بررسی مقایسه‌ای سمیّت ژنی و سمّیت سلولی نانوهیدروکسی آپاتیت ساخت ایران و هیدروکسی آپاتیت Algipore روی سلول‌های فیبروبلاست لثه‌ای

دکتر رضا بیرنگ[۱]، دکتر محمد شاه ابویی[*]، دکتر منصور ریسمانچیان[۲]، دکتر هوشنگ باقری[۳]، دکتر ندا رسایی[۴]، دکتر انسیه باطنی[۴]، دکتر بنفشه پورمرادی[۴]

چکیده

مقدمه: واکنش‌های بین سلول‌های لثه‌ای و مواد موجود در گرافت استخوانی در بررسی رژنراسیون آسیب‌های پریودنتال از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. در مطالعه‌ی حاضر سمّیت سلولی و ژنی نانوهیدروکسی آپاتیت ایرانی با هیدروکسی آپاتیت خارجی مقایسه شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه آزمایشگاهی سلول‌های فیبروبلاست لثه‌ای با رده‌ی C502 در فاز لگاریتمی رشد، تهیه و کشت داده شدند. سمّیت ژنی و سمّیت سلولی نانوهیدروکسی آپاتیت ساخت ایران و هیدروکسی آپاتیت Algipore به ترتیب در غلظت‌های ۱۰۰٪، ۷۵٪، ۵۰٪ و ۲۵٪ بر روی این سلول‌ها بررسی گردید. جهت بررسی سلامت DNA موجود در هسته‌ی سلول‌های تحت تیمار و بررسی سمّیت ژنی، از تست کامت استفاده شد. مقایسه‌ی اثر این دو نوع هیدروکسی آپاتیت با استفاده از آزمون آماری رگرسیون چندگانه در سطح معنی داری ۰/۰۵ و با در نظر گرفتن درصد سلول‌های مرده در ابتدای مطالعه و پس از افزودن این مواد در غلظت‌های مشخص انجام شد.

یافته‌ها: تفاوت معنی‌داری بین دو ماده مورد مطالعه وجود نداشت ($P>0.05$). با استفاده از رگرسیون چندگانه مشخص گردید که بین غلظت ماده در هر دو گروه و درصد سلول‌های مرده ارتباطی معنی‌دار وجود دارد ($P<0.05$). در بررسی ژنوتوکسیسیته، هیچ موردی از کامت مشاهده نشد که نشان می‌دهد هیچ یک از مواد مورد مطالعه، ژنوتوکسیک نمی‌باشند.

نتیجه‌گیری: با توجّه به محدودیت‌های این مطالعه، کاربرد نانوهیدروکسی آپاتیت ایرانی جهت استفاده به عنوان ماده‌ی جایگزین هیدروکسی آپاتیت در دندان‌پزشکی، خصوصاً در زمینه‌ی بازسازی و ترمیم بافت پریودنتال آسیب دیده قابل توصیه می باشد. بررسی های بیشتر در این زمینه ضروری است .

کلید واژه‌ها: سلول فیبروبلاست لثه، هیدروکسی آپاتیت، نانوهیدروکسی آپاتیت، سمیّت ژنی، سمیّت سلولی، comet assay.

* دانشیار، گروه پریودنتولوژی، دانشکده‌ی دندان‌پزشکی و عضو مرکز تحقیقات پروفسور ترابی نژاد، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران. (مؤلف مسؤول)
m.shahabouei @dnt.mui.ac.ir

۱: دانشیار، گروه پریودنتولوژی، دانشکده‌ی دندان‌پزشکی و عضو مرکز تحقیقات پروفسور ترابی نژاد، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

۲: دانشیار گروه پروتزهای دندانی، دانشکده دندان‌پزشکی و مرکز تحقیقات دندان‌پزشکی پروفسور ترابی نژاد، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان،اصفهان، ایران.

۳: PHD گروه داروسازی، دانشکده‌ی داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

۴: دستیار تخصصی پریودنتولوژی، دانشکده‌ی دندان‌پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

این مقاله حاصل پایان‌نامه دوره دستیاری در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان می‌باشد

این مقاله در تاریخ ۸۸/۹/۱۱ به دفتر مجله رسیده، در تاریخ ۸۹/۳/۲۹ اصلاح شده و در تاریخ ۸۹/۴/۱۵ تأیید گردیده است.

مجله دانشکده دندان‌پزشکی اصفهان
۱۳۸۹؛ ۶(۶): ۶۵۵ تا ۶۶۲

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

در طی سه دهه‌ی اخیر، تحولی اساسی در طراحی و ساخت بیوسرامیک‌ها به وقوع پیوسته است (۱). این سرامیک‌ها که جهت درمان بیماری‌ها، بازسازی صدمات وارد بر بدن و نیز ترمیم اعضای آسیب دیده مورد استفاده قرار می‌گیرند، بیشتر در ترمیم سیستم‌های اسکلتی بدن، استخوان‌ها، دندان‌ها، مفاصل و همچنین بازسازی و افزایش بافت‌های نرم و سخت کاربرد دارند (۳).

بیوسرامیک‌ها در انواع شکل‌ها به صورت کاشتنی (Implant)، عضو مصنوعی (Prosthesis)، پودر جهت پر کردن فضا، پوشش (Coating) بر روی زیرلایه‌ی فلزی کاشتنی و یا به صورت فاز ثانویه، در یک کامپوزیت دندانی مورد استفاده قرار می‌گیرند؛ تا ماده‌ی جدیدی با خواص مکانیکی بالاتر و خواص شیمیایی- زیستی (Biochemical) بهتر فراهم نمایند (۴-۳).

هیچ ماده‌ای هنگام کاشت در بافت زنده، خنثی (Inert) نیست و تمام مواد هنگام کاشت در بدن، سبب واکنش و پاسخ از جانب بافت میزبان خواهند شد. امروزه چهار نوع پاسخ ماده-بافت شناخته شده است (۱) :

۱. اگر واکنش ماده-بافت سمّی باشد، موجب مرگ بافت خواهد شد.

۲. اگر واکنش و پاسخ از نظر بیولوژیکی تقریباً خنثی باشد، بافت یک غشای فیبروزه (Fibrous Capsule) غیرچسبنده در اطراف ماده تشکیل خواهد داد.

۳. اگر ماده‌ی کاشتنی، زیست‌فعّال (Bioactive) باشد، پیوندی در محل تماس ماده-بافت پدید خواهد آمد که در سطح، از جابه‌جایی و حرکت بین دو ماده جلوگیری می‌نماید. این پیوند همانند نوعی از محل تماس است که هنگام ترمیم بافت‌های طبیعی تشکیل می‌شود.

۴. اگر آهنگ (Rate) تغییر ماده‌ی زیست‌فعّال به اندازه‌ی کافی سریع باشد، ماده حل شده و حذف می‌گردد و توسط بافت‌های اطراف جایگزین می‌شود.

ترکیب هیدرواکسی آپاتیت [Ca 10 (Po 4)6 (OH)2] اوّلین ماده‌ای بود که برای پوشش دادن کاشتنی‌های فلزی مورد استفاده قرار گرفت (۱). مواد آلی با پایه‌ی کلسیم و فسفر نظیر هیدروکسی آپاتیت، به دلیل شباهت ساختاری و شیمیایی با بخش معدنی استخوان و دندان، جایگزین‌های بسیار مناسبی برای پیوندهای استخوانی اتوگرافت در دندان‌پزشکی، ارتوپدی و جراحی‌های ماگزیلوفاسیال می‌باشند (۸). هیدروکسی آپاتیت با بافت‌های سخت و نرم زیست‌سازگار بوده، جذب نمی‌شود، تحلیل نمی‌رود و از طرفی استخوان‌سازی را تحریک کرده و باعث می‌شود، استخوان به درون تخلخل‌های موجود در کاشتنی رشد نماید (۲). رشد استخوان به داخل تخلخل‌های سطح، فصل مشترکی با سطح تماس زیاد بین کاشتنی و میزبان آن فراهم خواهد کرد (۱).

استخوان طبیعی ساختاری نظیر نانو اکسیل دارد، به همین دلیل این‌چنین به نظر می‌رسد که ساختار نانوی هیدروکسی‌آپاتیت می‌تواند نتایج حاصل از استخوان‌های سنتتیک را به علّت دارا بودن سطوح تماس بیشتر بهبود بخشد. با بهره‌گیری از نانوذرات هیدروکسی آپاتیت، درصد خلوص مولکولی افزایش یافته و ویژگی‌های مکانیکی نیز بهبود خواهند یافت لذا کاشتنی‌هایی با این پوشش کمترین احتمال شکست و پس‌زدگی را خواهند داشت (۲). امروزه نانوهیدروکسی آپاتیت سنتتیک که شامل ۶۵٪ آب و ۳۵٪ ذرات غیرساختاری آپاتیت است، جهت ترمیم نقایص استخوانی معرفی شده است (۷-۶). براساس مطالعات اخیر، از مزایای ذرات غیر ساختاری تماس نزدیک آن‌ها با بافت احاطه کننده است. جذب کامل نانوهیدروکسی آپاتیت در طی ۱۲ هفته اتفاق می‌افتد (۹).

مطالعات در زمینه‌ی بررسی توانایی نانوهیدروکسی آپاتیت بر رشد و تکثیر سلول‌های PDL نشان دادند این بیوسرامیک به عنوان یک محرک برای تکثیر سلول‌ها عمل کرده که احتمالاً مهّم‌ترین علّت آن نقش این بیوسرامیک در رژنراسیون بافت لثه می‌باشد (۲۰).

باتوجّه به نقش بسیار مهّم واکنش بین سلول‌های بافت میزبان و مواد موجود در پیوند استخوانی در بررسی رژنراسیون آسیب‌های پریودنتال و نیز امکان ایجاد آسیب‌های ژنی و سلولی توسط این مواد به بیمار و کلینیسین (۱۰)، باید از ایمن بودن این مواد اطمینان حاصل کرد؛ لذا روش‌های بیوشیمیایی و

Archive of SID
www.SID.ir

آزمایشگاهی که اثر این مواد را بر روی DNA و سلول‌های بیمار بررسی می کنند در ارتباط با به حداقل رساندن پتانسیل خطر آفرینی این مواد مورد استفاده قرارمی گیرند (۱۱).

هدف از مطالعه‌ی حاضر، بررسی تداخلات و واکنش‌های بین سلولی در بافت لثه‌ی کشت داده شده با بیوسرامیک ساخته شده در کشور یعنی نانوهیدروکسی آپاتیت و هیدروکسی آپاتیت Algipore می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مطالعه‌ی حاضر به صورت in vitro و تجربی انجام گرفت. در این مطالعه جهت تستهای comet assey و سمیّت سلولی، سلول‌های فیبروبلاست لثه‌ای با رده C502، در فاز لگاریتمی رشد خود از انستیتو پاستور ایران تهیه گردید. سلول‌های انتخاب شده برای رشد، در محیط کشت RPMI و ۱۰ درصد Fetalcalf serum درون انکوباتور با ۵ درصد CO2 و در دمای 37°c انکوبه شدند. سلول‌ها قبل از شروع فرایندآزمایش، کشت داده شدند تا میزان آن‌ها در ۵ پاساژ به اندازه‌ی مورد نیاز رسید.

مراحل تیمار سلول‌های فیبروبلاست لثه‌ای با HA و Nano HA جهت بررسی سمیّت سلولی:

یک فلاسک سلولی تریپسینه شد، سپس شمارش سلول‌ها با لام نئوبار و رنگ‌آمیزی تریپان‌بلو صورت گرفت. تعداد ۳۰ الی ۱۰۰ هزار سلول به چاهک‌های کشت سلولی اضافه شد. دو چاهک برای هر غلظت و دو چاهک برای شاهد رشد سلولی در نظر گرفته شد. تا ۳ روز سلول‌ها از نظر mono layer شدن کنترل شدند و سپس توسط میکروسکوپ، در هر چاهک ۱۰۰۰ سلول شمارش شده و درصد سلول‌های مرده ثبت گردید.

در مرحله‌ی بعد HA و Nano HA با غلظت‌های ۱۰۰، ۷۵، ۵۰ و ۲۵ درصد با سلول‌ها مجاور شدند. سپس سلول‌ها به مدّت ۲۴ ساعت انکوبه شدند و رنگ‌آمیزی سلولها با تریپان‌بلو و شمارش ۱۰۰۰ سلول و تعیین درصد سلول‌های مرده زیر میکروسکوپ در هر چاهک سلولی صورت گرفت. میانگین درصد سلول‌های مرده هر دو چاهکی که حاوی یک غلظت از یک ماده بودند تعیین شد. در نهایت داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از آزمون‌های آماری مورد تجزیه وتحلیل قرار گرفت.

مراحل تیمار سلول‌های فیبروبلاست لثه‌ای با HA و Nano HA جهت بررسی سمیّت ژنی:

فلاسک‌های mono layer جهت بررسی تعداد سلول‌های مرده و زنده زیر میکروسکوپ چک شدند. سلول‌های تریپسینه شده توسط تریپان‌بلو رنگ‌آمیزی شدند تا سلول‌های مرده رنگ شده و درصد آن‌ها محاسبه شود. زیر میکروسکوپ و روی لام نئوبار سلول‌های تریپسینه شده شمارش شدند و سپس در هر یک از چاهک‌های پلیت کشت سلولی، حدود ۳۰ الی ۱۰۰ هزار سلول اضافه شد و تا ۳ روز سلول‌ها از نظر mono layer شدن کنترل شدند. جهت شمارش تعداد سلول‌های مرده، زیر میکروسکوپ ۱۰۰۰ سلول فیبروبلاست در هر چاهک چک شد و درصد سلول‌های مرده در هر چاهک ثبت گردید. غلظت‌های مختلف HA و Nano HA که برای هرغلظت ۲ چاهک و ۲ چاهک نیز برای شاهد در نظر گرفته شده بود، ۲۴ ساعت در محیط کشت سلولی قرار گرفتند تا تست کامت جهت بررسی آسیبDNA انجام شود (۱۰).

تست کامت:

برای بررسی سلامت DNA موجود در هسته‌ی سلول‌های تحت تیمار از این تست استفاده شد. در این روش ابتدا محلول‌های آگارز نرمال ۱٪، آگارز با نقطه‌ی ذوب پایین(LMP)، بافر لیز کننده، بافر الکتروفرز و بافر خنثی کننده تهیه شد. پس از تهیه‌ی محلولها، لام‌ها در بشر حاوی آگارز نرمال فرو برده شد تا به این محلول آغشته شود تا پس از خشک شدن در محیط آزمایشگاه مورد استفاده قرار گیرند. جهت آماده نمودن سلول‌ها 250 میکرولیتر سوسپانسیون سلولی حاوی صد هزار سلول را با 250 میکرولیتر محلول ۲ درصدآگارز با نقطه‌ی ذوب کم (LMP) مخلوط کرده و نمونه‌ی تهیه شده به مدّت ۱۰ دقیقه در دمای4°c قرار گرفت تا آگارز به صورت جامد در آید. در نهایت پس از برداشت لامل‌ها از روی نمونه، لام‌ها به مدت ۱ ساعت در بافر لیز کننده قرار داده شد تا غشای سلول لیز شده و هسته در معرض جریان الکتریکی قرار گیرد. درون تانک الکتروفرز محلول الکتروفرز ریخته و لام‌ها درون تانک به مدّت ۳۰ دقیقه با شدت جریان ۳۰۰ میلی آمپر و PH=13 قرار گرفتند. سپس لام‌ها ۳ بار و هر بار ۵ دقیقه با بافر خنثی کننده شستشو شده و

Archive of SID
www.SID.ir

در پایان لام‌ها با رنگ اتیدیم بروماید رنگ‌آمیزی و با میکروسکوپ فلورسنت مشاهده شدند.

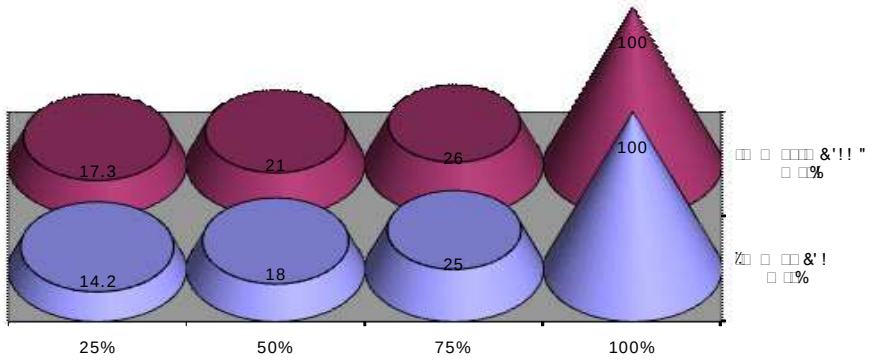
داده‌های جمع‌آوری شده به وسیله‌ی نرم افزار آماری SPSS 11 با کاربرد آزمون‌های آماری رگرسیون و t-test مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. میانگین‌ها به صورت Mean±SD گزارش شدند.

یافته‌ها

با توجّه به اینکه سمیّت سلولی و ژنی در ۴ غلظت ۱۰۰٪، ۷۵٪، ۵۰٪ و ۲۵٪ مورد بررسی قرار گرفت، ۸ چاهک به هیدروکسی آپاتیت و ۸ چاهک دیگر به نانوهیدروکسی آپاتیت اختصاص داده شد. میانگین درصد سلول‌های مرده در ابتدای مطالعه و پس از افزودن مواد مورد مطالعه در غلظت‌های مذکور در جدول شماره‌ی ۱ آمده است. پس ازثبت نتایج مربوط به تست سایتوتوکسیسیتی از همان چاهک‌ها جهت تست ژنوتوکسیسیتی استفاده شد. مقایسه‌ی دو ماده با استفاده از آزمون آماری رگرسیون چندگانه و با در نظر گرفتن درصد سلول‌های مرده در ابتدای مطالعه و پس از افزودن مواد مورد مطالعه در غلظت‌های ذکر شده، گویای آن بود که تفاوت معنی‌داری بین دو گروه وجود ندارد ($P > 0.05$). با استفاده از رگرسیون چندگانه مشخص شد که بین غلظت و درصد سلول‌های مرده ارتباط معنی‌داری وجود دارد، بدین ترتیب که درصد سلول‌های مرده در هر دو گروه با غلظت‌های بالاتر بیشتر بود (نمودار ۱).

جدول ۱. میانگین درصد سلول‌های مرده در ابتدای مطالعه و پس از افزودن هیدروکسی آپاتیت و نانوهیدروکسی آپاتیت در غلظت‌های ۱۰۰٪، ۷۵٪، ۵۰٪ و ۲۵٪

	هیدروکسی آپاتیت		نانوهیدروکسی آپاتیت	
غلظت (٪)	میانگین درصد سلول‌های مرده در ابتدای مطالعه	میانگین درصد سلول‌های مرده در انتهای مطالعه	میانگین درصد سلول‌های مرده در ابتدای مطالعه	میانگین درصد سلول‌های مرده در انتهای مطالعه
٪۱۰۰	٪۶.۴	٪۱۰۰	٪۳.۸	٪۱۰۰
٪۷۵	٪۸.۲	٪۲۵	٪۴.۱	٪۲۶
٪۵۰	٪۶.۸	٪۱۸	٪۷.۴	٪۲۱
٪۲۵	٪۶.۲	٪۱۴.۲	٪۶.۴	٪۱۷.۳



نمودار ۱. میانگین درصد سلول‌های مرده پس از افزودن هیدروکسی آپاتیت و نانوهیدروکسی آپاتیت در غلظت‌های ۱۰۰٪، ۷۵٪، ۵۰٪ و ۲۵٪

Archive of SID
www.SID.ir

در بررسی ژنوتوکسیسیته مواد مورد مطالعه از تست کامت به منظور بررسی سلامت DNA موجود در هسته‌ی سلول‌ها استفاده گردید که بر اساس نتایج حاصل هیچ موردی از کامت مشاهده نشد که نشان می‌دهد هیچ یک از دو ماده مورد مطالعه‌ی ما، ژنوتوکسیک نیستند.

یافته‌های میکروسکوپیک:

در غلظت ۱۰۰٪ نانوهیدروکسی آپاتیت، سلول‌های فیبروبلاست از کف جدا شده و کاملاً از هم پاشیده بودند و ۱۰۰٪ آن‌ها مرده بودند. مرگ کامل، زودتر رخ داده و هسته‌ها به طور مشخصی دیده نمی‌شدند. در غلظت ۱۰۰٪ هیدروکسی آپاتیت نیز ۱۰۰٪ سلول‌های فیبروبلاست مرده بودند ولی هسته‌ها کمتر متورم بود و غشای آن‌ها دیده می‌شد. به علاوه تعداد سلول‌های معلق کمتر از گروه نانوهیدروکسی آپاتیت ۱۰۰٪ بوده و زواید در اکثر سلول‌ها مشخص بود و سلول‌ها کاملاً گرد نشده بود.

در گروه نانوهیدروکسی آپاتیت ۷۵٪، نسبت به هیدروکسی آپاتیت ۷۵٪، رسوب پارتیکل‌ها در محیط کشت بیشتر و رسوب پارتیکل‌ها روی سلول‌ها نیز بیشتر بود که شاید به این دلیل باشد که تمام ذرات نانوهیدروکسی آپاتیت در سانتریفوژ رسوب نکردند ولی خود به خود در محیط کشت رسوب نمودند.در این گروه، سلول‌های در حال مرگ نسبت به مرده‌ها بیشتر بود.

قابل ذکر است که سلول‌هایی که از قبل مرده بودند، تحت تأثیر نانوهیدروکسی آپاتیت اضافه شده قرار نگرفته و اندازه آن‌ها تفاوتی نکرده بود. به نظر می‌رسد که نانوهیدروکسی آپاتیت نتوانسته بود روی سلول‌های مرده‌ی قبلی تأثیر بگذارد ولی با این حال مرگ تحت تأثیر نانوهیدروکسی آپاتیت نسبت به هیدروکسی آپاتیت زودتر رخ داده بود. در گروه هیدروکسی آپاتیت ۷۵٪ نسبت به نانوهیدروکسی آپاتیت ۷۵٪، سلول‌های جوان بیشتر و تورم سلولی کمتر بود (سلول‌ها باریک‌تر بودند) و رسوبات در سطح سلول‌ها کمتر مشاهده می‌شد و درصد سلول‌های معلق کمتر مشاهده می‌شد.

بحث

نتایج حاصل از این مطالعه نشان دهنده‌ی آن است که نانوهیدروکسی آپاتیت ساخته شده در کشور از نظر سمیّت سلولی و ژنی همانند هیدروکسی آپاتیت Algipore بوده (نمودار ۱) و بالطبع دارای کارایی مشابهی نیز می‌باشد و می‌تواند جایگزین هیدروکسی آپاتیت وارداتی در پروسه‌های دندان‌پزشکی خصوصاً در زمینه بازسازی و ترمیم بافت پریودنتال آسیب دیده گردد. در زمینه‌ی سمیّت سلولی هیدروکسی آپاتیت و نانوهیدروکسی آپاتیت گزارشات حاصل از مطالعات مختلف متفاوت می‌باشد.

در مطالعه‌ای Inayat و همکارانش، سمیّت سلولی دو نوع هیدروکسی آپاتیت را بر روی فیبروبلاست با روش MTT مورد مطالعه قرار دادند و گزارش نمودند که این ماده سمیّت سلولی ندارد (۱۷) و اساساً مرگ سلولی مشاهده شده به علّت آپوپتوز است. در مطالعه‌ی دیگری Shamsuria و همکارانش سمیّت سلولی هیدروکسی آپاتیت و سایر مواد را مطالعه نموده و هیچ گونه سمیّت سلولی گزارش نکردند، علاوه بر آن به این نتیجه رسیدند که این مواد حتی باعث تحریک رشد سلولی نیز خواهند شد (۱۳).

Theiszova و همکاران، سمیّت سلولی هیدروکسی آپاتیت را به دو روش MTT و شمارش مستقیم سلولی، در غلظت‌های مختلف بررسی نموده و خاصیت سیتوتوکسیستی را فقط در غلظت ۱۰۰ درصد هیدروکسی آپاتیت گزارش دادند و درصد سمیت سلولی آن را بین ۰-۸۶٪ بیان نمودند (۱۱). در مطالعه‌ی Coimbra، سیتوتوکسیستی هیدروکسی آپاتیت به عنوان ماده‌ی پیوندی در رژنراسیون استخوان بررسی گردید و بر اساس نتایج حاصل هیدروکسی آپاتیت در غلظت‌های بالای ۵۰٪ سیتوتوکسیک بود (۱۸).

در مطالعه‌ی حاضر سمیّت سلولی هر دو ماده در غلظت‌های بالا بیشتر بود (جدول ۱) و علی‌رغم مطالعات ذکر شده مرگ سلولی در مورد هر دو ماده مشاهده گردید که میزان آن در هر دو تفاوت معنی‌داری با یکدیگر نداشت. علّت تفاوت موجود می‌تواند به دلیل تفاوت‌های موجود در نوع روش‌های استفاده شده و یا نوع سلول‌های مورد مطالعه در مطالعات مختلف باشد. از طرفی همانند آنچه که Inayat و همکارانش گزارش نمودند (۱۷) علّت مرگ سلولی مشاهده شده، می‌تواند آپوپتوز سلولی باشد که این مورد نیازمند بررسی‌های بیشتری است. آنچه که در راستای اهداف این مطالعه اهمیّت بیشتری دارد، تشابه

Archive of SID
www.SID.ir

سمیّت سلولی نانوهیدروکسی آپاتیت با هیدروکسی آپاتیت است که گویای کارایی این ماده‌ی جدید در مقایسه با ماده‌ی قبلی می‌باشد.

با این حال بر اساس مشاهدات میکروسکوپیک در غلظت ۱۰۰٪، در گروه نانوهیدروکسی آپاتیت مرگ سلول‌ها زودتر رخ داده، شکل آن‌ها متورم‌تر و درصد از دست دادن زایده‌های سلولی نسبت به گروه هیدروکسی آپاتیت بیشتر بود و همچنین درصد سلول‌های معلق در گروه نانوهیدروکسی آپاتیت نسبت به گروه هیدروکسی آپاتیت بیشتر مشاهده شد. علّت چنین یافته‌هایی می‌تواند بیشتر بودن سطح تماس ذرات نانوهیدروکسی آپاتیت به دلیل شکل سلولی خاص آن‌ها باشد (۵،۲) ولی نتیجه‌گیری دقیق در این زمینه منوط به مطالعات وسیع‌تر در این زمینه خواهد بود.

نتایج این مطالعه با بسیاری از مطالعات انسانی و حیوانی قبلی مطابقت دارد. در خصوص سمیّت ژنی هیدروکسی آپاتیت و نانوهیدروکسی آپاتیت اکثر گزارشات مربوط به مطالعات انسانی و حیوانی، حاکی از آن است که این مواد فاقد اثرات ژنوتوکسیک هستند (۱۲،۱۴،۱۶،۱۵،۲۰). در مطالعه‌ی Kannan و همکارانش، هیچ گونه جهش کروموزومی و سمیّت سلولی از هیدروکسی آپاتیت بروی سلول‌های موش گزارش نشد (۱۲). همچنین در مطالعه‌ی دیگری بر روی سلول‌های خونی گوسفند، هیچ گونه جهش ژنی در رابطه با سمیّت ژنی هیدروکسی آپاتیت گزارش ننمودند (۱۶). در مطالعه‌ی Kasaj و همکاران از محلول استخراج شده‌ی ماده‌ی Nano Ha استفاده شد؛ این ماده نه تنها هیچ گونه تأثیر سمیّت سلولی و ژنی نداشت بلکه خاصیت بهبود فرایند رشد و تکثیر سلول‌های PDL را نیز دارا بود (۲۰).

در مطالعه‌ی حاضر ژنوتوکسیسیته مواد مورد مطالعه با استفاده از تست کامت به منظور بررسی سلامت DNA موجود در هسته‌ی سلول‌های مورد مطالعه بررسی گردید، که بر اساس نتایج حاصل هیچ موردی از کامت مشاهده نشد که گویای آن بود که هر دو ماده‌ی مورد مطالعه فاقد اثر ژنوتوکسیک می‌باشند. از طرفی تست کامت یا single–cell gel (SCG) روش ارزشمندی است که با استفاده از تکنیک الکتروفورز میکروژلی می‌تواند آسیب DNA موجود در هسته‌ی سلول‌ها را در سطح تک‌سلولی مشخص نماید (۱۹). به هر حال همانند آنچه که در مورد سمیّت سلولی نیز گفته شد، آنچه که در راستای اهداف این مطالعه اهمیّت بیشتری دارد، عدم وجود سمیّت ژنی نانوهیدروکسی آپاتیت بوده که مشابه هیدروکسی آپاتیت است و گویای کارایی این ماده‌ی جدید در مقایسه با ماده‌ی قبلی می‌باشد.

با توجّه به یافته‌های حاصل از این مطالعه، می‌توان این‌گونه نتیجه‌گیری نمود که نانوهیدروکسی آپاتیت ساخت داخل همانند هیدروکسی آپاتیت، فاقد سمیّت ژنی بوده و سمیّت سلولی آن نیز مشابه هیدروکسی آپاتیت است، لذا می‌توان از این ماده در زمینه‌ی بازسازی نسوج پریودنتال آسیب دیده و یا نقایص استخوانی پیرامون ایمپلنت‌های دندانی استفاده نمود.

References

1. Fathi MH , Mortazavi V. Medical using of implant bioceramic coatings . Isfahan Ardakan publication ; 1999
2. Torkian L .Different methods in preparation of nano hydroxyapatite powder .season j of ceramic in iran ; 2007 :no (9), 46-59 .
3. Hench LL, Wilson J. Introduction in: An Introduction to Bioceramics. World Scienific; 1993: 1-2.
4. Hulbert SF, Bokros JC, Hench LL. Ceramics in Clinical Applications: Past, Present and Future. High Tech Ceramics. Amsterdam, The Netherlands; 1987: 189-213.
5. ۵.Fathi M,Zahrani Mohamadi E.Mechanochemical synthesis of fluoridated hydroxyl apatite nanopowder.International Journal of Modern Physics2008; B 22:3099 -3106
6. Spies C, Schnürer S, Gotterbarm T, Breusch S .Animal study of the bone substitute material Ostim within osseous defects in Göttinger minipigs. Z Orthop Unfall 2008;146: 64-69
7. Thorwarth M, Schultze-Mosgau S, Kessler P, Wiltfang J, Schlegel KA. Bone regeneration in osseous defects using a resorbable nanoparticular hydroxyapatite. J Oral Maxillofac Surg 2005;63: 1626-1633
8. Schnettler R, Stahl JP, Alt V, Pavlidis T, Dingeldein E, Wenisch S .Calcium phosphate-based bone substitutes. Eur J Trauma 2004; 30: 219-229

Archive of SID
www.SID.ir

9. Chris Arts JJ, Verdonschot N, Schreurs BW, Buma P .The use of a bioresorbable nano-crystalline hydroxyapatite paste in acetabular bone impaction grafting. Biomaterials 2006;27: 1110-1118

10. Marica Theiszova, Sona Jantova, Jana Dragunova, Petra Grznarova, Martin Palou. Comparison the cytotoxicity of Hydrxy apatite measured by direct cell counting and MTT test in murine fibroblast NIH-3T3 cells. Biomed pap Med fac univ palacky olomouc Czech Repub 2005; 149(2) : 393-6.

11. Stanford JW. Recommendations for determining biocomfatibility and safty for the clinical use of methals in dentistry. Int dent J 1986; 36: 45-8.

12. Kannen TP, Nik Ahmad Shah NL, Azlina A, Samsudin AR, Narazah MY, Salleh M. in vivo chromosom aberration test forhydroxyapatite in mice. Med J Malaysia 2004; 59 suppl B : 115-6.

13. Sharnsuria O, Fadilah AS, Asiah AB, Rodiah MR, Suzina AH, Sorn Sudin AR. In vitro cytotoxicity evaluation of biomaterials on human osteoblast cells CRL-1543: hydroxyapatite, natural coral and polyhydroxy butarate. Med J Malaysia 2004; 59 Suppl B: 174-5.

14. Yel, Su Q, Zhou XD, Tan H. Genotoxicity of a new Nano HA-PA root filling material in virto. Hua Xi Qiang Yi Xue Zazhi 2004; 22(2): 93-5.

15. Yel, Su Q, Zhou XD, Tan H. Animal test of nHA-PA in root canal filling. Scihyan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban 2004; 35(4) 522-4.

16. Kannan TP, Nik Ahmad Shah NL, Azlina A, Samsudin AR, Narazah MY, Sallehm. Chromosome aberration test for hydroxyapatite in sheep. Med J Malaysia 2004; May (59) suppl B: 168-9.

17. Inayat – Hussain SH, Rajab NF, Roslei H, Hussin AA, Ali AM, Annuar Bo. Cell death induced by hydroxyapatite on L 929 fibroblast cells. Med J Malaysia 2004; May (59) suppl B: 176-7.

18. Coimbra ME ,Salles MB, Yoshimoto M, Allegrini S, Fancio E, Higa O,et al. Physico/Chemical Characterization,In Vitro, and In Vivo Evaluation of Hydroxyapatite/PLGA Composite and Tricalcium Phosphate Particulate Grafting Materials. TITANIUM 2009 ; 1(1): 16-28

19. Rojas E, Lopez MC, Valverde M. Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. J Chromatogr B Biomed Sci Appl. 1999(5); 722:225-54.

20. Kasaj A, Willershausen B, Reichert C, Röhrig B, Smeets R, Schmidt M. Ability of nanocrystalline hydroxyapatite paste to promote human periodontal ligament cell proliferation.

Archive of SID

www.SID.ir

Comparison of genotoxicity and cytotoxicity of Iranian Nano-hydroxyapatite and Algipore hydroxyapatite on gingival fibroblasts

Reza Birang, Mohammad Shah Abouei*, Mansour Rismanchian, Houshang Bagheri, Neda Rasaei, Ensiyeh Bateni, Banafsheh Poormoradi

Abstract

Introduction: *Interaction between periodontal cells and bone graft materials is important for the regeneration of periodontal lesions. The aim of this study was to compare the genotoxicity and cytotoxicity of Iranian Nano-hydroxyapatite and foreign Algipore hydroxyapatite on periodontal fibroblasts.*
Materials and Methods: *In this in vitro study, gingival C502 fibroblasts were captured in their logarithmic phase, cultured and grown. Genotoxicity and cytotoxicity of Nano-hydroxyapatite and Algipore hydroxyapatite were evaluated on these cultured cells at 100%, 75%, 50% and 25% concentrations. Comet test was used in order to study the toxicity of the materials on the chromosomes in the nucleus. Multiple regression was used to compare the effect of the two materials at a significance level of $\alpha=0.05$, by considering the percentage of the lysed cells at baseline and after incorporating the two materials.*
Results: *No significant differences were observed between the two materials (p value > 0.05). Multiple regression showed that there was a significant relationship between the cytotoxicity and the concentration of these two materials (p value < 0.05). There was no case of Comet, which indicates that the materials had no genotoxicity.*
Conclusion: *The results of this study demonstrated that Nano-hydroxyapatite is an appropriate alternative to hydroxyapatite, especially in regeneration and repair of periodontal lesions. Further studies are recommended in this regard.*

Key words: *Comet assay, Cytotoxicity, Fibroblast, Genotoxicity, Gingiva, Hydroxyapatite, Nano-hydroxyapatite.*

Received: 2 Dec, 2009 **Accepted:** 6 Jul, 2010

Address: D.S, M.S, Associate Professo, Department of Periodontology and Torabinejad Dental Research Center, School of Dentistry, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.
Email: mshahaboei@dnt.mui.ac.ir

Journal of Isfahan Dental School 2011; 6(6): 655-662.

Archive of SID
www.SID.ir