

# مقایسه اثر سمیت سلولی بر Root – MTA و Portland Cement

## روی سلولهای منونوکلئر خون محیطی انسان

دکتر قاسم حسین جواهری<sup>\*</sup>، دکتر حسن عابدی<sup>\*\*</sup>، دکتر ماندان استاری<sup>\*\*\*</sup>، سعید خلیلی<sup>\*\*\*\*</sup>

### چکیده

سابقه و هدف: Mineral Trioxide Aggregate (MTA) امروزه در جراحی‌های پری‌رادیکولر و درمان موارد پیچیده اندودنتیک از جمله پروفوراسیون‌ها نقش حیاتی بازی می‌کند. سمان پرتلندر نیز به عنوان ماده‌ای که از نظر ساختمانی، میکروسکوپی و ماکروسکوپی مشابه MTA می‌باشد، مطرح است. از طرفی اخیراً در ایران ماده‌ای به نام Root – MTA ساخته شده است که بنا به ادعای سازنده‌گانش تمام خصوصیات MTA را دارد می‌باشد. هدف از این تحقیق مقایسه سمیت سلولی سه ماده فوق بر سلولهای منونوکلئر خون محیطی انسان است.

مواد و روش‌ها: روش تحقیق تجربی و تکنیک اجرای آن مشتمل بر معاینه بیمار، پرسش از بیمار، مشاهده نتایج و تکمیل فرم اطلاعاتی بود. برای انجام این منظور سه ماده مورد مطالعه پس از مخلوط کردن، طبق دستور کارخانه سازنده در داخل لوله‌های هماتوکربیت که به طول ۵mm برش زده شده بودند، قرار داده شدند. پس از گذشت بیست و چهار ساعت آنها در محیط‌های کشت حاوی سلولهای منونوکلئر خون محیطی انسان قرار گرفتند. از لوله‌های هماتوکربیت خالی به عنوان گروه کنترل استفاده شد. این پلیت‌های کشت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و رطوبت ۱۰۰٪ انکوبه شدند. پس از گذشت بیست و چهار ساعت، اثر سمیت سلولی این مواد بر سلولهای منونوکلئر مورد مقایسه قرار گرفت. برای مقایسه‌های آماری از آزمون Kruskal – wallis استفاده شد.

یافته‌ها: در مورد اثرات سمیت سلولی این مواد بر سلولهای منونوکلئر خون محیطی انسان پس از گذشت بیست و چهار ساعت آنالیز آماری نشان داد که اختلاف آماری معنی‌داری وجود دارد ( $P=0.025$ ) بیشترین سمیت سلولی به Root - MTA و کمترین میزان به MTA مربوط بود. با مقایسه دو به دو گروه‌ها مشخص گردید که بین گروه Root - MTA و Root - MTA از نظر اثر سمیت سلولی اختلاف آماری معنی‌دار می‌باشد ( $P=0.033$ ) در حالی که این اختلاف بین گروه MTA و سمان پرتلندر معنی‌دار نمی‌باشد ( $P=0.599$ ).

نتیجه‌گیری: از مشاهدات می‌توان نتیجه گرفت که MTA و سیمان پرتلندر از نظر اثر سمیت سلولی مشابه می‌باشند در حالی که Root - MTA سمیت سلولی بالایی داشت. با توجه به نتایج حاصل می‌توان سیمان پرتلندر را جهت جایگزینی MTA وارد مراحل تحقیقاتی دیگر نمود.

کلید واژگان: سمیت سلولی، MTA، سیمان پرتلندر

تاریخ تأیید مقاله: ۱۳۸۳/۱۰/۷

تاریخ اصلاح نهایی: ۱۳۸۳/۹/۳۰

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۳/۸/۳۰

### مقدمه

استخوان می‌گردد. دندانپزشک ممکن است در درمان ریشه با مشکلات پیچیده‌ای از جمله مشکلات دندانهای تروماتیزه با آپکس باز، تحلیل خارجی ریشه، تکمیل درمانهای اندو به وسیله جراحی‌های پری‌رادیکولر و بستن پروفوراسیون‌ها مواجه

درمان ریشه دندان شامل مواردی از درمان دندانپزشکی است که به معالجه بیماری‌های پالپ و پری‌آپیکال می‌پردازد. هدف از این نوع درمان حذف باکتریها و کلیه عوامل محرکی است که سبب ایجاد عوارضی نظیر درد، آبسه و مشکلات عفونی

E-mail:drjavaheri@sbmu.ac.ir

\*نویسنده مسئول: دانشیار گروه اندودنتیکس، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی.

\*\*استادیار گروه اندودنتیکس، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان.

\*\*\*دانشیار گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی.

\*\*\*\*ایمونولوژیست.

Archive of SID

بودند مرده یا round شده بودند.<sup>(۵)</sup> در مطالعه Saidon و همکاران (۲۰۰۳) که تحت عنوان واکنش سلولی و بافتی به سیمان پرتلند و MTA انجام گرفت مشخص شد که این دو ماده در محیط In vitro و In vivo Cytotoxic نبوده، از این نظر نیز مشابه می‌باشند.<sup>(۶)</sup> از طرفی اخیراً در دانشکده دندانپزشکی تبریز، لطفی اقدام به ساختن ماده‌ای به نام Root - MTA نموده است که مشابه MTA می‌باشد. سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران آنالیز کیفی این ماده را با MTA ساخت کارخانه Tulsadent آمریکا مقایسه نموده، مشابهت آن را مورد تایید قرار داده است. عmadی و همکاران (۱۳۸۱) به مقایسه سمیت سلولی Root-MTA و MTA بر روی سلولهای تک‌هسته‌ای خون انسان پرداختند و به این نتیجه رسیدند که سمیت MTA ایرانی (Root - MTA) به طور معنی‌داری از MTA خارجی (در غلظت‌های مختلف) کمتر می‌باشد.<sup>(۷)</sup> MTA ماده‌ای گران بوده و به راحتی در دسترس نمی‌باشد. بنابراین لزوم جایگزینی ماده مشابهی که در داخل کشور تهیه شده، به راحتی در دسترس بوده، ارزان باشد منطقی به نظر می‌رسد. بنابراین ضرورت دارد که مطالعاتی پیرامون مقایسه این مواد با ماده اصلی انجام پذیرد. هدف از این مطالعه مقایسه اثر سمیت سلولی سه ماده MTA، سیمان پرتلند و Root - MTA بر روی سلولهای مونونوکلئر خون محیطی انسان می‌باشد.

### مواد و روشها

روش مطالعه تجربی و تکنیک اجرای آن مشتمل بر معاینه بیمار، پرسش از بیمار، مشاهده نتایج و تکمیل فرم اطلاعاتی بود. از ۲۰ فرد سالم که در زمان خونگیری، هیچ داروئی مصرف نمی‌کردند. با استفاده از یک سرنگ ۵ cc آغشته به هپارین ۵ cc خون تهیه شد. سپس در شرایط استریل به نمونه خونی جمع‌آوری شده ۵ cc محلول HBSS (Hanks

شود).<sup>(۱)</sup> بنابراین کاربرد موادی که بتوانند مهروموم مناسب ایجاد نموده، در عین حال حداقل واکنش التهابی را داشته باشند، ضرورت دارد. از طرفی این مواد باید به راحتی و سهولت Mineral Trioxide Aggregate (MTA) در اختیار باشند. ماده Lomalinda توسط تراپی نژاد معرفی گردید. پس از انجام تحقیقات بسیار پیرامون خصوصیات فیزیکی و شیمیایی و عدم تحریک کنندگی آن مشخص شده که این ماده جهت درمانهای فوق کاملاً مورد تایید می‌باشد.<sup>(۲)</sup> این ماده در حال حاضر در ایالات متحده آمریکا در بسته‌بندی‌های ۱، ۲ و ۳ گرمی موجود بوده که از قیمت بالایی برخوردار است. بنا به پیشنهاد کارخانه سازنده برای درمان عادی هر ۲ دندان ۱ گرم آن کاربرد دارد.

در تحقیقات بعدی انجام گرفته Green و Wucherpfening در سال ۱۹۹۹ گزارش کردند که MTA و سیمان پرتلند از نظر X-Ray defraction میکروسکوپیک، ماکروسکوپیک و آنالیز مشابه می‌باشند. این محققین همچنین مطرح نمودند که سیمان پرتلند از نظر تطابق و سازگاری نسبجی و حمایت در تشکیل ماتریکس استخوانی کاملاً مشابه MTA می‌باشد.<sup>(۳)</sup> در مطالعه Keiser و همکاران (۲۰۰۰) که به بررسی Super EBA و Amalgam MTA سه ماده cytotoxicity روی سلولهای فیبروبلاست PDL انسان پرداخت در تمام گروههای Fresh mixed با غلظت کم و غلظت زیاد و نیز در گروه set شده با غلظت زیاد، کمترین میزان cytotoxicity به MTA مربوط بود.<sup>(۴)</sup> Abdullah و همکاران (۲۰۰۲) به مقایسه سازگاری نسبجی سیمان ساختمانی Unmodified سیمان پرتلند گلاس آینومر و MTA بر روی سلولهای SaOs-2 استئوسارکومای انسانی در شرایط آزمایشگاهی (invitro) پرداختند. نتیجه تحقیق آنها مشخص کرد که سلولهای SaOs-2 که با MTA و سیمان پرتلند در تماس بودند سالم بوده در حالی که سلولهایی که با گلاس آینومر در تماس

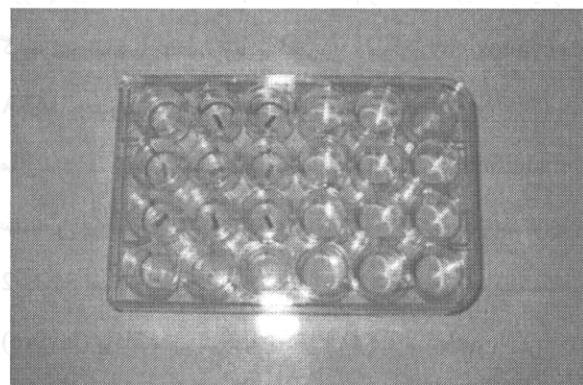
سازنده مخلوط شده، از یک سمت در داخل لوله‌ها قرار داده شدند. (شکل ۲) پس از گذشت مدت زمان ۲۴ ساعت - جهت set شدن مواد - در شرایط استریل، مواد در پلیت‌های کشت گذاشته شدند. (شکل ۳) سپس پلیت‌ها به داخل انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد و  $5\%$   $\text{CO}_2$  منتقل شدند.



شکل ۱ - لوله‌های هماتوکریت



شکل ۲ - مواد مورد مطالعه



شکل ۳ - مواد مورد مطالعه در پلیت‌های کشت

اصفهنه شد. در مرحله بعد ۵ cc از محلول فوق به آرامی و از کنار لوله - به نحوی که با فایکول مخلوط نگردد - بر روی ۳cc فایکول - آلمانی Lymphodex شده از شرکت شیمی طب - اضافه شد. سپس محلول بدست آمده به مدت ۳۰ دقیقه با دور ۱۸۰۰ rpm جهت جداسازی سلولهای منونوکلئر از سایر سلولها سانتریفوژ شد. پس از آن لایه مربوط به سلولهای منونوکلئر به آرامی به داخل یک لوله سانتریفوژ استریل دیگر منتقل و سه مرتبه با محلول HBSS و انجام سانتریفوژ با دور ۱۵۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه شستشو داده شد. پس از بار سوم، مایع رویی خارج شده، بر روی آن ۱ cc محلول HBSS ریخته شد. سلولهای بدست آمده شمارش شدند تا از زنده بودن سلولها، حداقل به میزان ۹۵ درصد، اطمینان حاصل شود. شایان ذکر است که برای اطمینان از زنده بودن سلولها، آنها با تریپان‌بلو رنگ آمیزی شدند. نفوذ توپیان بلو به داخل سلول - نشان‌دهنده نفوذپذیر شدن غشاء به دلیل تغییرات تخریبی یا مرگ می‌باشد.

خوشبختانه در تمام موارد سلولهای زنده در حد بسیار بالای بودند.  $6 \times 10^6$  سلول در هر میلی‌متر مکعب). با استفاده از محلول Gibco-BRL (RPM) ساخت شرکت طوبی نگین)، FCS (Fetal Calf Serum) ساخت شرکت بهار افشار) جنتامایسین سولفات ( $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) و آمفورتیسین B ( $2/5 \mu\text{g}/\text{ml}$ )، محیط کشت مناسب فراهم شد. سپس برای کشت سلولها،  $100 \mu\text{l}$  از سوسپانسیون سلولی به داخل چاهک‌های (well) بلیت‌های کشت ۲۴ خانه‌ای (NuNC - دانمارک خریداری شده از شرکت تکنوژن) ریخته و به آن  $200 \mu\text{l}$  از محیط کشت اضافه شد.

جهت آمده‌سازی مواد مورد مطالعه لوله‌های هماتوکریت (موئینه) به طولهای مساوی  $5 \text{ mm}$  برش زده شده، استریل گردیدند. (شکل ۱) مواد مورد مطالعه طبق دستور کارخانه

مشخص شد که بین گروههای مورد مطالعه اختلاف آماری معنی داری وجود داشت ( $P=0.025$ ) (نمودار ۱). با استفاده از آزمون آماری U Mann Whitney گروههای مورد مطالعه دو به دو با یکدیگر مورد مقایسه قرار گرفته، مشخص شد که این اختلاف آماری بین گروههای Root-MTA و MTA (Root - MTA) ( $P=0.033$ ), همچنین بین Root - MTA و گروه کنترل (Root) ( $P=0.003$ ) معنی دار بود. (جدول ۱) بالاترین میزان cytotoxicity مربوطه MTA - Root و کمترین میزان به MTA مربوط بود. ترتیب میزان cytotoxicity به شرح زیر می باشد: (جدول ۲)

Root-MTA > P.C > MTA

در نهایت پس از گذشت ۲۴ ساعت میزان سلولهای زنده کف پلیت کشت شمارش و viability سلولها محاسبه و با استفاده از آزمون آماری Kruskal Wallis مورد قضاؤت آماری قرار گرفت.

#### یافته ها

این مطالعه بر روی سلولهای منونوکلئو خون محیطی ۲۰ فرد سالم انجام گرفت. در طی مطالعه هیج کدام از نمونه های خونی حذف نشدند. با بررسی اثر cytotoxic مواد مورد مطالعه بر روی سلولهای منونوکلئو خون محیطی انسان پس از گذشت ۲۴ ساعت با استفاده از آزمون آماری Kruskal Wallis

جدول ۱- مقایسه دو به دو مورد مطالعه از لحاظ viability سلولهای چسبیده به کف پلیت کشت در بیست و چهار ساعت

گروه ها	شاخص ها					گروه ها	
	تعداد	میانگین	جمع Rank ها	Mann-Whitney U	Asymp-P (۲ دامتنه)	P واقعی (۲ دامتنه)	
MTA	۲۰	۲۴/۳۸	۴۸۷/۵۰	۱۲۲/۵۰۰	۰/۰۳۳	۰/۰۳۵	
Root-MTA	۲۰	۱۶/۶۳	۳۳۲/۵۰				

گروه ها	شاخص ها					گروه ها	
	تعداد	میانگین	جمع Rank ها	Mann-Whitney U	Asymp-P (۲ دامتنه)	P واقعی (۲ دامتنه)	
MTA	۲۰	۲۱/۴۵	۴۲۹/۰۰	۱۸۱/۰۰۰	۰/۰۹۹	۰/۰۶۲	
Portland cement	۲۰	۱۹/۵۵	۳۹۱/۰۰				

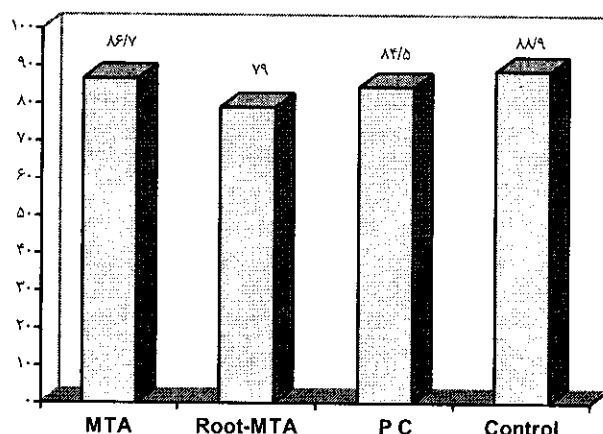
گروه ها	شاخص ها					گروه ها	
	تعداد	میانگین	جمع Rank ها	Mann-Whitney U	Asymp-P (۲ دامتنه)	P واقعی (۲ دامتنه)	
Root-MTA	۲۰	۱۸/۲۹	۴۴۷/۵۰	۱۵۷/۵۰۰	۰/۲۴۵	۰/۲۵۸	
Portland cement	۲۰	۲۲/۵۰	۴۷۲/۵۰				

میزان سمیت سلولی انجام پذیرفت. در انجام این بروزی مانند مطالعات دیگر از لوله‌هایی به عنوان حامل مواد و نیز از همان لوله‌ها به صورت خالی به عنوان کنترل استفاده گردید. استفاده از حامل برای قرار دادن مواد سبب می‌شد که شرایطی مانند شرایط کanal ریشه ایجاد شود. در ضمن با این روش در مدت مطالعه مواد در محیط کشت پخش نمی‌شدند.<sup>(۱۰۹)</sup> در سوابق مطالعاتی که روی MTA و سیمان پرتلند انجام شده، Green و Wucherpfening در سال ۱۹۹۹ گزارش کردند که MTA و سیمان پرتلند غالباً از نظر میکروسکوپیک، ماکروسکوپیک و آنالیز X-Ray defraction مشابه یکدیگر می‌باشند. آنها بیان کردند که هر دو ماده زمانی که به عنوان ماده پالپ کپ مستقیم در دندان Rat استفاده شوند، سبب تشکیل ماتریکس از راه مشابه در محیط کشت سلولهای osteoblast-like می‌باشند.<sup>(۳)</sup> همچنین سبب تشکیل دنتین ترمیمی می‌شوند.<sup>(۳)</sup> و همکاران Estrela در سال ۲۰۰۰ نیز خواص شیمیایی و آنتی‌میکروبیال برخی از مواد از جمله MTA و سیمان پرتلند را مورد بررسی قرار دادند. آنها گزارش کردند که سیمان پرتلند عناصر شیمیایی اصلی مشابه MTA را دارد، فقط به MTA بیسوموت اضافه شده است. آنها نشان دادند که MTA و سیمان پرتلند PH مشابه یکدیگر نیز دارند.<sup>(۸)</sup> در مطالعه‌ای هم که Saidon و همکاران<sup>(۲۰۰۳)</sup> بر روی واکنش سلولی و بافتی MTA و سیمان پرتلند انجام دادند اذعان داشتند که این دو ماده در محیط In vitro cytotoxic نبوده، از این نظر مشابه هم می‌باشند.<sup>(۶)</sup> یافته‌های تحقیق حاضر نیز MTA cytotoxicity و سیمان پرتلند را مشابه نشان داد. با مشاهده جداول آماری یافته‌ها مشخص می‌شود که کمترین میزان cytotoxicity در MTA مشاهده می‌شود که با مشاهدات ترابی نژاد<sup>(۱۹۹۵)</sup> که بیان داشت کمترین cytotoxicity در بین چهار ماده پرکننده انتهای ریشه، مربوط به MTA است<sup>(۲)</sup>. همخوانی دارد. نتایج حاصل از تحقیق Keiser در سال ۲۰۰۰ که اثرات cytotoxic

جدول ۲- مقایسه چهار گروه مورد مطالعه از لحاظ viability

سلولهای چسبیده به کف پلیت در بیست و چهار ساعت.

گروه‌ها	شاخص‌ها	تعداد	میانگین رتبه
MTA		۲۰	۴۳/۶۳
Root-MTA		۲۰	۲۸/۵۲
Protland cement		۲۰	۳۹/۸۳
کنترل		۲۰	۵۰/۰۳
نتیجه آزمون			
Chi Square	۹/۳۴۴		
درجه آزادی (df)	۳		
Asymp.Sig(P)	۰/۰۲۵		



نمودار ۱- مقایسه چهار گروه مورد مطالعه از لحاظ viability

سلولهای چسبیده به کف پلیت کشت در ۲۴ ساعت

## بحث

به علت تشابه ساختمانی و ترکیبات سیمان پرتلند و Root MTA با MTA<sup>(۸)</sup> محققین بر آن شدند تا میزان سمیت سلولی (cytotoxicity) این مواد بر روی سلولهای منونوکلئو خون محیطی انسان را مورد سنجش قرار دهند، تا شاید قدمی در جهت معرفی ماده‌ای جدید به جای MTA بردارند. از آنجا که برای معرفی یک ماده و کاربرد آن در کلینیک در درجه اول به ارزیابی سمیت سلولی این مواد در محیط In vitro نیاز می‌باشد، مراحل آزمایشگاهی زیر برای مواد فوق از نظر بررسی

Archive of SID

ممکن است در روش‌های کاملاً متفاوت به کار گرفته شده در دو تحقیق باشد و از طرفی طراحی و روش تحقیق عmadی (۱۳۸۱) با تحقیق حاضر کاملاً متفاوت بود. عmadی و همکاران (۱۳۸۱) غلظت‌های مختلف مواد مورد مطالعه را بدون این که در حاملی قرار گیرند بر محیط کشت اضافه کرده، در نهایت نیز با استفاده از روش MTT سمیت سلولی را بررسی کردند و یافته‌هایی متفاوت با یافته‌های مطالعه حاضر ارائه نمودند.

### نتیجه‌گیری

از بررسی یافته‌های این تحقیق چنین بنظر می‌رسد سیمان پرتلند با MTA مشابه است که احتمالاً این موضوع بخاطر شباهت ساختاری سیمان پرتلند با MTA می‌باشد. بنابراین مشخص می‌شود که سیمان پرتلند آمادگی شرکت در آزمونهای دیگر جهت جایگزینی MTA را دارد. با توجه به دسترسی آسان به سیمان پرتلند و قیمت مناسب آن و نتایج بدست آمده از این تحقیق راهی برای ادامه کار بر روی این ماده ارزشمند جهت کاربری آن بر روی انسان باز شده است. اما لازم است تا آزمایشات بافتی دیگری نظیر موتازنیستی، القای تشکیل بافت استخوانی و آزمایشات کلینیکی (in vivo, in vitro) در این زمینه توسط محققین دیگر انجام و پیگیری گردد.

### References

1. Torabinejad M, Chivian N, Noah C: Clinical Application of Mineral Trioxide Aggregate. *J Endod* 1999;25:197-205.
2. Torabinejad M, Hong CV: Physical and chemical properties of a new Root End Filling Material. *J Endod* 1995;21:349-352.
3. Wucherpfennig AL, Green DB: MTA VS Portland cement: two biocompatible filling materials. *J Endod* 1994;4:308.
4. Keiser K, ChandJohnson C, Tipton DA: Cytotoxicity of mineral trioxide Aggregate using human periodontal ligament fibroblasts. *J Endod* 2000;5: 288-291.
5. Abdullah D, Pittford TR, Papaianous S, McDonald F, Nicholson J: Evaluation of Accelerated portland cement as a restorative material. *Biomaterials* 2002;19:4001-4010.
6. Saidon J, He J, Zhu Q, Safavi K, Spangberg HS: Cell and Tissue reaction to mineral trioxide aggregate and portland cement. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radio Endod* 2003;4:483-489.

۷. عمادی - م، نظری مقدم - ک: مقایسه سمیت سلولی ایرانی و خارجی بر روی سلولهای تک هسته‌ای خون محیطی. پایان‌نامه دکتری دندانپزشکی، دانشکده دندانپزشکی شاهد، سال تحصیلی ۱۳۸۱-۸۲.

8. Estrela C, Bammann L, Estrela CR, Silva CR, Silva RS, Pecora JD: Antimicrobial and chemical study of MTA, Portland cement, Calcium Hydroxide paste, sealapex and Dycal. Bras Dent J 2000; 11:3-9.

9. Torneek CD: Reaction of rat connective tissue to polyethylene tube implants. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1966;21:379-87.

10. Degrood ME, Oguntebi BR, Cunningham CJ, Pink R: A comparison of tissue reaction to ketac – fil and amalgam. J Endod 1995;21:65-9.

۱۱. آهنگری - ز، حسین‌زاده - ح، اسلامی - ب: بررسی واکنش بافتی MTA و سیمان پرتالندر Rat. مجله دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی ۱۳۸۱؛ ۲۰: ۵۴۷-۵۳۸ (ویژه‌نامه مرکز تحقیقات).

۱۲. اثنتی‌عشری - م، بلورچی - آ، اسلامی - ب، ستاری - م: مقایسه واکنش بافتی دو ماده ROOT-MTA، (Proroot) در بافت همبند Rat. مجله دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی ۱۳۸۲؛ ۲۱: (ویژه‌نامه مرکز تحقیقات) ۶۱۳-۶۰۱.