاست‌ها

اوستئوبلاست‌ها، سلول‌های تک‌هسته‌ای شکل‌دهنده استخوان هستند و بر روی سطح خارجی استخوان رشد می‌کنند. اجداد این دسته از سلول‌های استخوانی به سلول‌های خونی می‌رسد که در ابتدای شکل‌گیری بافت استخوانی رشد سریعی داشته و سپس به اوستئوبلاست تمایز[5] می‌یابند. همچنین این سلول‌ها پس از تمایز اولیه، فرآیند معدنی شدن را پشت سر گذاشته و به سلول‌های اوستئوسیت تبدیل می‌گردند. ساختار سلول‌های بالغ اوستئوبلاست، دارای هسته مجزا و شبکه سخت درون هسته‌ای است. همچنین سلول‌های بالغ دارای سامانه گولگی[6] هستند که این امر نشاندهنده توانمند شدن سلول در تولید پروتئین است. طی فرآیند رشد، بلوغ و تمایز سلول‌های خونی(با قابلیت‌های سلول‌های بنیادی[7]) به سلول‌های اوستئوبلاست، توانایی بیان پروتئین کلاژن نوع یک و دیگر پروتئین‌های غیرکلاژنی به وجود آمده و این امر به تشکیل ماتریس معدنی منجر می‌شود که استخوان نام دارد. همچنین تولید ژن مخصوص بیان کلاژن نوع ۱، به تمایز سلولی به اوستئوسیت می‌انجامد که البته سیر اینگونه تمایزها از

[1] Osteoblasts
[2] Osteoclasts
[3] Osteocytes
[4] Lining cell
[5] Differentiate
[6] Golgi
[7] Stemcell

سطح داخلی استخوان به سطوح خارجی‌تر دنبال می‌شود و به همین دلیل بعد از گذشت زمان نسبتاً کوتاه، سلول‌های اوستئوبلاست توسط ماتریس معدنی استخوان که خود در حال تمایز به اوستئوسیت است، پوشانده می‌شود.

۱-۲-۲- اوستئوسیت‌ها

ماتریس معدنی استخوانی توسط سلول‌های اوستئوبلاست ترشح می‌شود و گرداگرد آن را می‌پوشاند. پس از گذشت زمان و تجمع ماتریس استخوانی، اوستئوبلاست به سلول‌هایی با مواد درون سلولی کمتر و نسبت هسته به سیتوپلاسم بیشتر تبدیل می‌گردد. سلول‌های تبدیل شده اوستئوسیت نام دارند و در اوستئون[1] نظم می‌پذیرند و همچنین از طریق دراز کردن شاخک‌های خود از میان دالان‌های باریک درون ماتریس، با سلول‌های هم‌جوار خود ارتباط برقرار می‌کنند. برقراری ارتباط با سلول‌های همسایه به منظور انتقال داده‌های تنش- کرنش و منظم‌سازی متابولیسم بافت استخوانی، امری حیاتی است زیرا سلول‌های اوستئوسیت وظیفه کنترل سامانه سوخت وساز کلی بافت را به عهده دارند. ساختار درون سلولی اوستئوسیت‌ها به سلول‌های فاگوسیت[2](سلول‌های بیگانه‌خوار) شبیه است [۸].

۱-۲-۳- سلول‌های استخوانی خطی پیوندی

سلول‌های خطی پیوندی، پهن و کشیده هستند و به صورت غیر فعال بر روی سطح خارجی استخوان قرار دارند و در شکل‌گیری آن نقشی ندارند. عملکرد اصلی این سلول‌ها هنوز به طور قطعی مشخص نشده است و محققین تنها این امکان را محتمل می‌دانند که این سلول‌ها به شکل‌گیری اولیه سلول‌های اوستئوبلاست کمک می‌کنند [۶].

۱-۲-۴- اوستئوکلاست‌ها

سلول‌های اوستئوکلاست چندهسته‌ای بوده و در شکل‌گیری ساختار استخوان نقش حساسی را به عهده دارند. به هنگام فعالیت این سلول‌ها ارتباط قطبی نسبتاً قوی مابین هسته سلول و هسته‌های خارج از ساختار استخوانی برقرار می‌شود [۹]. اوستئوکلاست‌ها سطح مواجی دارند و این امر به مکش

[1] Osteon
[2] Phagocytic

استخوانی کمک می‌کند. اجداد این دسته از سلول‌ها به سلول‌های مغز استخوان[1] می‌رسد. برخی از محققین نیز حضور چندین سلول تک هسته‌ای با منشاء خونی در کنار یکدیگر را عامل به وجود آمدن سلول‌های اوستئوکلاست می‌دانند. اوستئوکلاست‌ها پس از چسبیدن با واسطه شبکه پروتئینی به ماتریس استخوانی، فرآیند هوشیپ لاکنی[2] را آغاز می‌کنند. فرآیند مذکور میزان اسیدی بودن مناطق مجاور استخوان را با افزایش دادن یون مثبت هیدروژن که از واکنش انیدرازیسیون بنیان کربونیک حاصل می‌شود، افزایش می‌دهد. اسیدی شدن، سبب افزایش حلالیت کریستال‌های آپاتایت می‌شود و این در حالی است که باقی‌مانده ماتریس توسط فرآیند لیزوزوم آنزیم‌های اوستئوکلاست همچون اسید فوسفاتیس[3] مورد تخریب قرار می‌گیرد. آنزیم فوسفاتیس توانایی تخریب پیوندهای استری فسفریک را داراست [۶، ۷، ۸].

۱-۳- اجزای استخوان

ماتریس استخوانی سنتز شده از سلول‌های اوستئوبلاست، اجزای متفاوتی دارد که ترکیب درصد و میزان تکرار آنها به عوامل مختلفی همچون مکان آناتومیک شکل‌گیری استخوان، شیوه غذا رسانی و ژنتیک فرد، مربوط است [۶]. ۶۰ تا ۷۰ درصد استخوان از مواد معدنی شکل گرفته است که کلاژن نوع یک، ۹۰ درصد این میزان و پروتئین‌های غیرکلاژنی ۱۰ درصد باقی‌مانده را تشکیل می‌دهند [۸].

۱-۳-۱- کلاژن نوع یک

فراوانترین پروتئین موجود در بافت استخوانی کلاژن نوع یک است. پروتئین مذکور با وزن مولکولی ۳۰۰ هزار از سه زنجیره پلی‌پپتیدی با درجه پلیمریزاسیون هزار مونومر اسیدآمینه، تشکیل شده است که به صورت مارپیچی در کنار یکدیگر قرار گرفته‌اند. ساختار مارپیچی به واسطه پیوندهای هیدروژنی میان زنجیری هیدروکسی‌پرولین و دیگر بارهای یونی میان شبکه‌ای پایدار می‌گردد. زنجیره‌های اسیدآمینه سه‌تایی با نظم موازی در کنار هم قرار می‌گیرند و الیاف کلاژنی را شکل می‌دهند. الیاف کلاژنی پیکره اصلی ماتریس استخوانی را تشکیل می‌دهند [۱۰].

---

[1] Bone Marrow
[2] Howship lacunae
[3] Acid Phosphates

۱-۳-۲- پروتئین‌های غیرکلاژنی

پروتئین‌های غیرکلاژنی، ده درصد از ماتریس آلی استخوانی را تشکیل می‌دهند. وظیفه اصلی این پروتئین‌ها، ایجاد شبکه‌های بین سلولی، کمک به رشد و ازدیاد جمعیت سلولی و تولید مواد معدنی مورد نیاز بافت استخوانی است. همچنین برخی از این دسته پروتئین‌ها در آزمایش‌های محیط طبیعی[۱] و محیط مصنوعی[۲] به عنوان نشان‌گذار[۳] سلول‌های اوستئوبلاست مورد استفاده قرار می‌گیرند و چگونگی عملکرد سلول و سلامت زیستی آن را مشخص می‌سازند. مهمترین نشان‌گذارهای سلول‌های استخوانی در ذیل آورده شده‌اند.

۱-۳-۲-۱- عامل متصل‌کننده هسته ۱[۴]

عامل متصل‌کننده هسته یک، تنها عامل بیان پروتئین‌های سلول اوستئوبلاست محسوب می‌شود. نشان‌گذار CBFa1 قدیمی‌ترین نشان‌گذار تمایز به سلول استخوانی محسوب می‌شود. همچنین وجود این نشان‌گذار در بافت‌های غضروفی نیز به اثبات رسیده است که البته تنها در دوران جنینی قابل مشاهده است و پس از سن ۱ سالگی، نشان‌گذار CBFa1 تنها در بافت استخوانی فعالیت می‌کند. به طور کلی علائم و پیغام‌های الکتریکی نشان‌گذار مذکور تأثیر به سزایی بر تمایز و عملکرد سلول‌های اوستئوبلاست می‌گذارد. اهمیت اصلی این ژن به هنگامی آشکار شد که محققین به طور اتفاقی آن را از ژنوم موش حذف کردند. با حذف ژن، نوزاد موش پس از مدت کوتاهی از به دنیا آمدن، به دلیل عدم شکل‌گیری استخوان و نابالغ ماندن سلول‌های اوستئوبلاست، توانایی ادامه حیات را از دست داد. موش مورد آزمایش، فاقد نشان‌گذارهای اوستئوبلاست همچون اوستئوکلسین[۵] و اوستئوپونتین[۶] بود [۱۱]. آزمایش‌های بعدی نیز حاکی از فقدان رشد غضروف بودند که همگی نشانگر نقش بسیار مهم CBFA1 در رشد و ترمیم غضروف در دوران جنینی است [۱۲]. نشان‌گذار CBFA1 علاوه بر کمک به تمایز

[1] In Vivo
[2] In Vitro
[3] Marker
[4] Core Binding Factor 1(CBFa1)
[5] Osteocalcin
[6] Osteopontin

سلول‌های اوستئوبلاست، در بیان ژن اوستئوکلسین نیز که تنها توسط سلول‌های بالغ اوستئوبلاست تولید می‌شود، نقش به سزایی دارد.

۱-۳-۲-۲- اوستئوکلسین

مولکول کوچک اوستئوکلسین با درجه پلیمریزاسیون ۵/۸، از دسته پروتئین‌های وابسته به ویتامین K است و در میان پروتئین‌های غیرکلاژنی از فراوانترین آنها در بافت استخوانی محسوب می‌شود. تنها سه دسته از اسیدهای گلوتامیک در حضور ویتامین K و طی فرآیند بیان انتهایی، کربوکسیله می‌شوند. هرچند نقش اصلی اوستئوکلسین در تمایزات سلولی بافت استخوانی غیرمشخص است، محققان بر این باورند که این پروتئین طی فرآیند کربوکسیله کردن، در معدنی‌کردن و اتصال دادن یون کلسیم دو بار مثبت نقش حساسی دارد. همچنین وظیفه دیگر این پروتئین جذب سلول اوستئوکلاست به سمت بافت استخوانی است. با حذف اوستئوکلسین از ژنوم جانوران مورد آزمایش، بافت‌های استخوانی با تراکم شدید مواد معدنی روبه‌رو می‌شود که این امر به نقش پروتئین در تنظیم میزان حرکت بافت به سمت مواد معدنی، اشاره می‌کند [۸].

۱-۳-۲-۳- اوستئونکتین

اوستئونکتین که با نام اختصاری SPARC (پروتئین مترشحه، اسیدی و غنی از کیستئین[1]) نیز شناخته می‌شود، زنجیری متشکل از ۳۲ مونومر دارد. این پروتئین توسط سلول اوستئوبلاست ترشح می‌شود و توانایی اتصال به کلاژن، هیدروکسی‌آپاتیت و یون کلسیم دو بار مثبت را دارد [۱۳]. همچنین محققین تنظیم وزن کلی استخوان و تغییر شکل‌های آن را به وجود این پروتئین نسبت می‌دهند. اختلال در حضور ژن اوستئونکتین، سبب القاء و بروز آب مروارید[2] و اوستیوپروس[3] (یک نوع بیماری که در آن وزن استخوان همراه با درد زیاد مفاصل، کاهش یافته و تغییر شکل می‌یابد)، می‌شود [۱٤، ۱۵].

[1] Secreted Protein, Acidic, Rich in Cysteine
[2] Cataract
[3] Osteoporosis

۱-۳-۲-۴- اوستئوپونتین

اوستئوپونتین یکی از انواع پروتئین‌های نگهدار است که سکانس RGD در میانه زنجیره آمینواسیدی آن قرار گرفته است. این پروتئین در مرحله پایانی بلوغ سلول‌های استخوانی و قبل از شروع مرحله معدنی شدن بافت، به وجود می‌آید. همچنین وظیفه پروتئین مذکور، واسطه‌گری اتصال سلول‌های اوستئوکلاست به پوسته و شرکت در فرستادن پیام‌های الکتریکی از و به بافت، است. عدم مشاهده شروع هسته‌گذاری آپاتایت با وجود اثبات حضور پلی‌اسپارتیک[1] در زنجیره پروتئینی، گزارش شده است؛ با وجود این تمایل این پروتئین به یون کلسیم دو بار مثبت بالا است [۶].

۱-۳-۲-۵- سیالوپروتئین استخوانی[2] (بی‌اس‌پی۲)

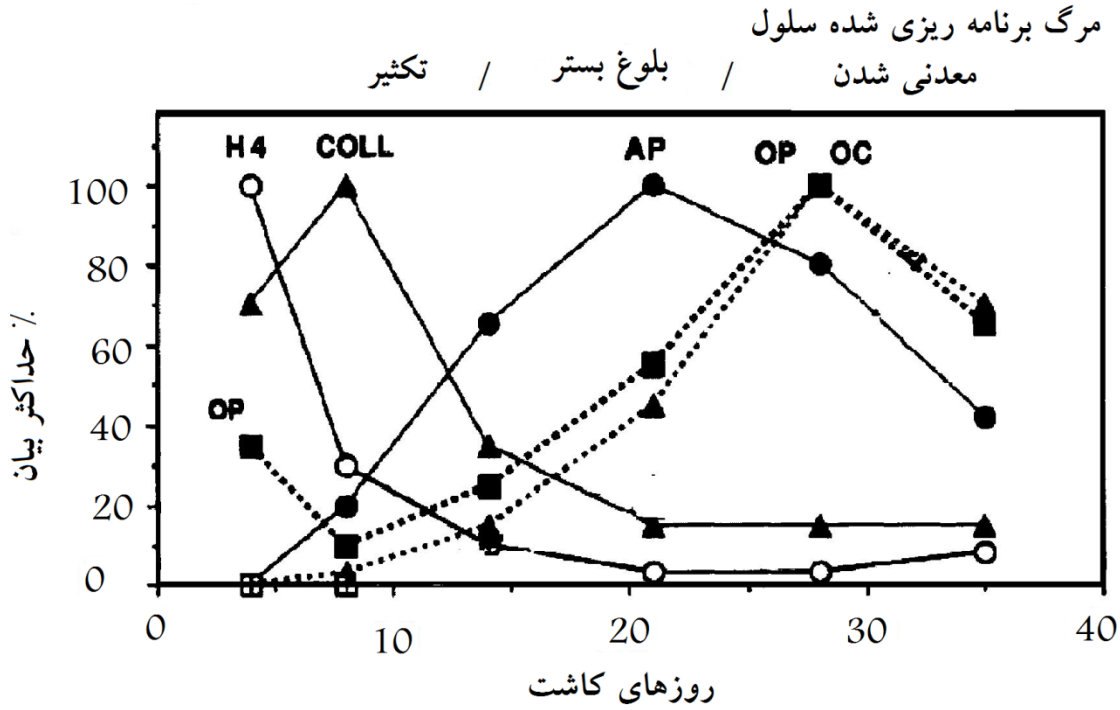
وجود سکانس‌های RGD در کربوکسی‌ترمینوس[3] و اسید پلی‌گلوتامیک در زنجیره اصلی، از مشخصه‌های بارز بی‌اس‌پی۲ است. پروتئین بی‌اس‌پی۲، مراحل انتهایی تمایز سلول‌های اوستئوبلاست و مراحل ابتدایی معدنی شدن بافت را نشان‌گذاری می‌کند و مکان اصلی انتشار آن غضروف و سلول‌های در حال بلوغ اوستئوبلاست در بافت استخوانی است. بی‌اس‌پی۲ تمایل بسیاری به یون کلسیم دو بار مثبت از خود نشان می‌دهد و نقش مهمی را در معدنی‌سازی ماتریس ایفا می‌سازد [۱۶]. نقش این پروتئین در القای هسته‌گذاری هیدروکسی‌آپاتیت اثبات شده و همچنین چسبندگی سلول‌ها به بافت استخوانی به حضور این پروتئین نسبت داده می‌شود [۱۷].

۱-۳-۲-۶- فسفاتازآلکالین[4] (ای‌ال‌پی)

ای‌ال‌پی از دسته پروتئین‌های غیرکلاژنی پیونددهنده گلیکوپروتئین است و درجه پلیمریزاسیون آن ۱۶۹ است. ای‌ال‌پی نشان‌گذار اصلی در فرآیند بلوغ سلول‌های اوستئوبلاست است و در سلول‌های ابتدایی اوستئوبلاست، اوستئوسیت و اوستئوسارکوما[5] بیان می‌شود و این در حالی است که بیان این پروتئین منحصر به بافت‌های استخوانی نبوده و پدیده اخیر در بافت‌های کبد و کلیه نیز گزارش شده است. این پروتئین در کیسه‌های کوچک یا همان آبدانک‌ها و در الیاف غیرکلاژنی همچون غشاهای

[1] Polyaspartic
[2] Bone Sialoprotein BSP II
[3] Carboxy Terminus
[4] Alkaline Phosphates
[5] Osteosarcoma

پلاسمایی، یافت می‌شود [۱۸].تاکنون دو نوع از ای‌ال‌پی، انحلال‌پذیر (فاقد شکل لنگری[1]) و غیر انحلال‌پذیر (لنگری آب‌گریز[2])، مشاهده شده است [۱۹]. با وجود اینکه عملکرد اصلی ای‌ال‌پی نامشخص است، محققین بر این باورند که این پروتئین در هیدرولیز فسفات‌های استری ناشناخته مؤثر عمل می‌کنند و سبب افزایش غلظت محلی فسفات‌های غیرمعدنی می‌شود. افزایش غلظت محلی فسفات‌های غیرمعدنی، شکل‌گیری مواد معدنی استخوان را بهبود می‌بخشد. احتمال می‌رود که ای‌ال‌پی برون‌سلولی به شکل‌گیری اولیه استخوان معدنی شده کمک کند. به طور معمول از ای‌ال‌پی به عنوان نشان‌گذار سلول‌های اوستئوبلاست استفاده می‌شود.



شکل ۱-۴: جایگزین‌های ایده‌آل نشان‌گذاری استخوان (ژن‌ها به ترتیب عبارتند از هیستون، کلاژن نوع یک، فسفاتاز آلکالین، اوستئوپونتین، اوستئوکلسین)

با توجه به پتانسیل‌های عملکردی و بیان گسترده ای‌ال‌پی در بافت‌های کلیدی، محققین پروتئین مذکور را بهترین گزینه نشان‌گذار کردن سلول‌های اوستئوبلاست و بارزترین نشانه توسعه بافت استخوانی

[1] Anchorless Form
[2] Hydrophobic Anchor