

بررسی سمیت سلولی ذرات نانوهیدروکسی

آپاتیت بر سلول‌های فیبروبلاست رده L929

نویسندگان: حسین شاهون^۱، رویا حامدی^{۲*}، زهرا یادگاری^۳، وحید مجد الحسینی^۴، ناصر ولایی^۵

۱- استادیار، مدیر گروه پارتمان جراحی فک و صورت دانشکده دندانپزشکی دانشگاه شاهد، تهران، ایران.

۲- دانشجوی دکترا، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران.

۳- کارشناس ارشد ایمونولوژی، آزمایشگاه بیولوژی سلولی و مولکولی دهان، دانشکده دندانپزشکی دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران.

۴- دانشجوی دکترا، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران.

۵- مشاور آمارحیاتی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

Email:hhamedi@shahed.ac.ir

*نویسنده مسئول: رویا حامدی

چکیده

مقدمه و هدف: هیدروکسی آپاتیت $(Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2)$ یکی از مهمترین بیوسرامیک‌ها برای کاربردهای پزشکی و دندانپزشکی است؛ ولی حلالیت پایین ذرات به کاهش اثر آن در ساخت استخوان (osteconductivity) منجر شده است و در نتیجه، ذرات نانو هیدروکسی آپاتیت (Nano-HA) با داشتن سطح تماس بیشتر و حلالیت بالاتر نسبت به HA معمولی، مورد توجه بسیاری از محققان به عنوان یک پیوند موثر و جدید استخوانی واقع شده است؛ اما مطالعات متعددی تناقض‌هایی را در زمینه‌ی سازگاری زیستی این ذرات نشان دادند. هدف از مطالعه حاضر بررسی سمیت سلولی (Cytotoxicity) ذرات نانوهیدروکسی آپاتیت روی سلول‌های فیبروبلاست رده L929 است.

مواد و روش‌ها: این مطالعه به صورت تجربی انجام گرفت. پس از استریل نمودن ذرات Nano-HA آن را با غلظت‌های ۱۵، ۷۵، ۳۲۰، ۶۵۰، ۱۲۵۰، ۲۵۰۰، ۵۰۰۰، ۱۰۰۰۰، ۲۰۰۰۰، ۴۰۰۰۰، ۸۰۰۰۰ (Parts Per Million) تهیه کرده و روی ۱۰۰۰۰ سلول فیبروبلاست رده L929 اثر داده، در پایان، میزان حیات سلول‌ها در زمان‌های ۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت با استفاده از تست MTT مورد ارزیابی قرار گرفت؛ سپس در صد سمیت سلولی نسبت به گروه کنترل در هر غلظت و زمان محاسبه شد و داده‌های حاصل با تست ANOVA آنالیز شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که با افزایش غلظت و گذشت زمان فعالیت حیاتی سلول‌ها کاهش یافته است؛ ولی این کاهش از لحاظ آماری معنی دار نبود ($P > 0.05$).
نتیجه‌گیری: نتایج عدم خاصیت سمیت سلولی ذرات Nano-HA را در مجاورت با سلول‌های فیبروبلاست رده L929 نشان داد.

واژگان کلیدی: نانو هیدروکسی آپاتیت، سمیت سلولی، سلول‌های فیبروبلاست رده L929، MTT

دوماهنامه علمی-پژوهشی
دانشگاه شاهد
سال نوزدهم- شماره ۹۵
آبان ۱۳۹۰

وصول: ۱۳۹۰/۵/۲۷
آخرین اصلاحات: ۱۳۹۰/۸/۲۲
پذیرش: ۱۳۹۰/۹/۹

مقدمه

مطالعات بیشتر و دقیق تر ضروری به نظر می‌رسد؛ بنابراین در این مطالعه از سلول‌های فیروبلاست L929 استفاده شد که از پرکاربردترین رده‌های سلولی نامیرا برای ارزیابی سمیت سلولی (Cytotoxicity) است که به علت ثبات نسبی خصوصیات سلول‌ها در نسل‌های مختلف باعث بالا رفتن اعتبار و تکرارپذیری نتایج نسبت به رده سلولی اولیه می‌شود؛ همچنین در استاندارد جهانی مواد دندانپزشکی (ISO-10993:5) این رده سلولی با هدف انجام تست تعیین سمیت سلولی مواد توصیه شده است (۱۶). در مطالعه حاضر اثر سمیت سلولی پارتیکل‌های Nano-HA (با ابعاد زیر ۱۰۰ nm و میله‌ای شکل) روی سلول‌های فیروبلاست رده L929 مورد بررسی قرار گرفت تا در صورت توکسیک نبودن، این بیومتریال به عنوان یکی از جایگزین‌های موثر بافت استخوانی مورد استفاده قرار گیرد.

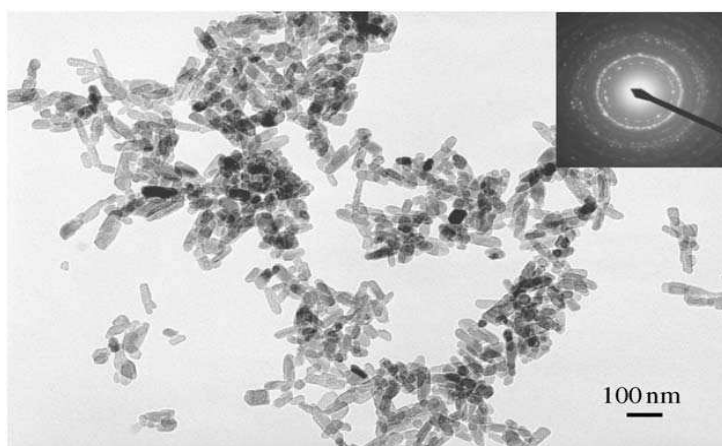
مواد و روش‌ها

مطالعه به روش تجربی (Experimental) و در دانشگاه شهید بهشتی و شاهد در سال ۸۹ و ۹۰ به منظور تعیین سایتوتوکسیسیته ذرات نانو هیدروکسی آپاتیت روی سلول‌های فیروبلاست رده L929 انجام گرفت.

۱- تهیه و استریل کردن ذرات Nano-HA

در این مطالعه از ذرات میله‌ای شکل Nano-HA با ابعاد زیر ۱۰۰ nm (تصویر ۱) با خلوص ۹۹ درصد ساخت شرکت آلمانی NANOSHEL (Batch No#20090621) استفاده شد. با استفاده از نور ماورای بنفش به مدت ۲۴ ساعت، پارتیکل‌های Nano-HA استریل شد.

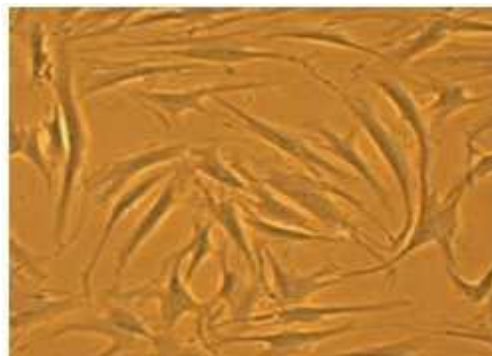
هیدروکسی آپاتیت $(Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2)$ WA یک ماده زیستی مهم و جزء اصلی بخش معدنی استخوان بودندان است (۳-۱) که به دلیل داشتن قرابت شیمیایی و بیولوژیکی با ساختمان استخوان و دندان به عنوان یکی از مهم‌ترین بیوسرامیک‌ها برای کاربردهای پزشکی و دندانپزشکی به خصوص، در زمینه جایگزینی بافت استخوانی مطرح است (۸-۴) اما پروسه ساخت آن به دما و فشاری بالا نیاز دارد که به کاهش تخلخل و افزایش دانسیته آن منجر شده و در نتیجه به کاهش حلالیت این ماده در محیط و کاهش اثر ذرات در تحریک ساخت استخوان (osteocoductivity) می‌انجامد (۹) و درحقیقت بیشتر به عنوان یک فیلر برای پرکردن نقایص استخوانی به کار می‌رود (۱۸-۱۰). از طرفی ذرات نانو هیدروکسی آپاتیت (Nano-HA) به دلیل داشتن سطح تماس بیشتر و حلالیت بالاتر، قدرت و کارایی بالاتری نسبت به HA دارند [۱۹] و تحقیقاتی فراوان در زمینه استفاده از ذرات Nano-HA در درمان ضایعات استخوانی پر یودنتال (۵)، افزایش osteointegration در ایمپلنت‌ها (۷)، ترمیم سوراخ دندان (۸)، افزایش ترمیم نقایص استخوانی در ارتوپدی (۹) و همچنین سیستم‌های انتقال دارو و واکسن صورت گرفته است (۱۰)؛ اما از آنجا که برای معرفی یک ماده و کاربرد آن در کلینیک، در درجه اول به ارزیابی سمیت این مواد در محیط *in vitro* نیاز است (۲۲-۲۰)، مطالعاتی متعدد، روی سازگاری زیستی (Biocompatibility) این ماده صورت گرفته است ولی نتایج حاصل از این مطالعات تناقض‌هایی را در این زمینه نشان می‌دهد (۱۵-۱۱) برای بررسی این تناقضات



تصویر ۱. TEM (Transmission electron micrograph) از پارتيكل‌های Nano-HA با مقیاس ۱۰۰ نانومتر

شرایط آزمایشگاهی شامل دمای 37°C ، CO_2 به میزان ۵ درصد و رطوبت ۹۸ درصد تکثیر شدند و پس از چهار بار پاساژ دادن آنها با استفاده از Trypsin-EDTA تعداد کافی از آنها برای انجام آزمایش فراهم شد. سلول‌ها توسط لام هموسیتر (نئوبار) شمارش شدند و با استفاده از رنگ تریپان بلو در صد سلول‌های زنده بیش از ۹۵ درصد تعیین شد. پس از آن تعداد 100000 سلول به صورت یک لایه (monolayer) درون هر چاهک از پلیت‌های ۹۶ خانه ای مخصوص کشت سلولی قرار داده شد. برای هریک از غلظت‌های مواد مورد آزمایش، حداقل سه چاهک از چهار پلیت (برای زمانهای مختلف ۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت) اختصاص داده شد؛ سه چاهک نیز برای گروه کنترل اختصاص داده شد.

۲- کشت سلول‌های فیبروبلاست رده ی L929 کرایوتیوب سلولی تهیه شده از انسیستوپاستور ایران دربرگیرنده ی سلول‌های فیبروبلاست رده سلولی L929 موش پس از خارج شدن از وضعیت منجمد، در فلاسک‌های مخصوص کشت سلولی کشت داده شدند (تصویر ۲). برای کشت این سلول‌ها از محیط کشت (Grand Island (NY, DMEM همراه ۱۰۰ واحد بین المللی در میلی لیتر از آنتی بیوتیک پنی سیلین (Sigma)، (USA) و ۱۰۰ میکرو گرم در میلی لیتر استرپتومایسین (Sigma)، (USA) استفاده شد. علاوه بر محیط کشت، به منظور غنی سازی محیط (FBS (Fetal Bovin Serum (GIBCO)، (USA) به میزان ۱۰ درصد به محیط کشت اضافه شد که در این حالت به آن محیط کشت کامل یا Complete Media گفته می شود؛ سپس این سلول‌ها در



شکل ۱ - سلول‌های فیبروبلاست رده ی L929 کشت داده شده در فلاسک بزرگنمایی (200 میکروسکوپ نوری)

۳- قرارگیری ذرات Nano-HA در مجاورت

سلول‌های فیبروبلاست رده ی L929

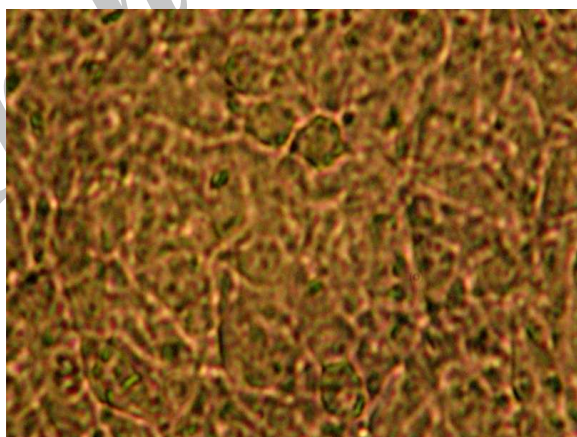
پس از ۲۴ ساعت از کشت ۱۰۰۰۰ سلول در هر چاهک پلیتهای کشت ۹۶ خانه ای، محیط کشت رویی سلول‌ها تخلیه شد؛ سپس ذرات Nano-HA با غلظت‌های ۵،۷۵، ۳۲، ۶۵، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۲۰۰۰، ۴۰۰۰، ۸۰۰۰ ppm (Part Per Million) در چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه روی سلول‌ها اثر داده شد و در سه چاهک کنترل محیط کشت کامل به‌عنوان یک ماده ۱۰۰ درصد بدون خاصیت سم سلولی ریخته شد.

۴- ارزیابی میزان حیات سلول‌های فیبروبلاست

رده ی L929

و ایتالیایی سلول‌ها در زمانهای ۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از مجاورت با ذرات با استفاده از تست MTT مورد سنجش قرار گرفت. به این ترتیب که بعد از گذشت زمانهای موردنظر، محیط‌های کشت سلولی را از انکوباتور (فشار CO₂ ۵ درصد، رطوبت ۹۸ درصد، دمای ۳۷ درجه) خارج کرده، یک دهم حجم رویی سلول‌ها به هر چاهک محلول (Dimethylthiazol-2-yl 2-5) (MTT) (diphenyl tetrazolium bromide) اضافه شد و پلیت

به مدت ۴ ساعت به انکوباتور برگردانده شد؛ در این شرایط فقط سلول‌هایی که زنده بوده، میتوکندری فعال دارند قادر هستند به کمک آنزیم‌های میتوکندریایی نمک MTT را احیا کرده، به بلورهای فورمازون تبدیل کنند. پس از سپری شدن ۴ ساعت، پلیت را بیرون آورده، با کشیدن محیط روئی به چاهک‌ها ایزوپروپانل اسیدی اضافه گشته تا کریستال‌های بنفش رنگ فورمازون ایجاد شده در سلول‌هایی که زنده مانده اند (شکل ۱)، حل شده و مایع رنگی یکنواختی ایجاد شود. این مایع رنگی را به چاهک‌های یک پلیت الیزا منتقل و جذب آن با استفاده از دستگاه ELISA READER در طول موج nm ۵۷۰ با فیلتر رفرانس ۶۲۰ نانومتر خوانده شد. درصد حیات سلولی از تقسیم میانگین میزان جذب غلظت مورد نظر به میانگین جذب گروه کنترل در همان زمان ضربدر ۱۰۰ به دست آمد و با کم کردن این عدد از ۱۰۰ میزان درصد سمیت سلولی به دست آمد. نتایج به دست آمده با استفاده از آزمون ANOVA جذب نوری چاهک‌های Nano-HA مورد قضاوت آماری قرار گرفت.



تصویر ۲- پیکان بلورهای فورمازون تشکیل شده در مجاورت سلول‌های فیبروبلاست L929 را نشان می‌دهد.

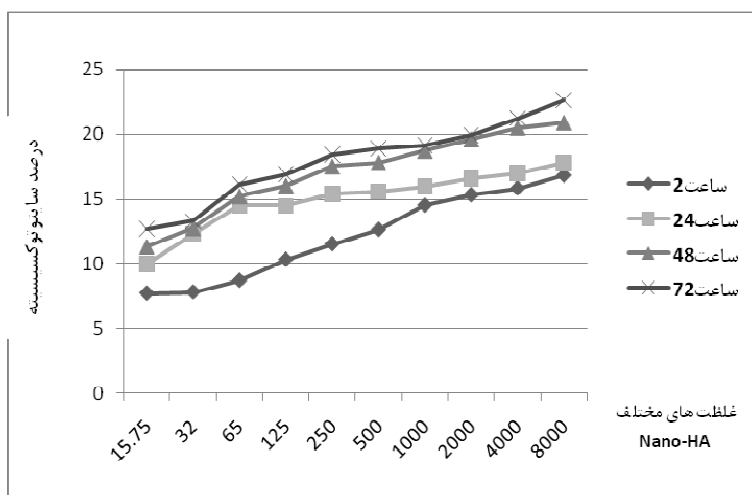
یافته‌ها

فعالیت حیاتی سلول‌ها مربوط به غلظت ppm ۸۰۰۰ بعد از گذشت ۷۲ ساعت بود (0.108 ± 0.004). در نمودار ۱ مقایسه‌ی بین درصد‌های سایتوتوکسیک بر حسب زمانهای پیگیری به تفکیک غلظت‌های مختلف Nano-HA نشان داده شده است. درصد حیات سلولی از تقسیم میانگین میزان جذب غلظت مورد نظر به میانگین جذب گروه کنترل در همان زمان ضربدر 100 به دست آمد و با کم کردن این عدد از 100 میزان درصد توکسیسیته حاصل شد. براساس نتایج به دست آمده حداکثر درصد توکسیسیته نسبت به گروه شاهد بعد از گذشت ۷۲ ساعت و در غلظت ppm ۸۰۰۰ معادل ۲۲/۶ درصد شد.

تحقیق روی ۱۰ گروه تجربی و ۱ گروه شاهد در مجموع ۳۳ نمونه صورت گرفت و در آن غلظت‌های ۸۰۰۰، ۴۰۰۰، ۲۰۰۰، ۱۰۰۰، ۵۰۰، ۲۵۰، ۱۲۵، ۶۵، ۳۲، ۱۵، ۷۵ ppm از Nano-HA به مدت ۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت با سلول‌های فیروبلاست رده L929 مجاورت داده شد. میزان فعالیت حیاتی سلول‌ها بر حسب زمانهای پیگیری به تفکیک مقادیر مختلف Nano-HA در جدول ۱ نشان داده شده است. آزمون ANOVA نشان داد که میزان فعالیت حیاتی سلول‌ها در گروه‌های ۱۰ گانه و زمانهای پیگیری اختلاف معنی‌دار آماری نداشته است ($P > 0.05$)؛ همچنین با گذشت زمان در تمام گروه‌ها میانگین فعالیت حیاتی سلول‌ها کاهش یافت و کمترین میانگین

جدول ۱- میانگین جذب نوری و انحراف معیار آنها بر حسب زمانهای پیگیری به تفکیک غلظت‌های مختلف Nano-HA

زمان	غلظت Nano-HA (ppm)	۷۲ ساعت	۴۸ ساعت	۲۴ ساعت	۲ ساعت
کنترل		0.141 ± 0.012	0.16 ± 0.005	0.256 ± 0.003	0.65 ± 0.006
۱۵،۷۵		0.122 ± 0.002	0.14 ± 0.006	0.23 ± 0.015	0.6 ± 0.045
۳۲		0.121 ± 0.007	0.139 ± 0.006	0.224 ± 0.007	0.59 ± 0.009
۶۵		0.117 ± 0.006	0.135 ± 0.008	0.219 ± 0.01	0.59 ± 0.012
۱۲۵		0.116 ± 0.01	0.134 ± 0.007	0.218 ± 0.011	0.58 ± 0.006
۲۵۰		0.114 ± 0.002	0.132 ± 0.003	0.216 ± 0.009	0.57 ± 0.007
۵۰۰		0.113 ± 0.009	0.131 ± 0.005	0.216 ± 0.004	0.56 ± 0.006
۱۰۰۰		0.113 ± 0.001	0.13 ± 0.002	0.215 ± 0.005	0.55 ± 0.01
۲۰۰۰		0.112 ± 0.008	0.128 ± 0.002	0.213 ± 0.01	0.55 ± 0.007
۴۰۰۰		0.11 ± 0.003	0.127 ± 0.005	0.212 ± 0.006	0.54 ± 0.012
۸۰۰۰		0.108 ± 0.004	0.126 ± 0.003	0.21 ± 0.005	0.54 ± 0.01



نمودار ۱. مقایسه‌ی درصد‌های سائیتوتوکسیک بر حسب زمان‌های پیگیری به تفکیک غلظت‌های مختلف Nano-HA - با افزایش غلظت ذرات Nano-HA و نیز گذشت زمان، درصد سائیتوتوکسیسیته افزایش می‌یابد ولی از نظر آماری تفاوت معنی‌داری بین گروه‌ها وجود ندارد.

بحث

ی اخیر نیز در تایید نتیجه‌ی مطالعه‌ی فوق نشان داد که این ماده دارای سازگاری زیستی قابل قبولی است. همچنین در مطالعه‌ی ای که توسط Yantae و همکاران در سال ۲۰۰۹ صورت گرفت و در آن سازگاری زیستی اشکال میله‌ای و کروی Nano-HA را در غلظت‌های ۱ تا ۱۰۰ ppm روی استئوبلاست‌ها از طریق تست MTT و بعد از گذشت ۷۲ ساعت مورد بررسی قرار دادند نیز نتیجه‌گیری کردند که این ماده دارای سازگاری زیستی قابل قبولی است [۲۴]. البته در مطالعه‌ی Yantae بازه‌ی زمانی محدود بوده، تنها تا غلظت ۱۰۰ ppm مورد تحقیق قرار گرفت. از طرفی مطالعه‌ی Hsieh-MF و همکاران در سال ۲۰۰۹ نیز نشان دادند که پارتیکل‌های Nano-HA تا غلظت ۵۰۰۰ ppm کمترین سمیت را برای استئوبلاست دارا هستند [۲۵] و نتایج مطالعه‌ی ما هم به‌طور مشابه بیانگر سازگاری زیستی ذرات Nano-HA است. اما در مطالعه‌ی ای که Motskin و همکاران در سال ۲۰۰۹ انجام دادند و در آن سائیتوتوکسیسیته‌ی پارتیکل‌های Nano-HA به شکل کلئوئید و ژل را در غلظت‌های ۳۱، ۶۲، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ ppm روی ماکروفاژهای مشتق از مونسیت از طریق تست MTT بعد از ۲۴ ساعت مورد ارزیابی قرار دادند، نشان دادند که پارتیکل‌های Nano-HA در فرم ژل در

نتیجه پژوهش نشان داد که با افزایش غلظت Nano-HA از ۱۵٫۷۵ تا ۸۰۰۰ ppm و نیز گذشت زمان از ۲ تا ۷۲ ساعت میزان توکسیسیته افزایش یافته، ولی این کاهش در فعالیت حیاتی سلول‌ها از نظر آماری معنی‌دار نیست ($P > 0.05$)؛ بنابراین، ذرات Nano-HA در مجاورت با سلول‌های فیرو بلاست رده‌ی L929 سازگاری قابل قبولی دارد؛ همچنین با توجه به استاندارد بین‌المللی مواد دندانپزشکی (ISO-10993:5) موادی که درصد سمیت آنها از ۲۵ درصد کمتر باشد جزو مواد غیر سمی (Non Toxic) محسوب می‌شوند که در مطالعه‌ی ما در همه موارد میزان آن از ۲۵ درصد کمتر بود.

در مطالعه‌ی ای که توسط شاهون و همکاران در سال ۲۰۱۱ صورت گرفت و در آن سازگاری زیستی اشکال میله‌ای Nano-HA را در غلظت‌های مشابه با مطالعه‌ی اخیر، روی سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی انسان و بعد از گذشت ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت با استفاده از تست MTT مورد بررسی قرار دادند، نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که با افزایش غلظت و زمان نیز میانگین فعالیت حیاتی سلول‌ها کاهش یافت ولی این کاهش در فعالیت حیاتی سلول‌ها از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری را نشان نداد (۲۳) و لذا نتایج مطالعه

ذرات و لذا مقدار حلالیت و قدرت ذرات موثراست و نیز می‌تواند روی سایتوتوکسیک بودن پارتیکل‌ها موثر باشد [۸-۶].

بنابراین با توجه به اهمیت موضوع پیشنهاد می‌شود تا مطالعات بیشتری نظیر بررسی واکنش‌های ایمونولوژیکی و مولکولی و همچنین بررسی سایتوتوکسیسیته این ماده در مدل‌های *in vivo* را محققان دیگر انجام و پیگیری کردند.

نتیجه‌گیری

همان‌طور که در نتایج به دست آمده ملاحظه می‌شود، هیچ‌یک از دوزهای مورد استفاده در این تحقیق، دارای خاصیت سمیت سلولی برای سلول‌های L929 نبود و Nano-HA ماده‌ای سازگار با حیات سلول‌های فیروبلاست رده L929 است.

تقدیر و تشکر

از حمایت مالی مرکز تحقیقات دندانپزشکی و معاونت محترم پژوهشی دانشگاه شاهد و آزمایشگاه بیولوژی مولکولی دانشکده دندانپزشکی دانشگاه شهید بهشتی در اجرای این تحقیق صمیمانه سپاسگزاری می‌شود.

تمامی غلظت‌ها توکسیک بوده و فرم کلونید آن فقط در غلظت‌های بالاتر از ۱۲۵ ppm توکسیک است [۲۶]؛ اما در این مطالعه پارتیکل‌های Nano-HA به شکل سوسپانسیون به کار رفت و سمیت آن روی سلول‌های فیروبلاست رده L929 بررسی شد؛ همچنین در سال ۲۰۰۴، J.Huang و همکاران اثر سازگاری زیستی Nano-HA میله‌ای شکل را در غلظت‌های ۱، ۱۰، ۱۰۰ و ۱۰۰۰ ppm را روی ماکروفازهای مشتق از مونوسیت از طریق تست LDH بعد از ۲۴ ساعت ارزیابی کردند و نشان دادند که در غلظت ۱۰۰ ppm Nano-HA توانائی آسیب‌زدن به غشا سلولی و آزاد کردن LDH را دارد [۲۷]، از طرفی Scheel و همکاران در سال ۲۰۰۹ در مطالعه‌ای ماکروفازهای رده 7. Murine RAT 264 را در معرض Nano-HA در غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۵۰۰۰ ppm قرار دادند و سایتوتوکسیسیته ذرات را از طریق X-TT بررسی کردند و نتیجه‌گیری کردند که غلظت‌های بالاتر از ۵۰۰ ppm توکسیک بود [۲۸]؛ بنابراین نتایج این سه مطالعه با نتیجه حاصل از مطالعه فعلی تفاوت دارد و این تناقض‌ها در نتایج ممکن است به دلیل ویژگی‌های خاص ذرات مورد استفاده، نوع سلول مورد بررسی و نیز تفاوت در روش‌های بکار رفته باشد. به طوری که ممکن است علت توکسیک بودن ذرات برای ماکروفازها در غلظت‌های بالاتر از ۱۲۵ ppm به دلیل فاگو سیت کردن ذرات و افزایش غلظت کلسیم در سیتوپلاسم سلول‌ها باشد، اما درباره استئوبلاست‌ها، سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی انسانی و فیروبلاست‌ها به مقدار کمتری وارد سلول می‌شود. بنابراین می‌توان این گونه نتیجه‌گیری کرد که اگر پارتیکل Nano-HA وارد سلول شود، می‌تواند در غلظت‌های بالاتر ساست ولی به شکل خارج سلولی حتی تا غلظت ۸۰۰۰ ppm برای سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی انسانی و همین‌طور فیروبلاست‌ها و ۵۰۰۰ ppm برای استئوبلاست‌ها دارای سازگاری زیستی قابل قبولی باشد؛ همچنین به کار بردن اشکال مختلف ذرات نیز روی سطح تماس

منابع

- 1- javascript:AL_get(this. 'jour'. 'Acta Biomater. '); Thein-Han WW, Shah Ji, Misra RD. Superior in vitro biological response and mechanical properties of an implantable nanostructured biomaterial: Nanohydroxyapatite-silicone rubber composite. *J Materials in Medicine* 2011;57:567-600.
- 2- Puvvada N, Panigrahi PK, Pathak A. Nanoscale. Room temperature synthesis of highly hemocompatible hydroxyapatite. study of their physical properties and spectroscopic correlation of particle size. *J ADA* 2010; 12:261-289
- 3- Nam YH, Kim JI, Um SJ, Lee SK, Son CH. Absence of hyper-responsiveness to methacholine after specific bronchial provocation tests in a worker with hydroxyapatite-induced occupational asthma. *J Allergy Asthma Immunol Res* 2011;32:135-157.
- 4- Shahoon H, Ghazanfari T, Valaie N, Safaee M. Evaluation of Human Endochondral Bone Matrix Gelatin cytotoxicity on the human peripheral WBC mononuclear cells. *J Shahed University March* 2010;56:86-99.
- 5- Beud H, Adrian K. Clinical effects of nanocrystalline hydroxyapatite paste in the treatment of intrabony periodontal defects. *J clin oral invest* 2009 ;52:28-68.
- 6- Tamai N, Myoui A, Tomita T, Nakase T, Tanaka J, Ochi T. Novel hydroxyapatite ceramics with an interconnective porous structure exhibit superior osteoconduction in vivo. *J Biomed Mater Res* 2002; 59:110-117.
- 7- Wojciech S, Masahiro Y. Processing and properties of hydroxyapatite-based biomaterials for use as hard tissue replacement implants. *J The Materials Gateway* 2004; 21:665-736.
- 8- Yovana P, Cristina C, Cristina R, Maria P. Comparative study of nanohydroxyapatite microspheres for medical applications. *J InterScience DOI* 2007; 23:262-307.
- 9- Huber FX, McArthur N, Hillmeier J, Kock HJ, Baier M. Void filling of tibia compression fracture zones using a novel resorbable nanocrystalline hydroxyapatite paste in combination with a hydroxyapatite ceramic core: first clinical results. *J Orthop Trauma Surg* 2006 ; 26:533-540.
- 9- Thorwarth M, Schultze-Mosgau S, Kessler P, Wiltfang J, Schlegel KA. Bone regeneration in osseous defects using a resorbable nanoparticulate hydroxyapatite. *J Oral Maxillofac Surg* 2005;63:1626-1633.
- 10- Kim K, Dean D, Lu A, Mikos AG, Fisher JP. Early osteogenic signal expression of rat bone marrow stromal cells is influenced by both hydroxyapatite nanoparticle content and initial cell seeding density in biodegradable nanocomposite scaffolds. *J Acta Biomater* 2011;73:1249-64
- 11- Webster TJ, Ergun C, Doremus RH, Siegel RW, Bizios R. Enhanced functions of osteoblasts on nanophase ceramics. *Biomaterials. J Biomaterials* 2000;21:1803-1810.
- 12- Krejci CB, Bissada NF, Farah C, Greenwell H. Clinical evaluation of porous and nonporous hydroxyapatite in the treatment of human periodontal bony defects. *J Periodontol.* 2007; 58:521-528.
- 13- Kasaj A, Röhrig B, Zafiroopoulos GG, Willershausen B. Clinical evaluation of nanocrystalline hydroxyapatite paste in the treatment of human periodontal bony defects—a randomized controlled trial: 6-month results. *J Periodontol* 2008; 79:394-400
- 15- Grigor'ian AS, Grigor'iants LA, Podoinikova MN A. comparative analysis of the efficacy of different types of filling materials in the surgical elimination of tooth perforations (experimental morphological research). *J Stomatologi* 2000;79:79-92.
- 16- Gerlach KL, Niehues D. Treatment of jaw cysts with a new kind of nanoparticulate hydroxyapatite. *J Mund Kiefer Gesichtschir* 2007 ;14:59-79.
- 17- Schwarz F, Bieling K, Latz T, Nuesry E, Becker J. Healing of intrabony peri-implantitis defects following application of a nanocrystalline hydroxyapatite (Ostim™) or a bovine-derived xenograft (Bio-Oss™) in combination with a collagen membrane (Bio-Gide™). A case series. *J Clin Periodontol* 2006; 14:99-109..
- 18- Mater S, Mater M. Electrospun titanium dioxide nanofibers containing hydroxyapatite and silver nanoparticles as future implant materials 2010;21:2551-9
- 19- Ferraz MP, Mateus AY, Sousa JC, Monteiro FJ. Nanohydroxyapatite microspheres as delivery system for antibiotics: release kinetics, antimicrobial activity, and interaction with osteoblasts. *J Biomed Mater* 2008;23:56-100.
- 20- Matsumoto T, Okazaki M, Inoue M, Yamaguchi S, Kusunose T, Toyonaga T, et al. Hydroxyapatite nanoparticles as a controlled release carrier of protein. *J Biomaterials* 2004; 17:37-92.
- 21- Uchida A, Shinto Y, Araki N, Ono K. Slow release of anticancer drugs from porous calcium hydroxyapatite ceramic. *J Orthopedic Research* 2002; 10:3:440-507.
- 22- Zhou G, Li Y, Xiao W, Zhang L, Zuo Y, Xue J, Jansen JA. Synthesis, characterization, and antibacterial activities of a novel nanohydroxyapatite/zinc oxide complex. *J Biomed Mater Res* 2007; 82:49-100.
- 23- Shahoon H, Hamed R, Yadegari Z, Valai N. Evaluation of hydroxyapatite nano particles. on the human peripheral blood mononuclear cells: An In vitro Study. *J Medwell* 2010 ;512:764-768
- 24- Yantao Z, Yumei Z, Dagang G. Synthesis and cellular Biocompatibility of Two Kinds of HAP with Different Nanocrystal Morphology. *J Wiley interscience* 2009;24:548-689.
- 25- Hsieh MF, Li Jk, Huang SH, Sperling RA, Parak W. Tracking of cellular uptake of hydrophilic Cd/Zn quantum dots/hydroxyapatite composites nanoparticles in MC3T3-E1 osteoblast cells. *J Nanosci Nanotechnol* 2009;9:27-62.
- 26- Motkin M, Wright D.M, Muller K, Kyle N, Gard T.G, Porter A. Hydroxyapatite nano and microparticles: Correlation of particle properties with cytotoxicity and biostability. *J Biomaterials* 2009; 30: 337-397.
- 27- Huang J, Scherbar AM, van Berlo, Schins RP. Evaluation of cytotoxic effects and oxidative stress with hydroxyapatite dispersion of different physicochemical properties in rat NR8383 cells and primary macrophages. *J Toxic in vitro* 2004;23:520-630.
- 28- Scheel J, Weimans S, Thiemann A. Exposure of the murine RAW 264.7 macrophage cell line to hydroxyapatite dispersions of various composition and morphology: assessment of cytotoxicity and activation. *J Toxic in vitro* 2009; 23:531-548.