بررسی اثرات خمیر پانسمان پریودنتال همراه با هیدروکسید کلسیم بر سلولهای فیبروبلاست L929 در محیط آزمایشگاه (In-Vitro)

دکتر حمید رضا عرب*#، دکتر جلیل توکل افشاری، دکتر امیر معین تقوی*، دکتر ناصر سرگلزائی*، خانم اعظم بروگ*****

* استادیار گروه آموزشی پریودانتیکس، دانشکده دندانپزشکی و عضو مرکز تحقیقات دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد

** دانشیار و رئیس مرکز تحقیقات ایمونولوژی دانشگاه علوم پزشکی مشهد

*** کارشناس مرکز تحقیقات ایمنولوژی دانشگاه علوم پزشکی مشهد

تاریخ ارائه مقاله : ۸۴/۱۲/۱۳ – تاریخ پذیرش : ۸۵/۵/۲

Title: In-vitro evaluation of periodontal dressing plus calcium hydroxide on L929 fibroblast cells

Authors:
Arab HR. Asistant Professor*#, Tavakol Afshari J. Associate Professor**, Moeintaghavi A. Assistant Professor*, Sargolzaie N. Asistant Professor*, Brook A. Assistant***

Address:
* Dept of Periodontics, School of Dentistry and Dental Research Center of Mashhad University of Medical Sciences, Masshad, Iran.
** Dept of Immunology, Medical School, Bu Ali Research Institute, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.
*** Bu Ali Research Institute, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.

Introduction:
In most cases, after the surgical procedures were completed, the area was covered with a surgical pack. Dentin hypersensitivity is one of the common problems after periodontal surgeries. Calcium Hydroxide is an inexpensive and available material used for desensitizing. The purpose of this study was to evaluate the cytotoxicity of mixture of calcium hydroxide and periodontal dressing on L929 fibroblasts.

Materials & Methods:
In this study Rat fibroblasts were used. For preparing extracts, we added 0, 1, 5 and 10 mg of calcium hydroxide to 1 gr of periodontal dressing. Then, they were placed in autoclave followed by 5^{cc} of basal media (DMEM).A control group consisting of L929 fibroblasts plus basal media was also considered. After 24, 48 and 72 hours incubation, we examined the numbers (quantity) as well as the morphology of the cells (quality). For quantitative evaluation (MTT assay) after adding Tetrazolium salt to cells, we read the optical density of each plate using ELISA reader. The data were analyzed statistically using chi-square and Kruskal wallis test.

Results:
All of the plates had the same quality but the cells in the control group showed more proliferation. All of the plates had plenty of vital and normal fibroblasts but in comparison with the control group the cells had developed less proliferation. Statistical test analysis of the data showed a significant difference between the optical density of the experimental plates and the control group indicating that the number of vital cells in control group was significantly greater than the test groups.

Conclusion:
Because the number of active vital cells in the plates with periodontal dressing was equal to other plates but less than control group, it can be concluded that the cytotoxic effects in the different plates were related to periodontal dressing, not Calcium hydroxide.

Key words:
Calcium hydroxide, fibroblast, L929 cell, periodontal dressing.

 # Corresponding Author: hrarab@yahoo.com

Journal of Dentistry. Mashhad University of Medical Sciences, 2006; 30: 279-88.

مولف مسؤول، آدرس : مشهد، دانشکده دندانپزشکی، بخش پریودانتیکس، تلفن: ۱۷- ۸۸۲۹۵۰۱- ۰۵۱۱

چکیده

مقدمه:

در بیشتر موارد وقتی جراحی پریودنتال تکمیل می گردد، ناحیه مورد عمل توسط پانسمان پریودنتال پوشیده می شود. پس از حذف پانسمان مزبور، حساسیت‌های عاجی از جمله مشکلات شایع بیماران بعد از جراحیهای لثه می‌باشد. یکی از موادی که جهت رفع این مشکل استفاده شده، هیدروکسیدکلسیم است. برای محققین حاضر این تصور وجود داشت که راهی بیابند تا بتوانند از این ماده همراه با پانسمان های پریودنتال استفاده کنند. از طرفی این ظن وجود داشت که به واسطه توان قلیایی بالای هیدروکسید کلسیم ممکن است که همراه نمودن آن با خمیر پانسمان پریودنتال اثرات سوئی بر روی بافت لثه باقی گذارد. هدف از این مطالعه بررسی اثرات سیتوتوکسیک پانسمان پریودنتال حاوی هیدروکسید کلسیم بر روی سلولهای فیبروبلاست L929 در محیط آزمایشگاه بود.

مواد و روش ها:

این مطالعه از نوع تجربی بوده و در محیط آزمایشگاهی روی رده L929 سلولهای فیبروبلاست موش انجام گردیده است. سلولها به دو روش کیفی (مشاهده در زیر میکروسکوپ نوری) و کمی (تست MTT) مورد ارزیابی قرارگرفتند. بمنظور تهیه عصاره مورد نظر خمیر پانسمان پریودنتال با مقادیر mg ۰،۱،۵ و۱۰ هیدروکسیدکلسیم مخلوط گردید، سپس اتوکلا و شده و در 5cc محیط کشت DMEM قرار داده شد. پس از انکوباسیون در زمانهای ۲٤، ٤۸ و ۷۲ ساعت عصاره تهیه شده به عنوان محیط کشت استفاده شد و سلولها از لحاظ مورفولوژی بعد از زمان های ۲٤، ٤۸ و ۷۲ ساعت مورد بررسی قرار گرفتند. برای گروه کنترل فقط از سلولهای فیبروبلاست L929 و محیط کشت DMEM فاقد عصاره استفاده شد. در آزمایش کمی به روشMTT پس از اضافه نمودن نمک تترازولیوم به سلولها، جذب نوری توسط دستگاه ELISA reader در هر یک از نمونه‌ها اندازه‌گیری و با استفاده از آزمون Kruskal wallis و Chi-square مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت.

یافته ها:

نمونه‌های مورد نظر در بررسی مورفولوژیک (کیفی) در وضعیت یکسانی قرار داشتند در حالیکه در نمونه کنترل، سلولها رشد بیشتری را نشان دادند. پلیت های مورد نظر حاوی تعداد زیادی از سلولهای فیبروبلاست زنده و واجد خصوصیات سلول فیبروبلاست نرمال بودند ولی نسبت به نمونه کنترل، سلول ها رشد و پرولیفراسیون کمتری داشتند. تجزیه و تحلیل آماری داده‌های حاصل از تست MTT نیز نشان داد که اختلاف معنی داری بین میزان جذب نوری درگروه کنترل با سایر گروهها وجود دارد یعنی درصد سلولهای زنده در گروه کنترل بالاتر از سایر گروه ها بود.

نتیجه گیری:

از این مطالعه می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که اثر سمیت اندکی که در چهار گروه مورد آزمایش مشاهده می‌شد ناشی از ماده پانسمان پریودنتال می‌باشد و هیدروکسید کلسیم در هیچ یک از غلظتهای مورد استفاده دارای اثرات سوء بر رشد سلولها نبوده است.

واژه های کلیدی:

هیدروکسیدکلسیم، فیبروبلاست، سلول L929، پانسمان پریودنتال.

مجله دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد / سال ۱۳۸۵ جلد ۳۰ / شماره ۳و۴

مقدمه:

جراحی های پریودنتال عموماً پس از انجام، توسط پانسمان های پریودنتال پوشیده می شوند از طرفی حساسیت عاجی پس از انجام جراحی های فوق ممکن است به وجود آید به طوری که برخی از بیماران به دلیل همین عارضه از انجام جراحی خودداری می کنند.

هیدروکسید کلسیم ماده ای است که برای رفع حساسیت های عاجی تا کنون به صورت مستقیم بر روی عاج عریان به کار می رفته است[۱].

هیدروکسید کلسیم می تواند با کاهش قطر توبولهای عاجی، سبب کاهش حساسیت های عاجی گردد[۱] همچنین با تحریک میتوز فیبروبلاستهای پالپ، باعث تکثیر این سلولها می شود. فیبروبلاستهای پالپ با تولید الیاف کلاژن درون توبولی، سبب اسکلروز شدن توبولهای عاجی شده و در نهایت باعث کاهش قطر توبولهای عاجی می شود[۱]. Huang در سال ۲۰۰۲[۲] و Reit و همکاران در سال ۱۹۸۰[۳] با آزمایشات متعددی نشان دادند که استفاده از هیدروکسید کلسیم موجب کاهش نفوذپذیری می شود و همچنین در اثر افزایش غلظت یون کلسیم در اطراف الیاف عصبی، تحریک پذیری اعصاب کاهش می یابد. هیدروکسید کلسیم از جهت سهولت کاربرد، سرعت اثر و ارزانی آن ماده ای بسیار مطلوب می باشد. هیدروکسید کلسیم دارای خاصیت ضد باکتریال از طریق لیز بخش لیپیدی LPS نیز می باشد[۴و۵].

Huang و همکارانش نشان دادندکه سیلرهای حاوی هیدروکسید کلسیم در بین سایر مواد مورد آزمایش دارای کمترین اثر سمی بر روی سلولهای فیبروبلاست PDL انسان در محیط کشت هستند[۲].

در زمینه اثرات پانسمان پریودنتال در انساج لثه مطالعات مختلفی صورت گرفته است. Kretch و همکارانش اثر چهار نوع خمیر پانسمان پریودنتال را بر روی محیط کشت سلولهای Hela بررسی نمودند و متوجه شدند که دو نوع خمیر پانسمان حاوی اوژنول شامل PPC و Wondrpak اثر مهاری کمی بر روی رشد سلولها دارند[۶]. Hildebrand و همکاران اثر دو نوع پانسمان حاوی اوژنول (PPC و Wondrpak) و دو نوع بدون اوژنول (Coe-pak و PPC بدون اوژنول) را بر روی سلولهای فیبروبلاست بررسی نمودند[۲]. در این مطالعه، بعد از ۸ ساعت، Wondrpak بیشترین و PPC دارای اوژنول کمترین اثر سمی را بر روی سلولها داشتند. بعد از ۲٤ ساعت Coe-pak بیشترین و PPC بدون اوژنول کمترین اثر سمی را بر روی سلولها داشتند[۷].

Coe-pak، خمیر پانسمان پریودنتال است که بطور رایج مورد استفاده قرار می گیرد شامل دو خمیر می باشد: یکی از خمیرها حاوی زینک اکساید و روغن (برای ایجاد حالت پلاستیکی)، و لوراتیدول (یک ماده ضدقارچ)، می باشد. خمیر دیگر حاوی اسید چرب مایع، رزین، کلروتیمول (یک ماده باکتریواستاتیک) می باشد[۸]. Haugen و همکارانش خصوصیات چسبندگی Coe-pak، Peripac و Wondrpak را به دندان و بافتهای نرم مورد آزمایش قرار دادند[۹].

Haugen و همکاران اثرات سمی Coe-pak و Peripac و Wondrpak را در دو حالت تازه مخلوط شده و سخت شده بر روی محیط کشت سلولهای اپی تلیال بررسی نمودند. در این تحقیق نشان داده شد که هر سه ماده دارای اثرات سمی بالایی می باشند. در هر حال آزمایش بر روی محیط کشت سلول، دارای کاربرد اندکی برای ارزیابی اثرات سمی پانسمان پریودنتال می باشد. چرا که عناصر سمی موجود در پانسمان پریودنتال توسط بزاق، خون، مایع بافتی و دفاع سلولی رقیق می شوند[۱۰]. همچنین Alpar و همکاران[۱۱] میزان سمیت مواد پانسمان پریودنتال مختلف را بر روی سه نوع سلول شامل: سلولهای فیبروبلاست لثه انسان (HGF) و سلولهای شبه استخوانی انسان (Hobl) با منشأ استخوان آلوئولار و فیبروبلاست های موش (3T3) بررسی نمودند. در این مطالعه مشخص شد که اغلب عصاره های مواد پانسمان پریودنتال شامل: Vocopak، Peripak و Barricaid دارای اثر مهاری بر

روی رشد سلولهای HGF نمی باشند، درحالیکه Coe-pak بطور مشخص میزان پرولیفراسیون سلولهای HGF را در مقایسه با نمونه های کنترل کاهش داد.

هیدروکسیدکلسیم دارای وزن ملکولی ۷٤/۱ و PH حدود ۱۲-۱۱ است. کلسیم ٥٤/۰۹ درصد، هیدروژن ۲/۷۲ درصد و اکسیژن ٤۳/۱۹ درصد آن را تشکیل می دهد. کریستالهای آن نرم، گرانوله یا به شکل پودر هستند. مزه هیدروکسید کلسیم کمی تند و حالت قلیایی دارد. هیدروکسید کلسیم به آسانی با CO_2 هوا ترکیب شده و تشکیل $CaCo_3$ می دهد. هیدروکسید کلسیم وقتی می سوزد آب از دست می دهد و ایجاد CaO می کند. هیدروکسید کلسیم ماده ای است که به مقدار جزئی در آب، گلیسرول و شکر قابل حل بوده، ولی در الکل غیر محلول می باشد. این ماده دارای PH بالا می باشد و مواد مختلفی که با آن ترکیب می شوند می توانند روی PH آن تأثیر بگذارند.

هدف این مطالعه آن بود که در محیط آزمایشگاهی به بررسی اثرات این ترکیب بر روی سلولهای فیبروبلاست L929 بپردازیم.

مواد و روش ها:

در این مطالعه، برای بررسی میزان تاثیر مواد مورد نظر، از سلولهای فیبروبلاست از نوع L929، استفاده شد. مراحل آماده سازی به روش زیر انجام گرفت. ابتدا عمل Reterive انجام شد برای این کار سلولهای L929 را از تانک ازت خارج کرده و برای حذف DMSO (محلول نگهدارنده)، سلولها ۳ بار شستشو داده شدند برای این منظور ابتدا یخ سلولها را با ۲cc محیط کشت (RPMI 1640) ذوب کرده و سپس به سوسپانسیون حاصل، ۳cc نرمال سالین برای رقیق تر شدن DMSO افزودیم. سپس سانتریفوژ گردیده و سوپرناتانت آن حذف گردید (شستشوی اول). در مرحله بعد به رسوب سلولی باقیمانده ٤cc نرمال سالین افزوده شد و رسوب سلولی به صورت سوسپانسیون درآورده، سانتریفوژ کردیم تا سوپرناتانت آن حذف شود (شستشوی دوم). این مرحله شستشو یکبار دیگر نیز تکرار شد.

پس از مراحل شستشو به رسوب حاصله، محیط کشت اضافه شد سپس سوسپانسیون حاصل به فلاسک ٥۰ml منتقل شده و انکوباسیون انجام دادیم. پس از گذشت ۳ تا ٥ روز و پر شدن سلولها در کف فلاسک (Confluent شدن سلولها)، سلولها پاساژ داده شدند. برای این منظور به فلاسک حاوی سلول، ۰/٥cc تریپسین (۰/۲٥٪) اضافه شده و به مدت ۲ دقیقه انکوبه گردید تا سلولها از کف فلاسک جدا شدند و بعد از این عمل برای حذف تریپسین، سه بار شستشو به وسیله محلول هانکس انجام شد. سلولها پس از مرحله آخر شستشو، شمارش شده و در چند فلاسک کشت داده شدند. پس از ۳ بار پاساژ دادن، سلولها جهت آزمایشات آماده بودند.

برای تهیه عصاره مورد نظر، چهار نوع نمونه تهیه شد.

نمونه اول: شامل ۱ گرم خمیر پانسمان پریودنتال که از مخلوط نمودن متناسب هر یک از خمیر های Base و Catalyst تهیه شد.

نمونه دوم: شامل ۱ گرم خمیر پانسمان پریودنتال که قبل از اتمام Setting time، با ۱ میلی گرم پودر هیدروکسید کلسیم مخلوط گردید.

نمونه سوم: شامل ۱ گرم خمیر پانسمان پریودنتال که مطابق روش فوق با ٥ میلی گرم پودر هیدروکسید کلسیم مخلوط گردید.

نمونه چهارم: شامل ۱ گرم خمیر پانسمان پریودنتال که با ۱۰ میلی گرم پودر هیدروکسید کلسیم مخلوط گردید.

در این مطالعه، جهت بررسی اثر عصاره مواد مورد نظر از دو روش کیفی (مشاهده در زیر میکروسکوپ نوری) و کمی (با استفاده از تست MTT) استفاده شد.

الف: **بررسی کیفی:**

برای انجام این آزمایش، هر یک از چهار نمونه فوق به منظور حذف هرگونه آلودگی احتمالی، اتوکلاو شده و در ۵cc محیط کشت DMEM قرار داده شدند. پس از انکوباسیون در زمانهای ۲٤، ٤۸ و ۷۲ ساعت عصاره تهیه شده جایگزین محیط کشت سلولها گردید. سلولها قبلاً در محیط کشت DMEM و ۱۰٪ FBS به همراه پنی سیلین ۱۰۰mg/ml و استرپتومایسین ۱۰۰mg/ml کشت داده شدند. پس از اینکه عصاره مورد نظر جایگزین محیط کشت گردید، در زمانهای ۲٤، ٤۸ و ۷۲ ساعت سلولها از لحاظ مورفولوژی (کیفی) در زیر میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفتند. برای سهولت انجام کار، نمونه های فوق در سه گروه قرار داده شوند.

گروه اول:

در این گروه، به لوله های آزمایش حاوی هر کدام از چهار نمونه فوق، ۵cc محیط کشت DMEM اضافه شده و نمونه ها به مدت ۲٤ ساعت به منظور به دست آوردن عصاره مواد مورد آزمایش، انکوبه شدند. پس از انکوباسیون، محیط کشت DMEM که حاوی عصاره هر یک از چهار نمونه مورد آزمایش می باشد، به جای محیط کشت سلولهای L929، که از قبل در پلیت های مورد نظر کشت داده شده اند قرار گرفت. سپس سلولها از لحاظ مورفولوژیک بعد از زمان های ۲٤، ٤۸ و۷۲ ساعت در زیر میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفتند. یک نمونه نیز که حاوی سلولهای L929 و محیط کشت DMEM، بدون عصاره مواد مورد نظر می باشد به عنوان نمونه کنترل همراه ٤ نمونه قبل، در هر یک از زمانهای فوق مورد بررسی قرار گرفت. تصاویر میکروسکوپی مربوط به هر یک از نمونه ها به رایانه منتقل شده و از آن عکس گرفته شد.

گروه دوم:

در این گروه، به لوله های آزمایش حاوی هر کدام از چهار نمونه فوق، ۵cc محیط کشت DMEM اضافه شده و نمونه ها به مدت ٤۸ ساعت به منظور به دست آوردن عصاره مواد مورد آزمایش، انکوبه شدند. پس از انکوباسیون، محیط کشت DMEM که حاوی عصاره هر یک از چهار نمونه مورد آزمایش می باشد، به جای محیط کشت سلولهای L929، که از قبل در پلیت های مورد نظر کشت داده شده اند قرار گرفت.

گروه سوم:

در این گروه، به لوله های آزمایش حاوی هر کدام از چهار نمونه فوق، ۵cc محیط کشت DMEM اضافه شده و نمونه ها به مدت ۷۲ ساعت به منظور به دست آوردن عصاره مواد مورد آزمایش، انکوبه شدند. پس از انکوباسیون، محیط کشت DMEM که حاوی عصاره هر یک از چهار نمونه مورد آزمایش می باشد، به جای محیط کشت سلولهای L929، که از قبل در پلیت های مورد نظر کشت داده شده اند قرار گرفت.

ب: **بررسی کمی:**

جهت بررسی کمی سلولها با استفاده از MTT assay، نمونه ها طبق روش شرح داده شده تهیه

شدند. سلولهای L929 در پلیت های ۹۶ خانه به گونه ای کشت داده شدند که در هر چاهک (Well) ۲۵۰۰ سلول فیبروبلاست L929 به همراه ۲۰۰ میکرو لیتر محیط کشت DMEM باشد. سپس به هر یک از نمونه های مورد نظر، ۳ چاهک اختصاص داده شد.

پس از اضافه نمودن نمک تترازولیوم، میزان جذب نوری هر یک از نمونه ها توسط دستگاه ELISA reader اندازه گیری و یادداشت شده و داده های به دست آمده مورد بررسی و تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. در این مطالعه جهت تحلیل داده ها از آزمون Kruskal- wallis استفاده شد.

یافته ها:

الف) بررسی کیفی سلولها (مشاهده مورفولوژی سلولها در زیر میکروسکوپ نوری)

نتایج گروه اول:

در بررسی مورفولوژیک (کیفی) سلولها بعد از هریک از زمانهای ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، تمام نمونه‌ها از لحاظ مورفولوژی سلولی در وضعیت یکسانی قرار داشتند و پلیت‌های موردنظر حاوی تعداد زیادی از سلولهای فیبروبلاست زنده و واجد خصوصیات سلول فیبروبلاست نرمال بودند ولی نسبت به نمونه کنترل سلولها رشد و پرولیفراسیون کمتری داشتند.

نتایج گروه دوم:

در این گروه نیز مانند گروه قبلی در بررسی مورفولوژیک بعد از هر یک از زمانهای ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تمام نمونه ها (بجز نمونه کنترل) از لحاظ مورفولوژی سلولی در وضعیت یکسانی قرار داشتند. پلیت‌های مورد نظر حاوی تعداد زیادی از سلولهای فیبروبلاست زنده و واجد خصوصیات سلول فیبروبلاست نرمال بودند ولی نسبت به نمونه کنترل سلولها رشد و پرولیفراسیون کمتری را نشان دادند.

نتایج گروه سوم:

در این گروه نیز مانند دو گروه قبل در بررسی مورفولوژیک بعد از هر یک از زمانهای ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تمام نمونه‌ها (بجز نمونه کنترل) از لحاظ مورفولوژی سلولی در وضعیت یکسانی قرار داشتند. پلیت‌های مورد نظر حاوی تعداد زیادی از سلولهای فیبروبلاست زنده و واجد خصوصیات سلول فیبروبلاست نرمال بودند ولی نسبت به نمونه کنترل، سلول‌ها رشد و پرولیفراسیون کمتری داشت.

ب) بررسی کمی سلولها با MTT assay

برای مقایسه داده های بدست آمده از تست MTT، نمونه ها در پنج گروه تقسیم بندی شدند (جدول ۱).

گروه اول: شامل نمونه های کنترل (حاوی سلولهای L929 و محیط کشت DMEM بدون اضافه نمودن عصاره).

گروه دوم: شامل نمونه های حاوی عصاره پانسمان پریودونتال به تنهایی.

گروه سوم: شامل نمونه های حاوی عصاره پانسمان پریودنتال همراه با یک میلی گرم هیدروکسید کلسیم.

گروه چهارم: شامل نمونه های حاوی عصاره پانسمان پریودنتال همراه با پنج میلی گرم هیدروکسید کلسیم.

گروه پنجم: شامل نمونه های حاوی عصاره پانسمان پریودنتال همراه با ده میلی گرم هیدروکسید کلسیم.

در هر یک از گروه ها ۹ داده بدست آمد. ۳ تا از داده ها مربوط به انکوباسیون در ۲۴ ساعت بود (که پس از اضافه نمودن عصاره به سلولها در زمانهای ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، جذب نوری اندازه گیری شد). همچنین ۳ تا از داده ها مربوط به انکوباسیون ۴۸

ساعته بود (که در زمانهای ٢٤، ٤٨ و ٧٢ ساعت، جذب نوری در نمونه ها اندازه گیری شد) و ٣ داده نیز مربوط به انکوباسیون ٧٢ ساعت (که این نمونه ها نیز بعد از ٢٤، ٤٨ و ٧٢ ساعت جذب نوری در آنها اندازه گیری شد).

جدول ١ : بررسی توزیع فراوانی و میانگین سطوح جذب نوری (OD) در گروههای مورد آزمایش

میزان جذب نوری	گروه ١		گروه ٢		گروه ٣		گروه ٤		گروه ٥	
	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد
کمتر از ٨٥٪	٣	٣٣/٣	٧	٧٧/٨	٤	٤٤/٤	٧	٧٧/٨	٦	٦٦/٧
٩٠٪ – ٨٥٪	٣	٣٣/٣	١	١١/١	٤	٤٤/٤	٢	٢٢/٢	١	١١/١
بیشتر از ٩٠٪	٣	٣٣/٣	١	١١/١	١	١١/١	–	–	٢	٢٢/٢
کل	٩	١٠٠	٩	١٠٠	٩	١٠٠	٩	١٠٠	٩	١٠٠
میانگین و انحراف معیار	٠/٨٨±٠/٠٤٧		٠/٨٣±٠/٤١		٠/٨٤±٠/٣٦		٠/٨١±٠/٣٨		٠/٨٤±٠/٥١	
نتیجهٔ آزمون	*P-value* = 0.045						*df* = 4		$X^2 = 9.7$	

بر اساس جدول فوق مشاهد می‌شود که بیشترین درصد جذب نوری بالای ٩٠٪ مربوط به گروه (١) یعنی گروه کنترل می‌باشد. در این گروه جذب نوری در سه سطح فوق یکسان می‌باشد. آزمون Kruskal-wallis بین گروه‌های فوق از نظر جذب نوری تفاوت آماری معنی داری نشان داد (P=٠/٠٤٥) و با آزمون من-ویتنی مشخص گردید که این تفاوت بین گروه ١ (با میانگین رتبه ٤/٥٦) با بقیه گروه ها می باشد (P =٠/٠٠٣). بقیه گروه ها با یکدیگر در میزان جذب نور تفاوت معنی داری نداشتند.

بحث:

حساسیت‌های عاجی از مشکلات شایعی است که بسیاری از بیماران به اشکال گوناگون از آن شکایت دارند. یکی از عواملی که سبب بروز این مشکل می‌شود، جراحی های لثه است که سبب عدم رضایت برخی از بیماران از درمانهای لثه می گردد. تا کنون درمانهای بسیاری برای این مشکل پیشنهاد شده است. از جمله این مواد که ارزان قیمت و کاملاً در دسترس می‌باشد هیدروکسیدکلسیم است که تأثیر آن بر حساسیت‌های فوق به اثبات رسیده است[١٢].

هیدروکسید کلسیم را می‌توان به طرق مختلف استفاده نمود از جمله استفاده مستقیم برای نواحی اکسپوز عاج که نیاز به درمان در جلسات متعدد و مراجعه مکرر بیمار دارد. یکی دیگر از راههای استفاده از هیدروکسیدکلسیم جهت کاهش حساسیت‌های عاجی می تواند اضافه نمودن این ماده به خمیر پانسمان پریودنتال باشد. لذا هدف در این مطالعه بررسی اثرات افزودن هیدروکسیدکلسیم به خمیر پانسمان پریودنتال روی سلولهای فیبروبلاست در

شرایط آزمایشگاهی است. بنابراین دلایل استفاده از سلول فیبروبلاست به شرح زیر است:

اولاً این سلول ٦٥٪ از کل جمعیت لثه را تشکیل می‌دهد و بیشترین تعداد را در بین سلولهای بافت همبند لثه دارد[۱۱]. دوماً مسؤول بازسازی بافت همبند لثه است یعنی اینکه الیاف مختلف از جمله کلاژن را ساخته و الیاف از بین رفته را فاگوسیت می‌نماید. سوماً در محیط آزمایشگاه قابل کشت می‌باشد. می توان از سلولهای اپی تلیالی نیز استفاده نمود که از محدودیتهای مطالعه حاضر عدم استفاده از این چنین سلولها به دلیل عدم وجود امکانات لازم برای کشت سلولهای فوق بوده است. اگر پانسمان پریودنتال همراه با هیدروکسید کلسیم تأثیر شدید برروی نسج لثه نداشته باشد در مطالعات کلینیکی می توان به ارزیابی تأثیر آن بر روی حساسیت‌های عاجی پرداخت.

در این مطالعه هم ارزیابی کیفی شامل بررسی مورفولوژیک با میکروسکوپ نوری و هم ارزیابی کمی با بررسی آزمایشات فانکشنال سلول جهت کفایت سیستم دهیدروژناز میتوکندریایی با استفاده از MTT assay صورت گرفت. از نکات مثبت این مطالعه آن است که آنچه بصورت کیفی در زیر میکروسکوپ نوری مشاهده گردید بوسیله MTT assay بصورت کمی نیز ارزیابی شد. از آنجا که در MTT assay که یک تست کالریمتریک است به ارزیابی فعالیت دهیدروژنارمیتوکندری سلول فانکشنال در تبدیل نمک تترازولیوم زرد رنگ به یک ترکیب ارغوانی نا محلول بنام فورمازان پرداخته می شود بنابراین، واکنش تنها در سلول زنده‌ای صورت می‌پذیرد که علاوه بر زنده بودن از نظر متابولیک فعال است.

در این مطالعه در بررسی مورفولوژیک (کمی) سلولها در تمام گروههای مورد آزمایش زنده بودند ولی در گروه کنترل نسبت به چهار گروه دیگر سلولها رشد بهتری را نشان دادند. در چهار گروه فوق سلولها از لحاظ موروفولوژیک در وضعیت یکسانی قرار داشتند. همچنین در بررسی درصد سلولهای زنده توسط تست MTT گروه کنترل نسبت به سایر گروهها درصد سلولهای زنده بیشتری داشت. به عبارت دیگر تفاوت معنی داری بین گروه کنترل با سایر گروهها وجود داشت (P-value=۰/۰۰۳) و میزان حداقل و حداکثر جذب نوری که رابطه مستقیم با تعداد سلولها دارد در گروه کنترل بالاتر از سایر گروهها بود.

همانطوری که قبلاً گفته شد، گروه (۱) حاوی عصاره پانسمان پریودنتال (Coe-pak) به تنهایی بود و از آنجا که درصد سلولهای زنده و فعال در این گروه با سایر گروههای مورد آزمایش برابر بود می‌توان چنین نتیجه گیری نمود که اثر سمیت اندکی که در چهار گروه مورد آزمایش مشاهده شد ناشی از ماده پانسمان پریودنتال (Coe-pak) بوده است و هیدروکسید کلسیم در هیچیک از غلظتهای مورد استفاده در این آزمایش اثرات سوء بر رشد سلولها نداشته است. در مطالعات دیگر نیز اثر مواد پانسمان پریودنتال مختلف برروی سلولهای فیبروبلاست مورد بررسی قرار گرفته است.

Hildebrand و همکاران[۷] اثر چهار نوع ماده پانسمان پریودنتال مختلف شامل: PPC حاوی اوژنول، Wondrpak ، Coe- pak، PPC بدون اوژنول را برروی سلولهای L929 بررسی نمودند. در این مطالعه نمونه ها بعد از ۱، ۲، ٦، ۸ ساعت مورد بررسی قرار گرفتند. این مطالعه نشان داد که هر چهار نوع ماده

مورد آزمایش دارای اثرات سایتوتوکسیسیتی محدودی برروی سلولهای L929 بودند. همچنین در مطالعه فوق ماده پانسمان Coe-pak که در مطالعه حاضر نیز استفاده شد، بعد از ۲٤ ساعت دارای بیشترین اثر سمی برروی سلولها نسبت به سایر مواد مورد آزمایش بود.

Alpar و همکاران در سال ۱۹۹۹[۱۱] میزان سازگاری سلولی چهارنوع پانسمان پریودنتال شامل: Coe-pak و Voco pac و Peri pac و Barricard را در محیط کشت سلولهای فیبروبلاست لثه انسان (HGF) بررسی نمودند. در این مطالعه Coe-pak بطور مشخص میزان پرولیفراسیون سلولهای HGF را در مقایسه با نمونه‌های کنترل کاهش داد. در مورد تأثیر هیدروکسید کلسیم به همراه پانسمان پریودنتال برروی سلولهای فیبروبلاست تاکنون مطالعه‌ای انجام نگرفته است. Huang در سال ۲۰۰۲[۲] نشان داد که سیلرهای حاوی هیدروکسید کلسیم در بین سایر مواد مورد آزمایش دارای کمترین اثر سمی برروی سلولهای فیبروبلاست PDL انسان در محیط کشت هستند. بنابراین نتایج مطالعه حاضر هیچگونه تضادی با نتایج سایر مطالعات انجام شده در این زمینه ندارد. در هر حال نتایج بدست آمده از آزمایشات کشت سلولی را نمی‌توان بطور کامل به شرایط موجود در محیط دهان تعمیم داد چرا که بسیاری از اجزاء پانسمان پریودنتال که در محیط کشت ممکن است اثر سمی برروی سلولها داشته باشند در محیط دهان توسط بزاق، خون، مایع میان بافتی و دفاع سلولی رقیق شده و یا از بین می روند.

نتیجه گیری:

اضافه نمودن هیدروکسیدکلسیم به خمیر پانسمان پریودنتال جهت کاهش حساسیت‌های عاجی بعد از جراحی های لثه باعث افزایش خاصیت سمی پانسمان پریودنتال برروی سلولهای فیبروبلاست لثه نمی گردد و لذا پیشنهاد می شود اثر این ماده جهت برطرف نمودن و یا کاهش حساسیت‌های عاجی که یکی از شکایات عمده بیماران بعد از جراحیهای لثه می باشد، در کلینیک ارزیابی شود.

منابع:

1. Dababneh RH, Khouri AT, Addy M. Dentine hypersensitivity-on enigma? A review of terminology, epidemiology, Mechanism, etiology and management. Br Dent J 1999; 187(11): 606-11.
2. Huang FM, Tai KW, Chou MY, Chang YC. Cytotoxicity of resin, Zinc oxid - eugenol and calcium hydroxide - based root canal sealer on human periodontal ligament cells and permanent V79 cells. J Int Endod 2002; 35(2): 153-8.
3. Reit C, Dahlen G. Decision making analysis or endodontics treatment strategies in teeth with apical periodontitis. J Int Endod 1988; 21(5): 291-9.
4. Morrier J, Benay G, Hartmann C, Barsotti O. Antimicrobial Activity of Ca(OH)2 Dental cements: An in vitro study. J Eendod 2003; 29(1): 51-54.
5. Estrela C. Control of microorganism in vitro by calcium hydroxide pastes. J Int Endod 2001; 34(5): 341-5.
6. Kreth KK, Zimmermann ER, Collings CK. Effect of periodontal dressings on tissue culture cells. J Periodontol 1966; 37(1): 48-53.

7. Hildebrand CN, De Renzis FA. Effect of periodontal dressing on fibroblast in vitro. J Periodont Res 1974; 9(2):114-20.
8. Newman MC, Takai H, Carranza FA. Clinical periodontology. 9th ed. New York: W.B. Sunders Co; 2002. P. 725.
9. Haugen E, Espevik S, Mjor IA. Adhesive properties of periodontal dressing. J Periodent Res 1977; 14(6): 487-91.
10. Haugen E, Henesten-Pettersen A. In vitro cytotoxicity of periodontal dressing. J Dent Res 1978; 57(3): 495-9.
11. Alpar B, Gunay H, Geurtsen W, Leyhausen G. Cytocompatibility of periodontal dressing materials in fibroblast and primary human osteoblast - like cultures. Clin Oral Invesing 1999; 3(1): 41-8.
12. Jan Lindhe, Thorkild, Niklaus P, Lang J. Clinical periodontogy and implant dentistry. 4th ed. Black well: CopenHaugen; 2003. P. 190.