دانشور
پزشکی

دوماهنامه علمی–پژوهشی
دانشگاه شاهد
سال هفدهم– شماره ۸۶
اردیبهشت ۱۳۸۹

وصول: ۸۸/۱۱/۳
آخرین اصلاحات:۸۸/۱۲/۱۹
پذیرش: ۸۸/۱۲/۲۴

بررسی اثر سایتوتوکسیک بایومتریال ژلاتین ماتریکس داخل غضروفی استخوان انسان روی سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی

حسین شاهون*[۱]، طوبی غضنفری[۲]، ناصر ولایی[۳]، مجتبی ترک صفایی[٤]

۱- متخصص جراحی دهان، فک و صورت، استادیار و مدیرگروه بخش جراحی فک و صورت دانشکده دندانپزشکی دانشگاه شاهد
۲- دانشیار بخش ایمونولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه شاهد
۳- مشاور آمار
٤- دندانپزشک، دانشکده دندانپزشکی دانشگاه شاهد
* نویسنده مسئول: **Email : Shahoonh@yahoo.com**

چکیده

مقدمه و هدف: بافت استخوانی یکی از عمده‌ترین بافت‌های موجود در بدن انسان است که همواره مورد پیوند (ترانسپلنتیش) قرار می‌گیرد. کاربرد گرافت‌ها به صورت اتوژن و آلوژن با مشکلات خاصی از قبیل، پس زدن، محدودیت دهنده استخوان، افزایش زمان جراحی، عفونت‌ها و در نهایت مرگ و میر احتمالی مواجه می‌شود و علاوه بر این، تحمل جراحی دوباره برای افرادی که از آنها اوگرافت تهیه می‌شود، مشکل است. اصولاً بایومتریال‌ها با استفاده از خاصیت استئواینداکتیو یا استئوکانداکتیو به صورت کمی یا کیفی در موضع نقص استخوان عمل می‌کنند، اما HECBMG به طور اختصاصی به صورت کیفی عمل می‌کند و با حجم بسیار کم از این ماده می‌توان به نتیجه دلخواه دست یافت. برای حل این مشکلات فوق، موادی از قبیل ترکیبات مختلف (کلسیم- فسفات) معرفی شده‌اند که این مواد به دلیل شباهت‌های نزدیک فیزیکی و شیمیایی با مواد معدنی طبیعی استخوان و تحریک کمتر بافت‌های میزبان، واکنش‌های آماسی کمتری ایجاد می‌کنند. این بایومتریال (HECBMG) از انسان گرفته شده و سرشار از BMPs است و خاصیت استئواینداکتیو (OSTEOINDUCTIVE) بیشتری نسبت به بایومتریال‌های دیگر با پایه پروتئینی دارد و بدن میزبان نسبت به این ماده هیچ‌گونه واکنش سوئی ندارد. با تکیه بر اهمیت و روند ترمیم نقایص استخوانی و اهمیت پاسخ سلولی و منشاء سلول‌های استخوان‌ساز و همین‌طور تحریک سلول‌های مزانشیمال اندیفرانسیه، تصمیم به بررسی اثر سایتوتکسیک این بابومتریال گرفتیم.

مواد و روش کار: تحقیق با روش تجربی انجام گرفت. پس از تهیه HECBMG و استریل کردن آن و گرفتن کشت میکروبی در محیط BLOOD AGAR و اطمینان حاصل کردن از عاری بودن HECBMG از هر نوع عامل بیماری‌زا (میکروب، قارچ، باکتری، مخمر و ...)، آن را به وزن‌های ۱۰ و ۲۰ و ۵۰ میلی‌گرم بر ۱۰۰ هزار سلول تک‌هسته‌ای خون محیطی در چاهکهای ۲۴ خانه کشت داده، در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ و ۷۲ ساعت اثر دادیم. برای اندازه‌گیری سمیت سلولی روش MTT را به کار بردیم و در پایان با استفاده از دستگاه ELISA LEADER میزان جذب نوری تعیین شد که میزان جذب نوری به میزان جذب ماده MTT از طریق سلول‌ها بستگی دارد که نمایانگر فعالیت حیاتی سلول‌ها است.جذب نوری هر سه غلظت، سه بار اندازه‌گیری شده و میانگین آن ثبت شد، علاوه بر میانگین؛ انحراف معیار و تست تی هم به عمل آمد. هیچ‌کدام از دوزهای مورد استفاده توکسیک نبودند.

نتایج: نتایج نشان داد هیچ کدام از دوزهای مورد استفاده توکسیک نبوده، بلکه باعث افزایش تعداد سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی انسان نیز شده‌اند.

نتیجه‌گیری: با هر بار افزایش وزن ماده HECBMG و گذشت زمان، افزایش تعداد سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی مشاهده شد که از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری با گروه کنترل داشت. بنابراین در مجموع می‌توان این‌گونه نتیجه گرفت که بایومتریال HECBMG ماده‌ای سازگار با سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی انسان است.

واژگان کلیدی: HECBMG، سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی انسان، سایتوتوکسیسیته

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

یکی از دغدغه‌های جامعه جراحان، اثر سایتوتکسیک بایومتریال‌ها است که در ناحیه دیفکت‌ها و بازسازی نقایص استخوانی کاربرد دارد (۱ و۲). بافت استخوانی یکی از عمده‌ترین بافت‌های موجود در بدن انسان است که همواره مورد پیوند(Trans plantation) قرار می‌گیرد. (۳ و٤)

جراحان اغلب برای بیمارانی که به دلایل متعدد از قبیل شکستگی‌ها، کیست‌ها و تومورها دچار نقایص استخوانی می‌شوند، برای جبران این نقایص از گرفت‌های استخوانی می‌گردند (٥).

همچنین نقایص استخوانی می‌توانند به صورت مادرزادی بروز کنند که در این رابطه بروز شکاف کام و آلوئول در انسان دارای شیوع قابل توجهی است (٦).

با وجود چنین وضعیتی کاربرد بالینی گرافت‌ها به صورت اتوژن یا آلوژن به دلیل مشکلات خاصی از قبیل پس‌زدن، محدودیت‌دهنده استخوان، افزایش زمان عمل، عفونت‌ها، درد و در نهایت مرگ و میر احتمالی با محدودیت مواجه است (۷).

به منظور رفع این محدودیت‌ها طی چندین دهه گذشته، در جهت یافتن ماده‌ای که بتواند جایگزین مناسبی برای گرفت‌های استخوانی باشد، انجام گرفته و موادی به عنوان جایگزین گرافت‌های استخوانی، معرفی و مورد استفاده قرار گرفته است (۸).

از جمله این مواد که شاید بتواند جایگزین شایسته‌ای برای گرافت‌های استخوانی در ترمیم نقایص استخوانی باشد، مشتقات مختلف کلسیم فسفات هستند (۹ و۱۰).

از آنجا که این مواد از نظر خواص فیزیکی و شیمیایی دارای شباهت‌های نزدیکی با مواد معدنی طبیعی استخوان هستند، در صورت استفاده باعث تحریک کمتر بافت میزبان و در نتیجه بروز کمتر واکنش‌های آماسی می‌گردد (۱۱و۱۳). از این‌رو به دلایل زیر لازم است در مورد این بایومتریال‌ها در داخل کشور تحقیقاتی صورت گیرد:

الف. نیاز روزافزون به بایومتریال‌ها

ب. هزینه بالای این مواد که نیاز به صرف قابل توجهی ارز دارد؛

ج. تولید این مواد داخل کشور و صادرات آن می‌تواند برای کشور درآمدزا باشد؛

د. اشتغال‌زایی.

برای اولین بار کارل (نقل از یوریست – ۱۹۹۳) تشکیل استخوان را بعد از کارگزاری داخل عضلانی DBM[1] در جوندگان و خرگوش گزارش کرد (۱۲). یوریست در این تحقیقات چنین فرض می‌کرد که پروتئین‌های موجود در DBM سبب متمایز شدن سلول‌های مزانشیمی‌تمایزنیافته در محل از سلول‌های غضروف‌ساز و استخوان‌ساز می‌شوند. او این پروتئین‌ها را پروتئین‌های شکل‌دهنده یا هدایت‌کننده استخوان (BMPs) نامگذاری کرد. یوریست سال‌ها بعد با ابداع روشی با ادامه روند خالص‌سازی DBM به ماده‌ای به نام ژلاتین، ماده زمینه‌ای استخوانی (BMG) حیوانی، دست یافت (۱۳). بایومتریال HECBMG HUMAN ENDOCHONDRAL BONE MATRIX GELATIN) از استخوان انسان گرفته شده و سرشار از BMPs است و خاصیت استئوایندکتیو OSTEOINDUCTIVE بیشتری نسبت به بایومتریال‌های دیگر دارد و بدن میزبان نسبت به این ماده هیچ‌گونه واکنش سوئی ندارد (١٤ و ۲۲ و ۲۳). با تکیه بر اهمیت و روند ترمیم نقایص استخوانی و اهمیت پاسخ سلولی و منشاء سلول‌های استخوان‌ساز و همچنین تحریک سلول‌های مزانشیمال POLY POTENTIAL AND UNDIFFERENTIATED تصمیم به بررسی اثر سایتوتکسیک این بایومتریال گرفتیم و این تحقیقات در دانشکده پزشکی شاهد در بخش ایمونولوژی این دانشگاه در تیرماه سال ۸۷ انجام شد.

مواد و روش‌ها

این تحقیق از نوع تجربی- تحلیلی بوده و در دانشگاه شاهد به منظورتعیین توکسیسیتی HECBMG به عنوان

1- Demonetarized Bone Matrix

Archive of SID

www.SID.ir

یکی از مؤثرترین بیوماتریال در ترمیم نقایص استخوانی انجام شده است. مراحل این تحقیق مرحله به مرحله شرح داده می‌شود.

۱. تهیه HECBMG

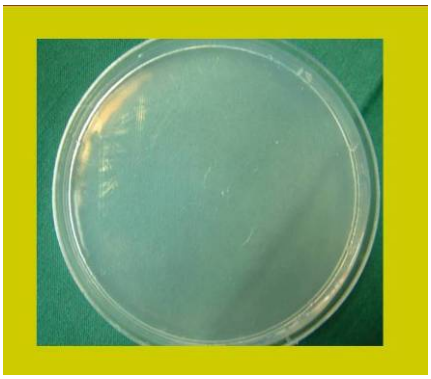
در این مطالعه از استخوان هومروس فرد میانسالی در حدود چهل ساله که کمتر از ٤٨ ساعت از مرگ وی گذشته بود از بانک استخوان بیمارستان امام خمینی تهیه کردیم. استخوان را به صورت استریل و با اطمینان از نظر ابتلا به HIV وHBV و ... از طریق آزمایش‌های آزمایشگاهی، برای انجام مراحل کاری فریز کرده و ابتدا دو سر استخوان را با دیسک صیقل داده و با استفاده از اره برقی و آب خنک برای جلوگیری از تخریب پروتئین‌های استخوان آن را جدا کردیم. سپس SHAFT LONG BONE (دیافیز) بدست آمده را به صورت CHIPS در آورده و با جدا کردن مغز استخوان و شست‌شوی قطعات، مراحل فرمولاسیون را برای تهیه HECBMG آغاز کردیم (در این پروژه پودر HECBMG آماده از سوی آقای دکتر شاهون که در اداره کل ثبت اختراعات شرکت‌ها و مالکیت صنعتی به شماره ٤٥٧٣٥ به ثبت رسیده و در معاونت پژوهشی و فناوری وزارت بهداشت به شماره ٥٨٨٧٣٦/١/١ تأیید شده است، در اختیار ما قرار گرفت) (۲۳).

۲. استریل کردن HECBMG

بایوماتریال به دست آمده در ظرف‌های شبیه به هم با حجم یک لیتر تهیه شد که درب آنها به طور کامل مسدود می‌شد و در هر ظرف یک لیتری، یک پلیت در باز حاوی دو گرم پودر HECBMG که قبلاً به ابعاد ۳۰۰-۵۰۰ میکرومتر تهیه شده بود، قرار داده شد و سپس H2O2 با غلظت سی درصد با حجم ده سی‌سی تهیه و در ظرفی جداگانه، در کنار پودر HECBMG در ظرف یک لیتری اصلی قرار داده شد. دمای محیط اطراف سی درجه سانتی‌گراد و فشار هوا یک اتمسفر بود. مدت زمان آزمایش برای در مجاورت قرار گرفتن بخار H2O2 با HECBMG ، سه سیکل دوازده دقیقه‌ای پیوسته بود. این روش استریلیزاسیون از ابداعات نویسنده مقاله بود که در بررسی آزمایشگاهی نمونه‌ها و تهیه کشت میکروبی و... این روش تأیید شد. ثابت شده مابقی روش‌های استریلیزاسیون، باعث تخریب پروتئین‌های بیوماتریال‌ها با پایه پروتئین می‌شود.

۳. تهیه کشت میکروبی از HECBMG

در مجاورت با محیط BLOOD AGAR، نمونه کشت گرفته شد و پس از اطمینان از عاری بودن HECBMG از هر نوع عامل بیماری‌زا (میکروب و قارچ و باکتری و مخمر....) مرحله چهار را انجام دادیم. (شکل ۱)



شکل ۱- کشت میکروبی با زمینه Blood Agar و عدم رشد هرگونه میکروب از گرانول‌های HECBMG

Archive of SID

www.SID.ir

٤- بررسی اثر سایتوتوکسیک HECBMG روی سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی

ما برای هر بار آزمایش به ده سی‌سی خون نیاز داشتیم که از افراد داوطلب سالم تهیه شد. ٤-٥cc فایکول را در یک لوله ریخته و خون گرفته شده را به آرامی‌از کنار دیواره لوله حاوی فایکول داخل لوله خالی ریختیم، به‌طوری که روی فایکول قرار بگیرد. نسبت خون به فایکول باید دو به یک باشد. سپس لوله را داخل سانتریفوژ قرار داده و با دور RPM ۲۸۰۰ به مدت بیست دقیقه سانتریفوژ می‌کنیم. در این مرحله، سلول‌های PMN در لایه وسط قرار گرفته و به آرامی‌آن‌ها را جدا کرده، در لوله آزمایش استریل می‌ریزیم. پنج سی‌سی سرم فیزیولوژی قابل تزریق به آن اضافه کرده، دوباره به مدت ده دقیقه در دستگاه سانتریفوژ با دور RPM۱۵۰۰ قرار می‌دهیم. حال به هر لوله آزمایش یک سی‌سیFbs10% + RPMI اضافه کرده و زیر میکروسکوپ نوری تعداد سلول‌ها را می‌شماریم. سپسHECBMG را به وزن‌های۱۰ و ۲۰و۵۰ میلی‌گرم بر ۱۰۰هزار سلول تک‌هسته‌ای خون محیطی که در چاهک‌های پلیت ٢٤خانه کشت داده‌ایم، در زمان‌های ٢٤ و٤٨ و٧٢ ساعت اثر می‌دهیم. برای اندازه‌گیری سمیت سلولی از روش MTT استفاده شد. بعد از گذشت زمان‌های موردنظر، محیط‌های کشت سلولی را از انکوباتور خارج کرده و یک‌دهم حجم محیط رویی سلول‌ها در هر چاهک، محلول MTT اضافه می‌کنیم و پلیت را برای مدت چهار ساعت به انکوباتور بر می‌گردانیم. پس از سپری شدن این چهار ساعت، پلیت را بیرون آورده و با کشیدن محیط رویی به چاهک‌ها، ایزوپروپانل اسیدی اضافه می‌کنیم تا کریستال‌های بنفش رنگ ایجاد شده به وسیله سلول‌هایی که زنده مانده‌اند، حل شده و مایع رنگی یکواختی ایجاد شود. این مایع رنگی را به چاهک‌های یک پلیت الایزا منتقل و جذب آن را با استفاده از دستگاه الایزاریدر در طول موج ٤٩٢A می‌خوانیم.

با استفاده از آنالیز واریانس و آزمون تست تی و آزمون‌های ناپارامتری جذب نوری چاهک‌های دارو در مقایسه با گروه کنترل، سمیت سلولی را محاسبه می‌کنیم.

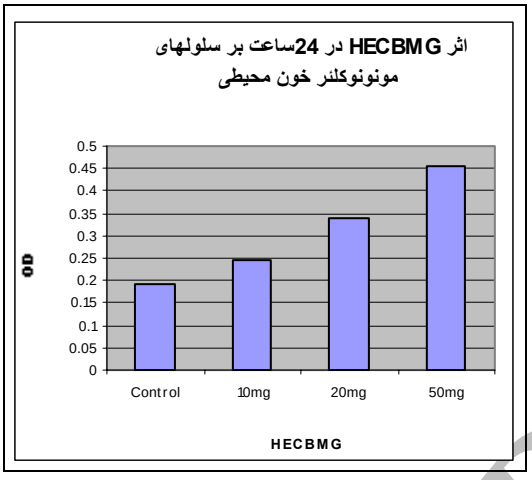
یافته‌ها

در آزمایش‌های انجام‌شده وزن‌های۱۰ و۲۰ و۵۰ میلی‌گرم از HECBMG به مدت٢٤ و٤٨ و٧٢ ساعت با سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی انسان مجاورت داده شد که نتایج زیر به دست آمد.

مقادیر HECBMG در نمودار یک ارائه شده است و آزمون ANOVA نشان داد، تعداد سلول‌ها در گروه‌ها به لحاظ آاری معنی‌ار است (P<0/01) و در گروه شاهد برابر ۰/۱۹۱±۰/۰۱۳ و در گروه ده میلی‌گرمی‌برابر ۰/۲٦٤±۰/۰٤٥ است. آزمون‌ها نشان داد، در گروه ده میلی‌گرمی۲۸/۸ درصد افزایش تعداد سلول‌ها را نسبت به گروه کنترل داریم که با توجه به آزمون تست تی، این افزایش تعداد از لحاظ آماری معنادار می‌باشد (P<0/05). در نتیجه در گروهای ۲۰ و ۵۰ میلی‌گرمی‌به ترتیب ۷۸/۵۳ و ۱۳۷/٦۹ درصد افزایش تعداد سلول‌ها را نسبت به گروه کنترل داریم.

Archive of SID

www.SID.ir

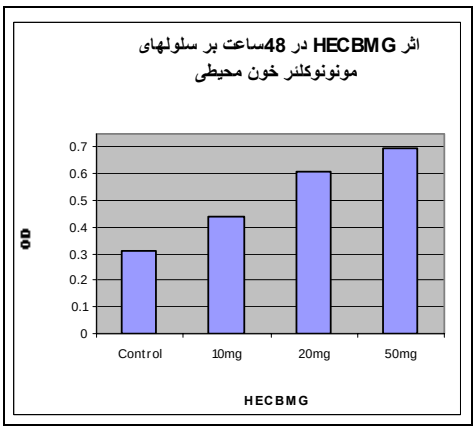


نمودار شماره ۱- تعداد سلول‌ها بر حسب مقادیر HECBMG در پیگیری ٢٤ ساعته

جدول ۱. تعداد سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی بر حسب زمان‌های پیگیری و به تفکیک مقادیر مختلف HECBMG

زمان پیگیری / مقادیر HECBMG	٢٤ساعت	٤٨ ساعت	٧٢ ساعت
کنترل	۰/۱۹۱±۰/۰۱۳	۰/۳۱±۰/۰۳٦	۰/۱±۰/۳۷
۱۰ میلی‌گرم	۰/۲٦٤±۰/۰٤٥	۰/٤۳±۰/۰٦	۱/٤٥±۰/۰٤۹
۲۰ میلی‌گرم	۰/۳٤۱±۰/۰۷	۰/٦±۰/۰۱	۱/۲٥±۰/۱۳۲
٥۰میلی‌گرم	۰/٤٥٤±۰/۰۷	۰/۷±۰/۱۰۸	۱/٤٥±۰/۰٥

مقادیر HECBMG در نمودار دو ارائه شده است و آزمون ANOVA نشان داد، تعداد سلول‌ها در گروه‌ها به لحاظ آماری معنادار است (P<0/01) و در گروه شاهد برابر۰/۳۱±۰/۰۳٦ و در گروه ده میلی‌گرمی‌برابر ۰/٤۳±۰/۰٦ است. آزمون‌ها نشان داد، در گروه ده میلی‌گرمی٤۱/۲ درصد افزایش تعداد سلول‌ها را نسبت به گروه کنترل داریم. افزایش تعداد از لحاظ آماری معنادار است (P<0/05). در نتیجه گروهای ۲۰ و ٥۰ میلی‌گرمی‌به ترتیب۹۳/٥٤ و ۱۲٥/۸درصد افزایش تعداد سلول‌ها را نسبت به گروه کنترل داریم.

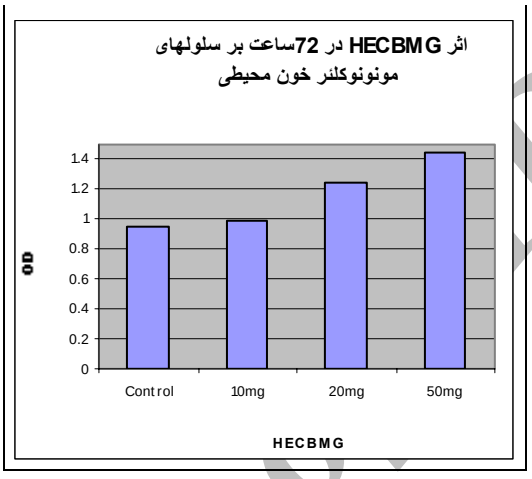


نمودار شماره ۲- تعداد سلول‌ها بر حسب مقادیر HECBMG در پیگیری ٤۸ ساعته

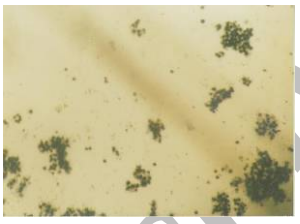
Archive of SID

www.SID.ir

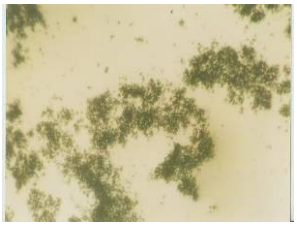
مقادیر HECBMG در نمودار سه ارائه شده است و آزمون ANOVA نشان داد، تعداد سلول‌ها در گروه‌ها به لحاظ آماری معنادار است (P<0/01) و در گروه شاهد برابر ۰/۱±۰/۳۷ و در گروه ده میلی‌گرمی‌برابر ۰/۰۴۵±۰/۰۴۹ است. آزمون‌ها نشان داد، در گروه ده میلی‌گرمی ۷۵۰ درصد (۷/۵ برابر) افزایش تعداد سلول‌ها را نسبت به گروه کنترل داریم که با توجه به آزمون تست تی این افزایش تعداد از لحاظ آماری معنادار می‌باشد (P<0/05). در نتیجه در گروه‌های ۲۰ و ۵۰ میلی‌گرمی‌به ترتیب۱۱/۵ و۱۳/۵ درصد افزایش تعداد سلول‌ها را نسبت به گروه کنترل داریم.



نمودار شماره ۳- تعداد سلول‌ها بر حسب مقادیر HECBMG در پیگیری ۷۲ ساعته

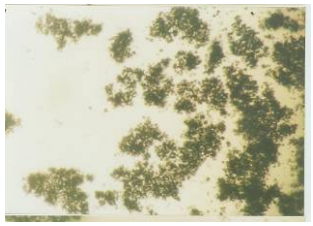


شکل ۲- CONTROL



شکل ۳- Effect of 10mg HECBMG

شکل ٤- Effect of 20mg HECBMG



شکل ٥- Effect of 50mg HECBMG

با توجه به شکل‌های فوق مشاهده می‌شود، با افزایش وزن بایومتریال HECBMG در محیط کشت میزان سلول‌های رنگ گرفته‌شده که نشان‌دهنده سلول‌های زنده هستند، بیشتر شده و در مجموع نشان‌دهنده اثر سازگاری HECBMG در مجاورت با سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی است.

بحث

همان‌طور که در مقدمه ذکر شد، هدف این مطالعه بررسی اثر سایتوتوکسیک بایومتریال HECBMG روی سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی بود تا در صورت توکسیک نبودن، این بایومتریال به‌عنوان جایگزین بافت استخوانی مورد استفاده قرار گیرد. در ارتباط با ترمیم استخوان، سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی از سلول‌های مهم هستند. بنابراین سازگاری سلول‌های

www.SID.ir

تک‌هسته‌ای خون محیطی با HECBMG نشان‌گر سازگاری این ماده با بدن است. 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 است و از سلو ل‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی در بیشتر مطالعاتی که هدف آنها بررسی سازگاری مواد مختلف است، استفاده می‌شود. (۱۵و۱۶و۱۷)، ما نیز از این سلول‌ها استفاده کردیم. تحقیق نشان داد، طی ۲٤ ساعت اول در دوز پنجاه میلی‌گرم در مقایسه با گروه شاهد فعالیت سلول‌های به میزان کمی‌افزایش یافته و از لحاظ آماری معنادار است. پس از ٤۸ ساعت، وجود HECBMG نه تنها سمیتی برای رشد سلول‌ها نداشته، بلکه در هر سه دوز ۲۰،۱۰و۵۰ میلی‌گرم فعالیت سلول‌ها افزایش یافته و از لحاظ آماری معنادار است. تماس HECBMG با سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی پس از ۷۲ ساعت نشان می‌دهد، افزایش زمان، افزایش تعداد سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی منجر خواهد شد و از لحاظ آماری نیز اختلاف معناداری با گروه کنترل دارند. با توجه به نتایج به دست آمده از میزان جذب نوری سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی در مجاورت HECBMG، پس از گذشت ۲٤،٤۸ و ۷۲ ساعت می‌توان به این نکته پی برد که مجاورت سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی با HECBMG نه تنها سمیتی نداشته، بلکه باعث افزایش میزان فعالیت سلولی به‌طور معنادار نیز می‌شود. تحقیقات Enders S و همکاران در سال ۲۰۰٦ نشان داد، سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی بدست آمده از سلول‌های مزانشیمی‌مغز استخوان را علامت‌گذاری کرده و روی یک داربست از HECBMG سوار کرده و سپس این مجموعه را در بافت عضلانی موش کاشته‌اند. پس از سی روز پیگیری به این نتیجه رسیده‌اند که سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی به فعالیت خود ادامه می‌دهند (۱۸). Reidmiller JS و همکاران در سال ۲۰۰۷ که سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی را در مجاورت HECBMG کشت دادند، اظهار کردند، پس از هشت هفته سلول‌ها رشد طبیعی داشته و به‌طور نرمال گسترده شده‌اند و با توجه به ارزیابی سلول‌ها با میکروسکوپ الکترونی، اجزای داخل سلولی مانند ریبوزوم‌ها و میتوکندری‌ها فعالیت نرمال داشته‌اند (۱۹). همچنین در مطالعه‌ای که Nakamura و همکاران در سال ۲۰۰۸ انجام دادند، اثر سایتوتوکسیک ماده ژلاتینی مغز استخوان را در مجاورت سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی با روش MTT بررسی و اعلام کردند، که اثر توکسیک نداشته است، از این نظر با مطالعه حاضر به طور کامل همخوانی دارد (۲۰). Malinin T و همکاران در سال ۲۰۰۵، اثر سمیت HECBMG را در محیط کشت فیبروبلاست لثه انسان مورد بررسی قرار دادند و نتایج نشان داد، از نظر سمیت تفاوت معنادار زیادی وجود ندارد که این نتیجه با نتیجه حاصل از مطالعه فعلی اندکی متفاوت است. این تفاوت شاید به این دلیل باشد که مطالعه حاضر روی سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی انجام شده و مطالعه Malinin T و همکاران روی سلول‌های فیبروبلاست لثه انسان بوده است و همچنین کیفیت بررسی نتایج در دو مطالعه به طور کامل متفاوت است. این توضیح لازم است که دلیل این تفاوت شاید در روش‌های کاملا متفاوت به‌کار گرفته شده در دو تحقیق باشد و از طرفی طراحی و روش تحقیق Malinin T و همکاران با تحقیق حاضر به طور کامل متفاوت بود (۲۱). همچنین با توجه به اهمیت موضوع، توصیه می‌شود تا آزمایش‌های بافتی دیگری مانند موتاژنیستی، القای تشکیل بافت استخوانی و آزمایش‌های کلینیکی (in vitro ,vivo n) در این زمینه از سوی محققان دیگر انجام و پیگیری شود.

نتیجه‌گیری

همان‌طور که در نتایج به دست آمده ملاحظه می‌شود، جذب نوری هر سه غلظت سه بار اندازه‌گیری شده و میانگین آن ثبت می‌شود. علاوه بر میانگین؛ انحراف معیار و تست تی هم به عمل آمده است. هیچ‌کدام از دوزهای مورد استفاده توکسیک نبوده، بلکه باعث افزایش تعداد سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی نیز شده است و با افزایش وزن ماده HECBMG و افزایش زمان، افزایش تعداد سلول‌های خونی مشاهده می‌شود. بنابراین در مجموع می‌توان این‌گونه نتیجه گرفت که بایومتریال HECBMG ماده‌ای فوق‌العاده سازگار با سلول‌های سفید تک‌هسته‌ای خون محیطی انسان است.

تقدیر و تشکر

از حمایت مالی و علمی مرکز تحقیقات بخش ایمونولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه شاهد در اجرای این تحقیق سپاسگزاری می‌شود.

Archive of SID

www.SID.ir

منابع

1- Rabia AB, Deny YM, Samman N. The effect of demineralized bone matrix on the healing of intramembranous bone grafts in rabbit skull defects.J. of dent. Res. 1996; 75 (4): 1054-1051.

2- Chalmers J, Gray DH, Rush J. Observation on the induction of bone in soft tissue. J.Bone and Joint surg. 1978; 57 B (1): 36-45.

3- Zhang Min, Ralph M, et al. Effect(s) of the demineralization process on the osteoinductivity of demineralized bone matrix. J. Periodontal. 1991; 68: 1085-1092.

4- You HB, Chen An. Effect of cefazolin loaded bone matrix gelatin on repairing large segmental bone defects and preventing infection. J. chins. Traumatol. 2004; 7(4): 201-4.

5- Miller TA, Ishida K, Kobayashi D. The induction of bone by an osteogenic protein and the conduction of bone by porous hydroxyl apatite. A Laboratory study in rabbit. Plastic Reconstr. Surg. 1991; 87: 87-94.

6- Moghadam H. Histomorphometric evaluation of bone regeneration using allogenic and alloplastic bone substitutes. J. oral and maxillo fac Surg, 2004; 62: 202-213

7- Mulliken JB, Kaban LB, et al. Induced osteogenesis, the biologincal principle and clinical application. J.Surg.Res. 1984; 37: 478-496.

8- Nakashima M. An ultrastractural Study of the differentiation of the mesenchymal cells in implants of allogenic dentin matrix on the amputated dental pulp of the dog. Arch Oral Biol. 1990; 35: 277-281.

9- Nishimura K, Solchaga LA, Johnstone B, et al. The chondrogenic potential of synovium, Trans of 44th ann. Meet. Orthop. Res. Soc. 1998; 23-495 - 10- WeiQi, Yan Bone bonding in bioactive glass ceramics with bone matrix gelatin. J.Biomed. Mater. Res. 1998; 42: 258-265.

10- Reddi AH, Weintourb S. Sterilization of bone chips. orthop. clin. North. Am. 1987; 18: 207-212.

11- Urist MR, Iwata H. Bone morphogenesis in implants of insolouble bone gelatin. Proc. Nat. Acad. Sci. 1973 Vol 10.No. 12. Part I: 3511-3515.

12- Yamashita K, and Tendike P. Bone morphogenetic protein receptors1996; 19(6): 569-574.

13- Takaoka K, Nakahara H, et al. Ectopic bone induction on and in Porous hydroxyl apatite combined with collagen and bone morphogenetic protein. Clinic. Orthop. 1988; 234:250-254.

14- Zhang Min, Ralph M, et al. Effect(s) of the demineralization process on the osteoinductivity of demineralized bone matrix. J. Periodontal. 1991; 68: 1085-1092.

15- Lorado T, Polte J.Effect of hydrogen peroxide on osteoinduction by demineralized bone. Am J Orthop 2006 Dec; 35(12):562-7American journal of orthopedics (Belle Mead, N.J.).Department of Psychiatry, School of Medicine, University of California at Los Angeles, Los Angeles, California, USA.

17.Azimi H R,Tofighi H.Histologic evaluation of coral in repair of parietal bone defect in rabbit.Journal of shahid beheshti un.1386;24(4):485-491.

18- Enders S, Yamashita K, et al. Muscle tissue Raction to implantation of bone matrix gelatin. Chin. Orthop. Rcl. Res. 2006; 263: 242-252.

19- Reidmiller JS, Cell biology and biochemistry of endochondral bone development. Collagen Reaserch. 2007; 1: 205-226.

20- NakamuraK, takagi T. Calcification preceeding new bone formation induced by demineralized bone matrix gelatin. Arch. Histo. Cytol 2008; 55: 37-43. 21- Malinin T, Weiss RE. Saba K, et al. bridging large defects in bone by demineralized bone matrix in the form of powder.J.Bone. JOINT surg 2005; 69 a (7): 994-992.

21- Bayat M,Shahoon H,Sobhani A.comparison repair of Bone Matrix Gelatin and Auotograft on the parietal bone defect in rabbit.Journal of IRI medical council 1382;44-50.

23- Shahoon H,Mashhadiabbas F,Kharrazi MH,Nematolahi M.Shahravi N.Histologic evaluation of Human Bone Matrix Gelatin and auotograft in repair of bone defect in rat.Journal of shahid beheshti un. 1388;83-91.

Archive of SID

www.SID.ir

Daneshvar

Medicine

Scientific-Research Journal of Shahed University Seventeenth Year, No.86 April, May 2010

Received: 31/12/2010
Last revised: 26/5/2010
Accepted: 30/5/2010

Evaluation of Human Endochondral Bone Matrix Gelatin cytotoxicity on the human peripheral WBC mononuclear cells

Hossein Shahoon[1*], Tuba Ghazanfari[2], Naser valaie[3], Mojtaba Turk Safaee[4]

1. Assistant Professor - Department of Maxillofacial Surgery, School of Dentistry, Shahed University, Tehran, Iran.
2. Associate Professor - Department of Immunology, School of Medicine, Shahed University, Tehran, Iran.
3. Department of Biostatistics- Azad Medical University, Tehran.
4. DDS - School of Dentistry, Shahed University, Tehran, Iran.

E-mail: Shahoonh@yahoo.com

Abstract

Background & Objective: Bone tissue is one of the principal tissues in the human body and its transplantation has always been performed. Autogeneic and allogeneic grafts have their limitations including rejection, prolonged surgery time, infections, and possible mortality and also difficulty for repreparation of allograft. For this reason, biomaterials with osteoinductive and osteoconductive properties are quantitatively and qualitatively more appropriate for bone defects. Human endochondral bone matrix gelatin **(**HECBMG) with a stronger osteoinductive property as compared to other biomaterials and with physical and chemical similariteis to natural bone composition and less stimulation of inflammatory response in host tissue are new and suitable candidates for this purpose. Considering the significance of bone defect repair and stimulation of undifferentiated mesenchymal cells, the goal of this research was to evaluate the cytotoxicity of this biomaterial.

Materials & Methods: After preparation and sterilization of HECBMG, the screening of our product for pathogenic agents including microbes, yeast and bacteria was done in blood agar medium. Then, it is divided into 10, 20, 50 mg portions and cultured on 24-well of 100000 mononuclear cells of peripheral blood and they are evaluated after 24, 48 and 72 hours. MTT method was used for evaluation of cytotoxic effect using ELISA reader. Light absorption rate depends on MTT uptake by the cells, indicating vital activity of the cells. The experiment was done 3 times for each of 3 concentrations and its average was reported. For statistical analysis, t test was used.

Results: None of the doses that were used were toxic and all of them increased number of the human peripheral blood mononuclear cells.

Conclusion: With increasing of HECBMG concentration and passing time, increasing of human peripheral blood mononuclear cells can be observed and it has a statistically significant difference with control group. Therefore, as a conclusion, HECBMG is compatible with human blood mononuclear cells.

Key Words: HECBMG, Human peripheral blood mononuclear cells, cytotoxicity

www.SID.ir