بررسی آزمایشگاهی سمیت سلولی و آزادسازی عناصر از سه آلیاژ Base metal از نوع نیکل، کروم و مقایسه با یک نمونه آلیاژ High noble، از نوع طلا، پالادیوم، نقره

دکتر شهین رکنی*، دکتر محمودرضا جعفری**، دکتر سارا کوشا***

چکیده

سابقه و هدف: *آلیاژهای دندانی به دنبال پدیده خوردگی می‌توانند تغییراتی در بافت‌های دهانی ایجاد کنند. چون در کشور ما اکثر آلیاژهای مورد استفاده در پروتز ثابت از نوع بیس متال و تولیداتی در زمینه ساخت این نوع آلیاژ در داخل کشور صورت گرفته، هدف از این مطالعه تعیین اثر سمیت سه نمونه آلیاژ بیس متال از نوع نیکل-کروم با یک نمونه آلیاژ* ***high noble*** *روی سلول‌های فیبروبلاست موش* ***L929*** *با استفاده از تست* ***MTT*** *(۳، ٤، ۵ دی متیل تیازول – ۲ و ۵ دی فنیل تترازولیوم برمید) بود.*

مواد و روش‌ها: *مطالعه به روش تجربی انجام گرفت. از هر آلیاژ ۱۲ دیسک به قطر ۵ میلی‌متر و ضخامت ۲/۵ میلی‌متر تهیه و در محیط کشت* ***RPMI*** *به مدت ٤۸ و ۷۲ ساعت قرار داده شد (ایجاد محیط* ***extract****). محیط‌های* ***Extract*** *هر آلیاژ با دو رقت ۲۰۰ میکرولیتر و ٤۰ میکرولیتر تهیه شده، سمیت آنها با تست* ***MTT*** *بررسی و با گروه کنترل شامل محیط کشت بدون نمونه و محیط کشت حاوی نمونه تفلون مقایسه گردید. عناصر نیکل، کروم، مس، روی و نقره آزاد شده از هر آلیاژ با استفاده از دستگاه جذب اتمی اندازه‌گیری شدند. جهت انجام آنالیزهای آماری از نرم‌افزار* ***Graph Instat*** *و آزمون‌های* ***ANOVA*** *یک طرفه و* ***Tukey*** *استفاده گردید.*

یافته‌ها: *پس از ٤۸ ساعت نمونه‌های آلیاژ از نظر سمیت نسبت به هم و نسبت به گروه کنترل، اختلاف معنی‌دار نداشتند. پس از ۷۲ ساعت، نمونه‌ها با هم تفاوت معنی‌داری نداشتند ولی نسبت به گروه کنترل اختلاف معنی‌دار ملاحظه گردید(مینالوکس با کنترل:* ***P<۰/۰۱****، دگوباند با کنترل:* ***P<۰/۰۰۱****، ویرون ۹۹ با کنترل:* ***P<۰/۰۰۱****، سوپرکست با کنترل:* ***P<۰/۰۵****). بین نمونه‌های هرآلیاژ با دو رقت ۲۰۰ میکرولیتر و ٤۰ میکرولیتر تفاوت معنی‌دار وجود نداشت. بیشترین آزادسازی نیکل و کروم از مینالوکس، نقره از دگوباند و روی از سوپرکست صورت گرفت.*

نتیجه‌گیری: *سه نمونه آلیاژ نیکل - کروم و یک نمونه آلیاژ* ***high noble*** *مورد مطالعه از نظر سمیت، تفاوتی با یکدیگر نداشتند. با افزایش زمان مجاورت سلول‌ها با نمونه‌های آلیاژ فوق، درجاتی از سیتوتوکسیته ملاحظه گردید.*

کلید واژگان: *آلیاژ بیس متال، آزادسازی عناصر، سازگاری حیاتی، سمیت سلولی*

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸٤/٦/۲٦ تاریخ اصلاح نهایی: ۱۳۸٤/۱۲/۲۰ تاریخ تأیید مقاله: ۱۳۸۵/۲/۱۵

مجله دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دوره ۲۵، شماره ۳، پاییز ۱۳۸٦، ۲٦۸-۲٦۱

مقدمه

آلیاژها به دلیل خواص مناسب و کاربرد متنوع در رشته‌های مختلف دندانپزشکی به ویژه پروتز دارای اهمیت و جایگاه ویژه‌ای می‌باشند. هر آلیاژ ترکیبی از فلزات مختلف است و نوع و مقدار فلزات تشکیل دهنده در تعیین خصوصیات آن موثر می‌باشد. اصولاً آلیاژهای دندانی براساس ترکیبشان توصیف می‌شوند. ترکیب عناصر به دو شیوه بیان می‌گردد: ۱- درصد وزنی و ۲- درصد اتمی یا درصد اتم‌های هر عنصر. اغلب کارخانه‌های سازنده، همچنین سازمان استاندارد از درصد وزنی برای توصیف آلیاژها استفاده می‌کنند(۱). راه دیگر جهت توصیف آلیاژ براساس مرحله ساختمانی (Phase structure) است. مرحله ساختمانی آلیاژ در پدیده خوردگی و سازگاری حیاتی بسیار مهم است. در

*نویسنده مسئول: استاد گروه پروتز ثابت، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد. E-mail:RokniOrahmani@yahoo.com

**دانشیار گروه فارماکوتیکس، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد.

***استادیار گروه پروتز، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز.

Archive of SID

www.SID.ir

تحقیقی که توسط Tufekci و Mitchell در سال ۲۰۰۲ روی ۲ نمونه آلیاژ High palladium از نظر آزادی‌سازی پالادیوم و گالیوم انجام گرفت، مشاهده شد که آزاد شدن عناصر مزبور به میزان زیادی به مرحله ساختمانی آلیاژ بستگی دارد(۲). از نظر سازگاری حیاتی، خوردگی آلیاژ زمانی رخ می‌دهد که عناصر آزاد شده روی بافت‌های اطراف تاثیر بگذارند.

سازگاری حیاتی عبارت است از توانایی ماده در بروز پاسخ بیولوژیک مناسب در هنگام کاربرد آن. این تعریف به صورت تداخل بین میزبان، ماده و عملکرد ماده می‌باشد (۳،٤). این واکنش‌ها به میزبان، ماده و نیروهایی که به ماده وارد می‌شوند، بستگی دارند. به عبارتی ماده روی میزبان اثراتی می‌گذارد و میزبان هم عکس‌العمل‌هایی روی ماده دارد(۵-۳). Wataha و همکاران (۱۹۹۱) آزاد شدن عناصر در ۱۰ نمونه آلیاژ از گروه Au-pt-pd را به کمک دستگاه flame atomic absorption بررسی نمود و نتیجه گرفت که میزان آزادسازی عناصر به ترکیب و ساختمان میکروسکوپی آلیاژ، خصوصیات ذاتی خود عنصر و شرایط محیطی بستگی دارد(٦). Convington و همکاران (۱۹۸۵) طی تحقیقی، تاثیر pH محیط روی آزادسازی عناصر نیکل و بریلیوم از یک آلیاژ بیس متال را بررسی نمودند و دریافتند که هر قدر pH پایین‌تر و مدت تماس آلیاژ با محیط بیشتر باشد، آزادسازی نیکل و بریلیوم بیشتر می‌شود(۷). همچنین Wataha و همکاران (۲۰۰۳) رابطه مسواک زدن را با سمیت آلیاژها مورد بررسی قرار داده و عنوان کردند که مسواک زدن می‌تواند باعث افزایش آزادسازی عناصر از آلیاژهای ریختگی دندانی و ناپایداری بیولوژیک آلیاژ گردد(۱۵-۸). مطالعات Sjogren و Odent (۲۰۰۰) نیز نشان داد که انجام سند بلاست و پرداخت باعث می‌شود تا عناصر کمتری آزاد گردند و بنابراین سمیت سلولی کاهش می‌یابد (۱). از آنجا که در حال حاضر بقای درمان، اهمیت بیشتری پیدا کرده، سازگاری نسجی مواد مورد استفاده، حیاتی‌تر شده است.

به طور کلی مقاومت آلیاژ در برابر خوردگی با کاهش میزان فلزات نوبل کاهش می‌یابد. مطالعات انجام شده، نشان داده‌اند که استفاده از آلیاژهای بیس متال باعث ایجاد عوارضی از قبیل سرطان‌زایی در حیوانات کوچک و ایجاد حساسیت بافتی در انسان شده است که به دلیل خوردگی و متعاقب آن آزادسازی عناصری نظیر نیکل، بریلیوم و کروم می‌باشد(٦،۷). برای به حداقل رساندن خطرات بیولوژیک، دندانپزشکان باید آلیاژهایی انتخاب کنند که دارای حداقل آزادسازی عناصر باشند (حداقل خوردگی). سمیت موضعی و سیستمیک، آلرژی و سرطان‌زایی همگی در نتیجه عناصری است که حین خوردگی از آلیاژ به محیط دهان آزاد می‌شوند. آلیاژهای High noble علی‌رغم ویژگی‌های مطلوب از قبیل سهولت ریخته‌گری، سهولت پرداخت، انطباق مارژین ... از قیمت بالایی برخوردارند، به همین دلیل آلیاژهای متنوعی از نوع بیس متال به بازار عرضه شده‌اند. در کشور ما اکثر آلیاژهای مورد استفاده در پروتز ثابت از نوع بیس متال بوده و تاکنون تولیداتی در زمینه ساخت این نوع آلیاژ انجام گرفته است. (نظیر تولید مینالوکس ساخت شرکت موادکاران وابسته به مرکز تحقیقات جهاد سازندگی). هدف از انجام این تحقیق مقایسه و ارزیابی سازگاری حیاتی سه نمونه آلیاژ نیکل - کروم (سوپرکست، ویرون ۹۹، مینالوکس) از نظر سمیت سلولی به صورت in vitro با آلیاژ طلا، پالادیوم، نقره (دگوباند ٤) با توجه به دستورالعمل‌های موجود در کتب مواد دندانی و استانداردهای مختلف و مطالعات قبلی و نیز با در نظر گرفتن امکانات موجود بود.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی، براساس استاندارد ایزو ISO 10993 (۱٦) مبنی بر استفاده از حداقل ۳ نمونه و براساس مطالعات قبلی، ۱۲ نمونه از هر آلیاژ تهیه گردید و جهت بررسی در دو زمان ٤۸ و ۷۲ ساعت به دو گروه شش‌تایی تقسیم شدند. آلیاژهای مورد مطالعه آلیاژ سوپر کست، مینالوکس، ویرون ۹۹ و دگوباند ٤ بودند (جدول ۱ و ۲). نمونه‌ها براساس استاندارد ISO 10993 و براساس مطالعات گذشته به صورت دیسک‌هایی به قطر ۵/۵ میلی‌متر و ضخامت ۲/۵ میلی‌متر تهیه شدند. برای سهولت کار دسته‌ای به قطر ۲ و ارتفاع ۳ میلی‌متر تهیه گردید. برای این منظور ابتدا دیسک‌هایی با ابعاد فوق از جنس آکریل فوری تهیه و سپس به روش حذف موم ریخته شده و پرداخت گردیدند.

Archive of SID
www.SID.ir

از آنجا که تفلون دارای پاسخ سیتوتوکسیک منفی می باشد، از آن به عنوان کنترل منفی استفاده شد. نمونه‌های تفلون در ابعاد مشابه سایر نمونه‌ها تهیه گردید. همچنین گروه کنترل دیگری که حاوی محیط کشت و سلول بود، برای مقایسه با گروه‌های مورد آزمایش در نظر گرفته شد. تعداد هر یک از گروه‌های کنترل ۱۲ عدد بود.

جدول ۱- ترکیب شیمیایی یک نمونه آلیاژ high noble (کاتالوگ کارخانه سازنده)

عناصر / آلیاژ	Au	Pd	Ir	Ag	Sn	Ga	Ta	Re
Degubond 4	٪۴۹/۶	٪۲۹	٪۰/۱	٪۱۷/۵	٪۳	٪۰/۵	٪۰/۱	٪۰/۲

جدول ۲- ترکیب شیمیایی سه نمونه آلیاژ نیکل ـ کروم (کاتالوگ کارخانه‌های سازنده)

عناصر / آلیاژ	Ni	Cr	Mo	Nb	Be	Fe	C	Si	Ce
Minalux	عنصر پایه	٪۱۲	٪۳/۵	٪۴/۲۵	--	---	--	--	
Super cast	٪۷۵	٪۱۴	٪۵	--	٪۱/۶	---	---	--	
Wirron 99	٪۶۵	٪۲۲/۵	٪۹/۵	٪۱	--	٪۰/۵	٪۰/۰۲	٪۱	٪۰/۵

پس از از انجام مراحل پرداخت، قبل ازآزمایش، مراحل تمیز کردن نمونه‌های آلیاژ و تفلون به ترتیب زیر صورت گرفت:

۱- قرار گرفتن در فسفات بافرسالین (pH=۷/۴) و گذاشتن داخل دستگاه اولتراسونیک به مدت ۳۰ دقیقه.

۲- شستشو با آب مقطر.

۳- قرار گرفتن در الکل اتانول ۷۰٪ و گذاشتن داخل دستگاه اولتراسونیک (۵ دقیقه).

۴- شستشو با آب مقطر.

۵- قرار گرفتن در استون و گذاشتن در دستگاه اولتراسونیک (۱۰ دقیقه).

۶- شستشو با آب مقطر و خشک کردن آن.

۷- قرار دادن مجدد در استون و بردن در دستگاه اولتراسونیک (۱۰ دقیقه).

۸- بردن نمونه‌ها به زیر هود لامینار (قم، ایران، شرکت بعثت، مدل BSC-126)، شتشو با آب مقطر استریل و خشک کردن آنها.

پس از آماده‌سازی، نمونه‌های مورد آزمایش به ظروف ۲۴ خانه حاوی ۲۴ خانه یا چاهک سلولی منتقل شدند و به هر چاهک cc ۰/۵ محیط کشت RPMI-1640 (شرکت بیوژن- مشهد، ایران) اضافه گردید.

محیط کشت RPMI شامل پودر RPM، استرپتومایسین، پنی‌سلین، آمفوتریسین B، بی‌کربنات سدیم و FCS (Fetal Calf Serum) (GIBCO، مدل 087–25140، فلورایدا، آمریکا) می‌باشد.

سپس درب آن محکم بسته و درون فویل آلومینیوم پیچیده و به دستگاه Shaker (HANA، ناپل، ایتالیا) منتقل گردید. نمونه‌ها به مدت ۵ روز در دمای ۳۷ درجه در این دستگاه تحت لرزش قرار گرفتند. با این کار آزادسازی بیشتر عناصر ازآلیاژ صورت گرفت.

سلول‌های فیبروبلاست موش (L929) که از بخش ایمونولوژی پژوهشکده بوعلی (مشهد) تهیه شده بودند، در ظرف ۹۶ خانه (NUNC، کپنهاگ، دانمارک) قرار داده شدند به گونه‌ای که ۱۰۰۰ سلول در ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت داخل هر خانه (چاهک سلولی) قرار داده شد. سپس ۲۴ ساعت داخل انکوباتور (LEEC، شفیلد، انگلستان) قرار گرفت تا سلول‌ها به کف چاهک سلولی بچسبند. (ویژگی سلول‌های فیبروبلاست آن است که دارای استطاله‌هایی از اطراف هستند که به کمک آن به جداره ظرف می‌چسبند). پس از گذشت ۲۴ ساعت محیط کشت به وسیله سمپلر از چاهک‌های ۹۶ خانه آسپیره گردید و محیط کشت حاوی عناصر آزاد شده که در ظرف ۲۴ خانه تهیه شده بودند به ظرف ۹۶ خانه حاوی سلول‌های فیبروبلاست با دو رقت neat (۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت حاوی عناصر آزاد شده) و یک پنجم (۴۰ میکرولیتر محیط کشت حاوی عناصر آزاد شده و ۱۶۰ میکرولیتر محیط کشت معمولی) افزوده شده و به مدت ۴۸ و ۷۲ ساعت در مجاورت سلول‌های فیبروبلاست در محیط‌های فوق داخل انکوباتور قرار گرفتند. پس از گذشت زمان لازم، ظرف ۹۶ خانه از انکوباتور خارج گردیده و ۲۰ میکرولیتر محلول MTT[1] [۵ میلی‌گرم MTT در ۱

[1] MTT: ۳و ۴ و ۵ دی متیل تیازول – ۲ و ۵ دی فنیل تترازولیوم برمید یا نمک تترازولیوم محلول در آب است تست MTT فعالیت آنزیم دهیدورژناز سلول را اندازه‌گیری می‌کند. نمک تترازولیوم از طریق چند عامل احیاکننده سلولی به یک ترکیب فورامازان بنفش رنگ تبدیل می‌شود که غیرمحلول است. اگر آنزیم دهیدروژناز سلول به علت اثرات سیتوتوکسیک فعال نباشد، فورامازان تشکیل نخواهد شد.

Archive of SID
www.SID.ir

میلی‌لیتر فسفات بافر سالین [SIGMA]، شرکت بتا، مشهد، ایران)] به هر چاهک افزوده شد. از آن جا که محلول MTT به نور حساس است، ظرف ۹۶ خانه توسط فویل پوشانده شده، به مدت ۳ الی ٤ ساعت داخل انکوباتور قرار گرفت. پس ازآن، ظرف ۹۶ خانه از انکوباتور خارج گردیده و هر یک از خانه‌ها (چاهک‌های سلولی) آسپیره و ۲۰۰ میکرولیتر DMSO (دی متیل سولفوکساید) [SIGMA] همراه با ۲۵ میکرولیتر بافر گلایسین Nacl (pH=۱۰/۵) [SIGMA] جهت حل کردن بلورهای فرومازان به هر یک از خانه‌ها اضافه شد. سپس ۳ الی ۵ دقیقه تحت لرزش قرار گرفت و در نهایت در دستگاه 2Microplate reader [STATFAX، فلوریدا، آمریکا STATFAX303] در طول موج ۵۷۰ نانومتر میزان جذب نمونه‌ها اندازه‌گیری شد. شدت جذب با تعداد سلول‌های زنده نسبت مستقیم دارد. تولید فورامازان با تجزیه و حل شدن آن و اندازه‌گیری جذب نوری محلول حاصل، به صورت کمی بررسی می‌شود.

آزادسازی نیکل، کروم، نقره، مس و روی: انتخاب عناصر برای اندازه‌گیری آزادسازی براساس مطالعات قبلی بوده است(۷-۵). جهت اندازه‌گیری میزان آزادسازی یون‌های نیکل، کروم، نقره، مس و روی از ٤ نمونه آلیاژ مزبور، از محیط کشت RPMI (شرکت بیوژن، مشهد، ایران) استفاده شد. مقدار cc ۰/۵ محیط کشت، وارد ویال گردید و نمونه آلیاژ داخل آن قرار گرفت. برای هر آلیاژ ٦ نمونه در نظر گرفته شد. پس از ۵ روز که نمونه‌ها در مجاورت محیط کشت و داخل دستگاه Shaker [HANA، ناپل، ایتالیا]، تحت لرزش قرار گرفتند، نمونه‌های آلیاژ از ویالها [NUNC، کپنهاگ، دانمارک]، خارج گردیده و محلول استخراج شده به آزمایشگاه ارسال گردید. اندازه‌گیری آزادسازی عناصر فوق در این تحقیق به روش دستگاه جذب اتمی[۲] (AA 670) Shimadzo و کوره گرافیت (GFA-4B، آلمان) برحسب PPB (Part per Billion) در آزمایشگاه شیمی تجزیه دانشکده علوم پایه مشهد صورت گرفت.

جهت انجام آنالیزهای آماری از نرم‌افزار آماری Graph Instat و آزمون‌های آماری ANOVA یک‌طرفه و Tukey – Keramer استفاده گردید.

یافته‌ها

نتایج آزمایش پس از ٤٨ ساعت نشان داد که بین ٤ نمونه آلیاژ با غلظت ۲۰۰ و با غلظت ٤۰ میکرولیتر تفاوت معنی‌دار وجود ندارد، به عبارتی هیچ یک از نمونه‌ها، سمیت سلولی ایجاد نمی‌کنند.

نتایج پس از ۷۲ ساعت نشان دادند که کلیه نمونه‌های آلیاژ با غلظت ۲۰۰ میکرولیتر با گروه‌های کنترل اختلاف معنی‌دار داشتند (مینالوکس با گروه کنترل P<۰/۰۱، دگوباند ٤ با گروه کنترل P<۰/۰۰۱، ویرون ۹۹ با گروه کنترل P<۰/۰۰۱، سوپر کست با گروه کنترل P<۰/۰۵). به عبارتی نمونه‌های آلیاژ با غلظت ۲۰۰ میکرولیتر درجاتی از سمیت سلولی در مقایسه با گروه کنترل نشان می‌دادند. بین نمونه‌های هر آلیاژ با دو رقت ۲۰۰ و ٤۰ میکرولیتر از لحاظ آماری اختلاف معنی‌دار ملاحظه نگردید. همچنین پس از ۷۲ ساعت بین نمونه‌های آلیاژ با غلظت ٤۰ میکرولیتر در مقایسه با گروه‌های کنترل، اختلاف معنی‌دار مشاهده نشد. بین نمونه‌های آلیاژها نیز تفاوت معنی‌دار ملاحظه نشد.

میزان آزادسازی عناصر از ٤ نمونه آلیاژ

با استفاده از آزمون ANOVA یک طرفه میزان آزادسازی عناصر مورد ارزیابی و مقایسه قرار گرفته، نتایج زیر به دست آمد:

نیکل: کمترین میزان آزادسازی نیکل مربوط به دگوباند ٤ و بیشترین میزان از آلیاژ و یرون ۹۹ صورت گرفته است (P<۰/۰۰۱). در مینالوکس و سوپر کست آزادسازی نیکل بیش از دگوباند ٤ (P<۰/۰۱) و به طور معنی‌داری کمتر از ویرون ۹۹ بود (P<۰/۰۱) ولی بین مینالوکس و سوپرکست این اختلاف معنی‌دار نبود.

کروم: بیشترین آزادسازی مربوط به ویرون ۹۹ بود که اختلاف معنی‌داری با سایر گروه‌ها داشت (P<۰/۰۰۱) و کمترین آزادسازی مربوط به دگوباند ٤ بود که اختلاف بارزی (P<۰/۰۰۱) با سایر گروه‌ها نشان می‌داد. مینالوکس

[۲] دستگاه جذب اتمی: دستگاهی است که به کمک آن تعداد سلول‌های زنده به طور کمی اندازه‌گیری می‌شود. به هر چاهک سلولی نور با طول موج ۵۷۰ nm توسط دستگاه تابانده می‌شود. سلول‌های زنده قادر به تولید فورامازان بنفش رنگ هستند. هر قدر تعداد سلول‌های زنده در هر چاهک بیشتر باشد، دستگاه عدد بالاتری را نشان می‌دهد.

Archive of SID
www.SID.ir

و سوپر کست نسبت به دگوباند ٤ بطور مشخصی کروم بیشتری آزاد کرده بودند (P<۰/۰۰۱) ولی بین مینا‌کولس و سوپر کست از نظر آزادسازی کروم اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید.

روی: بیشترین آزادسازی روی مربوط به سوپر کست بود و کمترین آن در مینالوکس صورت گرفت (P<۰/۰۰۱). همچنین در دگوباند ٤ به طور معنی‌داری بیش از مینالوکس (P<۰/۰۰۱) و در ویرون ۹۹ به طور معنی‌داری بیش از دگوباند ٤ بود (P<۰/۰۰۱).

مس: بیشترین میزان آزادسازی مس از نظر عددی در مینالوکس و کمترین آن در دگوباند ٤ صورت گرفت، ولی از نظر آماری بین ٤ نمونه آلیاژ تفاوت معنی‌داری وجود نداشت.

نقره: بیشترین آزادسازی نقره از دگوباند ٤ صورت گرفت که به طور بارزی با بقیه گروه‌ها اختلاف داشت (P<۰/۰۰۱). بین ویرون ۹۹، مینالوکس و سوپر کست، از نظر آماری تفاوتی مشاهده نگردید (جدول ۳).

جدول ۳- میانگین و انحراف معیار عناصر آزاد شده از هر آلیاژ

آلیاژ / عناصر آزاد شده	مینالوکس	دگوباند	سوپرکست	ویرون۹۹
نیکل	۱۸۹±۲۲	۸٤±۱۰	۲۰۱±۱۳	۳۸٥±۳۷
کروم	۸/۹±۱/٥	۱/٦±۰/۳	۱۰/۳±۱/٦	٥٤/٥±۳/٤
مس	۱۰/٤±۱/۹	۷/۹±۱/٥	۹/۰±۱/۲	۹/۹±۱/٦
روی	۱۸٤±۱٤	۲۹۷±۱٤	٥۸۳±۱۸	٤۸۲±۱۱
نقره	٤/۳±۰/۹	۲٥/۹±٥/٥	۲/۲±۰/٤	۳/۳±۰/٦

بحث

بررسی مقالات در رابطه با آزمایشات کشت سلولی با انواع مختلف سلول‌ها که برای نشان دادن تخریب سلولی توسط مواد دندانی انجام گرفته، نشان می‌دهد که دو نوع سلول فیبروبلاست لثه انسانی (HGF) و فیبروبلاست موش (L929) برای این منظور به کار رفته‌اند. جهت انجام این مطالعه براساس دستورالعمل موسسه بین‌المللی استاندارد و براساس مطالعات قبلی، از سلول فیبروبلاست موش (L929) استفاده شد(۱۱).

علت انتخاب این سلول در اکثر مطالعات انجام شده ، سهولت کار با رده سلولی به صورت ثانویه در مقایسه با سلول‌های انسانی بود.

انتخاب گروه آلیاژها براساس فراوانی آنها در بازار کشور و استفاده متداول آنها در لابراتوارهای دندانپزشکی جهت ساخت فریم پروتز ثابت صورت گرفت.

در مطالعات قبلی مشخص شده است که وجود سلول‌ها در محیط کشت نقشی در روند خوردگی آلیاژ ندارد و به نظر می‌رسد خوردگی، بیشتر واکنش میان آلیاژ و محیط کشت باشد. در اکثر مطالعات انجام شده جهت بررسی ارتباط آزاد سازی عناصر و سمیت سلولی، از محیط کشت استفاده شده است(٦). در مطالعه‌ای که در سال ۱۹۹۹ توسط Nelson و همکاران، صورت گرفت، میزان خوردگی یک آلیاژ stainless-steel در سه نمونه محلول نرمال سالین، نرمال سالین حاوی سرم آلبومین گاوی و محیط کشت، مورد مقایسه قرار گرفت. نتایج این مطالعه نشان داد که حضور پروتئین در محلول، می‌تواند بر روند خوردگی آلیاژ تاثیر بگذارد، به طوری که بیشترین مقدار خوردگی در نمونه‌های قرار گرفته در محلول نرمال سالین حاوی سرم گاوی رخ می‌دهد (۱۲،۱۳).

جهت بررسی سمیت و فعالیت متابولیک سلولی از تست MTT استفاده شد که در اکثر مقالات قبلی، این روش به عنوان یک روش معمول و گاهی به عنوان تنها روش مورد استفاده در اینگونه آزمایشات بکار رفته است(١٤).

در بررسی نتایج آزمایش پس از ٤٨ ساعت، بین کلیه نمونه‌ها با گروه کنترل، اختلاف معنی‌داری وجود نداشت(P>۰/۰٥). همچنین بین خود نمونه‌ها نیز اختلاف معنی‌داری ملاحظه نگردید (P>۰/۰٥) که این مطلب نشان‌دهنده عدم وجود سمیت پس از ٤٨ ساعت می‌باشد. بررسی نتایج پس از ۷۲ ساعت نشان داد که بین کلیه نمونه‌ها از نظر آماری، اختلاف معنی‌داری وجود ندارد (P>۰/۰٥) ولی با گروه کنترل اختلاف معنی‌دار بود. به عبارت دیگر با افزایش زمان مجاورت

Archive of SID
www.SID.ir

سلول‌ها در معرض extract، اثرات سمیت سلولی ملاحظه گردید.

با بررسی نتایج پس از ۷۲ ساعت مجاورت سلولی، ملاحظه شد که سمیت Degubond 4 نسبت به گروه کنترل با غلظت neat، ۳۳/۲٪ است در حالی که این میزان برای Wirron 99، ۳۱/٤٪، Minalux ۲۸/٦٪ و Supercast ۲۲٪ می‌باشد. از نظر عددی (نه آماری) بالاتر بودن سمیت Degubond می‌تواند به علت آزاد شدن بالای یون نقره باشد. براساس مطالعه Sjogren (۲۰۰۰) و محققین قبلی عنوان شده که نقره در کلیه آزمایش‌های invitro، سیتوتوکسیک است(۱). وقتی غلظت یون نقره در محیط افزایش می‌یابد، میزان فعالیت سلولی کاهش می‌یابد. با توجه به اینکه ۱۷/۵٪ وزنی آلیاژ Degubond را نقره تشکیل می‌دهد، متعاقباً تعدادی از سلول‌ها در تماس با یون نقره از بین می‌روند و میزان جذب نوری کاهش می‌یابد.

در مطالعه فوق در Degubond 4، آزادسازی نیکل و کروم به طور معنی‌داری کمتر از سایر نمونه‌ها صورت گرفته که به علت درصد پایین این عناصر در ترکیب آلیاژ می‌باشد.

در سه نمونه آلیاژ نیکل ـ کروم ، بیشترین آزادسازی نیکل و کروم در Wirron99 و بالاترین آزادسازی روی Supercast صورت گرفته است. درصد وزنی کروم در Wirron 99 تقریباً ۲ برابر Minalux و Supercast است، ضمن اینکه مرحله ساختمانی آلیاژ و ترکیب عناصر تشکیل دهنده آن می‌تواند در آزاد شدن عناصر تاثیر بسزایی داشته باشد.

در این مطالعه بررسی تاثیر رقت Extract با دو رقت neat ۱/۱ و ۱/۵، از نظر عددی (نه آماری) با هم متفاوت بودند. میزان جذب نوری در نمونه‌های با رقت ٤۰µl در مقایسه با ۲۰۰µl از هر آلیاژ، اعداد بالاتری را نشان داده است. ولی از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری وجود نداشت (P>۰/۰۵). براساس مطالعات جداگانه‌ای که توسط Sjogren (۲۰۰۰) و Tufekci و Mitchell (۲۰۰۲) و سایر محققین انجام گرفته، افزایش غلظت یونها در محیط روی سمیت موثر است(۱،۲). عدم وجود اختلاف آماری در دو رقت انجام شده نشان دهنده این است که عناصر آزاد شده در محیط، از پتانسیل تخریبی و قدرت سمیت سلولی پایینی برخوردارند. احتمالاً اگر میزان رقت در حد پایینتر (مثلاً ۱۰/ ۱ یا ۱/۲۰) تهیه می‌گردید، تاثیر غلظت در ایجاد واکنشهای سمیت سلولی، از لحاظ آماری قابل ملاحظه بود.

به طور کلی هیچ ماده‌ای وجود ندارد که وقتی درون بدن قرار می‌گیرد، عنصری آزاد نکند. اگر عناصر آزاد شده از آلیاژ، همان عناصری باشند که در رژیم غذایی روزانه وجود دارند، در این صورت به نظر نمی‌رسد که آن عنصر در ایجاد سمیت سیستمیک، نقش مهمی داشته باشد. مطالعات Skipor و Jucob (۱۹۹۳) نشان داده است که میزان تیتانیوم که در بسیاری از فرآورده‌ها نظیر مواد خوراکی، کرم‌های ضد آفتاب، فیلرهای دارویی و لوازم آرایشی وجود دارد، بیش از مقدار عناصر آزاد شده از آلیاژ است(٤).

براساس مطالعات Brune (۱۹۸٦) مقدار روی آزاد شده از آلیاژهای دندانی ۰/۱ µg/day است که به مراتب پایین‌تر از مقداری است که از طریق رژیم غذایی دریافت می‌شود. (۱٤۲۵۰ µg/day)، یا میزان مس آزاد شده از یک crown ممکن است به ۰/۲µg/day برسد که در مقایسه با میزان مس دریافتی از رژیم غذایی (۳۱۱۰ µg/day) بسیار ناچیز است(۵).

این مطالعه نشان داد که آلیاژهای دندانی می‌توانند باعث تخریب سلولی شوند. به عبارتی عناصر آزاد شده از آلیاژ مسئول تخریب سلولی هستند ولی همواره باید در نظر داشت که منافع استفاده از آلیاژ بیشتر است یا مضرات حاصل از آزاد شدن عناصر. اکثر محققین معتقدند که منافع حاصل از کاربرد آلیاژهای دندانی بیش از خطر آزاد شدن عناصر از آنان است(۳).

محیط کشت مورد استفاده در آزمون سمیت و آزادسازی دارای pH خنثی می‌باشد. مطالعات انجام شده در مورد اثر pH روی آزادسازی عناصر حاکی از تاثیر pH اسیدی در افزایش مقدار آزادسازی عناصر از آلیاژهای با Base نیکل می‌باشد که در این تحقیق در نظر گرفته نشده است(۱۲،۱۳).

در نهایت اینکه، تحقیق حاضر یک آزمایش invitro کوتاه مدت (٤۸ ساعت و ۷۲ ساعت) است که نمی‌تواند معرف آزمایشات invivo یا invitro درازمدت باشد. نتایج آزمایشات invitro کوتاه‌مدت اهمیت دارند، اما مقادیر اولیه

Archive of SID

www.SID.ir

تنها می‌توانند بخشی از نمای سمیت یک آلیاژ باشند. به صورت کلینیکی، مواجهه کوتاه مدت عنصر با بافت لثه‌ای آسیب دیده ممکن است دورهٔ مهمی در نمای سمیت کلی یک آلیاژ باشد(۱٤).

جهت بررسی میزان صحت و اعتبار نتایج، پیشنهاد می‌شود آزمایشاتی روی ردهٔ سلولهای فیبروبلاست لثه انسان و در مطالعهٔ جداگانه‌ای روی حیوانات کوچک انجام شود.

با توجه به تأثیر pH در آزادسازی یون‌ها، اثر تغییرات pH روی آزادسازی یون‌ها از ٤ نمونه آلیاژ مزبور، مورد بررسی قرار گیرد.

به منظور ایجاد شرایط مشابه با محیط دهان، استفاده از محیط بزاق مصنوعی جهت بررسی آزادسازی عناصر پیشنهاد می‌گردد.

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج حاصل از این تحقیق می‌توان نتیجه گرفت:

۱ـ اختلاف قابل ملاحظه‌ای از نظر سیتوتوکسیسیته بین سه نمونه آلیاژ نیکل ـ کروم و یک نمونه آلیاژ high noble مورد مطالعه، وجود ندارد.

۲ـ با افزایش زمان مجاورت سلول‌ها با نمونه‌های آلیاژ فوق، درجات پایینی از سمیت سلولی، ایجاد می‌شود.

References

1. Sjogren G, Odent D: Cytotoxicity of dental alloys, metals and ceramics assessed by Millipore filter agar overlay and MTT tests. J Prosthet Dent 2000;84:229-36.
2. Tufekci E, Mitchell M: Inductively coupled plasma-mass spectroscopy measurements of elemental release from 2 high paladium dental casting alloys in to a corrosion testing medium. J Prosthet Dent 2002;87:80-5.
3. Wataha JC: Biocompatibility of dental casting alloys: A review. J Prosthet Dent 2000;83:223-34.
4. Jacob S, Skipor AK, Black J, Monion LM, Schavocky J, Paprosky WP: Serum titanium transport in patients following primary total hip replacement: A 2 year prospective study. Trans Soc Biomater 1993;16:217-223.
5. Brune D: Metal release from dental biomaterials. Biomaterials 1986;7:163-75.
6. Wataha JC, Craig RG, Hanks CT: The release of elements of dental casting alloys in to cell-culture medium. J Dent Res 1991;70:1014-18.
7. Covington JS, McBride MA, Slayle WF: Quantization of nickel & Beryllium leakage from base metal casting alloys. J Prosthet Dent 1985;54:127-139.
8. Wataha JC, Lockwood PE, Nelson S: Effect of tooth brushing on Elemental Release from Dental Casting Alloys. J Prosthodont 1999;8:245-51.
9. Wataha JC, Lockwood PE, Nada M, Nelson S, Mettenburg D: Effect of tooth brushing on the toxicity of casting alloys. J Prosthet Dent 2002;87:94-8.
10. Wataha JC, Lockwood PE, Kajcatia S, Turner R: Effect of pH on elemental release from dental casting alloys. J Prosthet Dent 1998;80:641-48.
11. Craig RG, Hanks CT: Reaction of fibroblasts to various dental casting alloys. Oral Pathol 1988;17:341-47.
12. Craig RG, Hanks CT: The release of elements of dental casting alloys in to cell culture medium. J Dent Res 1991; 70:1614-18.
13. Steven K, Nelson D, Wataha JC, Lockwood E: Accelerated toxicity testing of casting alloys and reduction of intraoral release of elements. J Prosthet Dent 1999;81:715-20.

Archive of SID
www.SID.ir

14. Wennberg A: Invitro assessment of the biocompatibility of dental materials- the milipore filler method. J Inter Endo 1988;21:67-71.
15. Wataha JC, Lockwood PE, Mettenburg D, Bouilaguet S: Tooth brushing causes elemental retease from dental casting alloys over extended intervals. J Biomed Mater Res 13 Appl Biomater 2003;65:180-5.
16. International standard organization. Biological evaluation of medical devices; Part 5: Test for cytotoxicity: In vitro Methods. 2nd ISO 10993,1999(E).

Archive of SID

www.SID.ir