بررسی مقایسه‌ای سمیت سلولی چهار نوع سیلر درمان ریشه با استفاده از فیبروبلاست‌های لثه‌ای انسان

دکتر حمید رضویان[۱]، دکتر عباسعلی خادمی[۲]، احسان مستاجران[*]، دکتر بتول هاشمی‌بنی[۳]، فریبا حیدری[۴]

چکیده

مقدمه: از مهم‌ترین ویژگی سیلرهای درمان ریشه، خاصیت زیست‌سازگاری آن‌ها می‌باشد. هدف از انجام این مطالعه، بررسی میزان سمیت سلولی سیلرهای ADSEAL، tgsealer، AH 26 و MTA Fillapex به‌صورت آزمایشگاهی بر روی سلول‌های فیبروبلاست لثه‌ای انسانی بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه‌ی تجربی آزمایشگاهی سیلرها در دو حالت تازه تهیه شده و سفت شده مورد بررسی قرار گرفتند. جهت بررسی سمیت سلولی، هر کدام از نمونه‌ها به‌صورت جداگانه در RPMI-1640 (Sigma-aldrich, USA) عصاره‌گیری شدند. عصاره‌های حاصله ۱، ۳ و ۷ روز در تماس با سلول‌های فیبروبلاست رده C۱۶۵ در محیط کشت قرار گرفتند. سپس میزان سمیت سلولی به‌روش رنگ‌سنجی (2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) (4,5-Dimethylthiazol-2-Yl) MTT-3 و براساس میزان جذب نوری ارزیابی شد. برای آنالیز داده‌ها از آزمون آماری آنالیز واریانس چند طرفه و نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۱/۵ استفاده گردید (α = ۰/۰۵).

یافته‌ها: در این مطالعه همه‌ی سیلرها دارای سمیت سلولی بودند. با توجه به آزمون آماری، اختلاف معنی‌داری بین میزان سمیت سلولی سیلرهای AH 26 (p value = ۰/۰۲۸) در حالت تازه تهیه شده و سفت شده وجود داشت ولی در مورد سیلرهای ADSEAL (p value = ۰/۹۱۰)، MTA Fillapex (p value = ۰/۹۵۲) و tgsealer (p value = ۰/۵۶۶) بین این دو حالت اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. هم‌چنین با توجه به میانگین کلیه‌ی داده‌های به‌دست آمده از هر سیلر، کم‌ترین سمیت سلولی را MTA Fillapex (۰/۷۸) و بیش‌ترین سمیت سلولی را ADSEAL (۰/۶۰) نشان داد.

نتیجه‌گیری: با توجه به محدودیت‌های این مطالعه، از بین سیلرهای مورد بررسی، سیلرهای MTA Fillapex و ADSEAL به‌ترتیب دارای کم‌ترین و بیش‌ترین میزان سمیت سلولی رتبه‌بندی شدند.

کلیدواژه‌ها: سمیت سلولی، فیبروبلاست، زیست‌سازگاری، سیلر معالجه ریشه

* دانشجوی دندان‌پزشکی، کمیته پژوهش‌های دانشجویان، دانشکده دندان‌پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران (مؤلف مسؤول)
e_mostajeran1990@yahoo.com

۱: استادیار، مرکز تحقیقات دندان‌پزشکی ترابی‌نژاد، گروه اندودونتیکس، دانشکده دندان‌پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۲: استاد، مرکز تحقیقات دندان‌پزشکی ترابی‌نژاد، گروه اندودونتیکس، دانشکده دندان‌پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۳: استادیار، گروه علوم تشریحی و بیولوژی مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۴: کارشناس آزمایشگاه، مرکز تحقیقات دندان‌پزشکی ترابی‌نژاد، دانشکده دندان‌پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

این مقاله حاصل پایان‌نامه عمومی در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان به شماره ۳۹۱۳۵۴ می‌باشد.

این مقاله در تاریخ ۹۲/۶/۲۸ به دفتر مجله رسیده، در تاریخ ۹۲/۹/۱۳ اصلاح شده و در تاریخ ۹۲/۱۰/۲۴ تأیید گردیده است.

مجله دانشکده دندان‌پزشکی اصفهان
۱۳۹۳؛ ۱۰(۱)؛ ۱۰ تا ۱۸

مقدمه

هدف اصلی در درمان ریشه حذف بقایای پالپی، بافت‌های نکروز شده و میکروارگانیسم‌های موجود در سیستم کانال ریشه می‌باشد[۱]. درمان موفق ریشه با تشخیص صحیح، پاک‌سازی مؤثر عفونت و پرکردگی مناسب سیستم کانال ریشه به‌دست می‌آید[۳، ۲].

شایع‌ترین مواد پرکننده‌ی ریشه گوتا و سیلرهای اندودنتیک می‌باشند[۴]. سیلر مورد استفاده در درمان ریشه می‌تواند در تماس نزدیک با مایعات خارج سلولی قرار بگیرد و محصولات آن در تماس نزدیک با بافت‌های اطراف ریشه قرار می‌گیرد[۶، ۵]. در این صورت می‌تواند باعث ایجاد واکنش‌های متفاوت در اطراف ریشه گردد[۱۰-۸، ۷، ۳، ۲]. سیلر ایده‌آل باید دارای خواص فراوانی از جمله سازگاری زیستی و سیل مارژین کافی باشد؛ در این‌صورت است که بافت‌های آسیب‌دیده و ملتهب می‌توانند روند ترمیم را به‌خوبی طی کنند[۱۱]. ترکیبات سیلرهای اندودنتیک موجود بر پایه‌ی مواد متفاوتی از جمله اپوکسی رزین، زینک اکساید- اوژنول، سیلیکات، هیدروکسید کلسیم و MTA (Mineral trioxide aggregate) تولید شده‌اند[۱۳، ۱۲، ۴].

طرفداران استفاده از سیلرهای اپوکسی رزین، علی‌رغم سمیت سلولی و جهش‌زایی شناخته شده‌ی آن رو به افزایش می‌باشند. از این رو سیلرهای اپوکسی رزین جدیدی طراحی و تولید شده‌اند که خاصیت باند شدن به عاج را با پرایمر (Epiphany) و یا بدون پرایمر (EndoRez) دارند[۱۴]. از جمله سیلرهای رزین بیس می‌توان به AH 26، ADSEAL و AH Plus اشاره کرد. در مطالعات مختلف نتایج متفاوتی مبنی بر سمی بودن و در برخی موارد حتی محرک رشد بودن برای سلول‌ها توسط سیلرهای رزینی گزارش شده است[۱۷-۱۵].

در سال ۱۹۹۳ توسط ترابی‌نژاد[۱۸] MTA معرفی گردید. از MTA جهت بستن پرفوریشن‌های ریشه و فورکیشن‌ها، پالپ کپ و جراحی انتهای ریشه استفاده می‌شد. در سال ۱۹۹۹ Holand و همکاران[۱۹] از MTA به‌دلیل خواص مطلوب آن جهت پرکردن ریشه استفاده کردند که نتایج حاصله از لحاظ خصوصیات فیزیکی مطلوب نبود. اخیراً سیلری بر پایه‌ی MTA به نام MTA Fillapex به بازار آمده است که تحقیق در مورد خواص آن ضروری می‌باشد.

سیلرهای بر پایه‌ی ZOE (Zinc oxide eogenol) دسته‌ی دیگری از سیلرها می‌باشند. این سیلرها میزان متفاوتی از سمیت سلولی را از خود به خاطر اوژنول موجود در آن نشان داده‌اند[۲۰]. از جمله سیلرهای جدید در این طبقه‌بندی می‌توان به tgsealer اشاره کرد. در نتیجه پی بردن به خواص این سیلر ضروری می‌باشد.

تکنیک‌های کشت سلولی جهت ارزیابی سازگاری زیستی مواد دندان‌پزشکی بسیار مفید می‌باشند[۲۱]. این تکنیک‌ها ارزان ، تکرار پذیر و قابل اعتماد هستند[۲۳، ۲۲].

روش (2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) (4,5-Dimethylthiazol-2-Yl) MTT-3 جهت اندازه‌گیری میزان عملکرد سلول‌ها به‌صورت گسترده در بررسی‌های آزمایشگاهی سازگاری زیستی مواد دندان‌پزشکی مورد استفاده قرار می‌گیرد[۲۴، ۶].

لذا در مطالعه‌ی حاضر جهت بررسی مقایسه‌ای میزان سمیت سلولی سیلرهایی جدید و با بیس‌های متفاوت، سیلرهای MTA Fillapex، tgsealer، ADSEAL و AH 26 انتخاب شده و سمیت سلولی آن‌ها بر روی سلول‌های فیبروبلاست لثه‌ای انسانی با روش MTT اندازه‌گیری شد.

مواد و روش‌ها

این مطالعه از نوع تجربی- آزمایشگاهی بود و در مرکز تحقیقات پرفسور ترابی‌نژاد دانشگاه علوم پزشکی اصفهان در بهار ۱۳۹۲ انجام گردید.

سیلرهای استریل تازه تهیه شده، سیلرهای استریل سفت شده و محیط کشت سلول‌های استاندارد و استریل از جمله معیارهای ورود و سیلرهای غیر استریل تازه تهیه شده، سیلرهای غیر استریل سفت شده و محیط کشت سلولی غیر استاندارد و غیر استریل جزو معیارهای خروج بودند.

سیلرها

در این مطالعه از سیلرهای (DENTSPLY DeTrey, Technical &) AH 26 (GmbH, Konstanz, Germany، tgsealer (general Ltd, London, United Kingdom،

MTA Fillapex (Angelus I.P.O, Londrina, Brazil) و ADSEAL (Meta biomed, Chungbuk, Republic of Korea) استفاده شد.

به ترکیبات هر سیلر در جدول ۱ اشاره‌ی مختصری شده است.

جدول ۱: ترکیبات سیلرهای مورد آزمایش

نام سیلرها	ترکیبات
MTA Fillapex	سیلیکا رزین، رزین حلال، رزین طبیعی، بیسموت تری اکسید، نانو سیلیکا، MTA، رنگدانه
ADSEAL	بیس: اپوکسی رزین، کلسیم فسفات کاتالیست: آمین‌ها، بیسموت ساب کربنات
AH 26	پودر: بیسموت اکسید، تیتانیوم اکسید متنامین رزین: اپوکسی رزین
tgsealer	پودر: زینک اکساید، تیمول یدید، باریم سولفات مایع: اوژنول

آماده‌سازی سیلرها

سیلرهای اندودونتیک مورد استفاده در این مطالعه به‌صورت تازه تهیه شده و سفت شده مورد آزمایش قرار گرفت. جهت آماده‌سازی، سیلرها طبق دستورالعمل کارخانه‌ی سازنده در شرایط آسپتیک مخلوط گردید و سپس سیلرهای مخلوط شده در مولدهای تفلونی استریل به قطر ۷ میلی‌متر و ارتفاع ۳ میلی‌متر ریخته شد. نیمی از مولدهای تفلونی پر شده با سیلر در انکوباتور با فشار ۵ درصد دی‌اکسیدکربن، رطوبت ۱۰۰ درصد و دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفت تا به‌طور کامل سفت شود. سیلرهای سفت شده و سیلرهای تازه مخلوط شده از مولدهای تفلونی به‌طور کامل توسط اسپاتول خارج شد.

عصاره‌گیری سیلرها

سیلرهای تهیه شده در (Sigma-Aldrich, USA) RPMI-1640 با نسبت ۱/۲۵ cm^2/ml (سطح نمونه‌های سیلر به حجم RPMI-1640) به‌مدت ۲۴ ساعت و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، جهت عصاره‌گیری غوطه‌ور گردید، پس از آن عصاره‌ی حاصله توسط فیلتر استریل ۰/۲ میکرومتر (Milipore S.A.S. Molsheim. Cedex. France) فیلتر شد، فیلتر نمودن عصاره‌ی حاصله باعث می‌گردد محیط کشت جهت انتقال به چاهک آماده و استریل گردد[۱۵].

مراحل آماده سازی محیط کشت سلول‌ها

در این مطالعه جهت نزدیک کردن شرایط آزمایش به شرایط کلینیکی از سلول‌های فیبروبلاست لثه‌ای انسان استفاده شد. سلول‌های زنده فیبروبلاست لثه‌ای انسانی با رده C_{165} از انستیتو پاستور ایران تهیه گردید. سلول‌ها برای رشد در فلاسک T_{25} با محیط کشت حاوی (Roswell Park Memorial Institute) RPMI-1640، (Sigma-Aldrich, USA) FCS ۱۰ درصد، یک درصد آنتی بیوتیک (۱۰۰ واحد بر میلی‌لیتر پنی‌سیلین و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر استرپتومایسین) در انکوباتور با دمای ۳۷ و فشار ۵ درصد دی اکسیدکربن و رطوبت ۱۰۰ درصد قرار گرفتند[۲۵]. این محیط کشت هر سه روز یک‌بار در زیر هود آزمایشگاهی تعویض گردید تا سلول‌ها یک‌دست کف فلاسک را بپوشانند. وقتی سلول‌ها به تراکم ۷۰ تا ۸۰ درصد رسیدند با ۲ میلی‌لیتر (Ethylene diamine tetraacetic acid-trypsin) EDTA-Try به‌مدت ۲ تا ۵ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد تریپسینه شدند تا سلول‌ها از هم جدا شده و از کف فلاسک کنده شوند و سریعاً حداقل به اندازه‌ی هم حجم آن، محیط کشت RPMI-1640 به فلاسک افزوده شد تا آنزیم خنثی گردد و به مدت ۵ دقیقه با دور ۱۸۰۰ rpm سانتریفوژ (Hettich, USA) شدند. سپس محیط روی رسوبات سلولی ته‌نشین شده خارج گردید و مجدداً محیط کشت روی رسوبات سلولی ریخته شد و با دستگاه ورتکس (VEIP, zx3, Italy) یک سوسپانسیون سلولی درون لوله ایجاد گردید. محتویات لوله درون ۲ فلاسک جدید به‌عنوان سلول‌های پاساژ بعدی ریخته شد و درون انکوباتور قرار گرفت. پس از تکثیر سلولی و تریپسینه کردن، شمارش سلولی با لام نئوبار انجام شد.

سپس سلول‌ها در پلیت‌های کشت ۱۲ چاهکی به تعداد ۲۰۰۰۰ سلول در هر چاهک ریخته شد و سپس پلیت‌ها ۲۴ ساعت در انکوباتور قرار گرفت. پس از آن محیط کشت چاهک‌ها تخلیه و به هر چاهک یک میلی‌لیتر عصاره‌ی سیلرها اضافه گردید و پس از ۱، ۳ و ۷ روز بقای سلولی سلول‌های محیط کشت مورد بررسی قرار گرفت[۱۷-۱۵].

روش MTT

در این مطالعه از MTT جهت بررسی میزان سمیت سلولی استفاده شد. روش MTT توسط Mosmann در سال ۱۹۸۳

معرفی شد. این روش جهت ارزیابی سمیت سلولی مواد دندانی حساس می‌باشد. در این روش بر اساس ظرفیت آنزیم دهیدروژناز میتوکندری در سلول‌های زنده، نمک تترازولیوم محلول در آب به کریستال‌های فرمازان آبی رنگ تبدیل می‌گردد. مقدار فرمازان تشکیل شده با فعالیت آنزیم میتوکندری سلول‌های زنده متناسب است. هم‌چنین تعداد کل سلول‌های موجود در هر مرحله‌ای از رشد و میزان فعالیت متابولیکی سلول‌ها را نیز مشخص می‌کند و هنگامی‌که سلول‌ها مردند دیگر توسط این روش آشکار نمی‌شوند[۲۷، ۲۶]. در نهایت میزان جذب نوری هر یک از نمونه‌ها توسط دستگاه الایزا ریدر اندازه‌گیری و یادداشت شده و داده‌های به‌دست آمده مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند[۲۸].

برای هر نمونه سیلر در هر سه زمان مورد نظر (۱، ۳ و ۷ روز) سه چاهک از پلیت‌های کشت سلول اختصاص داده شد.

پس از ۱، ۳ و ۷ روز، محیط کشت تخلیه شد و شستشوی سلول‌ها با PBS (Phosphate buffered saline) منفی (بدون منیزیم و کلسیم) انجام گردید. سپس میزان ۴۰۰ میکرولیتر از محیط کشت و ۴۰ میکرولیتر MTT با غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر افزوده گردید و در انکوباتور به‌مدت ۴ ساعت انکوبه شد.

در مرحله‌ی بعد به آرامی محیط کشت تخلیه و ۴۰۰ میکرولیتر (Sigma-Aldrich, USA) Dimethyl Sulfoxide) DMSO اضافه گردید و به‌مدت ۲ ساعت در تاریکی قرار داده شد[۲۹]. در نهایت ۱۰۰ میکرولیتر محلول به پلیت ۹۶ چاهکی انتقال یافت و کمیت فرمازان حاصله به روش نورسنجی در طول موج ۵۷۰ نانومتر، تعیین گردید.

در این مطالعه برای هر سه زمان گروه کنترل مثبت (تمام سلول‌های موجود در چاهک توسط فنول ۱۰ درصد کشته شدند) و کنترل منفی (بر روی سلول‌های موجود در چاهک فقط محیط کشت خالص ریخته شد) به‌صورت جداگانه در نظر گرفته شد.

پس از اندازه‌گیری میزان جذب نوری هر محیط کشت، میزان زنده ماندن سلول‌ها نسبت به گروه کنترل منفی به‌صورت درصدی گزارش شد، بدین‌صورت که در محیط کشت اگر صفر تا ۳۰ درصد سلول‌ها زنده ماندند؛ سیلر دارای سمیت زیادی است، اگر ۳۰ تا ۶۰ درصد سلول‌ها زنده ماندند؛ سیلر سمیت متوسطی دارد، اگر ۶۰ تا ۹۰ درصد سلول‌ها زنده ماندند؛ سیلر سمیت کمی دارد و اگر بیش از ۹۰ درصد سلول‌ها زنده ماندند؛ سیلر غیر سمی می‌باشد[۳۰].

جهت آنالیز داده‌ها از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۱/۵ (version 11.5, SPSS Inc., Chicago, IL) و آزمون آماری آنالیز واریانس چند طرفه استفاده شد (α = ۰/۰۵).

یافته‌ها

نتایج به‌دست آمده از تست نورسنجی نمونه‌های مورد آزمایش میزان فعالیت متابولیسمی سلول‌ها را نشان می‌دهد که در جداول ۲ و ۳ قابل مشاهده می‌باشد.

جدول ۲. میزان سمیت سلولی سیلرهای تازه تهیه شده در هر سه زمان

روز	سیلر	میانگین (انحراف معیار)	سمیت سلولی
۱	AH 26	۰/۳۷ (۰/۰۳)	متوسط
	MTA Fillapex	۰/۹۵ (۰/۰۷)	فاقد
	ADSEAL	۰/۸۵ (۰/۱۱)	کم
	tgsealer	۰/۴۶ (۰/۰۳)	متوسط
۳	AH 26	۰/۴۷ (۰/۱۰)	متوسط
	MTA Fillapex	۰/۷۶ (۰/۰۷)	کم
	ADSEAL	۰/۴۷ (۰/۰۸)	متوسط
	tgsealer	۰/۷۲ (۰/۱۵)	کم
۷	AH 26	۰/۷۴ (۰/۲۳)	کم
	MTA Fillapex	۰/۶۱ (۰/۰۴)	کم
	ADSEAL	۰/۵۱ (۰/۰۱)	متوسط
	tgsealer	۰/۸۳ (۰/۱۱)	کم

جدول ۳. میزان سمیت سلولی سیلرهای سفت‌شده در هر سه زمان

روز	سیلر	میانگین (انحراف معیار)	سمیت سلولی
۱	AH 26	۰/۵۱ (۰/۰۷)	متوسط
	MTA Fillapex	۰/۹۵ (۰/۰۷)	فاقد
	ADSEAL	۰/۸۰ (۰/۲۳)	کم
	tgsealer	۰/۵۶ (۰/۱۱)	متوسط
۳	AH 26	۰/۸۱ (۰/۰۶)	کم
	MTA Fillapex	۰/۷۶ (۰/۰۷)	کم
	ADSEAL	۰/۴۶ (۰/۰۵)	متوسط
	tgsealer	۰/۷۶ (۰/۰۱)	کم
۷	AH 26	۰/۸۴ (/۰۵)	کم
	MTA Fillapex	۰/۶۱ (۰/۰۴)	متوسط
	ADSEAL	۰/۵۴ (۰/۱۳)	متوسط
	tgsealer	۰/۸۳ (۰/۰۳)	کم

میزان جذب نوری گروه کنترل مثبت (سلول‌ها علاوه بر محیط کشت خالص در تماس با فنول ۱۰ درصد بودند) در تمام نمونه‌ها صفر بود.

همه‌ی سیلرها تقریباً دارای سمیت سلولی بودند. بیش‌ترین میزان سمیت سلولی در روز اول مربوط به AH 26 و در روزهای سوم و هفتم مربوط به ADSEAL بود.

طبق آزمون آماری سمیت سلولی سیلر AH 26 در حالت تازه تهیه شده به‌طور معنی‌داری (p value = ۰/۰۲۸) در هر سه زمان بیش‌تر از حالت سفت شده بود ولی در مورد سیلرهای ADSEAL (p value = ۰/۹۱۰)، MTA Fillapex (۰/۹۵۲ = p value) و tgsealer (p value = ۰/۵۶۶) بین حالت تازه تهیه شده و سفت شده اختلاف معنی‌داری وجود نداشت.

در سیلرهای MTA Fillapex، AH 26 و tgsealer میزان سمیت سلولی نمونه‌های تازه تهیه شده بیش‌تر از نمونه‌های سفت شده بود، ولی در سیلر ADSEAL میزان سمیت سلولی نمونه‌های سفت شده در روزهای اول و سوم بیش‌تر از نمونه‌های تازه تهیه شده بود.

به‌منظور ارزیابی سمیت سلولی سیلرها به‌طور کلی، در هر سه زمان و هر دو حالت تازه تهیه شده و سفت شده، آزمون آماری نشان داد که سمیت سلولی سیلرها از حداقل به حداکثر سیلر MTA Fillapex (۰/۷۸)، tgsealer (۰/۶۹)، AH 26 (۰/۶۲) و ADSEAL (۰/۶۰) می‌باشد.

بحث

از نظر کلینیکی سیلرها به‌صورت تازه تهیه شده یا در مرحله‌ی پلی‌مریزاسیون ناکامل وارد دهان می‌شوند ولی حتی پس از سخت شدن این احتمال وجود دارد که ترکیبات بالقوه سمی از این مواد پس از تماس با مایعات بافتی آزاد گردد[۳۱]. به‌همین جهت در مطالعات مختلف پیشنهاد شده سیلرها در هر دو حالت سفت شده و تازه تهیه شده مورد مطالعه قرار گیرند و از سلول‌های فیبروبلاست جهت سنجش سمیت سلولی در محیط آزمایشگاه استفاده گردد. از آن‌جایی که سیلرها در سیستم کانال ریشه در طی زمان، مراحل سفت شدن را سپری می‌کنند؛ پیشنهاد می‌گردد جهت ارزیابی سمیت سلولی آن‌ها آزمایشات کشت سلولی در زمان‌های متفاوت انجام گردد[۳۲، ۲۵، ۱۵].

میزان سمیت سلولی سیلرها به متغیرهای زیادی هم‌چون غلظت، زمان مورد آزمایش، نوع تست، سلول مورد استفاده و تازه یا سفت بودن آن بستگی دارد؛ هم‌چنین در تعداد زیادی از مطالعات آزمایشگاهی انجام شده بر روی سیلرها نتایج بسیار متفاوتی گزارش شده است[۲۰، ۱۷-۱۵]؛ به‌همین دلیل مقایسه‌ی نتایج، مشکل و یا حتی غیرممکن می‌باشد زیرا همان‌گونه که بیان شد متغیرهای زیادی در ارزیابی اثر سمیت سلولی نقش ایفا می‌کند.

ماده‌ای که سیلرها در آن جهت انجام آزمایشات کشت سلولی عصاره‌گیری می‌شود در میزان سمیت سلولی نمونه‌ها مؤثر می‌باشد (البته در برخی روش‌ها سیلر به‌صورت مستقیم با سلول‌ها تماس می‌یابند) از این‌رو در مطالعه‌ای که در این زمینه انجام شد وقتی AH Plus در سدیم کلراید ۰/۰۹ درصد قرار گرفت کم‌ترین سمیت سلولی و وقتی در DMSO جهت عصاره‌گیری قرار گرفت بیش‌ترین سمیت سلولی را داشت[۳۳]. بدین‌منظور جهت حذف اثر DMSO، سیلرها بهتر است در RPMI که همان محیط کشت سلول‌هاست عصاره‌گیری شوند که در پژوهش حاضر از همین ماده استفاده شد.

در مطالعه‌ی حاضر بیش‌ترین میزان سمیت سلولی سیلرها در حالت تازه تهیه شده در روز اول و سوم مربوط به سیلر AH 26 و در روز هفتم مربوط به سیلر ADSEAL بود و در حالت سفت شده بیش‌ترین سمیت سلولی در روز اول مربوط به سیلر AH 26 و در روز سوم و هفتم مربوط به سیلر ADSEAL بود؛ هم‌چنین کم‌ترین میزان سمیت سلولی در روزهای اول و سوم در دو حالت مربوط به سیلر MTA Fillapex بود. به‌صورت کلی بیش‌ترین میزان سمیت سلولی مربوط به سیلر ADSEAL و کم‌ترین میزان سمیت سلولی مربوط به سیلر MTA Fillapex می‌باشد.

در مورد سیلر MTA Fillapex از آن‌جایی که این سیلر از دسته سیلرهای جدید موجود می‌باشد اطلاعات علمی کمی در مورد خواص این سیلر وجود دارد با این حال در مطالعه‌ی Bin و همکاران[۱۷] این سیلر در غلظت های ۱:۱ ، ۱:۲ و ۱:۴ سمیت سلولی زیادی داشت، علت متفاوت بودن سمیت سلولی MTA Fillapex در مطالعه‌ی Bin و همکاران[۱۷] و مطالعه‌ی حاضر می‌تواند مربوط به نوع سلول‌های مورد استفاده

در مطالعه باشد؛ زیرا در مطالعه‌ی Bin و همکاران[۱۷] از فیبروبلاست‌های خوکچه‌ی هندی استفاده شده است. هم‌چنین در مطالعه Yoshino و همکاران[۳۴] میزان سمیت White MTA به میزان متوسط و Portland Cement به میزان اندک بود ولی MTA Fillapex سمیت زیادی از خود نشان داد که در این مطالعه نیز از سلول‌های فیبروبلاست لیگامان‌های پریودنتالی استفاده شده بود. در مطالعات Zhang و همکاران[۳۲]، Bin و همکاران[۱۷] و Yoshinoو همکاران[۳۴] میزان سمیت سلولی MTA Withe خیلی کم بود.

سیلر MTA Fillapex علاوه بر MTA دارای اجزایی مانند سالیسیلات‌ها می‌باشد؛ هرچند در زمان‌های اولیه این سیلر خاصیت سمیت اندکی از خود نشان داد ولی با گذر زمان این سمیت افزایش یافت. این یافته نشان می‌دهد که هرچند ترکیبات موجود در این سیلر به‌ویژه سالیسیلات‌ها سمیت سلولی کمی دارند ولی با گذشت زمان میزان سمیت آن می‌تواند افزایش یابد که علت آن ممکن است حل شدن اجزاء سیلر و آزاد شدن تدریجی ترکیباتی با خاصیت سمیت سلولی باشد که این ویژگی با حلالیت سیلر نیز ارتباط دارد؛ لذا ممکن است با گذشت زمان حلالیت این سیلر نیز افزایش یابد که به دنبال آن باعث آزاد شدن ماده‌ی سمی از سیلر MTA Fillapex می‌شود. بنابراین با توجه به این سمیت می‌توان به گونه‌ای نظر مطالعه‌ی Bin و همکاران[۱۷] را که MTA Fillapex را با سمیت سلولی زیاد گزارش کرده بود با مطالعه‌ی حاضر به‌گونه‌ای مشابه دانست ولی به‌هرحال به‌نظر می‌رسد زمان هفت روز برای ارزیابی سمیت سلولی سیلر MTA Fillapex ناکافی باشد.

نکته‌ی قابل توجه دیگر در مورد سیلر MTA Fillapex در این مطالعه تشابه کامل میزان سمیت سلولی آن در سه زمان و در دو حالت تازه تهیه شده و سفت شده بود. علت این تشابه شاید آزاد شدن یکسان مواد سمی از این سیلر در دو حالت تازه تهیه شده و سفت شده باشد. البته این‌که چه ماده‌ای دقیقاً این اثر سمیت را دارد مشخص نیست.

نتایج به‌دست آمده در مورد سیلرهای رزین بیس ADSEAL و AH 26 در مطالعه‌ی حاضر نشان داد که ADSEAL در مجموع بیش‌ترین سمیت سلولی را دارد؛ هم‌چنین AH 26 نیز بعد از آن بیش‌ترین سمیت سلولی را دارا می‌باشد. پس در مطالعه‌ی حاضر سیلرهای رزین بیس بیش‌تر از همه دارای سمیت سلولی بودند. سیلر ADSEAL علی‌رغم این‌که سیلر جدیدی نمی‌باشد ولی اطلاعات علمی بسیار اندکی در مورد خواص آن وجود دارد و مستندات علمی کافی جهت بررسی خواص آن وجود ندارد. از این‌رو مطالعات بیش‌تری جهت پی بردن به خواص این سیلر و مقایسه‌ی آن با سایر سیلرها توصیه می‌شود.

در مطالعه‌ی Huang و همکاران[۳۱]، میزان سمیت سلولی AH 26 در روزهای اول بسیار زیاد بود و با گذر زمان میزان سمیت سلولی آن کاهش یافت ولی باز هم میزان سمیت سلولی آن قابل توجه بود، که این موضوع با نتایج مطالعه‌ی حاضر هم‌خوانی دارد. علت زیاد بودن سمیت سلولی AH 26 را می‌توان در عناصر سازنده‌ی آن مانند فرمآلدهید که ماده‌ای سمی است، دانست.

سیلر AH Plus مانند AH 26 می‌باشد با این تفاوت که فرمآلدهید ندارد. در مطالعات مختلف بر روی سیلر AH Plus نیز نظرات متفاوتی گزارش شده است؛ به‌گونه‌ای که در مطالعه‌ی Eldeniz و همکاران[۱۵] و Karapinar و همکاران[۲۶] میزان سمیت سلولی AH Plus بسیار اندک بود و در بعضی موارد و زمان‌ها این سیلر محرک رشد سلول‌ها نیز شده بود ولی در مطالعات دیگر که توسط Silva و همکاران[۱۶] و Bin و همکاران[۱۷] انجام شد، سیلر AH Plus در حد متوسط تا شدید سمی بود. البته این اختلاف نظر را می‌توان در روش انجام آزمایش جستجو کرد؛ چرا که در مطالعه‌ی Silva و همکاران[۱۶] جهت بررسی بقای سلول‌ها از تست MMP استفاده شده بود.

سلیر دیگر موجود در مطالعه‌ی حاضر سیلر tgsealer می‌باشد. میزان سمیت سلولی این سیلر متوسط و کم بود و بعد از MTA Fillapex کم‌ترین سمیت سلولی را داشت.

سیلر tgsealer سیلری جدید با بیس ZOE می‌باشد و به‌دلیل جدید بودن اطلاعات علمی کمی جهت مقایسه‌ی آن وجود دارد ولی می‌توان از سایر سیلرهای مرسوم با بیس ZOE جهت مقایسه و پی بردن به خواص tgsealer استفاده کرد.

از انواع سیلرهای ZOE بیس می‌توان به سیلرهای EWT, Endomethasone N و Canals اشاره کرد که در مطالعه Chang و همکاران[۲۰] میزان متوسط سمیت سلولی را از خود نشان دادند. این سمیت سلولی را می‌توان در اوژنول موجود در آن‌ها جستجو کرد. اوژنول باعث افزایش التهاب و ادامه‌دار شدن ضایعه‌ی پری اپیکال می‌گردد. در مطالعه‌ی Huang و همکاران[۳۱] سیلر Canals که سیلر دیگری با بیس ZOE می‌باشد میزان کم‌تری سمیت سلولی نسبت به AH 26، AH Plus و Endomethasone N از خود نشان داد، این نظر با مطالعه‌ی حاضر هم‌خوانی دارد؛ چرا که سیلر tgsealer سمیت سلولی کم‌تری و در حد متوسط نسبت به سیلرهای بیس رزین داشت.

از محدودیت‌های مطالعه‌ی حاضر محدودیت در وجود مطالعات قبلی انجام شده بر روی خواص سیلرهای ADSEAL، AH 26 و MTA Fillapex بود که مقایسه‌ی نتایج این پژوهش با سایر مطالعات را دشوار می‌نمود.

پیشنهاد می‌گردد با توجه به جدید بودن سیلرهای مورد استفاده در این مطالعه، سمیت سلولی سیلرها با سایر روش‌ها مثل تست MMP و بر روی سایر رده‌های سلولی مانند L929، V79 و سلول‌های پالپی انجام گردد؛ هم‌چنین می‌توان در زمان‌های طولانی‌تری اثر سمیت سلولی سیلرها را نیز مورد بررسی قرار داد.

نتیجه‌گیری

براساس نتایج مطالعه‌ی حاضر، سیلر MTA با بیس MTA Fillapex دارای کم‌ترین سمیت سلولی است و سیلر رزین بیس ADSEAL بیش‌ترین میزان سمیت سلولی را در مقایسه با سایر سیلرهای مورد مطالعه دارد.

References

1. Ng YL, Mann V, Rahbaran S, Lewsey J, Gulabivala K. Outcome of primary root canal treatment: systematic review of the literature-Part 2. Influence of clinical factors. Int Endod J 2008; 41(1): 6-31.
2. Bernath M, Szabo J. Tissue reaction initiated by different sealers. Int Endod J 2003; 36(4): 256-61.
3. Bouillaguet S, Wataha JC, Lockwood PE, Galgano C, Golay A, Krejci I. Cytotoxicity and sealing properties of four classes of endodontic sealers evaluated by succinic dehydrogenase activity and confocal laser scanning microscopy. Eur J Oral Sci 2004; 112(2): 182-7.
4. Geurtsen W. Biocompatibility of root canal filling materials. Aust Endod J 2001; 27(1): 12-21.
5. Geurtsen W, Leyhausen G. Biological aspects of root canal filling materials-histocompatibility, cytotoxicity, and mutagenicity. Clin Oral Investig 1997; 1(1): 5-11.
6. Huang T-H, Ding S-J, Hsu T-Z, Lee Z-D, Kao C-T. Root canal sealers induce cytotoxicity and necrosis. J Mater Sci Mater Med 2004; 15(7): 767-71.
7. Harrison JW, Bellizzi R, Osetek EM. The clinical toxicity of endodontic medicaments. J Endod 1979; 5(2): 42-7.
8. Kaplan AE, Ormaechea MF, Picca M, Canzobre MC, Ubios AM. Rheological properties and biocompatibility of endodontic sealers. Int Endod J 2003; 36(8): 527-32.
9. Hauman CH, Love RM. Biocompatibility of dental materials used in contemporary endodontic therapy: a review. Part 2. Root-canal-filling materials. Int Endod J 2003; 36(3): 147-60.
10. Gençog ̂lu N, Turkmen C, Ahiskali R. A new silicon-based root canal sealer (Roekoseal-Automix). J Oral Rehabil 2003; 30(7): 753-7.
11. Sagsen B, Er O, Kahraman Y, Orucoglu H. Evaluation of microleakage of roots filled with different techniques with a computerized fluid filtration technique. J Endod 2006; 32(12): 1168-70.
12. Schweikl H, Schmalz G, Federlin M. Mutagenicity of the root canal sealer AHPlus in the Ames test. Clin Oral Investig 1998; 2(3): 125-9.
13. Huang TH, Yang JJ, Li H, Kao CT. The biocompatibility evaluation of epoxy resin-based root canal sealers in vitro. Biomaterials 2002; 23(1): 77-83.
14. De Almeida WA, Leonardo MR, Tanomaru Filho M, Silva LA. Evaluation of apical sealing of three endodontic sealers. Int Endod J 2000; 33(1): 25-7.
15. Eldeniz A, Mustafa K, Ørstavik D, Dahl J. Cytotoxicity of new resin□, calcium hydroxide-and silicone-based root canal sealers on fibroblasts derived from human gingiva and L929 cell lines. Int Endod J 2007; 40(5): 329-37.
16. Silva EJ, Accorsi-Mendonça T, Almeida JF, Ferraz CC, Gomes BP, Zaia AA. 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.

17. 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 2011; 38(4): 495-500.
18. Roberts HW, Toth JM, Berzins DW, Charlton DG. Mineral trioxide aggregate material use in endodontic treatment: a review of the literature. Dent Mater 2008; 24(2): 149-64.
19. Holland R, de Souza V, Nery MJ, Otoboni Filho JA, Bernabe PFE, Dezan E Jr. Reaction of rat connective tissue to implanted dentin tube filled with mineral trioxide aggregate or calcium hydroxide. J Endod 1999; 25: 161-6.
20. 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.
21. Schwarze T, Leyhausen G, Geurtsen W. Long-term cytocompatibility of various endodontic sealers using a new root canal model. J Endod 2002; 28(11): 749-53.
22. Vajrabhaya L, Sithisarn P. Multilayer and monolayer cell cultures in a cytotoxicity assay of root canal sealers. Int Endod J 1997; 30(2): 141-4.
23. Beltes P, Koulaouzidou E, Kotoula V, Kortsaris AH. In vitro evaluation of the cytotoxicity of calcium hydroxide-based root canal sealers.Endod Dent Traumatol 1995; 11(5): 245-9.
24. Camps J, About I. Cytotoxicity testing of endodontic sealers: A New Method. J Endod 2003; 29(9): 583-6.
25. Sharifian MR, Ghobadi M, Shokouhinejad N, Assadian H. Cytotoxicity evaluation of proroot MTA, Root MTA and portland cement on human gingival fibroblasts. Iran Endod J 2007; 2(3): 91-4.
26. Karapınar-Kazandağ M, Bayrak OF, Yalvaç ME, Ersev H, Tanalp J, Şahin 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.
27. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods 1983; 65(1-2): 55–63.
28. Ferguson JW, Hatton JF, Gillespie J. Effectiveness of Intracanal Irrigants and medications against the yeast Candida albicans. J Endod 2002 Feb; 28(2): 68-71.
29. Ansar MM, Esfandiariy E, Mardani M, Hashemibeni B, Zarkesh-Esfahani SH, Hatef M, et al. A comparative study of aggrecan synthesis between natural articular chondrocytes and differentiated chondrocytes from adipose derived stem cells in 3D culture. Adv Biomed Res 2012; 1: 24.
30. Dahl JE, Frangou-Polyzois MJ, Polyzois GL. In vitro biocompatibility of denture relining materials. Gerodontology 2006; 23(1): 17-22.
31. Huang FM, Tai KW, Chou MY, Chang YC. Cytotoxicity of resin-, zinc oxide-eugenol-, and calcium hydroxide-based root canal sealers on human periodontal ligament cells and permanent V79 cells. Int Endod J 2002; 35(2): 153-8.
32. Zhang W, Li Z, Peng B. Ex vivo cytotoxicity of a new calcium silicate-based canal filling material. Int Endod J 2010; 43(9): 769-74.
33. Schweikl H, Schmalz G. The induction of micronuclei in V79 cells by the root canal filling material AH plus. Biomaterials 2000; 21(9): 939-44.
34. Yoshino P, Nishiyama CK, Modena KC, Santos CF, Sipert CR. In vitro cytotoxicity of white MTA, MTA Fillapex® and Portland cement on human periodontal ligament fibroblasts. Braz Dent J 2013; 24(2): 111-6.

Comparative evaluation of cytotoxicity of four endodontic sealers using human gingival fibroblasts

Hamid Razavian, Abbasali Khademi, Ehsan Mostajeran*, Batool Hashemibeni, Fariba Heydari

Abstract

Introduction: *Biocompatibility is one of the most important properties of endodontic sealers. The aim of the current study was to investigate the cytotoxicity of four endodontic sealers (AH26, MTA Fillapex, tgsealer and ADSEAL) on human gingival fibroblasts in vitro.*
Materials and methods: *In this in vitro experimental study, four endodontic sealers were evaluated in fresh and set states. The fresh and set specimens were separately extracted in RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, USA). The extracts were placed for 1, 3 and 7 days in close contact with* C_{165} *human gingival fibroblast in cell culture. Then the samples cytotoxicity was assessed by MTT assay (3-*(4,5-dimethylthiazol-2-Yl)*-2,5-diphenyltetrazolium bromide) and spectrophotometric analysis. Data were analyzed with multivariate analysis of variance using SPSS 11.5 (α=0.05).*
Results: *The results showed that all the sealers were cytotoxic. According to statistical analysis a significant difference was seen between fresh and set specimens in AH26 (p value = 0.028) but there were no significant differences in ADSEAL (p value = 0.910), MTA Fillapex (p value = 0.952) and tgsealer (p value = 0.566) between the two sealer states. In addition, based on means of all the data of each sealer MTA Fillapex (0.78) had the least cytotoxicity and ADSEAL (0.60) had the highest cytotoxicity.*
Conclusion: *It can be concluded under the limitations of the present study that among the sealers evaluated in the present study MTA Fillapex and ADSEAL had the highest and lowest cytotoxicity, respectively.*

Key words: *Biocompatibility, Cytotoxicity, Endodontic sealers, Fibroblast*

Received: 19 Sep, 2013 **Accepted:** 14 Jan, 2013

Address: Dental Student, Dental Students Research Center, School of Dentistry, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
Email: e_mostajeran1990@yahoo.com

Citation: Razavian H, Khademi A, Mostajeran E, Hashemibeni B, Heydari F. **Comparative evaluation of cytotoxicity of four endodontic sealers using human gingival fibroblasts.** J Isfahan Dent Sch 2014; 10(1): 10-18.