بررسی سمیت سلولی نانوهیدروکسی آپاتیت بر رده سلولی اپی‌تلیوم دهان انسان: یک مطالعه آزمایشگاهی

فرید عباسی[۱]
ماندانا ستاری[۲]
نوشین جلایرنادری[۳*]
مرضیه سروش‌زاده[۴]

۱- گروه بیماری‌های دهان، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران.
۲- گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.
۳- گروه آسیب‌شناسی فک و دهان، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران.
۴- دندانپزشک، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران.

*نویسنده مسئول: تهران، خیابان ایتالیا، بین وصال و قدس، دانشگاه شاهد، دانشکده دندانپزشکی، گروه آسیب‌شناسی فک و دهان تلفن: ۰۲۱-۸۸۹۵۹۲۱۰
E-mail: jalayer@shahed.ac.ir

چکیده

دریافت: ۱۳۹۴/۱۱/۲۸ ویرایش: ۱۳۹۵/۰۵/۲۶ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۷/۰۲ آنلاین: ۱۳۹۵/۰۷/۰۵

زمینه و هدف: ذرات نانوهیدروکسی آپاتیت با داشتن سطح تماس بیشتر وحلالیت بالاتر نسبت به هیدروکسی آپاتیت معمولی، مورد توجه پژوهشگران به‌عنوان یک پیوند موثر و جدید استخوانی قرار گرفته‌اند. مطالعات نشان داده‌اند که تناقض‌هایی در زمینه سازگاری زیستی این ذرات وجود دارد. هدف از مطالعه بررسی فعالیت حیاتی سلول اپی‌تلیوم دهان انسان در مجاورت با ذرات نانوهیدروکسی آپاتیت بود.

روش بررسی: مطالعه به‌صورت تجربی در آبان ۱۳۹۲ انجام شد. غلظت‌های مختلف نانوهیدروکسی آپاتیت از ۰/۰۱ تا ۵ mg/ml در ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بر سلول‌های اپی‌تلیال دهان انسان رده KB در محیط کشت تاثیر داده شد. میزان سمیت سلولی این ماده با روش متیل تیازول تترازولیوم بروماید و به‌وسیله دستگاه الیزا ریدر (Falcon, Becton-Dickinson, USA) بررسی شد.

یافته‌ها: سمیت سلولی غلظت‌های مختلف نانوهیدروکسی آپاتیت در ۲۴ ساعت (P<۰/۰۰۱)، ۴۸ ساعت (P<۰/۰۰۱) و ۷۲ ساعت (P<۰/۰۰۱) بر سلول‌های اپی‌تلیال دهان انسان، اختلاف معنادار داشت. ذرات نانوهیدروکسی آپاتیت در غلظت ۰/۵ تا ۱ mg/ml در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بیشترین سمیت سلولی را بر سلول‌های اپی‌تلیوم دهان انسان داشتند. در تمامی زمان‌ها، غلظت‌های کمتر از ۰/۰۵ mg/ml بهترین سازگاری زیستی را داشتند.

نتیجه‌گیری: نانوهیدروکسی آپاتیت سازگاری زیستی خوبی دارد و به دوز و زمان وابسته است. غلظت‌های کمتر از ۰/۰۵ mg/ml از نانوهیدروکسی آپاتیت بهترین سازگاری زیستی را با گذشت زمان دارند.

کلمات کلیدی: نانوهیدروکسی آپاتیت، سمیت سلولی، سلول‌های اپی‌تلیال، مطالعه آزمایشگاهی، الیزا.

مقدمه

استفاده از ذرات نانو به‌منظور افزایش بهبود مواد، موضوعی جدید است. نکته اصلی در فناوری نانو تهیه مواد یا وسایل در ابعاد کمتر از ۱ µm (۱ تا ۱۰۰ nm) است.[۱]

هیدروکسی آپاتیت به سبب شباهت زیاد به بخش معدنی دندان و ویژگی‌های بافتی مشابه استخوان مورد توجه بسیاری از پژوهشگران برای جایگزینی با استخوان قرار گرفته است.[۲]

استفاده از ذرات نانوهیدروکسی موجب افزایش خلوص مولکولی و ویژگی‌های مکانیکی می‌گردد. ذرات نانوهیدروکسی آپاتیت سطح تماس بیشتر و حلالیت بالاتر نسبت به هیدروکسی آپاتیت معمولی دارند. بدین‌سبب به‌عنوان یک پیوند موثر و جدید استخوانی مطرح شده‌اند.[۳-۵]

از این ذرات در افزایش استئواینتگریشن ایمپلنت[۶] ترمیم پرفوراسیون دندانی، کاهش حساسیت دندانی[۷] و افزایش رژنراسیون دیفکت‌های استخوانی در ارتوپدی[۸] استفاده شده است.

به‌سبب اندازه بسیار کوچک، ذرات نانو می‌توانند به سهولت وارد بافت‌های بدن شوند. ورود این ذرات موجب اختلال محیط

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2025-05-21]

بیوشیمیایی طبیعی سلول می‌شود. بررسی‌ها نشان داده‌اند که ذرات نانوهیدروکسی آپاتیت می‌توانند سبب بروز واکنش‌های التهابی و مرگ سلولی شوند.[۹-۱۳]

مطالعات انجام‌شده در مورد بررسی اثرات بیولوژیک ذرات نانوهیدروکسی آپاتیت بر اجزای تشکیل‌دهنده مخاط دهان بسیار اندک است. پژوهش کنونی با هدف بررسی سمیت سلولی نانوهیدروکسی آپاتیت (Nano-HA) بر سلول‌های اپی‌تلیوم دهانی انسان انجام شد.

روش بررسی

این آزمایش به‌صورت تجربی بر روی سلول‌های اپی‌تلیوم دهانی انسان رده KB در آزمایشگاه ایمونولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی بهشتی در آبان ۱۳۹۲ انجام شد. جامعه پژوهش رده سلولی اپی‌تلیوم دهان KB (NCBI Code: C152) تهیه شده از انستیتو پاستور بود. متغیرهای مطالعه دوز و زمان مصرف نانوهیدروکسی آپاتیت بود.

بر اساس استاندارد ISO 10993:5 برای گروه کنترل و مادهٔ ارزیابی شونده حداقل سه چاهک باید تهیه شود.[۱۴] در پژوهش کنونی از پنج چاهک استفاده شد. ارزیابی سمیت سلولی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از کشت نانوهیدروکسی آپاتیت با سلول‌های اپی‌تلیوم دهان انسان انجام شد. پس از کشت، سلول‌ها به تعداد مساوی در چاهک‌ها تقسیم شدند. در شرایط یکسان برای تمام چاهک‌ها، پنج چاهک برای یک دوز و یک زمان استفاده شد.

تست متیل‌تیازول‌تترازولیوم‌بروماید در بررسی سمیت سلولی استفاده شد. میزان فورامازان تولید شده براساس تغییر رنگ با Enzyme-linked immuno-sorbent assay (ELISA) reader آنالیز گردید. از ذرات نانوهیدروکسی آپاتیت با ابعاد کمتر از ۱۰۰ nm و میله‌ای‌شکل با خلوص ۹۹٪ (Batch No#2009062, Nanoshel LLC, Willmington, DE, USA) در مطالعه استفاده شد. ذرات نانوهیدروکسی آپاتیت، با استفاده از نور ماورای بنفش به‌مدت ۴۸ ساعت استریل شدند.

در شرایط کشت با دمای ۳۷ °C و رطوبت ۹۸٪ و اکسید کربن ۵٪، سلول‌های اپی‌تلیوم دهان انسان در محیط RPMI به محیط کشت ۱۰٪ Fetal Bovine Serum (FBS) به‌همراه آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین ۱۰۰ IU/ml (Sigma, USA) و استرپتومایسن ۱۰۰ µg/ml (Sigma, USA) اضافه گردید.

برای تمامی غلظت‌ها در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، درون پلیت‌های ۲۴ خانه‌ای محیط کشت، پنج چاهک استفاده شد. برای کنترل مثبت در هر زمان چهار چاهک و برای کنترل منفی نیز در هر زمان چهار چاهک اختصاص داده شد. برای هر زمان در مجموع ۴۸ چاهک استفاده شد. سپس تعداد ۱۰۰,۰۰۰ سلول به درون هر چاهک از پلیت‌های ۲۴ خانه‌ای اضافه شد. پلیت‌ها به‌مدت ۲۴ ساعت به انکوباتور منتقل شدند.

برای نمونه‌های کنترل مثبت از آب مقطر به‌جای محیط کشت، به سلول‌ها اضافه شد. برای نمونه‌های کنترل منفی از محیط کشت کامل حاوی FBS به سلول‌ها اضافه شد. غلظت‌های مختلف نانوهیدروکسی آپاتیت از ۰/۰۱ تا ۵ mg/ml در ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بر سلول‌های اپی‌تلیال دهان انسان در محیط کشت تاثیر داده شد. برای انجام تست متیل‌تیازول‌تترازولیوم‌بروماید از نمک تترازولیم‌بروماید (Sigma-Aldrich, USA) به‌نسبت ۵ mg/ml در Phosphate buffer Solution (PBS) که به نسبت ۱/۰ با محیط RPMI 1640 مخلوط شده بود، استفاده شد.

محیط کشت حاوی نانوهیدروکسی آپاتیت از چاهک‌ها تخلیه شده و ۱۵۰ µl از این محلول به هر چاهک اضافه شد. سپس به‌مدت چهار ساعت در شرایط کشت (حرارت ۳۷ °C، رطوبت ۹۸٪ و Co2 ۵٪) انکوبه شد. در مرحله بعد، محلول رویی خارج گردید و ۱۵۰ µl ایزوپروپانل اسیدی به هر چاهک افزوده شد. در نهایت از هر چاهک ۱۰۰ µl برداشته شد و وارد میکروپلیت‌های ۹۶ خانه‌ای ELISA شد (برای هر بار انتقال به هر چاهک از سر سمپلر مجزا استفاده شد). Optical Density (OD) با استفاده از ELISA reader (Anthous 2020, Australia) در طول موج ۴۹۲ nm با فیلتر ۶۲۰ nm خوانده شد. درصد حیات سلولی از تقسیم میانگین جذب نوری هر گروه مورد آزمایش بر میانگین جذب نوری گروه کنترل در عدد ۱۰۰ محاسبه شد.[۱۵]

یافته‌های جذب نوری مربوط به گروه‌های مورد مطالعه با استفاده از آزمون ANOVA آنالیز شد. در مواردی که ANOVA اختلاف آماری معنادار گزارش کرد، از آزمون Duncan برای آنالیز اختلاف بین

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2025-05-21]

دو گروه (در غلظت‌ها و کنترل‌های مثبت و منفی) استفاده شد. P<۰/۰۵ معنادار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

بیشترین میزان سمیت سلولی در ۲۴، ۷۲ و ۴۸ ساعت در غلظت ۰/۵ mg/ml از نانوهیدروکسی آپاتیت بود. بین غلظت‌های مختلف هیدروکسی آپاتیت (و گروه‌های کنترل) در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت اختلاف آماری معنادار مشاهده شد (P≤۰/۰۰۱) (جدول ۱).

مقایسه غلظت‌های مختلف و کنترل‌های مثبت و منفی، اختلاف آماری معنادار در ۲۴ ساعت نشان داد. اختلاف آماری معنادار در ۲۴ ساعت بین غلظت ۰/۰۱ با ۰/۱، ۲/۵ و ۵ (P<۰/۰۰۱)، غلظت ۰/۰۵ با ۰/۰۵، ۲/۵ و ۵ (P<۰/۰۰۱)، ۰/۱ با ۰/۰۱، ۰/۵ و ۵ (P<۰/۰۱)، غلظت ۰/۷۵ با ۰/۵، ۲/۵ و ۵ (P<۰/۰۰۱)، غلظت ۱ با ۰/۱، ۲/۵ و ۵ (P<۰/۰۰۱)، غلظت ۲/۵ با ۰/۰۱، ۰/۰۵، ۰/۷۵، ۲/۵ و ۵ (P<۰/۰۰۱) در ایجاد سمیت سلولی ذرات نانوهیدروکسی آپاتیت وجود داشت (نمودار ۱).

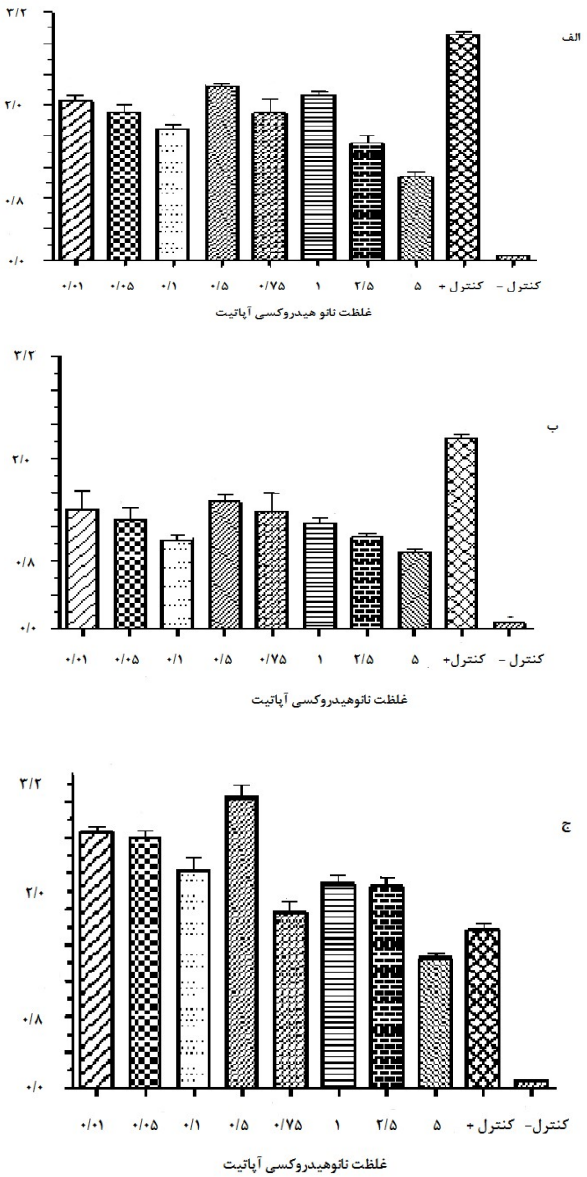
اختلاف آماری سمیت سلولی ذرات نانوهیدروکسی آپاتیت در غلظت‌های ۰/۰۱ با ۵ (P<۰/۰۰۱)، ۰/۰۵ با ۵ (P<۰/۰۰۱)، ۰/۱ با ۰/۵ (P<۰/۰۱)، ۰/۵ با ۰/۱، ۲/۵ و ۵ (P<۰/۰۰۱) و ۰/۷۵ با ۵ (P<۰/۰۰۱) پس از ۴۸ ساعت معنادار بود. در غلظت‌های ۰/۰۵ تا ۵ بین گروه‌ها و کنترل‌های مثبت و منفی پس از ۴۸ ساعت اختلاف آماری معنادار وجود داشت (P<۰/۰۰۱) (نمودار ۱).

پس از ۷۲ ساعت اختلاف آماری معنادار بین سمیت سلولی ذرات نانوهیدروکسی آپاتیت در غلظت‌های ۰/۰۱ با ۰/۱، ۰/۵، ۰/۷۵، ۱، ۲/۵ و ۵ (P<۰/۰۰۱)، غلظت ۰/۰۵ با ۰/۱، ۰/۵، ۰/۷۵، ۱، ۲/۵ و ۵ (P<۰/۰۰۱)، غلظت ۰/۱ با ۰/۰۱، ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۵، ۰/۷۵ و ۵ (P<۰/۰۰۱)، غلظت ۰/۷۵ با ۰/۰۱، ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۵، ۰/۷۵، ۱، ۲/۵ و ۵ (P<۰/۰۰۱)، غلظت ۱ با ۰/۰۱، ۰/۰۵، ۰/۵، ۰/۷۵، ۲/۵ و ۵ (P<۰/۰۰۱)، غلظت ۲/۵ با ۰/۰۱، ۰/۰۵، ۰/۵، ۰/۷۵، ۲/۵ و ۵ (P<۰/۰۰۱) وجود داشت. بین کنترل‌های مثبت و منفی پس از ۷۲ ساعت اختلاف آماری معنادار بود (P<۰/۰۰۱) (نمودار ۱). ذرات نانوهیدروکسی آپاتیت در غلظت ۰/۵ تا ۱ mg/ml در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بیشترین سمیت سلولی را بر سلول‌های اپی‌تلیوم دهان انسان داشتند. از ۲/۵ تا ۵ mg/ml سمیت سلولی ذرات نانوهیدروکسی آپاتیت در تمام زمان‌ها کاهش یافت.

جدول ۱: میانگین اثر غلظت‌های مختلف نانو ذرات هیدروکسی آپاتیت در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بر روی اپی‌تلیوم دهان انسان

غلظت	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت
	انحراف‌معیار± میانگین	انحراف‌معیار± میانگین	انحراف‌معیار± میانگین
۰/۰۱	۲/۰۶۰±۰/۰۷	۱/۴۰۸±۰/۲۱	۲/۸۴۷±۰/۰۶
۰/۰۵	۱/۹۱۱±۰/۱۰	۱/۲۹۳±۰/۱۲	۲/۷۹۰±۰/۰۷
۰/۱	۱/۶۸۷±۰/۰۵	۱/۰۵۳±۰/۰۶	۲/۴۳۶±۰/۱۴
۰/۵	۲/۲۵۰±۰/۰۴	۱/۴۹۶±۰/۰۹	۳/۲۴۷±۰/۱۳
۰/۷۵	۱/۸۹۶±۰/۱۸	۱/۳۸۲±۰/۲۲	۱/۹۶۱±۰/۱۱
۱	۲/۱۲۹±۰/۰۶	۱/۲۴۰±۰/۰۷	۲/۲۸۹±۰/۰۸
۲/۵	۱/۵۰۳±۰/۱۰	۱/۰۸۰±۰/۰۵	۲/۲۵۲±۰/۱۰
۵	۱/۰۶۸±۰/۰۷	۰/۹۱۲±۰/۰۲	۱/۴۴۹±۰/۰۴
کنترل مثبت	۲/۹۰۸±۰/۰۳	۲/۲۴۰±۰/۰۵	۱/۷۶۵±۰/۰۷
کنترل منفی	۰/۰۵۳±۰/۰۰	۰/۰۷۷±۰/۰۱	۰/۰۹۱±۰/۰۱

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2025-05-21]



نمودار ۱: مقایسه میانگین اثرات غلظت‌های مختلف نانو ذرات هیدروکسی آپاتیت در زمان‌های الف- ۲۴، ب- ۴۸ و ج- ۷۲ ساعت بر روی اپی‌تلیوم دهان انسان

بحث

یافته‌های این مطالعه نشان داد که زیست سازگاری ذرات نانوهیدروکسی آپاتیت با افزایش زمان بیشتر می‌شود. این اثر وابسته به دوز و زمان است. غلظت‌های کمتر از ۰/۰۵ mg/ml بهترین سازگاری زیستی با گذشت زمان را دارند. با افزایش غلظت از ۲/۵ تا ۵ mg/ml سمیت سلولی ذرات نانوهیدروکسی آپاتیت در تمام زمان‌ها کاهش می‌یابد.

مطالعات انجام‌شده بر روی سمیت سلولی ذرات نانوهیدروکسی آپاتیت نشان داده‌اند که این ذرات در برخی غلظت‌ها اثر سمی بر روی سلول‌ها دارند. Jalayer Naderi و همکاران گزارش کرده‌اند که غلظت‌های ۲ و ۵ mg/ml از نانوهیدروکسی آپاتیت اثر سمی بر روی سلول‌های فیبروبلاست لثه دارد.[۱۱]

Shahoon و همکاران با بررسی فعالیت حیاتی سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی انسان و سلول‌های فیبروبلاست موش L929 در مجاورت با ذرات نانوهیدروکسی آپاتیت مشاهده کرده‌اند که با افزایش زمان و غلظت، از فعالیت حیاتی سلول‌ها کاسته می‌شود، اما این کاهش معنادار نیست.[۱۶و۱۷]

Scheel و همکاران با بررسی اثرات سایتوتوکسیک غلظت‌های مختلف از هیدروکسی آپاتیت بر روی رده سلولی ماکروفاژهای موش RAW 264.7، بالاترین اثر التهابی را در غلظت ۱۰۰ µg/ml گزارش کرده‌اند.[۱۸]

در پژوهش کنونی غلظت بالاتر از ۵ µg/ml (۵۰۰۰ ppm) مورد بررسی قرار نگرفت. این امر دلیل به عدم حلالیت غلظت‌های بالاتر بود. این علت می‌تواند توجیه‌کننده‌ی اختلاف به‌دست آمده در غلظت سمیت سلولی باشد. اختلاف در رده سلولی مورد مطالعه نیز عامل دیگر ایجاد نتایج متفاوت این مطالعات است. سلول‌های مختلف در پاسخ به محرکات یکسان، پاسخ‌های مختلفی از خود نشان می‌دهند. این نکته‌ای است که می‌بایست در بررسی‌های تکمیلی مورد توجه قرار گیرد. بدن انسان مجموعه‌ای از سلول‌ها و بافت‌های مختلف است، بدین سبب بررسی تاثیر ماده بر تمامی بافت‌ها لازم خواهد بود.

Motskin و همکاران غلظت‌های بالاتر از ۲۵۰ µg/ml از هیدروکسی آپاتیت را دارای اثر سمیت سلولی گزارش کرده‌اند.[۱۲]

با وجود آنکه در پژوهش بالا نانوهیدروکسی آپاتیت مطالعه نشده اما شباهت زیادی با پژوهش کنونی دارد. در این پژوهش، غلظت‌های ۲۵۰۰ و ۵۰۰۰ ppm معادل ۲/۵ و ۵ mg/ml از نانوهیدروکسی آپاتیت، بالاترین سمیت سلولی را داشت.

از یافته‌های به‌دست‌آمده از پژوهش کنونی چنین نتیجه‌گیری می‌شود که ذرات نانوهیدروکسی آپاتیت از سازگاری زیستی خوبی

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2025-05-21]

برخوردار می‌باشند و این اثر وابسته به دوز و زمان است. غلظت‌های کمتر از ۰/۰۵ mg/ml از بهترین سازگاری زیستی با گذشت زمان برخوردار بودند.

Wang و همکاران اثر توکسیک نانوهیدروکسی آپاتیت را ناشی از القای مرگ سلولی یا آپوپتوز می‌دانند. این نتیجه که بر اساس بررسی اثر ذرات نانوهیدروکسی آپاتیت بر روی سلول‌های MC3T3-E1 و سلول‌های بافتی Rat SD به‌دست آمده است، به‌عنوان زمینه‌ای برای زیست سازگاری بهتر این مواد با استخوان شناخته شده است.[۱۹]

با وجود اینکه هدف بررسی بالا با بررسی کنونی تفاوت دارد اما تناقضی نیز بین این دو بررسی دیده نمی‌شود. گمانپذیر است که علت سمیت سلولی بیشتر نانوهیدروکسی آپاتیت در زمان ٤٨ ساعت به‌دلیل القای آپوپتوز باشد. یافته‌های پژوهش کنونی نشان داد که زیست سازگاری ذرات نانوهیدروکسی آپاتیت با افزایش زمان بیشتر می‌شود.

Meskinfam و همکاران گزارش کرده‌اند که نانوهیدروکسی آپاتیت می‌تواند بر تکثیر سلول‌ها اثر گذارد. این مطالعه نشان داده است که ترکیب نانوهیدروکسی آپاتیت با نشاسته اثر منفی بر روی مورفولوژی، حیات و تکثیر سلولی ندارد.[۲۰]

با وجود اختلاف در اهداف بررسی، نتایج حاصله ردکننده یکدیگر نمی‌باشند. افزایش زیست سازگاری ذرات نانوهیدروکسی آپاتیت با افزایش زمان را می‌توان به توان تکثیر سلول‌ها مربوط دانست.

سمیت سلولی ناشی از غلظت‌های به‌کار رفته در بررسی با روش متیل‌تیازول‌تترازولیوم‌بروماید با کاهش فعالیت و مرگ سلولی مشخص می‌شود. عدم مشاهده آسیب در غلظت‌های کم می‌تواند دلیلی بر عدم وارد شدن آسیب تاثیرگذار بر سلول‌ها و یا توانایی آن‌ها در ترمیم آسیب باشد. کاهش فعالیت سلولی در زمان‌های طولانی‌تر پدیده‌ای تنظیم‌کننده است و نشان می‌دهد که تکثیر سلولی به‌دلیل خروج از وضع ایده‌آل کمتر شده است، اما سلول‌ها دچار مرگ سلولی نشده‌اند. بدین‌ترتیب احتمال نکروز سلولی مطرح نمی‌باشد، در غیر این صورت با توجه به آزاد شدن فرآورده‌های التهابی از سلول‌های نکروتیک می‌بایست سمیت سلولی بیشتر در زمان ۷۲ ساعت نیز مشاهده می‌شد.

بررسی‌ها نشان داده‌اند محیطی که ذرات نانوهیدروکسی آپاتیت در آن قرار می‌گیرند[۲۰و۲۱] و همچنین اندازه و شکل صنعتی ذرات، اثرات توکسیک متفاوتی بر روی سلول‌ها دارند.[۱۲]

در این مطالعه به‌دلیل حلالیت پایین ذرات، امکان استفاده از غلظت‌های بالاتر میسر نشد. بررسی مکانیسم مرگ سلول پس از ٤٨ ساعت از اعمال اثر نانوهیدروکسی آپاتیت بر بافت و مقایسه اثرات سایتوتوکسیک اشکال مختلف نانوهیدروکسی آپاتیت سبب تکمیل یافته‌ها و مشخص شدن علت تناقضات موجود می‌شود. بررسی غلظت سایتوکین‌های التهابی مانند TNF-α، TGF-β، اینترلوکین 1β و اینترلوکین ٦ و ١٠ در غلظت‌های مختلف از ذرات نانوهیدروکسی آپاتیت جهت تکمیل نتایج پیشنهاد می‌شود.

ذرات نانوهیدروکسی آپاتیت از سازگاری زیستی خوبی برخوردارند. این اثر وابسته به دز و زمان است. غلظت‌های کمتر از ۰/۰۵ mg/ml بهترین سازگاری زیستی را با گذشت زمان دارند.

سپاسگزاری: این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی تحت عنوان "بررسی سمیت سلولی نانوهیدروکسی آپاتیت بر رده سلولی اپی‌تلیالی در شرایط آزمایشگاهی" مصوب مراکز تحقیقات دانشگاه شاهد در سال ۱۳۸۹ به کد ٤١٩٣/٨/م/دن می‌باشد که با حمایت مراکز تحقیقات دانشگاه شاهد، معاونت پژوهشی دانشگاه شاهد اجرا شده است.

References

1. Fathi MH, Azam F. Novel hydroxyapatite/tantalum surface coating for metallic dental implant. Mater Lett 2007;61(4-5):1238-41.
2. Liu DM, Troczynski T, Tseng WJ. Water-based sol-gel synthesis of hydroxyapatite: process development. *Biomaterials* 2001;22(13):1721-30.
3. O'Brien WJ. Dental Materials and Their Selection. 4th ed. Canada: Quintessence Publishing Co; 2008. P. 308-11.
4. Thein-Han WW, Shah J, Misra RD. Superior in vitro biological response and mechanical properties of an implantable nanostructured biomaterial: Nanohydroxyapatite-silicone rubber composite. *Acta Biomater* 2009;5(7):2668-79.
5. Cunniffe GM, Dickson GR, Partap S, Stanton KT, O'Brien FJ. Development and characterisation of a collagen nano-hydroxyapatite composite scaffold for bone tissue engineering. *J Mater Sci Mater Med* 2010;21(8):2293-8.
6. Heinz B, Kasaj A, Teich M, Jepsen S. Clinical effects of nanocrystalline hydroxyapatite paste in the treatment of intrabony periodontal defects: a randomized controlled clinical study. *Clin Oral Investig* 2010;14(5):525-31.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2025-05-21]

7. Shahoon H, Mashhadi Abbas F, Kharazifard MJ, Nematollahi M, Shahravi N. Histological evaluation of the effect of human bone matrix gelatin (BMG) with autogenous bone graft in the reconstruction of parietal bone defect in rats. *J Dent Sch* 2009;27(2):72-83.
8. Puvvada N, Panigrahi PK, Pathak A. Room temperature synthesis of highly hemocompatible hydroxyapatite, study of their physical properties and spectroscopic correlation of particle size. *Nanoscale* 2010;2(12):2631-8.
9. Vishwakarma V, Samal SS, Manoharan N. Safety and risk associated with nanoparticles: A review. *JMMCE* 2010;9(5):455-9.
10. Xu Z, Liu C, Wei J, Sun J. Effects of four types of hydroxyapatite nanoparticles with different nanocrystal morphologies and sizes on apoptosis in rat osteoblasts. *J Appl Toxicol* 2012;32(6):429-35.
11. Jalayer Naderi N, Yaraee R, Jamali D, Rezvani M B. Cytotoxicity of nano-hydroxyapatite on gingiva-derived fibroblast cell line (HGF2): An in vitro study. *Daneshvar Med* 2012;19(99):79-86.
12. Motskin M, Wright DM, Muller K, Kyle N, Gard TG, Porter AE, et al. Hydroxyapatite nano and microparticles: correlation of particle properties with cytotoxicity and biostability. *Biomaterials* 2009;30(19):3307-17.
13. Fröhlich E, Samberger C, Kueznik T, Absenger M, Roblegg E, Zimmer A, et al. Cytotoxicity of nanoparticles independent from oxidative stress. *J Toxicol Sci* 2009;34(4):363-75.
14. Liu LP, Xiao YB, Xiao ZW, Wang ZB, Li C, Gong X. Toxicity of hydroxyapatite nanoparticles on rabbits. *Wei Sheng Yan Jiu* 2005;34(4):474-6.
15. Morgan DM. Tetrazolium (MTT) assay for cellular viability and activity. *Methods Mol Biol* 1998;79:179-83.
16. Shahoon H, Hamedi R, Yadegari Z, Majd Hosseiny V, Valaie N. Evaluation of cytotoxicity of hydroxyapatite nanoparticles on L929 fibroblast cells. *Daneshvar Med* 2011;19(95):27-34.
17. Shahoon H, Yadegari Z, Valaie N, Farhadi S, Hamedi R. Evaluation of hydroxyapatite nanoparticles' biocompatibility at different concentrations on the human peripheral blood mononuclear cells: An in vitro study. *Res J Biol Sci* 2010;5(12):764-8.
18. Scheel J, Weimans S, Thiemann A, Heisler E, Hermann M. Exposure of the murine RAW 264.7 macrophage cell line to hydroxyapatite dispersions of various composition and morphology: assessment of cytotoxicity, activation and stress response. *Toxicol In Vitro* 2009;23(3):531-8.
19. Wang L, Zhou G, Liu H, Niu X, Han J, Zheng L, et al. Nano-hydroxyapatite particles induce apoptosis on MC3T3-E1 cells and tissue cells in SD rats. *Nanoscale* 2012;4(9):2894-9.
20. Meskinfam M, Sadjadi MA, Jazdarreh H, Zare K. Biocompatibility evaluation of nano hydroxyapatite-starch biocomposites. *J Biomed Nanotechnol* 2011;7(3):455-9.
21. Liu H, Zhang L, Li J, Zou Q, Zuo Y, Tian W, et al. Physicochemical and biological properties of nano-hydroxyapatite-reinforced aliphatic polyurethanes membranes. *J Biomater Sci Polym Ed* 2010;21(12):1619-36.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2025-05-21]

TUMJ Tehran University Medical Journal, August 2016; Vol. 74, No. 5: 314-320 Original Article

Cytotoxicity of nano-hydroxyapatite on human-derived oral epithelium cell line: an in vitro study

Farid Abassi M.D.[1]
Mandana Sattari Ph.D.[2]
Noushin Jalayer Naderi M.D.[3*]
Marzie Sorooshzadeh D.D.S.[4]

1- Department of Oral Medicine, Faculty of Dentistry, Shahed University, Tehran, Iran.
2- Department of Immunology, Faculty of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
3- Department of Oral and Maxillofacial Pathology, Faculty of Dentistry, Shahed University, Tehran, Iran.
4- Dentist-Graduated from Faculty of Dentistry, Shahed University, Tehran, Iran.

[*] Corresponding author: Department of Oral and Maxillofacial Pathology, Faculty of Dentistry, Shahed University, Italia St., Between Vesal and Qods, Tehran, Iran.
Tel: +98 21 88959210
E-mail: jalayer@shahed.ac.ir

Abstract

Received: 17 Feb. 2016 Revised: 16 Aug. 2016 Accepted: 23 Sep. 2016 Available online: 26 Sep. 2016

Background: Hydroxyapatite nanoparticles have a more surface contact and solubility than conventional hydroxyapatite. Hydroxynanoparticles enhances the biological and mechanical properties of new regenerated tissues. The hydroxyapatite nanoparticles have received attention as a new and effective osseous graft for using as scaffolds in bone regeneration. The reports on hydroxyapatite nanoparticles biocompatibility are controversial. It has been shown that hydroxyapatite nanoparticles induces inflammatory reaction and apoptosis. The aim of the present study was to evaluate the cytotoxicity of nano-hydroxyapatite on the human epithelial cells.

Methods: The study was experimental and completed in vitro. The study was carried out in department of Immonulogy, Faculty of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences in November 2014. The human-derived oral epithelium cell line (KB) obtained from Pasteur Institute, Tehran, Iran were exposed to hydroxyapatite nanoparticles at 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 0.75, 1, 2.5 and 5 mg/ml concentrations in 24, 48 and 72 hours. Rod-shaped hydroxyapatite nanoparticles with 99% purity and maximum 100 nm sized particles were used. Methylthiazol tetrazolium bromide (MTT) method was employed for cell vitality evaluation. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used for assessing the viability of cells. Distilled water and fetal bovine serum (FBS) were positive and negative controls. ANOVA and Duncan tests were used for statistical analysis.

Results: The cytotoxicity of different concentrations of hydroxyapatite nanoparticles on human-derived oral epithelium cell line in 24 ($P< 0.001$), 48 ($P< 0.001$) and 72 hours ($P< 0.001$) was significantly different. The nano-hydroxyapatite particles at 0.5 to 1 mg/ml had the highest cytotoxicity effect on human-derived oral epithelium cells in 24, 48 and 72 hours. Lower concentrations than 0.05 mg/ml had the best biocompatibility properties in 24, 48 and 72 hours.

Conclusion: Hydroxyapatite nanoparticles had a good biocompatibility. The biocompatibility of hydroxyapatite nanoparticles were dose and time dependent. The lower concentrations than 0.05 mg/ml of nano-hydroxyapatite had the best biocompatibility over time.

Keywords: cytotoxicity, enzyme-linked immunosorbent assay, epithelial cells, in vitro techniques, nano-hydroxyapatite.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2025-05-21]