بررسی چسبندگی و مورفولوژی سلولهای استئوبلاست انسان در مجاورت MTA سفید، MTA تیره و IRM بعنوان مواد پرکننده انتهای ریشه توسط اسکن میکروسکپ الکترونی

دکتر مریم بیدار*، دکتر جمیله قدوسی*#، دکتر جلیل توکل افشاری، دکتر فاطمه شهرامی***، محمدعلی فهمیده کار*****

* دانشیار گروه اندودانتیکس دانشکده دندانپزشکی و مرکز تحقیقات دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد

** دانشیار گروه ایمونولوژی دانشگاه علوم پزشکی مشهد

*** استادیار گروه اندودانتیکس دانشکده دندانپزشکی و مرکز تحقیقات دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد

**** کارشناس ارشد مرکز تحقیقات ایمونولوژی پژوهشکده بوعلی

تاریخ ارائه مقاله : ۸۴/۸/۲۸ – تاریخ پذیرش : ۸۵/۱/۱۶

Title: Evaluation of adhesion and morphology of human osteoblasts to white MTA/Gray MTA and IRM as root end filling materials by scanning electron microscopy

Authors:

Bidar M. Associate Professor*, Ghoddusi J. Associate Professor*#, Tavakol Afshari J. Associate Professor**, Shahrami F. Assistant Professor***, Fahmideh Kar MA. Master Degree**

Address:

* Dept of Endodontics, School of Dentistry and Dental Research Center of Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.

** Dept of Immunology Bu Ali Research Institute, Mashad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.

*** Dept of Endodontics, Dental School. Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.

Introduction:

Osteoblast and periodontal ligament cells are major cells for wound healing after root end resection. The interaction of osteoblast with directly contact filling materials could plays a critical role in healing of surgical lesion. Adhesion and spreading of cells on material surface are the initial phase for cellular function. The purpose of the present study was the evaluation of morphology and attachment of human osteoblasts in presence of Gray MTA, white MTA and IRM as root end filling material.

Materials & Methods:

This study was a descriptive study the human osteoblasts (MG-63 cell line) were prepared from Iranian Pasteur Institue; Cellular Bank, were grown in PRMI 1640 medium. The testing materials were mixed according to the manufacture's instruction, inserted into the wells of 24-well flat-bottomed plate, and condensed to disk of 1mm thickness and 1×1mm diameter. Cells were added to the materials after two weeks. During 1,3,7 days intervals, the disk of materials along with cells were grown on their surface, examined by a scanning electron microscopy.

Results:

First day: After first day cells in presence of white and gray MTA showed adhesion and normal morphology, in presence of IRM were totally round. Third day: After third day osteoblasts adjacent to white and gray MTA were flat with adhesion to both materials. In presence of IRM they were round and with no attachment.

Seventh day: In seventh day cells appeared with adhesion and normal morphology. Adjacent to IRM cells were round with no attachment.

Conclusion:

The results indicate that human osteoblasts have a favorable response to gray and white MTA compared with IRM.

Key words:

Osteoblast, white MTA (mineral trioxide aggregate), gray MTA, SEM (scanning electeron microscope)

 # Corresponding Author: mbidar 2001@yahoo.com

Journal of Dentistry. Mashhad University of Medical Sciences, 2006; 30: 25-32.

#مولف مسؤول، آدرس: مشهد دانشکده دندانپزشکی، بخش اندودنتیکس، تلفن ۱۷ – ۸۸۲۹۵۰۱ – ۰۵۱۱

چکیده

مقدمه:

استئوبلاست ها و سلول های لیگامان پریودنتال سلول های اصلی برای ترمیم زخم های پس از قطع انتهای ریشه هستند. تداخل بین سلول های استئوبلاست بصورت تماس مستقیم با مواد پرکننده انتهای ریشه نقش حیاتی در ترمیم زخم های جراحی دارند. هدف از این مطالعه ارزیابی مورفولوژی و چسبندگی سلولهای استئوبلاست انسان در مجاورت MTA تیره، MTA سفید و IRM بعنوان مواد پرکننده انتهای ریشه توسط اسکن میکروسکپ الکترونی بود.

مواد و روش ها:

این مطالعه یک مطالعه توصیفی بود. سلول های استئوبلاست انسان رده MG-36 تهیه شده از بانک سلولی انستیتوپاستور ایران در مدیوم RPMI-1640 رشد داده شدند. مواد مورد آزمایش براساس دستور کارخانه سازنده مخلوط شده و در مجاورت سلول های استئوبلاست قرار گرفتند. پس از ۱ و ۳ و ۷ روز در محیط کشت دیسک های حاوی مواد به همراه سلول های رشد کرده بر سطح آنها توسط اسکن میکروسکپ الکترونی مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته ها:

نتایج نشان داد که بسیاری از سلول های استئوبلاست پس از ۷ روز بر سطح هر دو ماده MTA تیره و سفید چسبیدند و به شکل نسبتا گرد (Round) یا پهن (Flat) ظاهر شدند. در مجاورت IRM سلولها بصورت کاملا گرد بدون هیچگونه چسبندگی و گسترش مشاهده شدند.

نتیجه گیری:

این نتایج دلالت بر این دارد که سلول های استئوبلاست انسان در مجاورت MTA تیره و MTA سفید پاسخ مناسبی نشان می دهند و روند ترمیم زخم را تسریع می نمایند.

واژه های کلیدی:

سلول استئوبلاست، MTA (Mineral trioxide aggregate) سفید، MTA (Mineral trioxide aggregate) تیره، اسکن میکروسکپ الکترونی (SEM)

مجله دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد / سال ۱۳۸۵ جلد ۳۰ / شماره ۱و۲

مقدمه:

در بعضی موارد بدنبال انجام درمان ریشه و طی ترمیم پرفوراسیون ها و حتی پس از درمان مجدد ریشه در صورت وجود ضایعات مقاوم به درمان در انتهای ریشه نیاز به درمان جراحی و دسترسی به ضایعه از انتهای ریشه می باشد. مراحل کار عموماً شامل اکسپوز انتهای ریشه و قطع ریشه، آماده سازی حفره در انتهای ریشه و قرار دادن یک ماده پرکننده و در مورد ترمیم پرفوراسیون ها قرار دادن ماده ترمیمی در ناحیه پرفوره در تماس با نسج زنده می باشد[۱].

یکی از اهداف نهایی درمانهای ریشه بازسازی کامل دستگاه اتچمنت پریودنتال صدمه دیده است و چون این مواد در تماس مستقیم با نسج زنده مثل بافت همبند و استخوان قرار می گیرند و بازسازی حقیقی این بافت در گرو عملکرد صحیح استئوبلاست ها، فیبروبلاست ها و سمنتوبلاست ها جهت ترمیم استخوان، PDL و سمنتوم است، بنابراین لازم است از موادی استفاده شود که از نظر سازگاری بافتی و سمیت سلولی ایده آل باشند و همچنین توانایی تحریک ترمیم در این منطقه را داشته باشند[۱].

از جمله موادی که بعنوان ماده پرکننده انتهای ریشه معرفی شده اند می توان به آمالگام، SuperEBA، IRM، کامپوزیت، گلاس آیونومر و یک ماده نسبتا جدید بنام MTA (Mineral trioxide aggregate) اشاره کرد[۱].

گزارشات هیستولوژیکی دلالت بر این دارد که سمنتوم جدید در کنار تعداد اندکی از مواد دندانی وقتی در تماس با بافت پریودنتال قرار می گیرند تشکیل می شود. این مواد شامل MTA، رزین کامپوزیت و هیدروکسی آپاتیت است[۲].

اخیراً MTA بعنوان ماده پرکننده انتهای ریشه بطور گسترده ای استفاده می شود[۱]. مطالعات هیستولوژیک پاسخ استخوان به MTA، بازسازی قابل توجه استخوان را نشان داده که با مواد رتروفیل دیگر ایجاد نشده است[۱].

چون یون های کلسیم و فسفر از اجزاء اصلی بافت سخت دندان و استخوان هستند بنظر می رسد که این ماده یک عامل سازگار بافتی در تماس با سلول ها و بافت باشد[۳]. از طرفی چون PH آن مشابه کلسیم هیدروکساید بالا می باشد (PH =۱۲) تعجب آور نیست که این ماده در ایجاد بافت سخت بعد از کاربرد بعنوان ماده رتروفیل شرکت داشته باشد[٤]. بازسازی سمنتوم جدید در مجاورت MTA یک حالت منحصر بفرد است که هنوز با هیچکدام از مواد رتروفیل دیگر گزارش نشده است[٥].

MTA که ابتدا معرفی شد به رنگ خاکستری بود. اخیراً نوع جدیدی از این ماده معرفی شده است که به رنگ سفید می باشد که برخلاف نوع قبلی سبب تغییر رنگ بافت سخت و نرم نمی شود. این دو ماده به لحاظ اندازه ذرات تفاوت بسیار اندکی دارند. ولی وقتی سخت می شوند به لحاظ توپوگرافی سطحی تفاوت زیادی دارند، همچنین MTA سفید بطور قابل توجهی دارای میزان کمتری آهن در ترکیب خود می باشد[۳].

به این علت است که این نوع جدید MTA معایب MTA تیره از جمله تغییر رنگ بافت سخت و لثه را ندارد و از آنجائی که تاکنون در مورد خواص این ماده جدید تحقیقات زیادی انجام نشده است. هدف از این مطالعه ارزیابی مورفولوژی و چسبندگی سلول های استئوبلاست انسان در مجاورت MTA سفید، MTA تیره و IRM بعنوان مواد پرکننده انتهای ریشه توسط اسکن میکروسکپ الکترونی بود. با توجه به نتایج این مطالعه اگر MTA سفید واکنشی بهتر از دو ماده دیگر و یا در حد MTA تیره داشت بدلیل عدم ایجاد تغییر رنگ بافت نرم و سخت و در دسترس بودن راحت تر آن می توان از این به بعد بجای MTA تیره در جراحی های پری اپیکال از این ماده استفاده کرد.

مواد و روش ها:

روش بکار رفته در این تحقیق توصیفی بود. رده سلولی انتخابی سلولهای استئوبلاست MG-36 از استئوسارکوم انسانی بودند. سلولها در مدیوم PRMI-1640 به همراه سرم گاوی ۱۰٪ و آنتی بیوتیک / آنتی مایکوتیک ۱٪ (۳۰۰units/ml، ۳۰۰g/ml پنی سیلین، ۳۰۰g/ml استرپتومایسین، g/ml آمفوترسین B) تحت شرایط استاندارد در حرارت ۳۷ درجه سانتی گراد و رطوبت ۹۵٪ هوا و ۵٪ دی اکسید کربن کشت داده شدند. مدیوم کشت هر ۲ تا ٤ روز یک بار تعویض می شد. مواد پرکننده انتهای مورد استفاده در این مطالعه شامل MTA تیره، MTA سفید و IRM بودند، هر سه ماده ساخت کارخانه Dentsplay کشور سوئیس بودند.

مواد براساس دستور کارخانه سازنده مخلوط شدند و بر روی دیسکهایی با ضخامت تقریبی ۱mm و ابعاد تقریبی ۱×۱mm درون پلیت های ١٤ خانه قرار گرفتند و سپس محیط کشت به پلیت ها اضافه شد. نمونه ها در حرارت ۳۷°c و رطوبت ۱۰۰٪ قرار گرفتند. مدیوم کشت (200g/well) هر روز بمدت دو هفته تعویض می شد. این عمل اجازه سخت شدن ماده و رقیق شدن مواد سیتوتوکسیک را می داد. پس از دو هفته سلولهای استئوبلاست MG-63 به میزان ٤×١٠^{٥} به هر پلیت اضافه شد.

از هر گروه ٤ نمونه وجود داشت و گروه کنترل که جمعاً پس از پریودهای ۱ و ۳ و ۷ روز ٤۸ نمونه داشتیم. پس از اضافه کردن سلول ها و گذراندن زمان انکوباسیون، دیسک ها تحت مراحل فیکس نمودن و آماده سازی جهت بررسی توسط اسکن میکروسکپ الکترونی قرار گرفتند. جهت فیکس نمودن نمونه ها دیسکهای حاوی نمونه سه بار با سالین فسفات بافر شسته شدند، سپس با گلوتارالدئید ۲/۵٪ به مدت یک ساعت فیکس شدند و به مدت ۳۰ دقیقه در اسمیوم تتراکساید ۲٪ مرحله پس از فیکس را طی کردند. نمونه ها در Ascending grade اتانل بصورت اتانل ۲۵٪، ۵۰٪ ، ۷۵٪ ، ۹۵٪ هرکدام بمدت ۱۵ دقیقه و ٤ مرتبه در اتانل ۱۰۰٪ هر کدام ۲۰ دقیقه دهیدراته شدند. سپس بمدت ۳۰ دقیقه درون هگزا متیل دی سیلازان قرار گرفتند و در معرض هوا خشک شدند.

آماده سازی جهت بررسی توسط SEM:

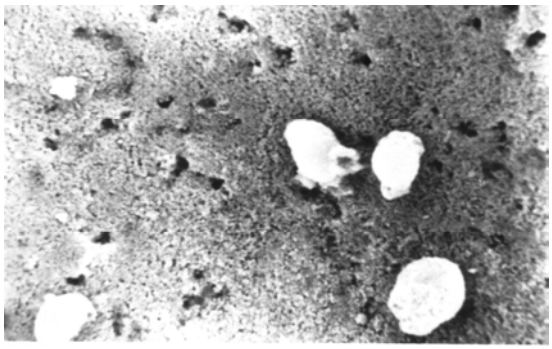
پس از طی کردن مراحل Fixation نمونه ها به مقدار ۱۵ نانومتر پوشش طلا داده شدند، سپس تحت خلاء قرار گرفتند و تحت بزرگنمایی ۱۰۰× و ۱۰۰۰× مشاهده شدند.

نحوه ارزیابی:

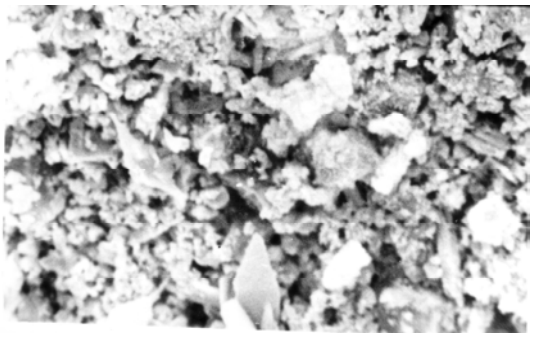
اگر سلول ها در مجاورت ماده مورد نظر به صورت Flat (پهن) یا نسبتاً Round (گرد) و چسبیده به سطح مشاهده شوند حاکی از این است که ماده خاصیت سازگاری نسجی مطلوبی دارد و سلول در مجاورت این ماده دارای فانکشن می باشد. اگر سلولها در مجاورت ماده مورد نظر بصورت کاملاً Round (گرد) و جدا از سطح مشاهده شوند دال بر سمیت و عدم سازگاری نسجی ماده می باشد. در این مطالعه IRM بعنوان گروه کنترل منفی و سلول های استئوبلاست که مجاورتی با هیچ ماده ای نداشت به عنوان گروه کنترل مثبت در نظر گرفته شدند.

یافته ها:

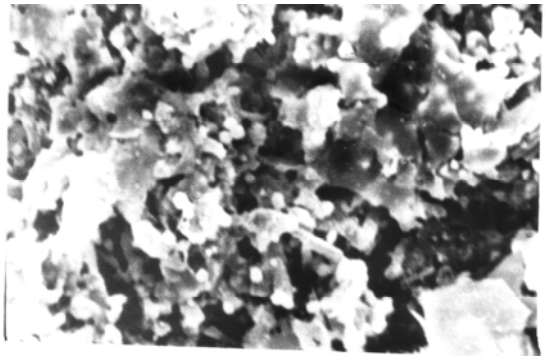
نتایج روز اول: پس از روز اول سلولها در مجاورت MTA تیره و سفید چسبندگی را نشان دادند و مورفولوژی نرمال داشتند و در مجاورت IRM – کاملاً گرد و بدون چسبندگی مشاهده شدند (تصاویر ۱و۲و۳).



تصویر ۱: نمای SEM گروه IRM بعد از ۲۴ ساعت با بزرگنمایی ۱۰۰۰ ×
سلولها بصورت round (گرد) و جدا از سطح دیده می شود

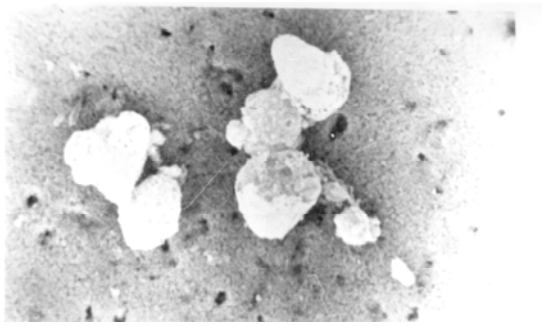


تصویر ۲: نمای SEM گروه MTA تیره بعد از ۲۴ ساعت با بزرگنمایی ۱۰۰۰ ×
نمای نرمال سلولی همراه با اتصال سلولی دیده می شود

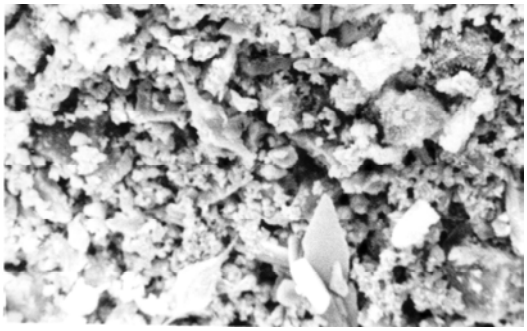


تصویر ۳: نمای SEM گروه MTA سفید بعد از ۲۴ ساعت با بزرگنمایی ۱۰۰۰ ×
اتصال سلولها به سطح قابل مشاهده است

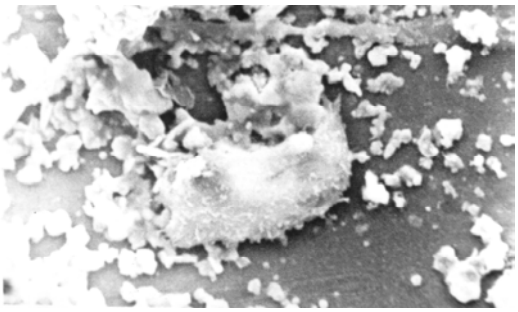
نتایج روز سوم: پس از روز سوم مورفولوژی سلولها در مجاورت MTA تیره و سفید بصورت Flat مشاهده شد و سلولها به ایندو ماده چسبندگی را نشان دادند. در مجاورت IRM سلولهای کاملاً گرد و جدا از سطح بودند (تصاویر ٤و٥و٦).



تصویر ۴ : نمای SEM گروه IRM (کنترل منفی) روز سوم
بزرگنمایی ۱۰۰۰ ×
سلولها به صورت گرد و جدا از سطح قابل مشاهده است



تصویر ۵ : نمای SEM گروه MTA تیره روز سوم
بزرگنمایی ۱۰۰۰ ×
اتصال سلولی قابل مشاهده است

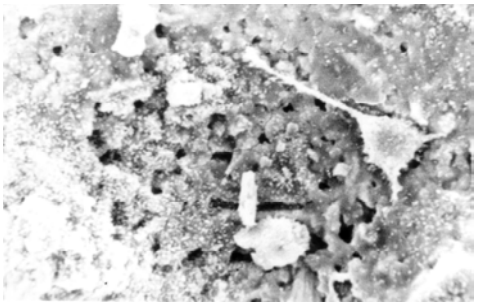


تصویر ۶ : نمای SEM گروه MTA سفید روز سوم
بزرگنمایی ۱۰۰۰ ×
مورفولوژی نرمال سلول همراه اتچمنت سلولی مشاهده می شود

نتایج روز هفتم: در روز هفتم چسبندگی و مورفولوژی نرمال درمجاورت هر دو MTA قابل مشاهده بود و در مجاورت IRM کاملاً گرد و جدا از سطح بودند (تصویر ۷و۸و۹).

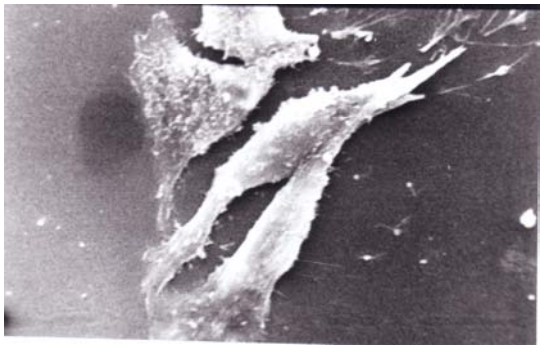
تصویر ۷ : نمای SEM گروه MTA تیره روز هفتم
بزرگنمایی ۱۰۰۰ ×
اتصال سلولی قابل مشاهده است

تصویر ۸ : نمای SEM گروه MTA سفید روز هفتم
بزرگنمایی ۱۰۰۰ ×
اتصال سلولی قابل مشاهده است



تصویر ۹ : نمای SEM گروه MTA تیره روز هفتم
بزرگنمایی ۱۰۰۰ ×
اتصال سلولی قابل مشاهده است

سلول های گروه کنترل مثبت که در مجاورت هیچگونه ماده ای قرار نگرفته بودند مورفولوژی نرمال و چسبندگی به سطح را پس از ۲٤ ساعت، سه روز و ۷ روز نشان دادند (تصویر ۱۰).



تصویر ۱۰: نمای SEM گروه کنترل مثبت بعد از ۲۴ ساعت با
بزرگنمایی ۱۰۰۰ ×
نمای نرمال مورفولوژی سلول با اتصال سلولی دیده می شود

بحث:

روش های مختلفی جهت بررسی سمیت سلولی مواد اندودنتیک که در جوار نسج زنده قرار می گیرند از جمله موادی که بعنوان ترمیم کننده پرفوراسیون ها و مواد پرکننده انتهای ریشه، مورد استفاده قرار می گیرند انجام شده است. از جمله Agar overloy، رادیوکرومیوم، ایمپلنت های استخوانی[٤]. استفاده از اسکن میکروسکپ الکترونی (SEM) جهت بررسی سیتومورفولوژی رده های سلولی خاص در جوار مواد پرکننده انتهای ریشه و بررسی تولید سایتوکاین ها توسط سلولها نیز راهی جهت بررسی سمیت سلولی مواد و سازگاری نسجی آنها می باشد[۲].

دلیل انتخاب سلول استئوبلاست در این مطالعه این بود که این سلولها و سلولهای PDL (پریودنتال لیگامان) سلول های اصلی جهت ترمیم زخم بدنبال قطع انتهای ریشه در جراحی پری آپیکال و همچنین در ترمیم پرفوراسیون ها می باشند[۱]. تماس مستقیم سلول استئوبلاست با مواد پرکننده انتهای ریشه نقش حیاتی در ترمیم زخم جراحی ایفا می کند. چسبندگی و گسترش (Spreading) سلولها بر سطح یک ماده مرحله ابتدائی برای فانکشن سلول می باشد. وجود سلولهای روند (گرد) بدون چسبندگی نشانه این است که ماده سازگاری نسجی ندارد[۱].

مطالعات متعددی سازگاری نسجی MTA تیره را ثابت کرده اند و همچنین اینکه این ماده توانایی تحریک سمنتوژنز و ترمیم زخم ناحیه را دارد ثابت شده است[۷و٦و۳].

اخیراً نوع جدیدی از MTA به نام MTA سفید (White MTA) نیز توسط دکتر محمود ترابی نژاد معرفی شده که هنوز مطالعات گسترده ای در مورد این ماده انجام نشده است.

دلیل انتخاب IRM در این مطالعه این بود که این ماده در سالهای اخیر کاربرد فراوانی بعنوان ماده پرکننده انتهای ریشه داشته است و در مطالعات مختلف عدم سازگاری نسجی این ماده ثابت شده است و بعنوان گروه کنترل منفی در نظر گرفته شده است[۶].

در این مطالعه واکنش سلولهای استئوبلاست در جوار IRM بصورت کاملا گرد (Round) و جدا از سطح بود حتی پس از ۷ روز که نتیجه مشابهی با نتیجه مطالعه Koh Tiong در سال ۱۹۹۷[۶] و Qangzhu در سال ۲۰۰۰[۱] داشت و نشان دهنده این بود که این ماده سمی است.

در مجاورت MTA تیره طی ۱ و ۳ و ۷ روز سلولها دارای مورفولوژی نرمال بودند و در تماس مستقیم با ماده و چسبیده برآن بودند که این نتیجه مشابه نتیجه ای بود که Koh در سال ۱۹۹۷[۶] و Qang zhu در سال ۲۰۰۰[۱] در مورد MTA تیره گرفتند.

در مطالعه Perez در سال ۲۰۰۳[۳] سلولهای استئوسارکوم MG-63 پس از ۹ روز در تماس با هر دو ماده MTA سفید و تیره با مورفولوژی نرمال مشاهده شدند ولی سلولهای Primary استئوبلاست پس از ۱۳ روز در سطح MTA سفید بصورت فعال و زنده دیده نشدند. طبق نتایج مطالعه ما پاسخ سلولی در جوار MTA سفید و MTA تیره مشابه بود و نشان دهنده سازگاری نسجی این مواد می باشد. چسبندگی سلولی یک روند پیچیده و دینامیک است که نقش حیاتی در ترمیم زخم بازی می کند و در روند رشد، پرولیفراسیون و تمایز سلول نقش دارد[۳] تفاوت در چسبندگی سلول های استئوبلاست به مواد مختلف بعلت تفاوت در مشخصات سطح ماده یا اجزاء شیمیایی مواد می باشند[۳].

در مورد اینکه آیا سلول های اولیه (Primary) یا رده های سلولی Aneuploid (سلول های تومورال) برای بررسی سازگاری نسجی مواد استفاده شود اختلاف نظر وجود دارد[۷]. فایده استفاده از رده های سلولی (Aneupliod) این است که این سلولها به لحاظ فنوتیپی پایدار هستند و جمعیت سلولی ثابت است و برای بررسی های بیوشمیایی به اندازه کافی بزرگ هستند[۳].

نتیجه گیری:

طبق نتایج این مطالعه پاسخ سلول های استئوبلاست در مجاورت MTA تیره و سفید مشابه بودند و نشان دهنده سازگاری نسجی هر دو ماده بود و استفاده از این مواد در مواردی که در مجاورت نسج زنده قرار می گیرند سبب سمیت سلولی نمی شود. در مجاورت IRM سلولها بصورت کاملاً گرد و جدا از سطح مشاهده شدند که پاسخ مناسبی نبود.

اتصال و مورفولوژی سلول استئوبلاست یک معیار مناسب جهت بررسی سمیت مواد می باشد و استفاده از اسکن میکروسکپ الکترونی (SEM) روش مناسبی جهت بررسی مورفولوژی سلولی و چسبندگی سلولهای استئوبلاست می باشد البته در مورد خصوصیات MTA سفید هنوز نیاز به مطالعات بیشتری می باشد.

تشکر و قدردانی:

این تحقیق در شورای پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مشهد مورد تصویب قرار گرفته است. بدینوسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه که هزینه های این تحقیق را پرداخت نموده اند، قدردانی می گردد.

منابع:

1. Qiang Zhu, Haglund R, Safavi K, Larz SW. Adhesion of human osteoblasts on root end filling material. J Endod 2000; 26: 404-7.
2. Troy S, Thomson Ts, Berry JE, Somerman MJ, Kirkwood KL. Cementoblest maintain expression of osteocalcin in the presence of mineral trioxide aggregate. J Endod 2002; 29: 407-11.
3. Perez AL, Spears S. Guttmann and Opperman. Osteoblasts and MG-63 osteosarcoma cells behave differently when in contact with pro root MTA and white MTA. Int Endod J 2003; 36: 564-70.
4. Torabinejad M, Hong CU, Pitt Ford R, Kettering JD. Cytotoxicity of four root end filling material. J Endod 1995; 21: 489.
5. Cohen S, Burns RC. Pathways of the pulp. 8th ed. Philadelphia: Sydney; 2002. P. 719.
6. Koh ET, Torabinejad M, Pitt Ford R, Brady K. Mineral trioxide aggregate stimulates a biologic response in human osteoblast. J Biomed Master Res 1997; 37: 432-9.
7. Mc Donald F, Pitt Ford R, Torabinegad M. Cellular response to mineral trioxide aggregate. J Endod 1998; 24: 543-6.