

بررسی سمیت سلولی نانو هیدروکسی آپاتیت بر رده سلولی فیبروبلاست لته (HGF2) در شرایط آزمایشگاهی

نویسندگان: نوشین جلاپور نادری^{۱*}، رویا یارایی^۲، داوود جمالی^۳ و
محمد باقر رضوانی^۴

۱. استادیار - گروه آسیب شناسی فک و دهان، دانشکده دندان پزشکی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران

۲. دانشیار - گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی و مرکز تحقیقات تنظیم پاسخ های ایمنی
دانشگاه شاهد، تهران، ایران

۳. کارشناس - گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران

۴. استادیار - گروه ترمیمی، دانشکده دندان پزشکی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران

* نویسنده مسئول: نوشین جلاپور نادری
Email: noushin_jly85@yahoo.com

چکیده

مقدمه و هدف: با گسترش فناوری نانو، ذرات نانو هیدروکسی آپاتیت در عرصه پزشکی و دندان پزشکی به کار گرفته شده اند؛ اطلاعات موجود درباره اثرهای بیولوژیک این ذرات به طور کامل، مشخص نیست. این مطالعه با هدف بررسی سمیت نانو هیدروکسی آپاتیت بر فیبروبلاست های لته انجام شد.

مواد و روش ها: غلظت های مختلف نانو هیدروکسی آپاتیت از ۰/۰۰۲ mg/ml تا ۲ در ۴۸، ۲۴ و ۷۲ ساعت بر سلول های فیبروبلاست لته تأثیر داده شد. میزان سمیت سلولی این ماده در غلظت و زمان های مختلف با روش های MTT و LDH بررسی شد.

یافته ها: روش MTT: دوزهای بالاتر از ۵ mg/ml و ۲ در ۲۴ ساعت، دوزهای بالاتر از ۵ و ۲ و ۰/۲ و دوزهای پایین تر از ۰/۰۱، ۰/۰۲، ۰/۰۵ و ۰/۰۰۲، ۰/۰۵ و ۰/۰۰۵ در ۴۸ ساعت، دوزهای بالای ۵ mg/ml، ۰/۵، ۱، ۲، ۵ و دوزهای پایین ۰/۰۱، ۰/۰۲، ۰/۰۵ و ۰/۰۰۲ در ۷۲ ساعت سبب کاهش معنادار احیاء رنگ و جذب نوری فیبروبلاست ها شدند. روش LDH: در ۲۴ ساعت در دوز ۵ mg/ml افزایش و در دوز ۰/۰۲ mg/ml کاهش، در ۴۸ ساعت در دوزهای ۱، ۲، ۵ mg/ml افزایش و در دوز ۰/۰۱ mg/ml کاهش معنی دار و در ۷۲ ساعت در دوز ۵ mg/ml افزایش تولید LDH وجود داشت. غلظت مورد نیاز برای ۵۰ درصد مرگ سلولی در هر سه زمان حدود ۶ میلی گرم در میلی لیتر بود.

نتیجه گیری: غلظت های بالای نانو هیدروکسی آپاتیت اثر توکسیک بر سلول های فیبروبلاست لته در ۲۴ ساعت و بیشتر از آن دارند.

واژگان کلیدی: سمیت سلولی، نانو هیدروکسی آپاتیت، رده سلولی فیبروبلاست

دوماهنامه علمی - پژوهشی
دانشگاه شاهد
سال نوزدهم - شماره ۹۹
تیر ۱۳۹۱

دریافت: ۹۰/۱۱/۲۳
آخرین اصلاح ها: ۹۱/۱/۲۴
پذیرش: ۹۱/۲/۲

مقدمه

هیدروکسی آپاتیت نوعی سرامیک آپاتیت است. سرامیک‌ها با داشتن خصوصیات همانند خشتی بودن و ثبات شیمیایی در مقایسه با فلزات سازگاری نسبی بالاتری دارند و پاسخ‌های بیولوژیک کمتری ایجاد می‌کنند. هیدروکسی آپاتیت به فاز معدنی استخوان و دندان، بسیار شباهت دارد و به‌عنوان جایگزین آنها به‌کار می‌رود؛ هدای پذیری کمتر حرارت و الکتروسیسته و خصوصیات الاستیک مشابه استخوان از خصوصیات دیگر این ماده است که استفاده از آن را مورد توجه قرار داده است (۱). پارتیکل‌های هیدروکسی آپاتیت در اندازه‌های نانو بر افزایش رشد سلولی و تشکیل بیومیرال‌ها تأثیری بیشتر دارند (۲). نشان داده شده است که نانوهیدروکسی آپاتیت سبب بهبود فعالیت زیستی و سازگاری نسبی بالاتر در ایمپلنت‌های استخوانی و مواد ترمیمی می‌شود (۳ تا ۷).

تأثیر پارتیکل‌های نانو بر سلامت انسان و محیط اطراف او به‌طور کامل مشخص نشده است. ذرات نانو، توانایی عبور از غشاهای بیولوژیک را دارند و به همین دلیل، احتمال آن می‌رود که توانایی تأثیر بر سلول‌های بدن را داشته باشند (۸).

بررسی اثر نانوهیدروکسی آپاتیت بر سلول‌ها نشان‌دهنده تأثیرهای بافتی متفاوت بوده است (۹ و ۱۰). از ذرات نانو هیدروکسی آپاتیت در دهان‌شویه‌ها، خمیر دندان‌ها و مواد ترمیمی دندان پزشکی به‌منظور افزایش بهبود تأثیر آنها استفاده می‌شود؛ همچنین، استفاده از این ذرات، سبب تماس این مواد با محیط دهان می‌شود. به‌رغم استفاده روزافزون از این مواد، اطلاعات موجود درباره خصوصیات بیولوژیک این ذرات به‌طور کامل مشخص نشده است. با توجه به اهمیت این نکته، مطالعه حاضر با هدف بررسی سمیت ذرات نانوهیدروکسی آپاتیت بر رده سلولی فیبروبلاست لثه (HGF2) انجام شد.

مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر از نوع بررسی توصیفی است. این مطالعه در گروه ایمنولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه شاهد انجام گرفت. نانو هیدروکسی آپاتیت به‌صورت پودری سفید با میانگین قطر ذرات 10nm از کمپانی NANOSHEL تهیه شد و به‌منظور پیشگیری از ایجاد آلودگی در محیط کشت، در قدم اول با قراردادن در زیر نور ماورای بنفش به مدت ۴۸ ساعت استریل شد؛ سپس با وزن کردن مقدار معینی پودر و اضافه کردن مقدار معینی محیط کشت به آن، غلظت‌های مشخصی از آن تهیه و به چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه حاوی سلول اضافه شد. در این مطالعه از غلظت‌های ۵، ۲، ۱، ۰/۵، ۰/۲، ۰/۱، ۰/۰۵، ۰/۰۲، ۰/۰۱ و ۰/۰۰۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر (۲ تا ۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) استفاده شد.

کشت سلول و اضافه کردن دارو

رده سلولی فیبروبلاست لثه انسان (HGF2) از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران (کد C166) خریداری و در محیط کشت RPMI1640 (Gibco، آمریکا) دارای ۱۰ درصد سرم FBS (Gibco، آمریکا) کشت داده شد. برای انجام تست، سلول‌ها به تعداد ۱۰ هزار در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه (Nunc دانمارک) کشت داده شدند و بعد از گذشت یک شب (۱۸ ساعت از زمان کشت سلول‌ها در پلیت) رقت‌های مختلف نانو هیدروکسی آپاتیت به آنها اضافه شدند. برای هریک از غلظت‌های نانو هیدروکسی آپاتیت و هریک از گروه‌های کنترل از ۵ چاهک استفاده شد.

بررسی سمیت سلولی به روش MTT

این تست در مدت زمان‌های مورد نظر (۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت) پس از مجاورت سلول‌ها با نانو هیدروکسی آپاتیت انجام شد. برای هر زمان، پلیت جداگانه‌ای در نظر گرفته شد. MTT (متیل تiazول تترازولیوم بروماید - Sigma، آلمان) در غلظت ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر تهیه شد

بدون سمیت سلولی (LC) Low Control و کنترل با سمیت سلولی بالا (HL) High Control نامیده شد. نتایج حاصل از جذب نوری با استفاده از فرمول به درصد سایتوتوکسیته در سلول‌های مورد نظر تبدیل شد.

$$100 \times (\text{LC/HC-LC} \text{ تست}) = \text{سیتوتوکسیسیته } (\%)$$

محاسبه IC50

در دستگاه خواننده الیزا برای تست‌های MTT و LDH جذب به دست آمده به درصد توکسیسته تبدیل شد و غلظتی از دارو که می‌تواند موجب ۵۰ درصد مرگ و میر سلول‌ها شود محاسبه شد (۱۳).

محاسبات آماری

محاسبه آماری گروه‌های مختلف با استفاده از آزمون آماری ANOVA و تست تکمیلی Tucky انجام شد. $p < 0.05$ از نظر آماری معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

نتایج سمیت سلولی به روش MTT در غلظت‌های بالای نانو هیدروکسی آپاتیت در هر سه زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت کاهش شدید فعالیت حیاتی سلول‌ها دیده شد که از نظر آماری معنی دار است. بیشترین کاهش مربوط به بالاترین غلظت‌ها یعنی ۵ و ۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود (حدود ۳۵ و ۱۶ درصد در ۲۴ ساعت)؛ در دوزهای کمتر و زمان‌های طولانی‌تر نیز آسیب سلولی یا کاهش رشد در مقایسه با کنترل دیده شد. نمودار ۱ نشان‌دهنده جذب نوری حاصل از سنجش MTT اثر نانو هیدروکسی آپاتیت بر رده سلولی فیروبلاست لته در ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت است.

نتایج سمیت سلولی به روش LDH

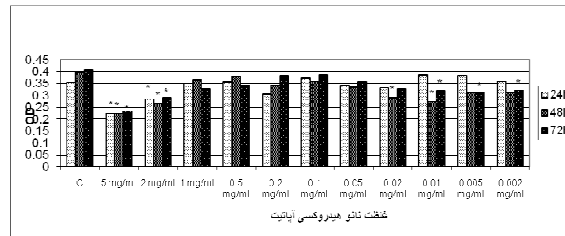
نتایج حاصل از جذب نوری (OD)، با استفاده از فرمول داده شده به درصد سایتوتوکسیته در سلول‌های مورد نظر تبدیل شد. مرگ سلولی فقط در غلظت‌های بالای ذرات نانو دیده شد و در غلظت‌های کمتر، سمیت قابل توجهی وجود نداشت. در غلظت ۱ میلی‌گرم افزایش

و به میزان یک‌دهم حجم هر چاهک به آن اضافه شد؛ سپس پلیت‌ها به مدت ۴ ساعت در انکوباتور (Biotek کره جنوبی) قرار گرفتند و محیط رویی سلول‌ها با احتیاط تخلیه شد؛ سپس با استفاده از ایزوپروپانول اسیدی (۰/۰۴N) اسید کلریدریک (Merck آلمان) کریستال‌های تشکیل شده حل شد و در نهایت، میزان جذب در دستگاه خواننده الیزا (ICN آمریکا) با طول موج ۴۹۲ خواننده شد. از آنجا که میزان جذب متناسب با فعالیت حیاتی است، با در نظر گرفتن گروه کنترل (فاقد نانو هیدروکسی آپاتیت) به عنوان صد درصد سمیت سلولی محاسبه شد (۱۱).

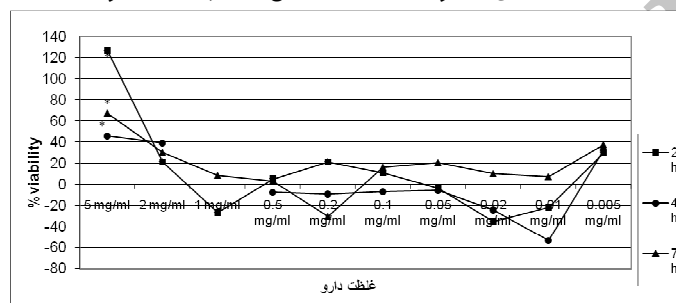
بررسی سمیت سلولی به روش LDH

این تست در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از مجاورت سلول‌ها با نانو هیدروکسی آپاتیت انجام شد. برای هر زمان، پلیتی جداگانه در نظر گرفته شد. به منظور بررسی سمیت سلولی بر سلول‌ها به روش LDH (کیت لاکتات دهیدروژناز - محصول شرکت Roche، آلمان)، از محیط رویی سلول‌ها در چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه مقدار ۵۰ میکرولیتر برداشته، به پلیت الیزا (Nunc دانمارک) منتقل شد و طبق دستورالعمل، ۵۰ μl از ترکیب محلول‌های حاوی NAD^+ و دیافوراز (سیتوکروم b5 ردوکتاز) و محلول حاوی نمک تترازولیوم (INT (2-[4-iodophenyl]-3-[4-nitrophenyl]-5-(phenyltetrazolium chloride) اضافه شد. پس از ۳۰ دقیقه جذب نوری، مایع داخل چاهک‌های پلیت در دستگاه خواننده الیزا که طول موج آن، روی ۴۹۲ تنظیم شده است، خوانده شد. علاوه بر کنترل بدون نانو هیدروکسی آپاتیت (فقط محیط کشتی که کنترل منفی و بدون مرگ سلولی است) در این سنجش یک گروه کنترل حاوی ۲ درصد ماده Triton X100 (Merck، آلمان) گذاشته شد تا بالاترین میزان سمیت سلولی و LDH تولید شده از سلول‌های مرتبط به دست آید (۱۲). کنترل با محیط

فعالیت دیده شد. نمودار ۲ نشان دهنده درصد سمیت سلولی نانوهیدروکسی آپاتیت بر رده سلولی فیبروبلاست لته در ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت است.



نمودار ۱. جذب نوری حاصل از سنجش MTT اثر نانو هیدروکسی آپاتیت بر رده سلولی فیبروبلاست لته در ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت. ستون‌های ستاره دار بیانگر معنی دار بودن اختلاف میانگین با گروه کنترل خود است ($p < 0.05$).



نمودار ۲. درصد سمیت سلولی نانوهیدروکسی آپاتیت بر رده سلولی فیبروبلاست لته در ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت. ستاره‌ها نشان دهنده معنی دار بودن اختلاف میانگین درصد سیتوتوکسیسته با گروه کنترل خود هستند ($p < 0.05$).

مورد استفاده در این مطالعه به صورت سوسپانسیون mg/ml

۱۰ و در اندازه متوسط با ابعاد ۱۰ میکرومتر بود. نتایج تست MTT نشان داد که نانو هیدروکسی آپاتیت در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در غلظت‌های ۵ و ۲ اثر سمی روی سلول‌های فیبروبلاست دارد و غلظت‌های کمتر نتوانسته‌اند آسیب جدی در فعالیت حیاتی سلول‌ها ایجاد کنند. از آنجاکه تست MTT نشان دهنده فعالیت حیاتی سلول‌هاست، کاهش آن نشانه آسیب یا مرگ سلولی خواهد بود. این نتایج نشان می‌دهند که مجاورت سلول‌های فیبروبلاست لته با غلظت‌های بالای نانوهیدروکسی آپاتیت سبب مرگ این سلول‌ها می‌شود.

جدول ۱. IC50 ذرات هیدروکسی آپاتیت روی سلول‌های فیبروبلاستی لته بر حسب میلی‌گرم در میلی‌لیتر

IC50 در تست MTT	IC50 در تست LDH	زمان
۶/۵۸ میلی‌گرم/میلی‌لیتر	۲/۴۶ میلی‌گرم/میلی‌لیتر	۲۴ ساعت
۶/۶۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر	۴/۶۱ میلی‌گرم/میلی‌لیتر	۴۸ ساعت
۶/۲۴ میلی‌گرم/میلی‌لیتر	۳/۸۱ میلی‌گرم/میلی‌لیتر	۷۲ ساعت

نتایج IC50 بر اساس تست MTT غلظت مورد نیاز برای ۵۰ درصد مرگ و میر سلولی در هر سه زمان، حدود ۶ میلی‌گرم در میلی‌لیتر است. در تست LDH غلظتی کمتر برای آسیب‌های ۵۰ درصد از سلول‌ها لازم است. جدول ۱ نشان دهنده IC50 ذرات هیدروکسی آپاتیت روی سلول‌های فیبروبلاستی لته است.

بحث

در این مطالعه، سمیت محلول نانو هیدروکسی آپاتیت بر سلول‌های فیبروبلاست لته انسان تهیه شده از بانک سلولی مورد بررسی قرار گرفت. نانو هیدروکسی آپاتیت

آسیب‌های وارد شده به سلول به خصوص آسیب‌های غشایی که می‌توانند خروج آنزیم‌ها را سبب شوند و مرگ سلول را به دنبال داشته باشند، استوار است.

همانگ بودن نتایج این دو تست در غلظت‌های بالا و زمان کوتاه می‌تواند نشان‌دهنده آن باشد که ساختار مهم در کاهش فعالیت حیاتی و آسیب سلولی، همان آسیب غشایی است. کاهش فعالیت در زمان‌های طولانی‌تر - به خصوص در غلظت‌هایی که آسیب مربوط به زمان کوتاه مشاهده نشده است یعنی غلظت‌های کم - می‌تواند پدیده‌ای تنظیمی باشد، زیرا در تست LDH این پدیده مشاهده نشد، پس آسیب غشایی اتفاق نیفتاده است؛ در عین حال، کاهش مختصر مشاهده شده در فعالیت سلول، ممکن است به دلیل حضور ذرات در محیط باشد که سبب ایجاد شرایطی در خروج رشد این سلول‌ها از حالت ایده‌آل می‌شود و متعاقب آن، کاهش مختصر در تکثیر را به دنبال دارد. بعد از ۷۲ ساعت که سلول‌های گروه کنترل، تکثیر شوند، این تفاوت خود را تا حدی به طور مطلوب، نشان می‌دهد.

گزارش‌های مختلف نشان داده‌اند که پارتیکل‌های نانو هیدروکسی آپاتیت سبب بهبود خصوصیت مواد می‌شوند (۱۵ تا ۱۷). نام فارسی آورده شود^۱ و همکاران (۲۰۱۰) گزارش کرده‌اند که وارد کردن نانو هیدروکسی آپاتیت در ماتریکس پلی‌پورتان، محیط مناسبی برای چسبیدن و تکثیر سلول‌ها ایجاد می‌کند (۱۸).

نام فارسی آورده شود^۲ و همکاران نیز در سال ۲۰۱۱ نشان داده‌اند که کمپوزیت نانو هیدروکسی آپاتیت در حضور ماتریکس نشاسته سازگاری زیستی بهتری از نانو هیدروکسی آپاتیت دارد، یعنی فاقد آثار نامطلوب نانو هیدروکسی آپاتیت بر تکثیر سلولی است (۱۹).

نتایج تست LDH نشان داد که نانو هیدروکسی آپاتیت در همه زمان‌های مورد آزمایش در غلظت‌های ۵ mg/ml و ۲ اثر سمی بر سلول‌های فیروبلستی دارد. با توجه به اینکه تست LDH در اصل بر آسیب غشایی سلول و خروج مواد از غشاء سلول استوار است (۱۴)، نتایج، نشان‌دهنده آسیب سلولی در غلظت‌های بالاست؛ از آنجاکه این آسیب در غلظت‌های کمتر مشاهده نشد، می‌توان نتیجه گرفت که در غلظت‌های پایین‌تر، آسیب جدی (در حد تأثیرگذار در این تست) به غشاء سلول وارد نشده‌اند و آسیب‌ها در حدی هستند که برای سلول قابل ترمیم‌اند.

کاهش مختصر فعالیت حیاتی در زمان‌های طولانی با غلظت‌های بسیار کم هم مشاهده شد؛ این امر ممکن است تحت تأثیر مکانیسم‌های متفاوت نظیر اثر بر گیرنده‌ها، مسیرهای سیگنالینگ یا اثر بر تنظیم فعالیت سلول باشد. از آنجاکه کاهش فعالیت سلولی فقط در زمان‌های بعد از ۴۸ ساعت دیده شد و در تست LDH مشاهده نشد، این امر می‌تواند ناشی از تغییر در فعالیت تکثیری سلول‌ها در مقایسه با کنترل باشد.

نتایج IC₅₀ نیز به این نکته اشاره دارند که شدت آسیب یا درصد سلول‌های آسیب‌دیده در تست LDH در مقایسه با تست MTT بیشتر است؛ به عبارت دیگر، غلظت مورد نیاز برای ۵۰ درصد آسیب به سلول‌ها در تست LDH کمتر است؛ از این یافته می‌توان این گونه استنباط کرد که در غلظت‌های بالا، عمده آسیب وارد شده به سلول، آسیب غشایی است که مرگ سلولی از پیامدهای آن است. این یافته در تست MTT به خوبی دیده شد. از آنجاکه تست MTT بر اساس فعالیت حیاتی سلول‌ها به خصوص آنزیم‌های میتوکندریایی استوار است، تناسب خوبی با فعالیت متابولیک و عمومی سلول‌ها (زنده بودن و فعالیت حیاتی) و همچنین تعداد آنها در صورت تکثیر دارد؛ برعکس تست LDH بر

غلظت نانوهیدروکسی آپاتیت در محیط کشت سلول‌های P388 (لوسمی) موجب افزایش مرگ آنها می‌شود. غلظت مورد استفاده در این مطالعه ۸ تا ۴۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بوده است (۲۳).

برخلاف این یافته‌ها، Wang و همکاران در سال ۲۰۰۷ گزارش کرده‌اند که داربست‌های تهیه‌شده از کمپوزیت نانوهیدروکسی آپاتیت/ پلی‌آمید بر تکثیر یا تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیال به‌دست‌آمده از مغز استخوان، تأثیری مخرب ندارند (۲۴).

تفاوت به‌دست‌آمده از نتایج، ممکن است از میزان ورودی پارتیکل‌ها به سلول ناشی باشد که برای سلول‌های مختلف به میزانی متفاوت است به‌طوری‌که میزانی در حد ۴ میکروگرم در میلی‌لیتر برای سلول‌های لوسمیک و براساس یافته‌های این مطالعه ۲ میکروگرم در میلی‌لیتر برای فیبروبلاست‌ها سمی است؛ این تفاوت می‌تواند از ساختار مختلف سلول‌ها ناشی شده باشد.

در جمع‌بندی با یافته‌های بالا می‌توان نتیجه‌گرفت که نانوهیدروکسی آپاتیت بالقوه توانایی ایجاد اثرهای نامطلوب بیولوژیکی را دارد. براساس یافته‌های مطالعه حاضر، این ماده در غلظت‌های بالا اثری جدی بر مرگ سلولی در ۲۴ ساعت و بیشتر از آن دارد لذا در زمان استفاده از غلظت‌های بالای آن، بهتر است احتیاط‌شود. به‌نظر می‌رسد که ساختار اصلی آسیب در غلظت‌های بالای نانوهیدروکسی آپاتیت، آسیب واردشده به غشای سلولی است، اکنون این پرسش مطرح می‌شود که «آیا این اثر در زمان‌های کمتر از ۲۴ ساعت هم مشاهده خواهد شد یا خیر؟»؛ این پرسشی است که جادارد در تحقیق‌های بعدی به آن پرداخته‌شود. این احتمال وجود دارد که غلظت‌های کمتر نانوهیدروکسی آپاتیت یا ترکیب آن با سایر مواد سازگار بیولوژیک با کاهش شدت این اثر همراه باشد. تأثیر بر سایر رفتارهای سلول از جمله تولید سایتوکاین‌هایی که

به‌رغم آثار مفید استفاده از این ماده، تأثیر ذرات نانو بر موجود زنده به‌خوبی مشخص نیست.

اسم فارسی آورده‌شود^۱ و همکاران در سال ۲۰۰۹ نشان‌دادند که اندازه ذرات و فرم سنتتیک آنها به شکل ژل یا کلویید اثری مهم روی تأثیر توکسیک آنها بر ماکروفازهای انسانی دارد. بیشترین تأثیر توکسیک در شکل ژل در مقدار ۳۱-۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر دیده‌شد؛ بقیه اشکال در غلظت‌های بالاتر از ۲۵۰ میکروگرم (۰/۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) تأثیر مخرب داشتند؛ این اثر به تغییرهای کلسیم داخل سلولی ارتباط داده‌شد (۲۰). بررسی ذرات نانو کربوکسیل پلی استایرین نشان‌داده‌است که سبب ایجاد صدمه سلولی توسط این ذرات، ناشی از آپوپتوز، نکروز و تکثیر سلولی است (۲۱).

مطالعه روی ذرات نانو اکسید فلزی نیز بیانگر آن بوده‌است که هرچه میزان بار کاتیونی بیشتر باشد، میزان سمیت پارتیکل‌های نانو اکسید فلزی کمتر است (۲۲).

این یافته‌ها بیانگر آثار مخرب پارتیکل‌های نانو بر موجود زنده هستند. با نتیجه این مطالعه که نشان‌داد غلظت‌های بالای نانوهیدروکسی آپاتیت اثر توکسیک بر سلول‌های فیبروبلاست لته دارد، همخوانی است. در مطالعه حاضر از شکل سوسپانسیون و در مطالعات بالا اشکال ژل واکسیده این ماده مورد استفاده قرار گرفته‌اند؛ این نکته نشان‌می‌دهد که بررسی سمیت سلولی پارتیکل‌های نانو به تحقیق‌هایی بیشتر و تکمیلی‌تر نیاز دارد. از آنجاکه مطالعه‌ای درخصوص آثار توکسیک نانوهیدروکسی آپاتیت بر رده سلولی فیبروبلاست لته یافت نشد؛ امکان مقایسه یافته‌های این مطالعه با مطالعات مشابه وجود نداشت. مطالعاتی محدود بر سلول‌های دیگر گزارش شده‌است.

Zi و همکاران (۲۰۰۷) گزارش کرده‌اند که افزایش

منابع

- O'Brien WJ. Dental materials and their selection. 4th ed. Canada: Quintessence Publishing Co; 2008: 308 -311.
- Liu X, Zhao M, Lu J, Ma J, Wei J, Wei S. Cell responses to two kinds of nanohydroxyapatite with different sizes and crystallinities. *Int J Nanomedicine*. 2012;7:1239-50.
- Huang S, Gao S, Cheng L, Yu H. Remineralization Potential of Nano-Hydroxyapatite on Initial Enamel Lesions: An in vitro Study. *Caries Res* 2011;45(5):460-468.
- Tschoppe P, Zandim DL, Martus P, Kielbassa AM. Enamel and dentine remineralization by nano-hydroxyapatite toothpastes. *J Dent* 2011;39(6):430-7.
- Abd El-Fattah H, Helmy Y, El-Kholy B, Marie M. In vivo animal histomorphometric study for evaluating biocompatibility and osteointegration of nano-hydroxyapatite as biomaterials in tissue engineering. *J Egypt Natl Canc Inst* 2010;22(4):241-50.
- Cunniffe GM, Dickson GR, Partap S, Stanton KT, O'Brien FJ. Development and characterisation of a collagen nano-hydroxyapatite composite scaffold for bone tissue engineering. *J Mater Sci Mater Med* 2010;21(8):2293-8.
- Yang GL, He FM, Hu JA, Wang XX, Zhao SF. Effects of biomimetically and electrochemically deposited nano-hydroxyapatite coatings on osseointegration of porous titanium implants. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2009;107(6):782-9.
- Brooking J, Davis SS, Illum L. Transport of nanoparticles across the rat nasal mucosa. *J Drug Target* 2001;9(4):267-79.
- 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 clinical trial: 6-month results. *J Periodontol* 2008 ;79(3):394-400.
- 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 ;33(7):491-9.
- Morgan DM. Tetrazolium (MTT) assay for cellular viability and activity. *Methods Mol Biol* 1998; 79: 179-83.
- Decker T, Lohmann-Matthes ML. A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity". *J Immunol Methods* 1988 ;115 (1): 61-9.
- Plumb JA. Cell sensitivity assays : the MTT assay. *Methods Mol Med* 1999;28:25-30.
- Racher AJ, Looby D, Griffiths JB. Use of lactate dehydrogenase release to assess changes in culture viability. *Cytotechnology* 1990 3(3): 301-307.
- Zeng S, Fu S, Guo G, Liang H, Qian Z, Tang X, Luo F. Preparation and characterization of nano-hydroxyapatite/poly(vinyl alcohol) composite membranes for guided bone regeneration. *J Biomed Nanotechnol* 2011;7(4):549-57.

ممکن است به فیروز، التهاب یا سایر پدیده‌های بیولوژیک منجر شوند و نیز بررسی در شرایط داخل بدن نکاتی هستند که به مطالعه نیاز دارند.

نتیجه‌گیری

غلظت‌های بالای نانوهیدروکسی آپاتیت بر سلولی‌های فیروبلاست لته در ۲۴ ساعت و بیشتر از آن، اثر توکسیک دارد.

تقدیر و تشکر

بدین وسیله از گروه ایمونولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه شاهد و مرکز تحقیقات دندان پزشکی دانشگاه شاهد تشکر و تقدیر به عمل می‌آید.

تضاد منافع

این مطالعه، نتیجه طرح پژوهشی (بررسی سمیت سلولی نانوهیدروکسی آپاتیت بر رده سلولی فیروبلاست لته (HGF2) در شرایط آزمایشگاهی) مصوب مرکز تحقیقات دندان پزشکی دانشگاه شاهد است.

16. Li Z, Yubao L, Yi Z, Lan W, Jansen JA. In vitro and in vivo evaluation on the bioactivity of ZnO containing nano-hydroxyapatite/chitosan cement. *J Biomed Mater Res A* 2010;93(1):269-79.
17. Li J, Li Y, Ma S, Gao Y, Zuo Y, Hu J. Enhancement of bone formation by BMP-7 transduced MSCs on biomimetic nano-hydroxyapatite/polyamide composite scaffolds in repair of mandibular defects. *J Biomed Mater Res A* 2010 ;95(4):973-81.
18. Liu H, Zhang L, Li J, Zou Q, Zuo Y, Tian W, Li Y. Physicochemical and biological properties of nano-hydroxyapatite-reinforced aliphatic polyurethanes membranes. *J Biomater Sci Polym Ed* 2010; 21(12): 1619-36.
19. Meskinfam M, Sadjadi MA, Jazdarreh H, Zare K. Biocompatibility evaluation of nano hydroxyapatite-starch biocomposites. *J Biomed Nanotechnol* 2011; 7(3): 455-9.
20. Motskin M, Wright DM, Muller K, Kyle N, Gard TG, Porter AE, Skepper JN. Hydroxyapatite nano and microparticles: correlation of particle properties with cytotoxicity and biostability. *Biomaterials* 2009; 30(19): 3307-17.
21. Fröhlich E, Samberger C, Kueznik T, Absenger M, Roblegg E, Zimmer A, et al. Cytotoxicity of nanoparticles independent from oxidative stress. *J Toxicol Sci* 2009 ;34(4):363-75.
22. Hu X, Cook S, Wang P, Hwang HM. In vitro evaluation of cytotoxicity of engineered metal oxide nanoparticles. *Sci Total Environ* 2009 1;407(8):3070-2.
23. Li G, Huang J, Li Y, Zhang R, Deng B, Zhang J, Aoki H. In vitro study on influence of a discrete nano-hydroxyapatite on leukemia P388 cell behavior. *Biomed Mater Eng* 2007; 17(5): 321-7.
24. Wang H, Li Y, Zuo Y, Li J, Ma S, Cheng L. Biocompatibility and osteogenesis of biomimetic nano-hydroxyapatite/polyamide composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2007; 28(22): 3338-48.

Daneshvar

Medicine

*Scientific-Research
Journal of Shahed
University
Seventeenth Year,
No.99
June, July
2012*

Received: 11/2/2012

Last revised: 12/4/2012

Accepted: 22/4/2012

Cytotoxicity of nano-hydroxyapatite on gingiva-derived fibroblast cell line (HGF2): An in vitro study

Noushin Jalayer Naderi^{1*}, Roya Yaraee², Davoud Jamali², Mohammad Bagher Rezvani³

1. Department of Oral and Maxillofacial Pathology, Faculty of Dentistry, Shahed University, Tehran.Iran
2. Department of Immunology, Faculty of Medicine, Shahed University and Immunoregulation Research Center, Shahed University, Tehran, Iran
3. Department of Operative Dentistry, Faculty of Dentistry, Shahed University, Tehran, Iran

Email: noushin _ jly85@yahoo.com

Asbtract

Background and Objective: With expansion of nanotechnology, nano-hydroxyapatite particles are used in medicine and dentistry fields. The biological effects of these particles are not completely defined. The aim of this study was to determine the cytotoxicity of nano-hydroxyapatite on gingiva-derived fibroblasts.

Materials and Methods: Various concentrations of nano-hydroxyapatite from 2 to 0.002 mg/ml were treated on gingiva-derived fibroblast cell line (HGF2) in 24, 48 and 72 hours. MTT and LDH methods were used for evaluation of cytotoxic effect.

Results: MTT method: doses higher than 5 and 2 mg/ml in 24 hours, doses higher than 0.2, 2 and 5 mg/ml and lower than 0.01, 0.02, 0.05, 0.002 and 0.005 in 48 hours and doses higher than 0.5, 1, 2, and 5 mg/ml and doses lower than 0, 0.01, 0.02, 0.002 and 0.005 mg/ml in 72 hours caused significant decreases in OD and absorbance of fibroblasts. LDH method: significant increase of LDH release noticed with 5 mg/ml dose in 24 hours, 1, 2, 5 mg/ml doses in 48 hours and 5 mg/ml dose in 72 hours. LDH release decreased with 0.02 mg/ml and 0.01 mg/ml in 24 and 48 hours, respectively. The IC50 was about 6 mg/ml in 24, 48 and 72 hours.

Conclusion: In 24 hours and after that, high doses of nano-hydroxyapatite have cytotoxic effect on gingival-derived fibroblasts.

Key words: Cytotoxicity, Nano-hydroxyapatite, Fibroblast cell line