

بررسی سمیت سلولی سیلر Endoseal MTA به عنوان ماده ترمیم کننده پرفوراسیون کانال ریشه، بر روی سلول های فیبروبلاست لته و مقایسه ی آن با ProRoot MTA ایرانی و CEM توسط تست MTT

سلما امیدی^{۱*}، کوثر دادگر^۲، عباس مسگرانی^۳، محمود موسی زاده^۴، فاطمه زاغی حسین زاده^۶

^۱ استادیار، گروه اندودانتیکس، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

^۲ استادیار، گروه پروتزهای دندانی، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

^۳ دانشیار، گروه اندودانتیکس، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

^۴ استادیار، گروه اپیدمیولوژی، مرکز تحقیقات علوم بهداشتی، پژوهشکده اعتیاد، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

^۵ مرکز تحقیقات سرطان های گوارشی، مرکز بیماری های غیرمسری، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

^۶ دندانپزشک، ساری، ایران

تاریخ ارائه مقاله: ۱۴۰۰/۴/۱ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱/۱۶

Evaluation of Cytotoxicity of Endoseal MTA Sealer as a Root Canal Perforation Restorative Material on Gingival Fibroblasts Compared to Iranian ProRoot MTA and CEM by MTT test

Salma Omidi^{1*}, Kosar Dadgar², Abbas Mesgarani³, Mahmood Moosazadeh^{4,5},
Fatemeh Zaghi Hosseinzadeh⁶

¹ Assistant Professor, Department of Endodontics, School of Dentistry, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

² Assistant Professor, Department of Prosthodontics, School of Dentistry, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

³ Associate Professor, Department of Endodontics, School of Dentistry, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁴ Assistant Professor, Department of Epidemiology, Health Sciences Research Center, Addiction Institute, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁵ Gastrointestinal Cancer Research Centre, Non-communicable Diseases Institute, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁶ Dentist, Sari, Iran

Received: 22 June 2021; Accepted: 5 April 2022

Introduction: Root canal perforation is a reason for root canal treatment failures. Cytocompatibility is an essential feature of a perforation restorative material. This in vitro study aimed to evaluate the cytotoxicity of Endoseal MTA sealer as a root canal perforation restorative material on human gingival fibroblast cells in comparison to Iranian ProRoot MTA and CEM using tetrazolium-based colorimetric assay (MTT test).

Materials and Methods: MTA, CEM, and Endoseal MTA were prepared and exposed (for 48 h) to cell culture media 72 h after setting. Human gingival fibroblasts were then cultivated and incubated for 24 h with different dilutions (1/2, 1/4, 1/8) of each sealer extract. Cell viability was evaluated using the MTT test. The data were compared using the analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's post hoc test for multiple comparisons. P-values less than 0.05 were considered statistically significant.

Result: There was a significant association between CEM cell viability and Endoseal MTA as well as between MTA and CEM in 1/2 dilution. No significant difference was found in 1/4 and 1/8 dilutions between the percentage of cell viability of different sealers.

Conclusion: Based on the results of this study, although Endoseal MTA sealer is more toxic than CEM in 1/2 dilution, it has higher biocompatibility compared to MTA and can be considered as a perforation restorative material in terms of other favorable qualities.

Key words: CEM, Cytotoxicity, Endoseal MTA, MTT assay, Sealer

Corresponding Author: Somidi@mazums.ac.ir

J Mash Dent Sch 2023; 46(4): 305-15.

چکیده

مقدمه: پرفوریشن ریشه دندان یکی از علل شکست درمان های ریشه می باشد. یکی از مهم ترین خواص ماده ی ترمیم کننده پرفوراسیون، زیست سازگاری آن است. هدف از این مطالعه ی آزمایشگاهی، بررسی سمیت سلولی سیلر Endoseal MTA به عنوان ماده ی ترمیم کننده ی پرفوراسیون کانال ریشه، بر روی سلول های فیبروبلاست لته انسانی در مقایسه با Pro Root MTA ایرانی و CEM توسط تست MTT بود.

مواد و روش ها: Endoseal MTA و CEM، آماده شدند و ۷۲ ساعت بعد از ست شدن، ۴۸ ساعت در تماس با محیط کشت قرار گرفتند. سپس فیبروبلاست های لته انسانی کشت و به مدت ۲۴ ساعت با غلظت های مختلف (۱/۲، ۱/۴ و ۱/۸) عصاره ی هر سیلر انکوبه شد. درصد زنده ماندن سلولها با استفاده از تست MTT بررسی شد. داده ها با استفاده از آنالیز واریانس (ANOVA) و سپس تست توکی جهت مقایسه های متعدد، مقایسه شدند. مقادیر P-value کمتر از ۰/۰۵+ معنادار در نظر گرفته شدند.

یافته ها: در رقت ۱/۲، بین درصد حیات سلولی CEM و Endoseal MTA و همچنین CEM و MTA ارتباط معنادار وجود داشت. در رقت ۱/۴ و ۱/۸ بین درصد حیات سلولی سیلرهای مختلف ارتباط معناداری یافت نشد.

نتیجه گیری: بر طبق نتایج این مطالعه، در غلظت ۱/۲ سیلر Endoseal MTA اگرچه نسبت به CEM سمی تر است، اما نسبت به MTA، سازگاری زیستی قابل مقایسه ای دارد و با توجه به سایر خواص مناسب، می تواند به عنوان یک ماده پرکننده پرفوراسیون در نظر گرفته شود.

کلمات کلیدی: CEM، سمیت سلولی، Endoseal MTA، تست MTT، سیلر

مجله دانشکده دندانپزشکی مشهد / سال ۱۴۰۱ دوره ۴۶ / شماره ۴: ۱۵-۳۰۵.

مقدمه

پرفوریشن ریشه دندان به معنای ایجاد یک راه ارتباطی غیرطبیعی بین حفره دهان یا بافت های حمایت کننده و سطح خارجی ریشه دندان است.^(۱) پرفوریشن های ریشه، دومین علت شایع شکست درمان ریشه هستند. در مطالعات گوناگون گزارش شده است که به طور میانگین ۹/۶۱ درصد از موارد شکست درمان های اندودانتیک مربوط به پرفوریشن ها می باشند و می تواند به دلیل تحلیل و پوسیدگی یا به دلایل ایاتروژنیک در حین مراحل مختلف درمان ریشه، ایجاد فضای پست یا در نتیجه گسترش تحلیل داخلی به بافت های پری رادیکولر، رخ دهند و اگر ترمیم نشوند، می توانند به عنوان یک عارضه مهم باقی مانده و نتیجه درمان را به خطر بیندازند.^(۲)

ماده ی ترمیم کننده ی پرفوریشن ریشه که در تماس نزدیک با بافت سخت و ساختار پرپودنشیم قرار می گیرد، باید به طور ایده آل دارای خواصی از جمله زیست سازگاری بالا، باکتریواستاتیک و رادیوپاک، صرفه اقتصادی، توانایی سیل مناسب، توانایی القای

استخوان سازی و سمان سازی، غیرسمی و غیرپوسیدگی زا باشد.^(۱) هیچ ماده ای تمام ویژگی های ذکر شده را ندارد و مواد سیل کننده و تکنیک های متعددی طی سال ها با موفقیت های متفاوت آزمایش شده اند.^(۲)

در قدیم موادی از جمله آمالگام، گوتا پرکا، سمان های زینک اکساید و سمان گلس اینومر، کلسیم هیدروکساید و کامپوزیت استفاده می شدند. امروزه مواد جدیدتری از جمله MTA و CEM با خواص بهتر معرفی شده اند.

MTA (Mineral Trioxide Aggregate) اولین بار در سال ۱۹۹۳ توسط دکتر ترابی نژاد به عنوان ماده پر کننده انتهای ریشه و در سال ۱۹۹۴ به عنوان ماده ترمیم کننده پرفوریشن، معرفی گردید.^(۳) MTA با سازگاری نسبی بالا و توانایی sealing بهتر از آمالگام و ZOE، به صورت پودر موجود است و با رطوبت ست می شود.^(۴)

سمان CEM در سال ۲۰۰۶ به عنوان ماده ی پر کننده اندودنتیک در دندانپزشکی معرفی شد.^(۵-۶) موارد استفاده کلینیکی آن مانند MTA می باشد، خواص آنتی باکتریالی

برای ترمیم پرفوریشن‌های ریشه استفاده کرد و نیز مطالعات انجام شده تاکنون، در زمینه سمیت و مقایسه آن با دیگر مواد ترمیم کننده پرفوریشن محدود است، بر آن شدیم سمیت سلولی این ماده را بر روی سلول‌های فیبروبلاست لته ای انسان بررسی کنیم و آن را با زیست سازگارترین مواد (MTA و CEM) مقایسه کنیم.

مواد و روش‌ها

این مطالعه آزمایشگاهی (in-vitro) که در کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی مازندران تأیید شد (کد: IR.MAZUMS.REC.1398.6986)، جهت بررسی سمیت و بقای سلولی در آزمایشگاه دانشکده داروسازی تحت نظارت متخصص داروساز انجام گرفت. لازم به ذکر است که در این نوع مطالعات، نمونه گیری مطرح نمی‌باشد. در این مطالعه از سه سیلر تجاری به نام های MTA (ProRoot, Endoseal MTA و CEM (Bionique Dent, Iran) (Iran) (Maruchi, South Korea) استفاده شد.

برای تهیه محیط کشت سلول‌ها، مقدار ۱۳/۴۸ گرم از DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium) (Gibco-USA) و ۷/۳ گرم بی‌کربنات سدیم در ۱ لیتر آب مقطر حل گردید. سپس PH محیط کشت با کمک اسید کلریدریک و NaOH در محدوده ۷/۴ تنظیم شد. در نهایت زیر هود لامینار محیط کشت از فیلتر با منافذ ۰/۲ میکرونی عبور داده شد و در ظروف استریل در یخچال نگهداری شد. قبل از استفاده برای سلول‌ها، سرم جنین گاوی (FBS) به محیط کشت فوق به میزان ۱۰ درصد (۱ میلی لیتر به ازاء ۹ میلی لیتر محیط کشت) و آنتی بیوتیک (۱۰۰ ml/U) پنی سیلین و ۱۰۰ ml/μ استرپتومایسین) اضافه گردید.

سلول‌های رده فیبروبلاست لته ای انسان از تانک ازت خارج شده و در فلاسک ۷۵ سانتیمتر مربع (Nunc-دانمارک) حاوی محیط DMEM غنی شده با FBS و آنتی بیوتیک

مانند کلسیم هیدروکساید و بیشتر از MTA و همچنین زیست سازگاری بالا و سمیت سلولی کمی دارد.^(۷،۸)

یکی از معایب دو ماده ی فوق کارکردن سخت و قراردمی مشکل آنها در محل پرفوریشن، به خصوص پرفوراسیون های کانال می باشد.^(۸،۹)

به تازگی یک سیلر کانال ریشه بر پایه MTA (Endoseal MTA) برای بهبود خواص زیستی سیلرها ساخته شده است.^(۱۰) این سیلر به صورت ماده از پیش مخلوط شده و پر شده در یک سرنگ محفوظ از هوا است که اجازه مستقیم قراردادن آن به درون کانال را می‌دهد. هنگام تزریق رطوبت محیط را از هوا جذب می‌کند و بدون نیاز به مخلوط کردن پودر و مایع یا بیس و کاتالیست ست می‌شود.^(۱۰،۱۱) خواص آن با MTA قابل مقایسه است و از نظر زیست سازگاری از AHplus برتر است.^(۱۲،۱۳)

همانطور که گفته شد غیر سمی بودن ماده ترمیم کننده پرفوراسیون یکی از خواص مهم آن است و زیست سازگاری ناکافی ماده سیل کننده وقتی در تماس با بافت مجاور قرار می‌گیرد، به خصوص وقتی پرفوریشن بزرگ است، ایجاد مشکل می‌کند و پیش آگهی درمان را به خطر می‌اندازد.^(۱۴)

سازگاری بافتی ابتدا توسط مطالعات کشت سلولی و سپس در سطوح بالاتر توسط ایمپلنت های داخل استخوانی یا زیر مخاطی در حیوانات بررسی می‌شود.^(۳)

آزمون MTT، یک روش کالریمتریک جهت شمارش تعداد سلولهای زنده بر اساس فعالیت میتوکندری بوده و یک تست استاندارد جهت ارزیابی سمیت سلولی مواد می باشد.^(۱۵-۱۹)

با توجه به اینکه Endoseal MTA یک سیلر نسبتا جدید می‌باشد که کار کردن با آن (قابلیت تزریق با سرنگ) ساده تر است و سازندگان آن ادعا دارند که می‌توان از آن

از فلاسک کشت جدا کرده و پس از ارزیابی زنده بودن آن‌ها با تریپان بلو، به پلیت کشت منتقل کردیم. سپس پلیت را به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور تحت شرایط استاندارد ذکر شده در بالا قرار دادیم تا سلول‌ها به کف پلیت بچسبند. بعد از ۲۴ ساعت سلول‌ها با عصاره سیلرهای MTA، CEM و Endoseal MTA در رقت‌های ذکر شده به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. در پایان زمان مورد نظر، درصد زنده ماندن سلول‌ها با تست MTT (3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-Diphenyl-2H-tetrazolium bromide بررسی شد.

از آزمایشگاهی و استاندارد برای تعیین سمیت داروها و دیگر مواد است. هنگامی که رنگ MTT (زرد رنگ) به محیط سلول‌ها اضافه می‌شود، در سلول‌های زنده توسط آنزیم ردوکتاز موجود در میتوکندری‌ها به فورمازان (بنفش) احیا می‌شود. بنابراین شدت رنگ بنفش معیاری از تعداد سلول‌های زنده یا همان پروليفراسیون سلولی می‌باشد.

روش انجام تست MTT از این قرار بود که پس از پایان زمان مجاورت سلول‌ها با عصاره سیلر، به هر یک از چاهک‌های پلیت، ۲۰ ml از محلول MTT اضافه شد. سپس پلیت حاوی سلول‌ها به مدت ۲ ساعت در انکوباتور نگهداری شد. پس از این مدت، محیط کشت رویی سلول‌ها تخلیه و به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر دی متیل سولفوکساید (DMSO, Merk, Germany) اضافه شد تا رنگ فورمازان احیا شده را در خود حل نماید. سپس برای تعیین شدت رنگ حاصل، جذب نوری هر چاهک در طول موج ۵۴۵ نانومتر (با رفرنس ۶۳۰ نانومتر) توسط دستگاه ELISA reader (Awareness Technology Inc.) تعیین شد. درصد سلول‌های زنده از رابطه زیر محاسبه گردید:

$$100 \times (\text{میانگین جذب نوری چاهک های کنترل} /$$

$$\text{جذب نوری هر چاهک}) = \text{درصد سلولهای زنده}$$

کشت داده شد. سلول‌ها در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و ۵٪ CO₂ انکوبه شدند. محیط کشت آن‌ها هر سه روز تعویض گردید. پس از پر شدن کف فلاسک از سلول با انجام پاساژ، سلول‌ها به چند فلاسک توزیع شدند. محل تهیه سلول‌ها بانک سلولی مرکز انستیتو پاستور ایران بود.

جهت تهیه عصاره مواد، هر یک از مواد مورد نظر، طبق روش کارخانه آماده شدند و بلافاصله قبل از Set شدن، داخل چاهک‌های پلیت ۲۴ ول (قطر ۱۶/۲ میلی متر و ارتفاع ۲ میلی متر) قرار داده شدند (برای هر ماده ۱ چاهک). پس از استریل کردن توسط نور فرابنفش، به مدت ۷۲ ساعت در انکوباتور قرار داده شدند. سپس ۲/۵ میلی لیتر از محیط کشت DMEM حاوی آنتی بیوتیک ولی فاقد FBS به هر چاهک اضافه شد و پلیت مذکور سپس به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و ۵٪ CO₂ قرار داده شد. پس از این مدت محیط کشت روی هر ماده به لوله‌های آزمایش منتقل و به آن ۱۰٪ FBS اضافه شد. این عصاره به عنوان نمونه حاوی ماده با غلظت ۱/۱ در نظر گرفته شد. برای تهیه محیط کشت‌های حاوی غلظت‌های کمتری از ماده، نمونه ۱/۱ را به طور متوالی (Serial dilution) و با استفاده از محیط کشت DMEM حاوی آنتی بیوتیک و ۱۰٪ FBS رقیق نموده تا رقت‌های ۱/۲، ۱/۴، ۱/۸، از هر یک مواد به طور جداگانه تهیه شود.

جهت بررسی سمیت سلولی، سلول‌های رده فیبروبلاست لته ای انسان را از تانک ازت خارج و در فلاسک کشت ۷۵ cm² حاوی محیط کشت DMEM و غنی شده با سرم جنین گاوی و آنتی بیوتیک (Penicillin 100 U/ml Streptomycin 100 μg/ml) در دمای ۳۷ درجه و ۵٪ CO₂ انکوبه نمودیم. پس از انجام چند پاساژ سلولی و اطمینان از پروليفراسیون طبیعی آن‌ها، سلول‌ها را با تریپسین

داشت و پس از آن MTA و در نهایت Endoseal MTA بودند. به طور کلی سیلر CEM با رقت ۱/۸، بیشترین درصد حیات سلولی و سیلر Endoseal MTA با رقت ۱/۲، کمترین درصد حیات سلولی و بیشترین سمیت سلولی را دارا بود (نمودار ۱).

بر اساس نتایج آزمون Tukey و مقایسه میانگین درصد حیات سلولی سیلرها با یکدیگر، در رقت ۱/۲ بین درصد حیات سلولی سیلر CEM و Endoseal MTA و همچنین MTA و CEM ارتباط معنادار وجود داشت. در رقت ۱/۴ و ۱/۸ بین درصد حیات سلولی سیلرهای مختلف ارتباط معناداری یافت نشد (جدول ۲).

داده‌ها در SPSS 16 وارد شد و با استفاده از آنالیز واریانس آنالیز شدند. در صورت نرمال نبودن داده‌ها، از آزمون کروسکال والیس استفاده شد. همچنین جهت مقایسه بین دو گروه از تست توکی استفاده شد. مقادیر P کمتر از ۰/۰۵، معنادار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

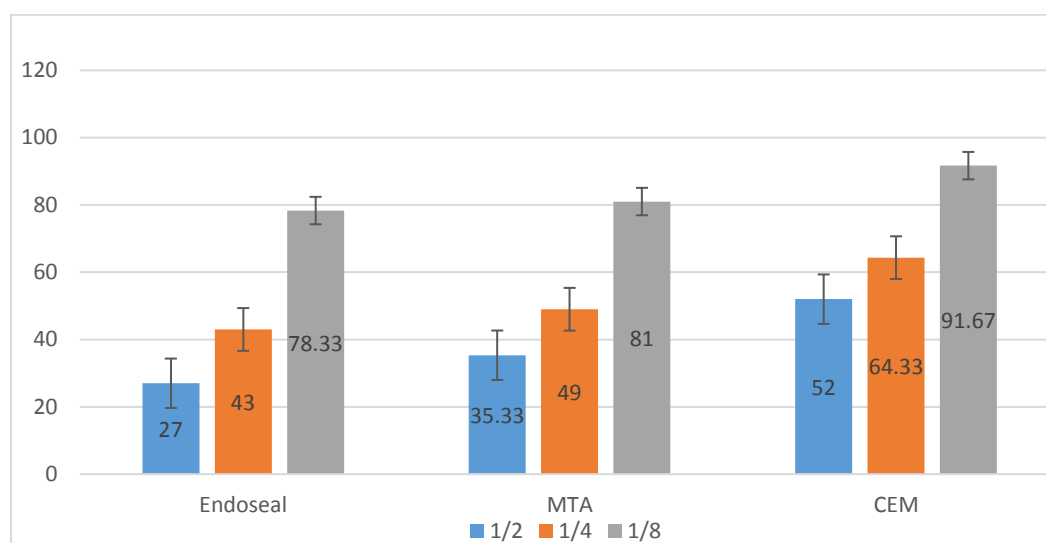
میانگین درصد حیات سلولی مواد مختلف در رقت‌های متفاوت در جدول ۱ آورده شده است. در مقایسه میان مواد مختلف در رقت ۱/۲، CEM بیشترین درصد حیات سلولی را داشت و پس از آن MTA و در نهایت Endoseal MTA بودند. در رقت ۱/۴ و ۱/۸ نیز مشابه رقت ۱/۲، CEM بیشترین درصد حیات سلولی را

جدول ۱: میانگین درصد حیات سلولی مواد در رقت‌های مختلف

رقت	MTA	CEM	Endoseal MTA	سطح معنی داری (آنالیز واریانس دو عاملی)	
				رقت	رقت × مواد
۱/۲	۳۵/۳۳	۵۲	۲۷	<۰/۰۰۱	<۰/۰۰۱
۱/۴	۴۹	۶۴/۳۳	۴۳		
۱/۸	۸۱	۹۱/۶۷	۷۸/۳۳		

جدول ۲: آزمون Tukey و مقایسه ارتباط سیلرهای مختلف با رقت‌های مشابه بصورت گروه‌های دوتایی

P-value	فاصله اطمینان ۹۵ درصد	اختلاف میانگین		
۰/۰۹۸۵	۳/۵۶ تا -۲۰/۲۳	-۸/۳۳	EndoSeal - MTA	رقت ۱/۲
۰/۰۳۴۳	-۴/۴۰ تا -۴۵/۶۰	-۲۵/۰۰	EndoSeal - CEM	
۰/۰۱۴۲	-۷/۹۴ تا -۲۵/۳۹	-۱۶/۶۷	MTA - CEM	
۰/۹۹۴۳	۷۹/۳۱ تا -۹۱/۳۱	۶/۰۰	EndoSeal - MTA	رقت ۱/۴
۰/۱۸۹۳	۲۲/۳۰ تا -۶۴/۹۷	-۲۱/۳۳	EndoSeal - CEM	
۰/۴۳۶۰	۳۷/۷۵ تا -۶۸/۴۲	-۱۵/۳۳	MTA - CEM	
۰/۹۹۷۷	۴۰/۹۷ تا -۴۶/۳۰	-۲/۶۷	EndoSeal - MTA	رقت ۱/۸
۰/۳۲۸۵	۲۴/۷۱ تا -۵۱/۳۷	-۱۳/۳۳	EndoSeal - CEM	
۰/۱۲۶۹	۶/۷۹ تا -۲۸/۱۲	-۱۰/۶۷	MTA - CEM	



نمودار ۱: نمودار مستطیلی میانگین درصد حیات سلولی سیلرهای مختلف با رقت های متفاوت

بحث

دستیابی به موفقیت بلند مدت در ترمیم پرفوریشن ها، به اندازه پرفوریشن، زمان سپری شده از وقوع آن، مهارت پزشک و همینطور به نوع ماده سیل کننده پرفوریشن بستگی دارد. مواد ترمیمی و سیل کننده ای که در تماس نزدیک با بافت سخت و ساختار پرپودنشیوم قرار می گیرند، باید زیست سازگار باشند و حداقل سمیت سلولی را دارا باشند، زیرا می توانند سبب واکنش های توکسیک شوند. در گذشته از مواد مختلفی مانند آمالگام، گوتاپرکا، زینک اکساید، گلس آینومر، کلسیم هیدروکساید و کامپوزیت در بستن پرفوریشن ها استفاده می شد. امروزه مواد جدیدتری مانند MTA، Biodentine، Biocerams و CEM جهت ترمیم پرفوریشن ها به بازار عرضه شده اند.^(۱)

MTA ماده Gold Standard در اندودانتیکس برای ترمیم پرفوریشن ها می باشد. CEM، یک بایومترال اندودانتیک هیدروفیلیک است. میتواند در محیط مرطوب ست شود و در نتیجه برای ترمیم پرفوراسیون ایده آل است. MTA و

CEM دو بایومترال ایده آل برای ترمیم پرفوراسیون ها می باشند.^(۲۰،۲۱) Endoseal MTA، سیلری متشکل از سیلیکات کلسیم، آلومینات کلسیم، سولفات کلسیم، ترکیبات رادیوپیک کننده، مواد قوام دهنده و کلسیم آلومینوفرایت از بیس MTA همراه با ویژگیهای بیولوژیکی و فیزیکی عالی MTA میباشد، که از قبل مخلوط و در یک سرنگ خالی از هوا نگهداری شده و در هنگام استفاده، بر رطوبت هوای محیط را جذب می نماید و ست می شود. بر طبق ادعای سازندگان این سیلر، بستن پرفوریشن یکی از کاربردهای آن میباشد.^(۲۵-۲۲) هدف از این مطالعه، ارزیابی سمیت سلولی سیلر نوظهور Endoseal MTA و مقایسه ی آن با MTA و CEM در رقت های مختلف بود.

در ارزیابی سمیت سلولی مواد اندودنتیک، از رده های سلولی متفاوتی از جمله فیبروبلاست های L۹۲۹ موش، رده سلولی استئوسارکومای انسانی،^(۲۱) فیبروبلاست های ۷۷۹، سلول های پروژنینتور گرانولوسیت-ماکروفاژ موش،^(۲۶) فیبروبلاست های لته انسانی^(۲۷) و فیبروبلاست های لیگامنت

مورد استفاده و تازه یا سفت بودن آن بستگی دارد؛ هم چنین در تعداد زیادی از مطالعات آزمایشگاهی انجام شده بر روی سیلرها، نتایج بسیار متفاوتی گزارش شده است. به همین دلیل مقایسه ی نتایج، مشکل و یا حتی غیرممکن می باشد زیرا همان گونه که بیان شد متغیرهای زیادی در ارزیابی اثر سمیت سلولی نقش ایفا می کنند. (۳۵ و ۳۱)

در مطالعه ی حاضر بعد از ۲۴ ساعت مجاورت عصاره مواد با سلول های فیبروبلاست لثه ای، CEM در رقت ۱/۲ از MTA و Endoseal MTA با رقت های مشابه، حیات سلولی بالاتری داشت. در سایر رقت ها تفاوت معناداری بین هیچ کدام از مواد دیده نشد.

به طور مشابه، ترشابی و همکاران^(۳۶) سمیت سلولی MTA، CEM و MTA Angelus را بر روی سلول های فیبروبلاست لثه ای انسان و بدون رقیق سازی متوالی که در مطالعه ی ما انجام شد، بررسی کردند و بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون، سمیت MTA از CEM بیشتر گزارش شد.

نقوی و همکاران^(۳۷) سمیت سلولی و سمیت ژنی MTA و CEM را در غلظت های مختلف بر روی فیبروبلاست های L929 موش بررسی کردند و جز در بالاترین غلظت (۱۰۰۰ μg/mL) که CEM سمیت کمتری داشت، در سایر غلظت ها تفاوت معناداری مشاهده نشد. در مطالعه ی ما، CEM در رقت ۱/۲ حیات سلولی بالاتری از MTA در این رقت داشت. یک علت اصلی تفاوت می تواند نوع سلول های مورد بررسی باشد.

امیدی و همکاران^(۳۸) سمیت سلولی TheraCal، MTA، Angelus، CEM و Biodentine را بر روی سلول های بنیادی پالپ دندانی انسانی در فواصل ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت با رقت های ۱/۱، ۱/۲، ۱/۴، ۱/۸، ۱/۱۶ و ۱/۳۲ بررسی نمودند. در فاصله ی ۲۴ ساعت، تفاوت معناداری بین سمیت CEM و MTA Angelus دیده نشد. این تفاوت

پریودنتال استفاده می شود. در مطالعه حاضر، جهت بررسی سمیت سلولی به صورت آزمایشگاهی از فیبروبلاست های لثه ای انسان استفاده شد که در پرفوراسیون های ناحیه تاجی بیشترین سلولهای موجود در محیط هستند.^(۲۸)

آزمون MTT، روش کالوریمتریک جهت شمارش تعداد سلول های زنده بر اساس فعالیت میتوکندری می باشد. در سلول های زنده حلقه متیل تترازولیوم، در اثر دهیدروژنز میتوکندری به فورامازون تبدیل می شود که بنفش رنگ می باشد و بوسیله اسپکتروفوتومتر اندازه گیری می شود.^(۱۶) آزمون MTT تعداد سلول های زنده را در هر مرحله از سیکل رشدی آنها نشان می دهد. از آنجا که سلول های مرده نمی توانند فورامازان رنگی تولید کنند، این تست می تواند بین سلول های زنده و مرده تمایز قایل شود. به همین جهت MTT یک تست استاندارد جهت ارزیابی سمیت سلولی مواد می باشد.^(۱۸)

یک ماده جدید به منظور استفاده کلینیکی باید همیشه توسط تست های سازگاری بافتی مورد ارزیابی قرار بگیرد. سازگاری بافتی ابتدا توسط مطالعات کشت سلولی و سپس در سطوح بالاتر توسط ایمپلنت های داخل استخوانی یا زیر مخاطی در حیوانات بررسی می شود.^(۲۹) جهت بررسی سمیت سلولی مواد در اندودانتیک، برخی از مطالعات (Ashraf و همکاران^(۱۵) یا Bracket و همکاران^(۳۰)) مواد را مستقیماً در مجاورت سلول قرار می دهند. اما در برخی مطالعات عصاره سیلر را با محیط کشت سلولی مخلوط کرده و اثر آن را بررسی می کنند.^(۳۱-۳۳) قرار دادن مستقیم سیلر در ظرف کشت، موجب آسیب فیزیکی به سلول ها می شود و احتمال آلودگی میکروبی را در محیط کشت بالا می برد. بنابراین در این مطالعه از روش دوم (تهیه عصاره سیلر) استفاده شد. میزان سمیت سلولی سیلرها به متغیرهای زیادی هم چون غلظت، زمان مورد آزمایش، نوع تست، سلول

طبق مطالعه ی Seo و همکاران^(۴۰) سمیت سلولی Endoseal MTA از AH plus روی سلول های بنیادی پالپ دندان انسان به طور معناداری کمتر بود و نسبت به سایر سیلرهای مورد بررسی از جمله Endosequence BC sealer و BioRoot RCS تفاوت معناداری نداشت.

طبق مطالعه Marins و همکاران^(۴۱) سمیت سلولی سیلر Endoseal MTA در رقت ۱/۲، مشابه MTA Fillapex و بیشتر از سیلر AH plus بود. اما در رقت های ۱/۴ و ۱/۸ تفاوت معناداری بین سیلر Endoseal MTA و AH plus وجود نداشت؛ در حالیکه نسبت به سیلر MTA Fillapex بقای سلولی بیشتری داشت. در این مطالعه هم مشابه مطالعه ما مشخص شد که بقای سلولی مواد وابسته به دوز میباشد. López-García و همکاران^(۴۲) مطالعه ای در رابطه با سیتوتوکسیسیته، بیواکتیویته و آزاد سازی یون توسط سیلرهای کلسیم سیلیکاتی بر روی سلول های لیگامان پریدنتال انسان به روش MTT wound healing and assay انجام دادند. نتیجه مطالعه نشان داد که سیلر های Endosequence BC و Ceraseal میزان بیشتری از بقای سلولی، جسبندگی سلولی و آزادسازی یونی نسبت به سیلر Endoseal MTA دارند.

زیست سازگاری سمان های بر پایه کلسیم سیلیکات، مربوط به آزادسازی یون های کلسیم طی ست شدن و تشکیل هیدروکسی آپاتایت توسط پیوند کلسیم و فسفر است.^(۳۲) CEM نه تنها شامل ترکیبات کلسیمی مثل کلسیم سیلیکات، کلسیم اکساید، کلسیم فسفات، کلسیم کربنات، کلسیم سولفات و کلسیم کلراید می باشد^(۴۳) بلکه تمایز سلولی برای تشکیل بافت سخت را هم القا می کند.^(۴۴) به علاوه از وقتی اجزای رادیواپسیفایر به میزان زیادی در بافت های کناری مواد پوشش دهنده یافت شدند، زیست سازگاری آن ها نیز مورد توجه و اهمیت قرار گرفت^(۴۳)

می تواند مربوط به تفاوت در نوع سلول، نوع MTA و روش کار مورد استفاده باشد.

مطالعه صابری و همکاران^(۷) بر روی سمیت MTA، CEM، Biodentine و Octacalcium phosphate نشان داد که سمیت این چهار نوع ماده بر روی سلول های بنیادی پاپیلای اپیکال انسانی، تفاوت معناداری با گروه کنترل پس از ۲۴، ۴۸ و ۱۶۸ ساعت نداشت. سمیت MTA و CEM به طور معناداری پس از ۱۶۸ ساعت با یکدیگر متفاوت بود، به طوریکه سمیت CEM کمتر از MTA بود. ولی در مطالعه ما، پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون، تفاوت معناداری بین سمیت MTA و CEM مشاهده گردید و مشابه با این مطالعه سمیت CEM از MTA کمتر بود.

در مطالعه ی Lim و همکاران^(۳۲) که سمیت Endoseal MTA را با MTA و AH plus بر روی سلول های MC3T3-E1 مقایسه کردند، Endoseal MTA از AH plus سمیت کمتر اما از MTA سمیت بیشتری داشت. در مطالعه ی ما، بین این دو در رقت های مختلف، تفاوت معناداری وجود نداشت. علت تفاوت میتواند استفاده از سیلرها به صورت خالص (بدون رقیق سازی)، تفاوت نوع سلول و برند MTA مورد استفاده باشد.

Lee و همکاران^(۳۹) در مطالعه ی خود سمیت سلولی دو گروه سیلرهای بر پایه ی کلسیم سیلیکات شامل Endoseal MTA، Nano-ceramic Sealer، Wellroot ST و سیلرهای بر پایه ی اپوکسی رزین شامل AH-Plus و AD Seal را بر روی سلول های بنیادی لیگامان پریدنتال انسانی (hPDLSCs) بررسی و بدون رقیق سازی صرفا در فواصل زمانی یک، سه و هفت روز حیات سلولی را ارزیابی کردند. سیلرهای بر پایه ی کلسیم سیلیکات سمیت کمتری داشتند و Endoseal MTA تفاوت معناداری با سایر سیلرهای همگروه خود نشان نداد.

مقایسه با سایر سیلرها سمیت کمتر یا قابل مقایسه ای دارد^(۴۹) در مقایسه با مواد دیگری که پرکننده ی پرفوریشن هستند، در رقت های بالاتر تفاوت معنادار ندارد و قابل استفاده است. هرچند تعداد مطالعاتی که سازگاری زیستی این سیلر را با بیومتریال های پرکننده پرفوریشن، مقایسه می کنند، اندک بوده و نیاز به مطالعات بیشتر می باشد. همینطور سایر خواص سیلر Endoseal MTA، مثل میزان ریزش نیز باید مورد مقایسه قرار گیرد.

نتیجه گیری

بر طبق نتایج این مطالعه، سیلر Endoseal MTA در غلظت ۱/۲، اگرچه نسبت به CEM سمی تر است اما نسبت به سمان MTA سازگاری زیستی قابل مقایسه ای دارد و با توجه به سایر خواص مناسب به خصوص کاربرد راحت تر نسبت به CEM و MTA، می تواند به عنوان ماده پرکننده پرفوراسیون در نظر گرفته شود.

تشکر و قدردانی

این مقاله بر اساس پایان نامه دانشجویی به شماره ی ۳۶۱ و کد اخلاق IR.MAZUMS.REC.1398.6986، با حمایت دانشگاه علوم پزشکی مازندران و همکاری جناب آقای دکتر شکرزاده و سرکار خانم دکتر متفقی، اجرا و نوشته شده است.

MTA و Biodentine به ترتیب حاوی زیرکونیوم اکساید و بیسموت اکساید به عنوان رادیوپاسیفایر، با سمیت های متفاوت، هستند.^(۴۵و۴۶) اما در CEM هیچ یک از این اجزا وجود ندارد و حتی برخلاف MTA باعث نکروز اولیه در بافت نمی شود.^(۴۷و۴۸)

سیلرهای برپایه ی کلسیم سیلیکات مانند MTA، واکنش های التهابی کمتری نسبت به سایر سیلر ها ایجاد کرده و نیز از نظر چسبندگی سلولی بهتر از سیلری مانند AH Plus عمل میکنند^(۴۹و۵۰) به AH Plus به دلیل آزادسازی فرمالدئید و یا آمین و اپوکسی رزین در ترکیباتش سمیت بیشتری دارد.^(۱۰) MTA و سیلرهای بر پایه ی آن، وقتی در تماس با بافت قرار می گیرند، کلسیم هیدروکساید تولید می کنند که باعث افزایش pH و در نتیجه تشکیل بافت سخت شده و همچنین در بافت های اطراف باعث اختلال در فعالیت استئوکلاست ها و التیام بهتر می شوند.^(۲۲)

در هر صورت سیلر Endoseal MTA نسبت به سایر بیومتریال های پرکننده ی پرفوریشن، یون کلسیم کمتری آزاد می کند، پروفوراسیون سلولی پایین تری دارد و به دلیل خشونت سطحی بیشتر، چسبندگی سلولی کمتری دارد.^(۵۱و۳۹و۵۰و۲۵) همچنین عموماً Endoseal MTA در

منابع

- Hegde M, Varghese L, Malhotra S. Tooth root perforation repair—A review. *Oral Health Dent Manag* 2017; 16(2):1-4.
- Kakani AK, Veeramachaneni C, Majeti C, Tummala M, Khiyani L. A review on perforation repair materials. *J Clin Diagn Res* 2015; 9(9):9-13.
- Subay RK, Subay MO, Tuzcu SB. Endodontic management of root perforating internal replacement resorption. *Eur J Dent* 2018; 12(3):450-3.
- Parirokh M, Torabinejad M, Dummer PMH. Mineral trioxide aggregate and other bioactive endodontic cements: an updated overview - part I: vital pulp therapy. *Int Endod J* 2018; 51(2):177-205.
- Utneja S, Nawal RR, Talwar S, Verma M. Current perspectives of bio-ceramic technology in endodontics: calcium enriched mixture cement-review of its composition, properties and applications. *Restor Dent Endod* 2015; 40(1):1-13.
- Ayatollahi F, Tabrizzadeh M, Baqdad Abad MH, Ayatollahi R, Zarebidoki F. Comparison of microleakage of MTA and CEM cement apical plugs in three different media. *Iran Endod J* 2016; 11(3):198-201.

7. Saberi EA, Karkehabadi H, Mollashahi NF. Cytotoxicity of Various Endodontic Materials on Stem Cells of Human Apical Papilla. *Iran Endod J* 2016; 11(1):17-22.
8. Milani AS, Shakouie S, Borna Z, Sighari Deljavan A, Asghari Jafarabadi M, Pournaghi Azar F. Evaluating the Effect of Resection on the Sealing Ability of MTA and CEM Cement. *Iran Endod J* 2012; 7(3):134-8.
9. Khatib M, Swapna DV, Aswathanarayana R, Das P, Nadig R. Comparison of the sealing ability of Endocem mineral trioxide aggregate and Endoseal mineral trioxide aggregate as a furcal perforation repair material under the operating microscope: An in-vitro study. *Endodontology* 2019;31(1):25-8.
10. Young Kim RJ, Hee Shin J. Cytotoxicity of a novel mineral trioxide aggregated based root canal sealer. *Dent Mater J* 2014; 33(3):313-8.
11. Hwang JH, Chung J, Na HS, Park E, Kwak S, Kim HC. Comparison of bacterial leakage resistance of various root canal filling materials and methods: Confocal laser-scanning microscope study. *Scanning* 2015; 37(6):422-8.
12. Lee DS, Lim MJ, Choi Y, Rosa V, Hong CU, Min KS. Tooth discoloration induced by a novel mineral trioxide aggregate-based root canal sealer. *Eur J Dent* 2016; 10(3):403-7.
13. Saad AY. Physicochemical, cytotoxicity, and biological properties of calcium silicate-based root canal sealers: A literature review. *Saudi Endod J* 2020; 10(3):173-80.
14. Mente J, Hage N, Pfefferle T, Koch MJ, Geletneký B, Dreyhaupt J, et al. Treatment outcome of mineral trioxide aggregate: repair of root perforations. *J Endod* 2010; 36(2):208-13.
15. Ashraf H, Taherian A, Kerdar AN. Evaluation of cytotoxicity of two root canal filling materials by MTT assay. *Aust Endod J* 2010; 36(1):24-8.
16. AlAnezi AZ, Jiang J, Safavi KE, Spangberg LS, Zhu Q. Cytotoxicity evaluation of endosequence root repair material. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2010; 109(3):122-5.
17. Karapınar-Kazandağ M, Bayrak Ö, Yalvaç ME, Ersev H, Tanalp J, Sahin F, et al. Cytotoxicity of 5 endodontic sealers on L929 cell line and human dental pulp cells. *Int Endod J* 2011; 44(7):626-34.
18. Pintor AVB, Queiroz LD, Barcelos R, Primo LSG, Maia LC, Alves GG. MTT versus other cell viability assays to evaluate the biocompatibility of root canal filling materials: a systematic review. *Int Endod J* 2020; 53(10):1348-73.
19. Rahmani M, Mahabadi M, Goharifar A. Evaluation of the Biocompatibility of Base Metal and Noble Alloys on Human Gingival Fibroblast. *J Mashhad Dent Sch* 2020; 44(2):138-48.
20. Haghgoo R, Arfa S, Asgary S. Microleakage of CEM cement and ProRoot MTA as furcal perforation repair materials in primary teeth. *Iran Endod J* 2013; 8(4):187-90.
21. Modareszadeh MR, Di Fiore PM, Tipton DA, Salamat N. Cytotoxicity and alkaline phosphatase activity evaluation of endosequence root repair material. *J Endod* 2012; 38(8):1101-5.
22. Lim ES, Park YB, Kwon YS, Shon WJ, Lee KW, Min KS. Physical properties and biocompatibility of an injectable calcium-silicate-based root canal sealer: in vitro and in vivo study. *BMC Oral Health* 2015; 15(1):1-7.
23. Nogueira Leal Silva EJ, Carvalho NK, Prado MC, Zanon M, Senna PM, Souza EM, et al. Push-out bond strength of injectable pozzolan-based root canal sealer. *J Endod* 2016; 42(11):1656-9.
24. Rehan AK. Biocompatibility and osteogenic potential of the new bioceramic endodontic material "EndoSeal MTA". *Egypt Dent J* 2019; 65(2):1577-83.
25. López-García S, Myong-Hyun B, Lozano A, García-Bernal D, Forner L, Llena C, et al. Cytocompatibility, bioactivity potential, and ion release of three premixed calcium silicate-based sealers. *Clin Oral Investig* 2020; 24(5):1749-59.
26. Souza N, Justo G, Oliveira C, Haun M, Bincoletto C. Cytotoxicity of materials used in perforation repair tested using the V79 fibroblast cell line and the granulocyte-macrophage progenitor cells. *Int Endod J* 2006; 39(1):40-7.
27. Mandal P, Zhao J, Sah SK, Huang Y, Liu J. In vitro cytotoxicity of guttaflow 2 on human gingival fibroblasts. *J Endod* 2014; 40(8):1156-9.
28. Yan P, Yuan Z, Jiang H, Peng B, Bian Z. Effect of bioaggregate on differentiation of human periodontal ligament fibroblasts. *Int Endod J* 2010; 43(12):1116-21.
29. Torabinejad M, Parirokh M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review—part II: leakage and biocompatibility investigations. *J Endod* 2010; 36(2):190-202.
30. Brackett MG, Marshall A, Lockwood PE, Lewis JB, Messer RL, Bouillaguet S, et al. Cytotoxicity of endodontic materials over 6-weeks ex vivo. *Int Endod J* 2008; 41(12):1072-8.

31. Bin CV, Valera MC, Camargo SE, Rabelo SB, Silva GO, Balducci I, et al. Cytotoxicity and genotoxicity of root canal sealers based on mineral trioxide aggregate. *J Endod* 2012; 38(4):495-500.
32. Omidi S, Bagheri M, Fazli M, Ahmadiankia N. Effects of Two Calcium Silicate Cements on Transforming Growth Factor- β 1 Secretion from Human Dental Pulp Stem Cells. *Iran Endod J* 2018; 13(4):522-7.
33. Javidi M, Zarei M, Omidi S, Ghorbani A, Gharechahi M, Shayani Rad M. Cytotoxicity of a New Nano Zinc-Oxide Eugenol Sealer on Murine Fibroblasts. *Iran Endod J* 2015; 10(4):231-5.
34. Chang MC, Lin LD, Chen YJ, Tsai YL, Cheng YA, Kuo CS, et al. Comparative cytotoxicity of five root canal sealers on cultured human periodontal ligament fibroblasts. *Int Endod J* 2010; 43(3):251-7.
35. Silva E, Accorsi-Mendonça T, Almeida J, Ferraz C, Gomes B, Zaia A. Evaluation of cytotoxicity and up-regulation of gelatinases in human fibroblast cells by four root canal sealers. *Int Endod J* 2012; 45(1):49-56.
36. Torshabi M, Amid R, Kadkhodazadeh M, Shahrabaki SE, Tabatabaei FS. Cytotoxicity of two available mineral trioxide aggregate cements and a new formulation on human gingival fibroblasts. *J Conserv Dent* 2016; 19(6):522-6.
37. Naghavi N, Ghodousi J, Sadeghnia HR, Asadpour E, Asgary S. Genotoxicity and cytotoxicity of mineral trioxide aggregate and calcium enriched mixture cements on L929 mouse fibroblast cells. *Dent Mater J* 2014; 33(1):64-9.
38. Omidi S, Bagheri M, Fazli M, Ahmadiankia N. The effect of different pulp-capping materials on proliferation, migration and cytokine secretion of human dental pulp stem cells. *Iran J Basic Med Sci* 2020; 23(6):768-75.
39. Lee JK, Kim S, Lee S, Kim HC, Kim E. In vitro comparison of biocompatibility of calcium silicate-based root canal sealers. *Materials* 2019; 12(15):1-12.
40. Seo DG, Lee D, Kim YM, Song D, Kim SY. Biocompatibility and mineralization activity of three calcium silicate-based root canal sealers compared to conventional resin-based sealer in human dental pulp stem cells. *Materials* 2019; 12(15):1-12.
41. Marins FC, Ronconi CT, Medeiros Saavedra F, Machado Lima AB, Augusto Zaia A, Lima Moreira EJ, et al. Cytotoxicity evaluation of two MTA-based root canal sealers: an in vitro study. *Rev Bras Odontol* 2017;74(1):27-30.
42. López-García S, Myong-Hyun B, Lozano A, García-Bernal D, Forner L, Llena C, et al. Cytocompatibility, bioactivity potential, and ion release of three premixed calcium silicate-based sealers. *Clinical oral investigations* 2020;24(5):1749-59.
43. Küçükaya S, Görduysus MÖ, Zeybek ND, Müftüoğlu SF. In vitro cytotoxicity of calcium silicate-based endodontic cement as root-end filling materials. *Scientifica* 2016; 2016:1-5.
44. Pornamazeh T, Yadegari Z, Ghasemi A, Sheykh-al-Eslamian SM, Shojaeian S. In vitro cytotoxicity and setting time assessment of calcium-enriched mixture cement, retro mineral trioxide aggregate and mineral trioxide aggregate. *Iran Endod J* 2017; 12(4):488-92.
45. Gomes Cornélio AL, Salles LP, da Paz MC, Cirelli JA, Guerreiro-Tanomaru JM, Tanomaru Filho M. Cytotoxicity of Portland cement with different radiopacifying agents: a cell death study. *J Endod* 2011; 37(2):203-10.
46. Silva GF, Bosso R, Ferino RV, Tanomaru-Filho M, Bernardi MI, Guerreiro-Tanomaru JM, et al. Microparticulated and nanoparticulated zirconium oxide added to calcium silicate cement: evaluation of physicochemical and biological properties. *J Biomed Mater Res A* 2014; 102(12):4336-45.
47. Mozayani MA, Milani AS, Marvasti LA, Asgary S. Cytotoxicity of calcium enriched mixture cement compared with mineral trioxide aggregate and intermediate restorative material. *Aust Endod J* 2012; 38(2):70-5.
48. Ghasemi N, Rahimi S, Lotfi M, Solaimanirad J, Shahi S, Shafaie H, et al. Effect of mineral trioxide aggregate, calcium-enriched mixture cement and mineral trioxide aggregate with disodium hydrogen phosphate on BMP-2 production. *Iran Endod J* 2014; 9(3):220-4.
49. Lim M, Jung C, Shin DH, Cho YB, Song M. Calcium silicate-based root canal sealers: a literature review. *Restor Dent Endod* 2020; 45(3):1-17.
50. Collado-González M, García-Bernal D, Oñate-Sánchez RE, Ortolani-Seltenerich PS, Lozano A, Forner L, et al. Biocompatibility of three new calcium silicate-based endodontic sealers on human periodontal ligament stem cells. *Int Endod J* 2017; 50(9):875-84.
51. Benezra MK, Wismayer PS, Camilleri J. Influence of environment on testing of hydraulic sealers. *Sci Rep* 2017; 7(1):1-11.