دانشور پزشکی

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

بررسی سمیّت 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، مدیرگروه دپارتمان 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 ی دندانپزشکی دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران.

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

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

*نویسنده مسئول:رویا حامدی **Email:hhamedi@shahed.ac.ir**

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

چکیده

مقدمه و هدف: هیدروکسی آپاتیت$Ca10(PO4)6(OH)2)HA$ یکی از مهمترین بیوسرامیک‌ها برای کاربردهای پزشکی و دندانپزشکی است؛ ولی حلالیت پایین ذرات به کاهش اثر آن در ساخت استخوان (osteoconductivity) منجر شده است و درنتیجه، ذرات نانو هیدروکسی آپاتیت (Nano-HA) با داشتن سطح تماس بیشتر وحلالیت بالاتر نسبت‌بهHAمعمولی، مورد توجه بسیاری ازمحققان به‌عنوان یک پیوند موثر و جدید استخوانی واقع شده‌است؛ اما مطالعات متعددی تناقض‌هایی را در زمینه ی سازگاری زیستی این ذرات نشان دادند. هدف از مطالعه حاضر بررسی سمیّت سلولی (Cytotoxicity) ذرات نانوهیدروکسی آپاتیت روی سلول‌های فیبروبلاست رده ی L929 است.

مواد وروش‌ها: این مطالعه به‌صورت تجربی انجام‌گرفت.پس از استریل نمودن ذرات Nano-HA آن را با غلظت‌های ۸۰۰۰، ۴۰۰۰، ۲۰۰۰، ۱۰۰۰، ۵۰۰، ۲۵۰، ۱۲۵، ۶۵، ۳۲، ۷۵، ۱۵ ppm (Parts Per Million)تهیه‌کرده 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 سمیّت سلولی نسبت‌به گروه کنترل در هر غلظت و زمان محاسبه شد و داده‌های حاصل با تست ANOVA آنالیزشد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که با افزایش غلظت و گذشت زمان فعالیت حیاتی سلول‌ها کاهش یافته‌است؛ ولی این کاهش از لحاظ آماری معنی دار نبود($P>0.05$).

نتیجه‌گیری: نتایج عدم خاصیت سمیّت سلولی ذرات Nano-HA را در مجاورت با سلول‌های فیبروبلاست رده L929 نشان داد.

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

مقدمه

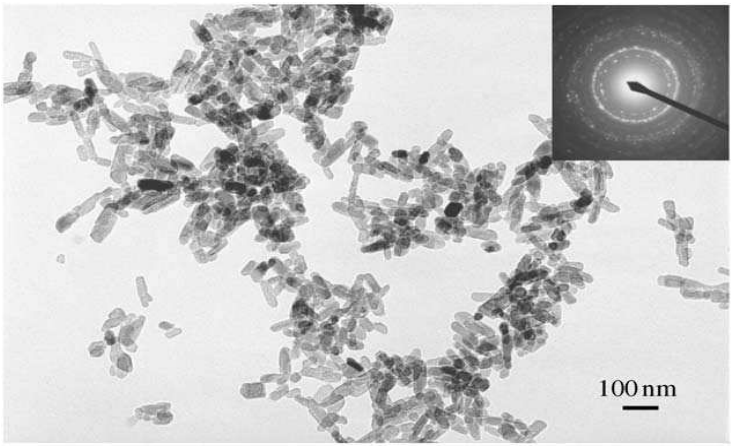
هیدروکسی آپاتیت WA (Ca10(PO4)6(OH)2) یک ماده زیستی مهم و جزء اصلی بخش معدنی استخوان بودندان است (۳-۱) که به دلیل داشتن قرابت شیمیایی و بیولوژیکی با ساختمان استخوان و دندان به‌عنوان یکی از مهم‌ترین بیوسرامیک‌ها برای کاربردهای پزشکی و دندانپزشکی به‌خصوص، در زمینه جایگزینی بافت استخوانی مطرح است (۸-٤) اما پروسه ساخت آن به دما و فشاری بالا نیاز دارد که به کاهش تخلخل و افزایش دانسیته آن منجرشده و درنتیجه به کاهش حلالیت این ماده در محیط و کاهش اثر ذرات در تحریک ساخت استخوان (osteocoductivity) می‌انجامد (۹) و درحقیقت بیشتر به‌عنوان 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 وکارایی بالاتری نسبت‌بهHA دارند[۱۹] و تحقیقاتی فراوان در زمینه استفاده از ذرات Nano-HA در درمان ضایعات استخوانی پریودنتال (۵)، افزایش osteointegration در ایمپلنت‌ها (۷)، ترمیم سوراخ دندانی (۸)، افزایش ترمیم نقایص استخوانی در ارتوپدی (۹) و همچنین سیستم های انتقال دارو و واکسن صورت‌گرفته است (۱۰)؛ اما از آنجا که برای معرفی یک ماده وکاربرد آن در کلینیک، در درجه اول به ارزیابی سمیت این مواد در محیطin vitro نیاز است (۲۲-۲۰)، مطالعاتی متعدد، روی سازگاری زیستی (Biocompatibility) این ماده صورت‌گرفته است ولی نتایج حاصل از این مطالعات تناقض‌هایی را دراین زمینه نشان‌می‌دهد (۱۵-۱۱) برای بررسی این تناقضات مطالعات بیشترو دقیق تر ضروری به‌نظرمی‌رسد؛ بنابراین در این مطالعه از سلول‌های فیبروبلاست L۹۲۹ استفاده‌شد که از پرکاربردترین رده‌های سلولی نامیرا برای ارزیابی سمیّت سلولی (Cytotoxicity) است که به علت ثبات نسبی خصوصیات سلول‌ها در نسل‌های مختلف باعث بالا رفتن اعتبار و تکرارپذیری نتایج نسبت‌به 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 (۱٦). در مطالعه حاضر اثر سمیت سلولی پارتیکل‌های Nano-HA (با ابعاد زیر ۱۰۰ nm و میله‌ای شکل) روی سلول‌های فیبروبلاست رده L929 مورد بررسی قرارگرفت تا در صورت توکسیک نبودن، این بیومتریال به‌عنوان یکی از جایگزین‌های موثر بافت استخوانی مورد استفاده قرار گیرد.

مواد وروش‌ها

مطالعه به روش تجربی (Experimental) و در دانشگاه شهید بهشتی و شاهد درسال۸۹ و۹۰ به‌منظور تعیین سایتوتوکسیسیته ذرات نانوهیدروکسی آپاتیت روی سلول‌های فیبروبلاست رده L۹۲۹ انجام‌گرفت.

۱-تهیه و استریل‌کردن ذراتNano-HA

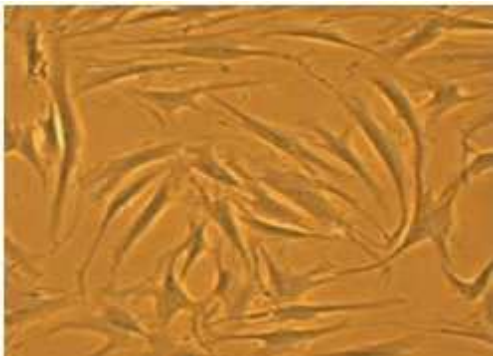
در این مطالعه از ذرات میله ای شکل Nano-HA با ابعاد زیر ۱۰۰ nm (تصویر ۱) با خلوص ۹۹درصد ساخت شرکت آلمانی NANOSHEL(Batch No#20090621) استفاده‌شد. با استفاده از نور ماورای بنفش به مدت ۲٤ساعت، پارتیکل‌های Nano-HA استریل شد.



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

۲- کشت سلول‌های فیبروبلاست رده ی L929

کرایوتیوب سلولی تهیه‌شده از انسیستوپاستور ایران دربرگیرنده‌ی سلول‌های فیبروبلاست رده سلولی L929 موش پس از خارج‌شدن از وضعیت منجمد، درفلاسکهای مخصوص کشت سلولی کشت داده‌شدند (تصویر۲). برای کشت این سلول‌ها از محیط کشت DMEM (Grand Island، NY) همراه ۱۰۰ واحد بین المللی در میلی‌لیتر از آنتی بیوتیک پنی سیلین(Sigma USA) ، و ۱۰۰ میکرو گرم در میلی‌لیتر استرپتومایسین (Sigma USA)، استفاده‌شد. علاوه‌بر محیط کشت، به‌منظور غنی‌سازی محیط FBS (Fetal Bovin Serum) (GIBCO USA)، به میزان۱۰درصد به محیط کشت اضافه شد که در این حالت به آن محیط کشت کامل یا Complete Media گفته‌می‌شود؛ سپس این سلول‌ها در شرایط آزمایشگاهی شامل دمای ۳۷°C، CO2 به میزان ۵درصد و رطوبت ۹۸درصد تکثیر شدند و پس از چهار بار پاساژ دادن آنها با استفاده از Trypsin-EDTA تعداد کافی از آنها برای انجام آزمایش فراهم‌شد. سلول‌ها توسط لام هموسیتومتر (نئوبار) شمارش شدند و با استفاده از رنگ تریپان بلو در صد سلول‌های زنده بیش از ۹۵درصد تعیین شد. پس از آن تعداد۱۰۰۰۰۰سلول به‌صورت یک لایه (monolayer) درون هر چاهک از پلیت‌های ۹۶ خانه ای مخصوص کشت سلولی قرار داده‌شد. برای هریک از غلظت‌های مواد مورد آزمایش، حداقل سه چاهک از چهار پلیت (برای زمانهای مختلف ۲، ۲٤، ٤۸ و ۷۲ ساعت) اختصاصداده‌شد؛ سه چاهک نیز برای گروه کنترل اختصاص داده‌شد.



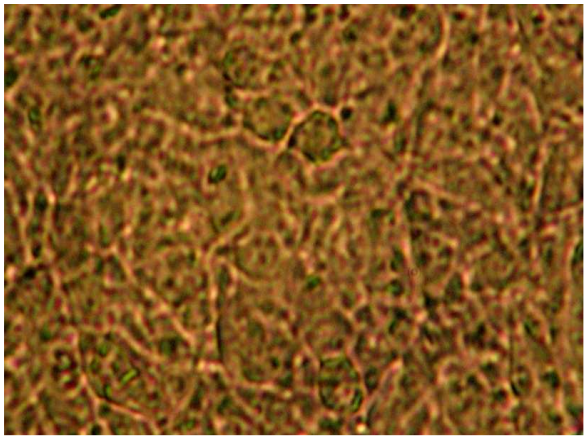
شکل ۱ - سلول‌های فیبروبلاست رده ی L929 کشت داده‌شده در فلاسک بزرگنمایی (200 میکروسکوپ نوری)

۳- قرارگیری ذراتNano-HA در مجاورت سلول‌های فیبروبلاست رده ی L929

پس از ۲٤ ساعت از کشت ۱۰۰۰۰ سلول در هر چاهک پلیتهای کشت ۹٦ خانه ای، محیط کشت رویی سلول‌ها تخلیه شد؛ سپس ذراتNano-HA با غلظت‌های ۵,۷۵، ۳۲، ٦۵، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰،۲۰۰۰، ٤۰۰۰،۸۰۰۰(ppm (Part Per Million در چاهک‌های پلیت 96 خانه روی سلول‌ها اثر داده‌شد و در سه چاهک کنترل محیط کشت کامل به‌عنوان یک ماده ۱۰۰درصد بدون خاصت سم سلولی ریخته شد.

۴-ارزیابی میزان حیات سلول‌های فیبروبلاست رده‌ی L929

و ایتالیتی سلول‌ها در زمانهای ۲، ۲٤، ٤۸ و ۷۲ ساعت پس از مجاورت با ذرات با استفاده از تست MTT مورد سنجش قرارگرفت.به این ترتیب که بعد از گذشت زمانهای موردنظر، محیط‌های کشت سلولی را از انکوباتور (فشار CO2 ۵درصد، رطوبت ۹۸درصد، دمای ۳۷ درجه) خارج‌کرده، یک دهم حجم رویی سلول‌ها به هر چاهک محلول 5-2 (Dimethylthiazol-2yl diphenyl tetrazolium bromide)MTTاضافه شد و پلیت به مدت ٤ 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 فورامازون تبدیل کنند. پس از سپری‌شدن ٤ ساعت، پلیت را بیرون آورده، با کشیدن محیط روئی به چاهک‌ها ایزوپروپانل اسیدی اضافه گشته تا کریستال‌های بنفش رنگ فومارازون ایجاد شده در سلول‌هایی که زنده مانده اند (شکل ۱)، حل شده و مایع رنگی یکنواختی ایجادشود. این مایع رنگی را به چاهک‌های یک پلیت الایزا منتقل و جذب آن با استفاده از دستگاه ELISA READERدر طول موج nm ۵۷۰ با فیلتر رفرانس ٦۲۰ نانومتر خوانده شد. درصد حیات سلولی از تقسیم میانگین میزان جذب غلظت مورد نظر به میانگین جذب گروه کنترل در همان زمان ضربدر 100به‌دست‌آمد و با کم‌کردن این عدد از 100 میزان درصد سمیّت سلولی به‌دست‌آمد. نتایج به‌دست‌آمده با استفاده ازآزمون ANOVA جذب نوری چاهک‌های Nano-HA مورد قضاوت آماری قرارگرفت.



تصویر-۲.پیکان بلورهای فومارازون تشکیل شده در مجاورت سلول‌های فیبروبلاست L929 را نشان‌می‌دهد.

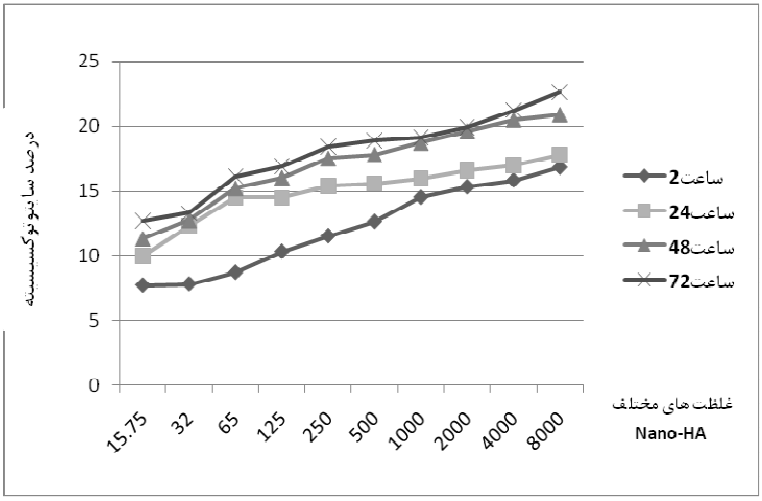
یافته‌ها

تحقیق روی ۱۰ گروه تجربی و ۱ گروه شاهد درمجموع ۳۳ نمونه صورت‌گرفت و در آن غلظت‌های ۷۵،۱۵،۳۲،۶۵،۱۲۵،۲۵۰،۵۰۰،۱۰۰۰،۲۰۰۰،۴۰۰۰،۸۰۰۰ ppm ازNano-HA به مدت ۲، ۲۴،۴۸و۷۲ ساعت با سلول‌های فیبروبلاست رده L929 مجاورت داده‌شد. میزان فعالیت حیاتی سلول‌ها بر حسب زمانهای پیگیری به تفکیک مقادیر مختلف Nano-HA در جدول ۱ نشان‌داده‌شده‌است.آزمون ANOVA نشان‌داد که میزان فعالیت حیاتی سلول‌ها در گروه‌های ۱۰گانه و زمانهای پیگیری اختلاف معنی‌دار آماری نداشته‌است (P>0.05)؛ همچنین با گذشت زمان در تمام گروه‌ها میانگین فعالیت حیاتی سلول‌ها کاهش یافت و کمترین میانگین فعالیت حیاتی سلول‌ها مربوط به غلظتppm ۸۰۰۰ بعد از گذشت ۷۲ ساعت بود(0.108±0.004).

در نمودار ۱ مقایسه ی بین درصدهای سایتوتوکسیک بر حسب زمانهای پیگیری به تفکیک غلظت‌های مختلف Nano-HA نشان داده‌شده است. درصد حیات سلولی از تقسیم میانگین میزان جذب غلظت مورد نظر به میانگین جذب گروه کنترل در همان زمان ضربدر 100به‌دست‌آمد و با کم‌کردن این عدد از 100 میزان درصد توکسیسیته حاصل شد. براساس نتایج به دست آمده حداکثر درصد توکسیسیته نسبت‌به گروه شاهد بعد از گذشت ۷۲ ساعت و در غلظت ppm۸۰۰۰، معادل ۲۲/۶درصد شد.

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

زمان / غلظتNano-HA (ppm)	۲ ساعت	۲۴ساعت	۴۸ساعت	۷۲ساعت
کنترل	۰,۶۵±۰,۰۶	۰,۲۵۶±۰,۰۳	۰,۱۶±۰,۰۰۵	۰,۱۴۱±۰,۰۱۲
۱۵,۷۵	۰,۶±۰,۰۴۵	۲۳ .۰±۰,۰۱۵	۰,۱۴±۰,۰۰۶	۰,۱۲۲±۰,۰۰۲
۳۲	۰,۵۹±۰,۰۰۹	۰,۲۲۴±۰,۰۰۷	۰,۱۳۹±۰,۰۰۶	۰,۱۲۱±۰,۰۰۷
۶۵	۰,۵۹±۰,۰۱۲	۰,۲۱۹±۰,۰۱	۰,۱۳۵±۰,۰۰۸	۰,۱۱۷±۰,۰۰۶
۱۲۵	۰,۵۸±۰,۰۰۶	۰,۲۱۸±۰,۰۱۱	۰,۱۳۴±۰,۰۰۷	۰,۱۱۶±۰,۰۱
۲۵۰	۰,۵۷±۰,۰۰۷	۰,۲۱۶±۰,۰۰۹	۰,۱۳۲±۰,۰۰۳	۰,۱۱۴±۰,۰۰۲
۵۰۰	۰,۵۶±۰,۰۰۶	۰,۲۱۶±۰,۰۰۴	۰,۱۳۱±۰,۰۰۵	۰,۱۱۳±۰,۰۰۹
۱۰۰۰	۰,۵۵±۰,۰۱	۰,۲۱۵±۰,۰۰۵	۰,۱۳±۰,۰۰۲	۰,۱۱۳±۰,۰۰۱
۲۰۰۰	۰,۵۵±۰,۰۰۷	۰,۲۱۳±۰,۱	۰,۱۲۸±۰,۰۰۲	۰,۱۱۲±۰,۰۰۸
۴۰۰۰	۰,۵۴±۰,۰۱۲	۰,۲۱۲±۰,۰۰۶	۰,۱۲۷±۰,۰۰۵	۰,۱۱±۰,۰۰۳
۸۰۰۰	۰,۵۴±۰,۰۱	۰,۲۱±۰,۰۰۵	۰,۱۲۶±۰,۰۰۳	۰,۱۰۸±۰,۰۰۴



نمودار ۱. مقایسه ی درصدهای سایتوتوکسیک بر حسب زمانهای پیگیری به تفکیک غلظت‌های مختلفNano-HA – با افزایش غلظت ذرات Nano-HA و نیز گذشت زمان، درصد سایتوتوکسیسیته افزایش می‌یابد ولی از نظر آماری تفاوت معنی‌داری بین گروه‌ها وجود ندارد.

بحث

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

در مطالعه ای که توسط شاهون و همکاران در سال ۲۰۱۱ صورت‌گرفت و در آن سازگاری زیستی اشکال میله ای Nano-HA را درغلظت‌های مشابه با مطالعه ی اخیر، روی سلول‌های تک هسته ای خون محیطی انسان و بعد از گذشت ۲،۲٤، ٤۸ و۷۲ ساعت با استفاده از تست MTT مورد بررسی قراردادند، نتایج حاصل از این تحقیق نشان‌داد 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 ی اخیرنیز در تایید نتیجه ی مطالعه ی فوق نشان‌داد که این ماده دارای سازگاری زیستی قابل قبولی است.

همچنین در مطالعه ای که توسط Yantae و همکاران در سال ۲۰۰۹ صورت‌گرفت و در آن سازگاری زیستی اشکال میله ای و کروی Nano-HA را در غلظت‌های ۱ تا ۱۰۰ ppm روی استئوبلاست‌ها از طریق تست MTT و بعد ازگذشت ۷۲ساعت مورد بررسی قراردادند نیز نتیجه‌گیری‌کردند که این ماده دارای سازگاری زیستی قابل قبولی است[۲٤].البته در مطالعه ی Yantae بازه ی زمانی محدود بوده، تنها تا غلظت ppm ۱۰۰ مورد تحقیق قرارگرفت. از طرفی مطالعه ی Hsieh-MF و همکاران در سال ۲۰۰۹ نیز نشان‌دادند که پارتیکل‌های Nano-HA تا غلظتppm ۵۰۰۰ کمترین سمیت را برای استئوبلاست دارا هستند [۲۵] و نتایج مطالعه ما هم به‌طور مشابه بیانگر سازگاری زیستی ذرات Nano-HA است.اما در مطالعه‌ای که Motskin و همکاران در سال ۲۰۰۹ انجام‌دادند و در آن سایتوتوکسیسیته ی پارتیکل‌های Nano-HA به شکل کلوئید و ژل را در غلظت‌های ppm ۲۵۰، ۱۲۵، ٦۲، ۳۱ و ۵۰۰ روی ماکروفاژهای مشتق از مونوسیت از طریق تست MTT بعد از ۲٤ ساعت مورد ارزیابی قراردادند ، نشان‌دادند که پارتیکل‌های Nano-HA در فرم ژل در

تمامی‌غلظت‌ها توکسیک بوده وفرم کلوئید آن فقط در غلظت‌های بالاتر ازppm ۱۲۵ توکسیک است[۲٦]؛اما در این مطالعه پارتیکل‌های Nano-HA به شکل سوسپانسیون به‌کاررفت و سمیت آن روی سلول‌های فیبروبلاست رده L929 بررسی شد؛ همچنین در سال ۲۰۰٤، J.Huang و همکاران اثر سازگاری زیستی Nano-HA میله‌ای شکل را در غلظت‌های ۱،۱۰و۱۰۰ ppm را روی ماکروفاژهای مشتق از مونوسیت از طریق تست LDHبعد از ۲٤ ساعت ارزیابی‌کردند و نشان‌دادند که در غلظت ppm ۱۰۰،Nano-HA توانائی آسیب‌زدن به غشا سلولی و آزادکردن LDH را دارد [۲۷]،ازطرفی Scheel و همکاران در سال ۲۰۰۹ در مطالعه‌ای ماکروفاژهای رده Murine RAT 264،7 را در معرض Nano-HA در غلظت‌های ۵۰،۱۰۰،۵۰۰،۱۰۰۰و۵۰۰۰ ppm قراردادند و سایتوتوکسیسیته ذرات را از طریق X-TT بررسی‌کردند و نتیجه‌گیری‌کردند که غلظت‌های بالاتر ازppm ۵۰۰ 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. به‌طوری که ممکن است علت توکسیک‌بودن ذرات برای ماکروفاژها در غلظت‌های بالاتر ازppm ۱۲۵ به دلیل فاگو سیت‌کردن ذرات و افزایش غلظت کلسیم در سیتوپلاسم سلول‌ها باشد، اما درباره استئوبلاست‌ها ، سلول‌های تک هسته ای خون محیطی انسانی و فیبروبلاست‌ها به مقدار کمتری وارد سلول می‌شود.بنابراین می‌توان این گونه نتیجه‌گیری‌کرد که اگر پارتیکل Nano-HA وارد سلول شود، می‌تواند در غلظت‌های بالاتر ساست ولی به شکل خارج سلولی حتی تا غلظت ppm ۸۰۰۰برای سلول‌های تک هسته ای خون محیطی انسانی و همین‌طور فیبروبلاست‌ها و ppm ۵۰۰۰ برای استئوبلاست‌ها دارای سازگاری زیستی قابل قبولی باشد؛ همچنین به کار بردن اشکال مختلف ذرات نیز روی سطح تماس ذرات و لذا مقدار حلالیت و قدرت ذرات موثراست و نیز می‌تواند روی سایتوتوکسیک بودن پارتیکل‌ها موثر باشد[۸-٦].

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

نتیجه‌گیری

همان طور که در نتایج به دست‌آمده 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 فیبروبلاست 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.

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 nanocrystallin hydroxyapatite paste in the treatment of in trabony 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 osteoconductionin 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 racturezones using a novel resorbable nanocrystalline hydroxyapatite pastein combination with a hydroxyapatite ceramic core: first clinicalresults.J Orthop Trauma Surg 2006 ; 26:533–540.

9- Thorwarth M، Schultze-Mosgau S، Kessler P، Wiltfang J، SchlegelKA.Bone regeneration in osseous defects using aresorbable nanoparticular 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، Zafiropoulos 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; 79:394–400

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 newkind of nanoparticular hydroxylapatite. 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 nanocyrstalline 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 nanoparticlesas 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, Hamedi 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 Biocopatibility 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 gydrophikic Cd/Zns quantum dots/hydroxyapatite composites nanoparticles in MC3T3-E1 osteoblast cells.J Nanosci Nanotechnol 2009;92:27-62.

26- Motskin M, Wright D.M, Muller K, Kyle N, Gard T.G, Porter A. Hydroxyapatite nano and microparticles: Correlation of particle propertieswith cytotoxicity and biostability.J Biomaterials 2009; 30: 337–397.

27- Huang J, Scherbart AM, van Berlo,Schins RP.Evaluation of cytoxic 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 cytoyoxicity and activation. J Toxic in vitro 2009; 23:531-548.

Daneshvar

Medicine

Scientific-Research Journal of Shahed University Seventeenth Year, No.95 October, November 2011

Received: 18/8/2011
Last revised: 12/11/2011
Accepted: 29/11/2011

Evaluation of cytotoxicity of hydroxyapatite nanoparticles on L929 fibroblast cells

Hossein Shahoon[1], Roya Hamedi[2*], Zahra Yadegari[3], Vahid Majd Hosseiny[4], Naser Valaie[5]

1. Assistant Professor - Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Dental Faculty, Shahed University, Tehran, Iran.
2. D.D.S educated from Dental Faculty, Shahed University, Tehran, Iran.
3. M.Sc of Cellular and Molecular Biology, Dental Faculty, Shahid Beheshti Medical University, Tehran, Iran.
4. D.D.S educated from Dental Faculty, Shahed University, Tehran, Iran.
5. Department of Biostatistics, Azad Medical University, Tehran, Iran.

E-mail: hhamedi@shahed.ac.ir

Abstract

Background and Objective: Hydroxyapatite ($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$) is an important biomaterial in medical and dental applications. Due to low solubility of its particles, it has had little application in bone reformation. For this reason, nanohydroxyapatite (Nano-HA) with a higher surface area and higher solubility has attracted the attention of researchers as an effective strategy for bone grafting purposes. There have been controversies regarding biocompatibility of the latter particles. The purpose of this research was to evaluate the biocompatibility of nano-HA on L929 fibroblast cells.

Materials and Methods: In this experimental study, nano-sized, rod- like hydroxyapatite particles sterilized, then L929 fibroblast cells were cultured on 96-well plate. Cells were exposed to nano-HA at the following concentrations: 15.75, 32, 65, 125, 250, 500, 1000, 2000, 4000, and 8000 ppm. Later, for measuring the cell toxicity of the material, MTT method was utilized to measure the absorption, which evaluated the viability of the cells for each concentration and time point. The statistical ANOVA test was used in this study.

Results: Results of this study showed that although cell viability decreased by increasing concentration and time but ANOVA analyze indicated that there was no significant difference between the groups ($p>0.05$).

Conclusion: The results indicate that “Nano-HA" biomaterial has acceptable compatibility with L929 fibroblast cells.

Key Words: Nano hydroxyapatite particles, cytotoxicity, L929 fibroblast cells, MTT