بررسی سمیت سلولی سیلر Endoseal MTA به عنوان ماده ترمیم کننده پرفوراسیون کانال ریشه، بر روی سلول های فیبروبلاست لثه 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 [۴و۵]، 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 Dadgar [2], Abbas Mesgarani [3], Mahmood Moosazadeh [4,5], Fatemeh Zaghi Hosseinzadeh [6]
[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, Deapartment 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 dilusions 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 ½ 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 .

---

* مؤلف مسؤول، نشانی: ساری، دانشکده دندانپزشکی، گروه اندودانتیکس، تلفن: ۰۱۱۳۳۳۰۳۹۴۷

E-mail: Somidi@mazums.ac.ir

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 لثه انسانی در مقایسه با Pro Root MTA ایرانی و CEM توسط تست MTT بود.

مواد و روش ها: MTA، CEM و Endoseal MTA آماده شدند و ۷۲ ساعت بعد از ست شدن، ۴۸ ساعت درتماس با محیط کشت قرار گرفتند. سپس فیبروبلاست های لثه 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 MTTبررسی 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 درنظرگرفته شدند.

یافته ها: در رقت ۱/۲، بین درصد حیات سلولی 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.

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 بافت‌های حمایت کننده و سطح خارجی ریشه دندان است.[۱] پرفوریشن‌های 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 پرفوریشن‌ها می‌باشند و می‌تواند 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 بافت‌های پری رادیکولر، رخ دهند و اگر ترمیم نشوند، می‌توانند 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 پریودنشیم قرار می گیرد، باید به طور ایده آل دارای خواصی از جمله زیست سازگاری بالا، باکتریواستاتیک و رادیواپک، صرفه اقتصادی، توانایی سیل مناسب، توانایی القای استخوان سازی و سمان سازی، غیرسمی و غیرپوسیدگی زا باشد.[۱] هیچ ماده ای تمام ویژگی‌های ذکر شده را ندارد و مواد سیل کننده و تکنیک‌های متعددی طی سال‌ها با موفقیت‌های متفاوت آزمایش شده‌اند.[۲]

در قدیم موادی از جمله آمالگام، گوتا پرکا، سمان‌های زینک اکساید و سمان گلس اینومر، کلسیم هیدروکساید و کامپوزیت استفاده می‌شدند. امروزه مواد جدیدتری ازجمله 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 ۱۹۹٤ به عنوان ماده ترمیم کننده پرفوریشن، معرفی گردید.[۳] MTA با سازگاری نسجی بالا و توانایی sealing بهتر از آمالگام و ZOE، به صورت پودر موجود است و با رطوبت ست می‌شود.[٤]

سمان CEM در سال ۲۰۰٦ به عنوان ماده ی پر کننده اندودنتیک در دندانپزشکی معرفی شد.[٦-٤] موارد استفاده کلینیکی آن مانند MTA می‌باشد، خواص آنتی باکتریالی

مانند کلسیم هیدروکساید و بیشتر از MTA و همچنین زیست سازگاری بالا و سمیت سلولی کمی دارد.[۷و۸]

یکی از معایب دو ماده ی فوق کارکردن سخت و قراردهی مشکل آنها در محل پرفوریشن، به خصوص پرفوراسیون های کانال می باشد.[۸و۹]

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.[۱۰و۱۱] خواص آن با MTA قابل مقایسه است و از نظر زیست سازگاری از AHplus برتر است.[۱۲و۱۳]

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.[۱٤]

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.[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 اینکهEndoseal MTAیک سیلر نسبتا جدید می‌باشد که کار کردن با آن (قابلیت تزریق با سرنگ) ساده‌تر است و سازندگان آن ادعا دارند که می‌توان از آن 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 برروی سلول‌های فیبروبلاست لثه ای انسان بررسی کنیم و آن را با زیست سازگارترین مواد (MTA و CEM) مقایسه کنیم.

مواد و روش ها

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, Iran)، CEM (Bionique Dent, Iran) و Endoseal MTA (Maruchi, South Korea) استفاده شد.

برای تهیه محیط کشت سلول‌ها، مقدار ۱۳/٤۸ 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 ۷/٤ 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 ۱۰درصد (۱ میلی لیتر به ازاء ۹ میلی لیتر محیط کشت) و آنتی بیوتیک (۱۰۰ml/U پنی سیلین و ۱۰۰ ml/µ استرپتومایسین) اضافه گردید.

سلول‌های رده فیبروبلاست لثه 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

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 ۲میلی متر) قرار داده شدند (برای هر ماده ۱ چاهک). پس از استریل کردن توسط نور فرابنفش، به مدت ۷۲ ساعت در انکوباتور قرارداده 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 ٤٨ 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 کشتDMEM حاوی آنتی بیوتیک و ۱۰٪ FBS رقیق نموده تا رقت‌های ۱/۲، ۱/٤، ۱/۸، از هر یک مواد به طور جداگانه تهیه شود.

جهت بررسی سمیت سلولی، سلول‌های ردهٔ فیبروبلاست لثه ای انسان را از تانک ازت خارج و در فلاسک کشت cm^2 ۷۵ حاوی محیط کشتDMEM 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 پرولیفراسیون طبیعی آن‌ها، سلول‌ها را با تریپسین 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 ٢٤ ساعت در انکوباتور تحت شرایط استاندارد ذکر شده در بالا قرار دادیم تا سلول‌ها به کف پلیت بچسبند. بعد از ٢٤ ساعت سلول‌ها با عصاره سیلرهای MTA، CEM و Endoseal MTA در رقتهای ذکر شده به مدت ٢٤ 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.

MTT (methyl-thiazol-tetrazolium)، از تست‌های 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 پرولیفراسیون 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، ml ۲۰ 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 ٥٤٥ نانومتر (با رفرنس٦٣٠ نانومتر) توسط دستگاه ELISA reader (Awareness Technology Inc.) تعیین شد. درصد سلول‌های زنده از رابطه زیر محاسبه گردید:

(میانگین جذب نوری چاهک های کنترل / جذب نوری هر چاهک) × ۱۰۰ = درصد سلولهای زنده

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. مقادیرP کمتر از ۰/۰۵، معنادار درنظرگرفته شد.

یافته ها

میانگین درصد حیات سلولی مواد مختلف در رقت های 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 ۱/٤ و ۱/۸ نیز مشابه رقت ۱/۲، CEM بیشترین درصد حیات سلولی را 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).

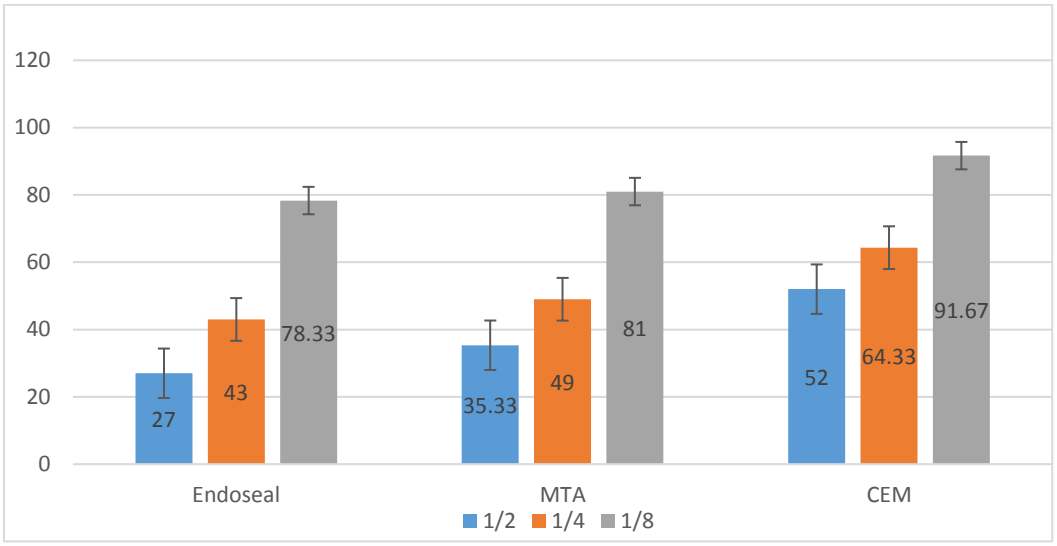
بر اساس نتایج آزمون Tukey و مقایسه میانگین درصد حیات سلولی سیلرها با یکدیگر، در رقت ۱/۲ بین درصد حیات سلولی سیلر CEM و Endoseal MTA و همچنین MTA و CEM ارتباط معنادار وجود داشت. در رقت ۱/٤ و ۱/۸ بین درصد حیات سلولی سیلرهای مختلف ارتباط معناداری یافت نشد (جدول ۲).

جدول ۱ : میانگین درصدحیات سلولی مواد در رقت های مختلف

رقت	MTA	CEM	Endoseal MTA	سطح معنی داری (آنالیز واریانس دو عاملی)		
				رقت	مواد	رقت× مواد
۱/۲	۳۵/۳۳	۵۲	۲۷	<۰/۰۰۱	<۰/۰۰۱	۰/٦۷۳
۱/٤	٤۹	٦٤/۳۳	٤۳			
۱/۸	۸۱	۹۱/٦۷	۷۸/۳۳			

جدول ۲ : آزمون Tukey و مقایسه ارتباط سیلرهای مختلف با رقت های مشابه بصورت گروه های دوتایی

		اختلاف میانگین	فاصله اطمینان ۹۵درصد	P-value
رقت ۱/۲	EndoSeal – MTA	-۸/۳۳	-۲۰/۲۳ تا ۳/٥٦	۰/۰۹۸٥
	EndoSeal – CEM	-۲٥/۰۰	-٤٥/٦۰ تا -٤/٤۰	۰/۰۳٤۳
	MTA – CEM	-۱٦/٦۷	-۲٥/۳۹ تا -۷/۹٤	۰/۰۱٤۲
رقت ۱/٤	EndoSeal – MTA	٦/۰۰	-۹۱/۳۱ تا ۷۹/۳۱	۰/۹۹٤۳
	EndoSeal – CEM	-۲۱/۳۳	-٦٤/۹۷ تا ۲۲/۳۰	۰/۱۸۹۳
	MTA – CEM	-۱٥/۳۳	-٦۸/٤۲ تا ۳۷/۷٥	۰/٤۳٦۰
رقت ۱/۸	EndoSeal – MTA	-۲/٦۷	-٤٦/۳۰ تا ٤۰/۹۷	۰/۹۹۷۷
	EndoSeal – CEM	-۱۳/۳۳	-٥۱/۳۷ تا ۲٤/۷۱	۰/۳۲۸٥
	MTA – CEM	-۱۰/٦۷	-۲۸/۱۲ تا ٦/۷۹	۰/۱۲٦۹



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

بحث

دستیابی به موفقیت بلند مدت درترمیم پرفوریشن ها، به اندازه پرفوریشن، زمان سپری شده ازوقوع 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 پریودنشیوم 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 پرفوریشن‌ها می باشد. CEM، یک بایومتریال اندودانتیک هیدروفیلیک است. میتواند در محیط مرطوب ست شود و درنتیجه برای ترمیم پرفوراسیون ایده آل است. MTA و CEM دو بایومتریال ایده آل برای ترمیم پرفوراسیون ها می باشند.[۲۰و۲۱] Endoseal MTA ، سیلری متشکل از سیلیکات کلسیم، آلومینات کلسیم، سولفات کلسیم، ترکیبات رادیوپک 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 نگهدای شده و در هنگام استفاده، رطوبت هوای محیط را جذب می‌نماید و ست می‌شود. بر طبق ادعای سازندگان این سیلر،بستن پرفوریشن یکی از کاربردهای آن میباشد.[۲۲-۲۵] 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 V۷۹، سلول های پروژنیتور گرانولوسیت-ماکروفاژ موش،[۲۶] فیبروبلاست های لثه انسانی[۲۷] و فیبروبلاست های لیگامنت

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 اسپکترفوتومتر اندازه گیری می‌شود.[۱٦] 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 اثرآن را بررسی می‌کنند.[۳۳-۳۱] 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 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.[۳۵و۳٤و۳۱]

در مطالعه ی حاضر بعد از ۲٤ 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[۳٦] 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 ۲٤ 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 L۹۲۹ موش بررسی کردند و جز در بالاترین غلظت (۱۰۰۰µg/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، Angelus MTA، CEM و Biodentine را برروی سلول های بنیادی پالپ دندانی انسانی در فواصل ۲٤، ٤۸ و ۷۲ ساعت با رقت های ۱/۱، ۱/۲، ۱/٤، ۱/۸، ۱/۱٦ و ۱/۳۲ بررسی نمودند. در فاصله ی ۲٤ ساعت، تفاوت معناداری بین سمیت CEM و Angelus MTA دیده نشد. این تفاوت

می تواند مربوط به تفاوت درنوع 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[۲۲] 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 برندMTA مورداستفاده باشد.

Lee و همکاران[۳۹] در مطالعه ی خود سمیت سلولی دو گروه سیلرهای برپایه 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 برروی سلول های بنیادی لیگامان پریودنتال 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.

طبق مطالعه ی Seo و همکاران[۴۰] سمیت سلولی Endoseal MTA از AH plus روی سلول های بنیادی پالپ دندانی انسان به طور معناداری کمتر بود و نسبت به سایر سیلرها ی مورد بررسی از جمله Endosequence BC sealer وBioRoot 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 سیتوتوکسیسیتی، بیواکتیویتی و آزاد سازی یون توسط سیلرهای کلسیم سیلیکاتی بر روی سلول های لیگامان پریودنتال 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 راهم 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]

MTA و Biodentine به ترتیب حاوی زیرکونیوم اکساید و بیسموت اکساید به عنوان رادیواپسیفایر، با سمیت های متفاوت، هستند.[٤٥و٤٦] اما در CEM هیچ یک از این اجزا وجود ندارد و حتی برخلاف MTA باعث نکروز اولیه در بافت نمی شود.[٤٧و٤٨]

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[٢٢و٤٩] AH Plus به دلیل آزادسازی فرمالدئید و یا آمین و اپوکسی رزین در ترکیباتش سمیت بیشتری دارد.[١٠] 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 درنتیجه تشکیل بافت سخت شده و همچنین در بافت های اطراف باعث اخلال در فعالیت استئوکلاست ها و التیام بهتر می شوند.[٢٢]

در هرصورت سیلر Endoseal MTA نسبت به سایر بیومتریال های پرکننده ی پرفوریشن، یون کلسیم کمتری آزاد می کند، پرولیفراسیون سلولی پایین تری دارد و به دلیل خشونت سطحی بیشتر، چسبندگی سلولی کمتری دارد.[٢٥و٣٩و٥٠و٥١] همچنین عموما Endoseal MTA در مقایسه با سایر سیلرها سمیت کمتر یا قابل مقایسه ای دارد[٤٩] 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 ریزنشت نیز باید مورد مقایسه قرار گیرد.

نتیجه گیری

بر طبق نتایج این مطالعه، سیلر Endoseal MTA در غلظت۱/۲، 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 وMTA، می تواند به عنوان ماده پرکننده پرفوراسیون در نظر گرفته شود.

تشکر و قدردانی

این مقاله بر اساس پایان نامه دانشجویی به شماره ی ۳٤٦۱ 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.

منابع

1. Hegde M, Varghese L, Malhotra S. Tooth root perforation repair–A review. Oral Health Dent Manag 2017; 16(2):1-4.
2. 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.
3. Subay RK, Subay MO, Tuzcu SB. Endodontic management of root perforating internal replacement resorption. Eur J Dent 2018;12(3):450-3.
4. 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.
5. 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.
6. Ayatollahi F, Tabrizizadeh 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, Geletneky 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-β1 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, Shahrbabaki 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, Ghoddusi 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. Küçükkaya 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. Mozayeni 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.