

بررسی میزان بیان (expression) فیبرونکتین، کلاژن نوع I و TGF- β توسط سلول‌های فیبروبلاست لیگامان پریودونتال انسانی در مجاورت مواد پرکننده انتهای ریشه

دکتر حسن رزمی[†] - دکتر سید ناصر استاد** - دکتر سارا فیاضی***

*دانشیار گروه آموزشی اندودنتیکس دانشکده دندانپزشکی و عضو مرکز تحقیقات دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی تهران

**دانشیار گروه آموزشی سم شناسی دانشکده دارو سازی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی تهران

***استادیار گروه آموزشی اندودنتیکس دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان

Title: Evaluation of fibronectin, type I collagen and TGF- β expression by human periodontal ligament fibroblasts exposed to root end filling materials

Authors: Razmi H. Associate Professor*, Ostad N. Associate Professor**, Fayyazi S. Assistant Professor***

Address: *Department of Endodontics, School of Dentistry, Tehran University of Medical Sciences

**Department of Toxicology, School of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences

***Department of Endodontics, School of Dentistry, Rafsanjan University of Medical Sciences

Background and Aim: Several materials have been introduced for retrograde fillings, pulp capping and sealing root perforations, but their biological effect on vital tissues and cells is not clear. The purpose of this study was to evaluate the reaction of human periodontal ligament fibroblasts to four root canal filling materials: Pro Root MTA, Root MTA, Portland cement and amalgam.

Materials and Methods: In this experimental study, impacted or semi impacted third molar teeth were extracted in aseptic conditions and tissues around the roots were used to obtain fibroblast cell line. After proliferation, cells were cultured in chamber slides and extracts of materials were added to wells. Fibronectin, type I collagen and TGF- β expression were measured by immunocytochemistry method. Data were analyzed by SPSS 11.0 using one way ANOVA and Tukey test. $P < 0.05$ was considered as the limit of significance.

Results: Collagen I expression was higher in Pro Root MTA group after 24 hours ($p < 0.05$) and in Portland cement group and positive controls after 48 hours. Portland cement group showed the highest expression of collagen after 1 week. There was no significant difference in fibronectin expression after 24 hours. After 1 week the highest expression of fibronectin was seen in Portland cement, Root MTA and Pro Root MTA groups. TGF- β expression was higher in amalgam, Root MTA and Pro Root MTA specimens after 24 hours and was the highest in Pro Root MTA group after 48 hours.

Conclusion: Based on the results of this study, Portland cement and Root MTA are comparable with Pro Root MTA and better than amalgam regarding their effects on human periodontal ligament fibroblasts.

Key Words: Type I collagen; Fibronectin; TGF- β ; Portland cement; MTA; Root MTA; Amalgam; Fibroblasts; Periodontal ligament

چکیده

زمینه و هدف: مواد مختلفی به عنوان پرکننده انتهای ریشه، پوشش پالپ یا ترمیم پر فوراسیون‌ها معرفی شده‌اند. اثرات بیولوژیک این مواد بر روی سلول‌ها و بافت‌های زنده روشن نیست. هدف از این مطالعه *in vitro* ارزیابی عملکرد سلول‌های فیبروبلاست لیگامان پریودونتال انسانی (HPDLF) در مجاورت چهار ماده مورد مصرف در درمان‌های اندو شامل Pro Root MTA، Root MTA، سیمان پرتلند و آمالگام بود.

روش بررسی: در این مطالعه آزمایشگاهی دندان‌های عقل نهفته یا نیمه نهفته سالم در شرایط آسپسی خارج شده و در محیط کشت DMEM غنی شده قرار گرفتند و برای کشت سلول‌های HPDLF از نسوج اطراف ریشه آنها استفاده شد. پس از کشت و تکثیر، سلول‌ها به تعداد ۴۰۰۰۰ در هر چاهک در chamber slide

[†] مؤلف مسؤول: نشانی: تهران - خیابان انقلاب - دانشگاه علوم پزشکی تهران - دانشکده دندانپزشکی - گروه آموزشی اندودنتیکس

تلفن: ۰۲۶۴۰۶۶۴۰ دورنگار: ۰۱۱۳۳۶۶۴۰ نشانی الکترونیک: hrazmi@tums.ac.ir

کاشته شدند و در مجاورت عصاره مواد مختلف قرار گرفتند. رنگ‌آمیزی در زمان‌های ۲۴ ساعت، ۴۸ ساعت و یک هفته انجام شد و هر آزمایش سه بار تکرار گردید (هر چاهک تحت تاثیر یک نوع ماده در یک زمان خاص قرار گرفت). متغیرهای بررسی شده شامل میزان بیان کلاژن نوع I، فیبرونکتین و β -TGF بود که توسط روش ایمونوسیتوشیمی به همراه نرم افزار Olysia Bioreport بررسی گردید. نتایج با روش آنالیز واریانس یک طرفه و تست Tukey توسط نرم‌افزار SPSS 11 تحت بررسی آماری قرار گرفت. $p < 0/05$ به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که بیان کلاژن نوع I در مدت زمان ۲۴ ساعت در گروه Pro Root MTA به صورت معنی‌داری بیشتر از بقیه مواد بود پس از ۴۸ ساعت بیشترین بیان کلاژن نوع I در گروه سیمان پرتلند و بعد از آن در گروه کنترل مثبت مشاهده گردید و پس از یک هفته نیز گروه سیمان پرتلند بیشترین میزان بیان کلاژن را نشان داد. پس از ۲۴ ساعت بیان فیبرونکتین بین گروه‌های مختلف تفاوت آماری معنی‌داری با یکدیگر نداشت ولی پس از ۴۸ ساعت بیشترین میزان بیان فیبرونکتین در گروه Pro Root MTA مشاهده شد. پس از یک هفته نیز بیشترین میزان بیان فیبرونکتین در گروه‌های سیمان پرتلند، Pro و Root MTA و Root MTA مشاهده گردید. بیان β -TGF پس از ۲۴ ساعت در گروه‌های آمالگام، Root MTA و Pro Root MTA بیشتر بود ($p < 0/05$) و پس از ۴۸ ساعت این میزان در گروه Pro Root MTA بیشتر از بقیه گروه‌ها بود. پس از یک هفته گروه‌های سیمان پرتلند، کنترل مثبت و Pro root MTA بیشترین میزان بیان β -TGF را نشان دادند.

نتیجه‌گیری: با توجه به بررسی‌های به عمل آمده می‌توان نتیجه گرفت که Root MTA و سیمان پرتلند از نظر اثر بر روی سلول‌های HPDLF قابل مقایسه با Pro Root MTA بوده و همچنین در بسیاری شرایط برتر از آمالگام بودند.

کلید واژه‌ها: کلاژن نوع I؛ فیبرونکتین؛ β -TGF؛ مواد پرکننده انتهایی ریشه؛ سیمان پرتلند؛ MTA؛ Root MTA؛ آمالگام؛ فیبروبلاست؛ لیگامان پریودونتال

وصول: ۸۶/۰۲/۱۹ اصلاح نهایی: ۸۶/۰۸/۲۰ تأیید چاپ: ۸۶/۱۲/۲۷

مقدمه

از معایب Pro Root MTA طولانی بودن زمان سفت شدن (setting time) و امکان جابه‌جایی یا تغییر شکل آن در حفره آماده شده در انتهای ریشه و نیز قیمت بالای آن می‌باشد (۹).
Root MTA ماده‌ای دیگر است که اخیراً در ایران به عنوان جانشینی برای Pro Root MTA مطرح شده است. این ماده به رنگ سفید و از نظر خواص فیزیکی مشابه Pro Root MTA است و در دانشکده دندانپزشکی تبریز ساخته و ارائه شده است. این ماده در مقایسه با Pro Root MTA خارجی قیمت ارزان‌تری داشته و دسترسی به آن ساده‌تر است (۱۰). در تحقیق لطفی و فیاض‌پور بر روی Root MTA و Pro Root MTA اختلاف ریزش بین این دو ماده معنی‌دار نبود (۱۱). همچنین در مطالعه‌ای دیگر ریزش بین Pro Root MTA و Root MTA با آمالگام معنی‌دار بود ولی دو گروه Pro Root MTA و Root MTA با هم تفاوت آماری معنی‌داری نداشتند (۱۲). همچنین در مطالعه رزمی و همکاران بر روی پاسخ بافتی به سه ماده Pro Root MTA، Root MTA و سیمان پرتلند در گربه تفاوت آماری معنی‌داری بین سه گروه از جهت میزان التهاب، وجود کپسول فیروز و شدت فیروز وجود نداشت (۱۳).

ماده دیگری که در مطالعات مختلف به عنوان جایگزینی برای Pro Root MTA مطرح شده، سیمان پرتلند است. ترکیب اصلی این

مواد مختلفی برای پر کردن انتهای ریشه در جراحی‌های اندودنتیک و هم چنین ترمیم پرفوراسیون‌ها توصیه شده‌اند. مطالعات متعدد مواد مختلفی را به عنوان ماده ایده آل جهت retrofilling توصیه نموده‌اند. طی یک قرن گذشته آمالگام به دلیل کاربرد آسان و قابل دسترس بودن به عنوان رایج‌ترین و پر مصرف‌ترین ماده جهت پرکردگی retrofill مورد استفاده قرار گرفته است. این ماده به خوبی توسط بافت نرم تحمل می‌شود، رادیوپاک است و مهروموم آپیکالی ابتدایی خوبی ایجاد می‌کند (۱). مواد دیگری نیز چون Pro Root MTA، Super EBA، IRM، رزین‌های کامپوزیتی و گلاس آیونومر اخیراً توصیه شده‌اند.

MTA (mineral trioxide aggregate) اولین بار توسط ترابی‌نژاد و همکاران در دانشگاه لومالیندا معرفی گردید (۲). این ماده به عنوان یک ترکیب مناسب برای پرکردگی انتهای ریشه و بستن فضای داخلی کانال معرفی شده است (۳-۶). این ماده حاوی ذرات بسیار ریز هیدروفیل می‌باشد و اجزا اصلی موجود در آن عبارتند از تری کلسیم سیلیکات، تری کلسیم آلومینات، تری کلسیم اکسید و سیلیکات اکسید. به علاوه مقادیر کمی از دیگر اکسیدهای فلزی در ماده وجود دارد که خصوصیات فیزیکی و شیمیایی ماده مربوط به آنهاست (۴، ۷، ۸).

پریودنتال از $\frac{2}{3}$ انتهای ریشه به صورت خراشیدن نسج گردید. توده های نسج داخل ظروف ۲۵ml حاوی ۴ml محیط کشت غنی DMEM قرار داده شد. نمونه های جدا شده در انکوباتور تحت حرارت 37°C و فشار $5\% \text{CO}_2$ قرار داده شدند. بعد از یک هفته جهت مشاهده رشد فیروبلاستها در ظروف کشت، نمونه ها توسط میکروسکوپ inverted با درشت نمایی $10\times$ تحت بررسی قرار گرفتند. محیط کشت سلولی هر هفته تعویض می شد. بدین صورت که محیط کشت مصرف شده نمونه ها در محیط استریل laminar air flow آسپیره شده و ظرف با محلول PBS شسته و آسپیره می گردید. سپس مقدار مناسب محیط کشت تازه به ظروف اضافه می شد. در صورت عدم مشاهده سلول های رویش یافته بعد از دو هفته ظروف حاوی نمونه ها از مطالعه حذف می شدند.

- تهیه عصاره

برای تهیه عصاره مواد مورد آزمایش و قرار دادن آنها در محیط کشت از روش غیرمستقیم استفاده شد. در این روش ۱۰۰mg از Pro Root MTA (Dentsply Tulsa, USA) با $3\% \text{H}_2\text{O}_2$ مخلوط گردید و به صورت قطعات 5×5 میلی متر در ۲ml محیط DMEM (در ظرف 35mm) قرار داده شد (۱۵). بعد از ۲۴ ساعت مایع DMEM کشیده شد و در سانتریفوژ 6000rpm به مدت ۵ دقیقه قرار گرفت تا ذرات معلق از آن حذف شود. مایع باقیمانده در سطح کشیده شده و از این به بعد محلول تست ۱ در زمان ۲۴ ساعت نامیده شد. (محلول تست ۱ در زمان ۲۴ ساعت عصاره Pro Root MTA در زمان ۲۴ ساعت می باشد). همین عمل در زمان ۴۸ ساعت و یک هفته نیز انجام و محلول تست ۱ در زمان های مزبور تهیه شد.

همین عمل برای Root MTA و سیمان Portland نیز انجام شد و محلول تست های ۲ و ۳ در زمان های مختلف (۲۴، ۴۸ ساعت و یک هفته) تهیه گردید (تست ۲ عصاره Root MTA و تست ۳ عصاره سیمان Portland در محیط کشت می باشد). در مورد آمالگام (Cinalux، شهید فقیهی - ایران) نیز ۱۰۰mg ماده پس از مخلوط کردن و قبل از setting اولیه (در ۸ دقیقه اول بعد از مخلوط کردن) در ۲ml محیط کشت DMEM قرار داده شد. بقیه مراحل مشابه MTA بود. به این ترتیب محلول تست شماره ۴ در زمان های مختلف تهیه شد (۱۶).

سیمان شامل کریستال های معدنی مصنوعی می باشد که مهمترین آنها کلسیم سیلیکات و آلومینیوم سیلیکات است (۳). در مطالعه Estrela و همکاران سیمان پرتلند از نظر اجزا شیمیایی کاملاً مشابه Pro Root MTA بود، به جز اینکه Pro Root MTA در ترکیب خود دارای اکسید بیسموت نیز می باشد که باعث رادیوپاسیتی آن می گردد (۱۴). در مطالعه حاضر، هدف ارزیابی عملکرد سلول های فیروبلاست لیگامان پریودنتال انسانی (HPDLF) در مجاورت مواد مذکور بود.

روشن بررسی

در این مطالعه تجربی آزمایشگاهی تعداد ۲۰ دندان عقل نهفته و نیمه نهفته مربوط به بیماران مراجعه کننده به بخش جراحی فک و صورت دانشکده دندان پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران انتخاب شد. محدوده سنی بیماران ۱۸-۲۵ سال بود. بیماران از لحاظ سیستمیک کاملاً سالم بوده و هیچ کدام از دندان ها دچار علائم پری کورونیت و التهاب نبودند. شرایط انتخاب دندان ها بدین صورت بود که با توجه به رادیوگرافی پانورکس حداقل $\frac{2}{3}$ از ریشه دندان تشکیل شده باشد و قرارگیری دندان در استخوان فک طوری باشد که با حداقل تروما، به راحتی با جراحی خارج شود. این مرحله توسط استادیاران یا دستیاران بخش جراحی فک و صورت دانشکده دندانپزشکی تهران انجام شد.

قبل از خارج کردن دندان از بیماران خواسته شد تا به مدت ۵ دقیقه سه بار محلول دهانشویه ۱٪ (Povidone Iodine) تولیدارو-تهران/ایران) را در دهان بگردانند تا فلور میکروبی به حداقل برسد. نمونه های سالم دندانی خارج شده بدون تماس با بزاق بیمار، بلافاصله توسط فورسپس جراحی داخل ظرف محتوی محیط کشت غنی (DMEM (10% FBS-1% Penicillin, Streptomycin) قرار داده شد. سپس نمونه ها به دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تهران، آزمایشگاه تحقیقات سلولی و مولکولی، گروه کشت سلولی منتقل و مراحل جداسازی نمونه ها در محیط استریل laminar air flow انجام گرفت. ابتدا نمونه ها با پنس به آرامی از ظرف حاوی محیط کشت خارج و سه بار در ظروف کشت حاوی محلول نمکی HBSS شسته شدند تا عاری از دبری ها و لخته خون شوند. سپس به کمک تیغ بیستوری شماره ۱۲ مبادرت به جدا سازی نسج لیگامان

- ایمونوسیتوشیمی

در مطالعه حاضر برای بررسی فیبرونکتین از کیت ایمونوسیتوشیمی LSAB2 (Dako-UK) و برای بررسی کلاژن I و β -TGF از horseradish peroxidase (HRP) conjugated affinity purified secondary antibody استفاده شد. مراحل کار به صورت زیر بود:

۱- برای هر نمونه از یک chamber slide (well ۴) استفاده شد که تعداد ۴۰۰۰۰ سلول فیبروبلاست (HPDLF) از پاساژهای ۳-۶ در هر well کاشته شد. سلول‌ها برای چسبیدن به کف چاله، ۲۴ ساعت در انکوباتور 37°C ، ۲۵٪ CO_2 قرار گرفتند.

۲- بعد از ۲۴ ساعت محیط هر well کشیده شد و محلول‌های تست و در مورد گروه کنترل، محیط کشت DMEM به میزان $500\ \mu\text{m}$ به هر well اضافه شد.

Well ۳،۲،۱ تست ۱ $500\ \mu\text{m}$

Well ۶،۵،۴ تست ۲ $500\ \mu\text{m}$

Well ۹،۸،۷ تست ۳ $500\ \mu\text{m}$

Well ۱۲،۱۱،۱۰ تست ۴ $500\ \mu\text{m}$

Well ۱۵،۱۴،۱۳ DMEM $500\ \mu\text{m}$ (Control +)

Well ۱۸،۱۷،۱۶ DMEM $500\ \mu\text{m}$ (Control -)

Well ۲۰،۱۹ DMEM $500\ \mu\text{m}$ (hematoxiline)

این عمل در سه زمان مختلف (۲۴ ساعت / ۴۸ ساعت / یک هفته) انجام شد، یعنی برای زمان ۲۴ ساعت، بعد از گذشت ۲۴ ساعت از قرار دادن محلول تست و برای زمان ۴۸ ساعت بعد از گذشت ۴۸ ساعت و برای زمان یک هفته بعد از گذشت ۱ هفته از قرار دادن محلول تست مربوطه قدم‌های بعدی (۳ به بعد) انجام گرفت.

۳- بعد از طی زمان مربوط (۲۴ ساعت / ۴۸ ساعت / یک هفته) مرحله ثابت سازی با محلول fixative (متانول ۸۰٪، استن ۲۰٪) انجام شد.

۴- پس از تکمیل مرحله ثابت‌سازی برای جلوگیری از فعالیت پراکسیداز اندوژن یا سودوپراکسیداز، نمونه‌ها در دمای اتاق با پراکسید هیدروژن ۳٪ به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شدند.

۵- well ها دو بار با محلول tris شسته شدند (هر بار ۵ دقیقه).

۶- نمونه‌ها ۱ ساعت در دمای اتاق با

۱٪ Bovine serum albumin انکوبه شدند، که این ماده اتصال

غیراختصاصی آنتی بادی‌های اولیه و ثانویه را بلاک می‌کند.

۷- نمونه‌های ۱، ۴، ۷، ۱۰ و ۱۳ با آنتی بادی اولیه فیبرونکتین با رقت $\frac{1}{4}$ انکوبه شدند (هر well با $100\ \mu\text{m}$ محلول آنتی بادی رقیق شده $\frac{1}{4}$). نمونه‌های ۲، ۵، ۸، ۱۱ و ۱۴ با آنتی بادی اولیه کلاژن نوع I با رقت $\frac{1}{4}$ انکوبه شدند (هر well با $100\ \mu\text{m}$ محلول آنتی بادی رقیق شده $\frac{1}{4}$). نمونه‌های شماره ۳ و ۶ و ۹ و ۱۲ و ۱۵ با آنتی بادی اولیه β -TGF با رقت $\frac{1}{4}$ انکوبه شدند (هر well با $100\ \mu\text{m}$ محلول آنتی بادی رقیق شده $\frac{1}{4}$). به بقیه نمونه‌ها PBS $100\ \mu\text{m}$ ، اضافه شد. نمونه‌ها در دمای 37°C یخچال به مدت ۱۲ ساعت قرار داده شدند.

به نمونه‌های کنترل (۱۶ تا ۲۰) آنتی بادی اولیه اضافه نشد ولی تمام مراحل مشابه بقیه نمونه‌ها روی آنها انجام شد. از آنجایی که هر گونه رنگ‌آمیزی مشاهده شده در این گروه‌ها نشان دهنده اتصال غیر اختصاصی آنتی بادی ثانویه می‌باشد، این تست ویژگی آزمایش ما را تعیین می‌کند (گروه کنترل منفی).

۸- نمونه‌های ۱، ۴، ۷، ۱۰، ۱۳ و ۱۶ به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق با biotinylated secondary antibody انکوبه شدند.

نمونه‌های ۲، ۳، ۵، ۶، ۸، ۹، ۱۱، ۱۲، ۱۴، ۱۵، ۱۷ و ۱۸ با HRP secondary antibody انکوبه شدند.

۹- نمونه‌های ۱، ۴، ۷، ۱۰ و ۱۳ با Streptavidin-horse radish peroxidase solution در دمای اتاق به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شدند.

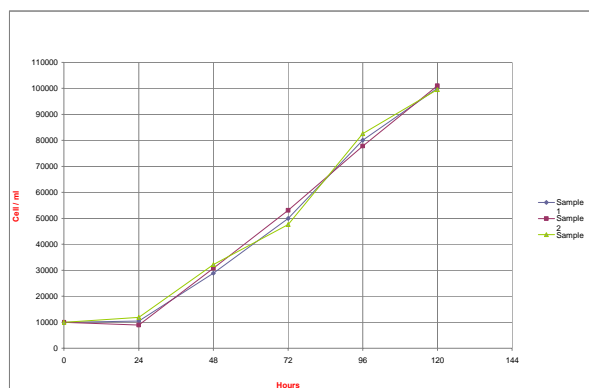
۱۰- تمام نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق با محلول کروموژن DAB انکوبه شدند.

۱۱- پوشش شیشه‌ای نمونه‌ها حذف شد.

همانطور که گفته شد به نمونه‌های شماره ۱۳، ۱۴ و ۱۵ که گروه کنترل مثبت بودند به جای محلول تست محیط کشت DMEM اضافه گردید تا وضعیت بیان آنتی ژن‌های مزبور توسط سلول‌ها در حالت طبیعی بررسی شود.

نمونه‌های ۱۶، ۱۷ و ۱۸ که گروه کنترل منفی آزمایش‌ها بودند برای ارزیابی صحت و اختصاصی بودن آنتی بادی ثانویه در نظر گرفته شدند. در این نمونه‌ها مرحله اضافه نمودن آنتی بادی اولیه حذف گردید، بنابراین انتظار می‌رود در صورت صحت آزمایش گروه‌های

یکسان می‌باشد.



نمودار ۱- منحنی رشد سلول‌ها در ۳ نمونه مختلف

فاز exponential رشد این سلول‌ها بین ۲۴ تا ۹۶ ساعت بعد از کشت بود. در فاز exponential (log) سلول‌ها در بهترین وضعیت سلامت‌شان می‌باشند و توانایی تطابق با محیط جدید را دارند.

این زمان برای تزاید سلول‌ها و بررسی‌های سلولی استفاده می‌شود. همانطور که در نمودار مشخص می‌باشد در ۲۴ ساعت اول کشت سلول‌ها در فاز lag یا سکون می‌باشند که رشد کمی دارند و در حال تطابق با محیط جدید می‌باشند. بنابراین اضافه نمودن مواد مورد آزمایش به سلول‌ها بعد از ۲۴ ساعت اول صورت می‌گیرد.

- نتایج مربوط به بیان کلاژن نوع I:

آنالیز واریانس دو طرفه نشان داد که زمان و نوع ماده بر روی میزان بیان کلاژن تاثیر معنی‌دار دارد و لذا آنالیز واریانس یک طرفه زمان‌های مختلف ۲۴ ساعت، ۴۸ ساعت و یک هفته انجام شد. طبق بررسی با تست tukey نتایج زیر حاصل آمد:

در مدت زمان ۲۴ ساعت بیان کلاژن در گروه Pro Root MTA به صورت معنی‌داری بیشتر از بقیه مواد بود. بیان کلاژن در گروه‌های آمالگام، سیمان پرتلند و گروه کنترل مثبت تفاوت معنی‌داری با یکدیگر نداشت و در هر سه آنها از گروه کنترل منفی و Root MTA به صورت معنی‌داری بیشتر بود. گروه کنترل منفی و Root MTA تفاوت معنی‌داری با هم نداشتند (جدول ۱). در مدت زمان ۴۸ ساعت گروه سیمان پرتلند میزان بالاتری از بیان کلاژن را نسبت به بقیه گروه‌ها نشان داد، بعد از آن گروه کنترل مثبت بیشتر از بقیه مواد بیان کلاژن را نشان داد و سپس به ترتیب گروه Pro Root MTA و Root MTA بیشترین بیان کلاژن ($p < 0.05$) را

کنترل منفی ما هیچگونه رنگ‌آمیزی را نشان ندهند. تمام آزمایشات ۳ بار تکرار شد.

- منحنی رشد سلول‌ها

رشد سلول‌ها در محیط کشت معمولاً طبق الگوی استاندارد می‌باشد. پس از طی کردن فاز lag یا سکون، متعاقب کاشت سلول‌ها، دوره رشد یا exponential دنبال می‌شود که فاز log نیز نامیده می‌شود. سلول‌ها بر اساس سرعت رشد و متابولیسم خاص خود، در طی دوره زمانی مشخص نیاز به تعویض محیط و پاساژ دارند.

برای دستیابی به منحنی رشد، نیاز به شمارش سلول‌ها در دوره‌های زمانی خاص می‌باشد. به همین منظور سلول‌ها با رقت 10^6 در ظرف well ۲۴ کاشته شدند. بعد از ۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶، ۱۲۰ ساعت تعداد سلول‌ها در ۳ well از کل well‌ها شمارش گردید و میانگین بدست آمده روی نمودار نشان داده شد. این عمل در ۳ نمونه سلولی بدست آمده از سه فرد مختلف انجام شد.

- آنالیز تصویری نیمه کمی

تصاویر دیجیتالی از رنگ‌آمیزی ایمونوسیتوشیمی سلول‌ها بدست آمد و با نرم افزار Olysia Bioreport Imaging آنالیز شد. شدت (intensity) رنگ‌آمیزی در چهار کوادرانت هر لام، تعیین شد. هر چه عددی که توسط نرم افزار به عنوان intensity بیان می‌شود بزرگ‌تر باشد نشان دهنده رنگ‌آمیزی کمتر نمونه‌ها می‌باشد یعنی هر چه متغیرهای مورد نظر بیان کمتری داشته باشد عدد مذکور بزرگتر خواهد بود.

- آنالیز آماری

آنالیز اطلاعات با نرم‌افزار SPSS 11 در سطح 0.05 با روش آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) انجام گردید. میانگین اعداد بدست آمده برای گروه کنترل منفی و مثبت نیز تعیین گردید و برای Post Test از تست Tukey استفاده شد.

یافته‌ها

همانطور که ذکر شد پس از شمارش سلول‌ها در زمان‌های معین نمودار پتانسیل رشد سلول‌ها در هر سه نمونه رسم گردید (نمودار ۱). بررسی هم‌زمان نمودارهای مذکور نشان داد که خواص رشدی فیبروبلاست‌های بافت لیگامان پرپودونتال در افراد مختلف تقریباً

نشان دادند (جدول ۲). در مدت زمان یک هفته، گروه سیمان پرتلند منفی قرار داشتند. گروه سیمان پرتلند بیان کلاژن بالاتری از بقیه بیشترین میزان بیان کلاژن را نشان داد و بعد از آن به ترتیب گروه Pro Root MTA، Root MTA، کنترل مثبت، آمالگام و گروه کنترل معنی دار نبود ($p=0/12$) (جدول ۳).

جدول ۱- مقایسه میزان بیان کلاژن با تعیین زیر گروه‌های آماری tukey post test (۲۴ ساعت)

مواد	N	سطح معنی داری = ۵٪		
		۱	۲	۳
Pro Root MTA	۷	۱۲۴/۱۸		
آمالگام	۱۳		۱۴۰/۰۸	
سیمان پرتلند	۸		۱۴۰/۴۷	
کنترل مثبت	۷		۱۴۶/۳۱	
کنترل منفی	۷			۱۷۵/۴۰
Root MTA	۹			۱۸۱/۷۶
Sig.		۱/۰۰	۰/۵۹	۰/۵۷

جدول ۲- مقایسه میزان بیان کلاژن با تعیین زیر گروه‌های آماری tukey post test (۴۸ ساعت)

مواد	N	سطح معنی داری = ۵٪			
		۱	۲	۳	۴
سیمان پرتلند	۱۰	۱۰۴/۳۰			
کنترل مثبت	۷		۱۴۰/۰۵		
Pro Root MTA	۵		۱۴۸/۷۶		
Root MTA	۷			۱۶۰/۵۶	
آمالگام	۱۰				۱۶۸/۹۸
کنترل منفی	۶				۱۷۱/۳۹
Sig.		۱/۰۰	۱/۰۰	۱/۰۰	۰/۹۵

جدول ۳- مقایسه میزان بیان کلاژن با تعیین زیر گروه‌های آماری tukey post test (یک هفته)

مواد	N	سطح معنی داری = ۵٪		
		۱	۲	۳
سیمان پرتلند	۱۰	۸۵/۷۹		
Pro Root MTA	۸	۱۱۱/۵۱	۱۱۱/۵۱	
Root MTA	۱۵		۱۱۸/۷۲	۱۱۸/۷۲
کنترل مثبت	۹		۱۳۷/۸۱	۱۳۷/۸۱
آمالگام	۱۵			۱۴۳/۸۷
کنترل منفی	۷			۱۷۴/۴۵
Sig.		۰/۱۲	۰/۱۱	۰/۱۴

- نتایج مربوط به بیان فیبرونکتین:

به کم به صورت زیر بود:

میزان بیان فیبرونکتین بین گروه‌های سیمان پرتلند، کنترل مثبت، آمالگام، Pro Root MTA و Root MTA در زمان ۲۴ ساعت تفاوت آماری معنی‌داری با یکدیگر نداشتند ($p=0/31$) (جدول ۴). در زمان ۴۸ ساعت میزان بیان فیبرونکتین در گروه Pro Root MTA بالاتر از Root MTA، کنترل مثبت و منفی بود ($p=0/09$) ولی با گروه‌های سیمان پرتلند و آمالگام تفاوت معنی‌داری نداشت (جدول ۵). در زمان یک هفته میزان بیان فیبرونکتین در گروه‌های مختلف به ترتیب از زیاد

سیمان پرتلند، Root MTA، آمالگام، Pro Root MTA، کنترل مثبت و کنترل مثبت و کنترل منفی. میزان بیان فیبرونکتین در گروه سیمان پرتلند با گروه Root MTA و Pro Root MTA تفاوت آماری معنی‌داری نداشت ($P=0/26$) ولی با گروه‌های آمالگام، کنترل مثبت و کنترل مثبت تفاوت آماری معنی‌داری داشت ($p<0/05$). اختلاف بین Root MTA، آمالگام و کنترل مثبت معنی‌دار نبودند ($p=0/17$) (جدول ۶).

جدول ۴- مقایسه میزان بیان فیبرونکتین با تعیین زیر گروه‌های آماری tukey post test (۲۴ ساعت)

مواد	N	سطح معنی‌داری = ۵٪	
		۱	۲
سیمان پرتلند	۸	۱۲۲/۶۲	
کنترل مثبت	۶	۱۲۴/۴۳	
آمالگام	۳	۱۳۱/۲۱	
Pro Root MTA	۱۲	۱۴۲/۲۲	۱۴۲/۲۲
Root MTA	۸	۱۴۵/۵۸	۱۴۵/۵۸
کنترل منفی	۴	۱۷۴/۶۶	
Sig.		۰/۳۱	۰/۰۶

جدول ۵- مقایسه میزان بیان فیبرونکتین با تعیین زیر گروه‌های آماری tukey post test (۴۸ ساعت)

مواد	N	سطح معنی‌داری = ۵٪		
		۱	۲	۳
Pro Root MTA	۱۰	۱۲۶/۴۱		
سیمان پرتلند	۸	۱۳۹/۵۱	۱۳۹/۵۱	
آمالگام	۱۰	۱۴۰/۵۲	۱۴۰/۵۲	
Root MTA	۸	۱۵۲/۳۰	۱۵۲/۳۰	۱۵۲/۳۰
کنترل مثبت	۵	۱۵۶/۶۰		
کنترل منفی	۵	۱۷۵/۹۵		
Sig.	۰	۰/۰۹	۰/۱۶	۰/۹۶

جدول ۶- مقایسه میزان بیان فیبرونکتین با تعیین زیر گروه‌های آماری (یک هفته)

مواد	N	سطح معنی‌داری = ۵٪		
		۱	۲	۳
سیمان پرتلند	۷	۱۱۲/۶۳		
Root MTA	۱۱	۱۲۸/۷۰	۱۲۸/۷۰	
Pro Root MTA	۸	۱۳۳/۰۴	۱۳۳/۰۴	
آمالگام	۹	۱۴۲/۷۴		
کنترل مثبت	۹	۱۵۱/۳۵	۱۵۱/۳۵	۱۵۱/۳۵
کنترل منفی	۳	۱۷۶/۶۷		
Sig.		۰/۲۶	۰/۱۷	۰/۰۹

نتایج مربوط به بیان β -TGF:

گروه‌ها بالاتر بود و بعد از آن به ترتیب Root MTA، آمالگام و کنترل منفی قرار داشتند. گروه کنترل مثبت و سیمان پرتلند به طور معنی‌داری از Pro Root MTA، Root MTA، آمالگام، و کنترل منفی بیشتر بود ($p < 0/05$). ولی گروه کنترل مثبت با سیمان پرتلند تفاوت آماری معنی‌داری را نشان نداد ($p = 0/94$).
گروه‌های Root MTA، Pro Root MTA، آمالگام نیز با یکدیگر تفاوت آماری معنی‌داری نداشتند ($p = 0/45$) (جدول ۷-۹).

میزان بیان β -TGF در زمان ۲۴ ساعت در گروه‌های آمالگام، Pro Root MTA و Root MTA بیشتر از بقیه گروه‌ها بود، مشخصاً گروه آمالگام دارای اختلاف معنی‌داری با سایر گروه‌ها بود ($p < 0/05$).
میزان بیان β -TGF در ۴۸ ساعت در گروه Pro Root MTA بیشتر از بقیه گروه‌ها بود ($p < 0/05$). میزان بیان β -TGF در زمان یک هفته در گروه‌های سیمان پرتلند، کنترل مثبت و Pro Root MTA از بقیه

جدول ۷- مقایسه میزان بیان β -TGF با تعیین زیر گروه‌های آماری (۲۴ساعت)

مواد	N	سطح معنی‌داری = ۵٪	
		۱	۲
آمالگام	۴	۱۶۱/۰۴	
Pro Root MTA	۶	۱۶۶/۶۹	۱۶۶/۶۹
Root MTA	۸	۱۷۰/۷۵	۱۷۰/۷۵
سیمان پرتلند	۸		۱۷۴/۷۲
کنترل منفی	۷		۱۷۵/۴۰
کنترل مثبت	۷		۱۷۷/۸۵
Sig.		۰/۱۲	۰/۰۵

جدول ۸- مقایسه میزان بیان β -TGF با تعیین زیر گروه‌های آماری (۴۸ساعت)

مواد	N	سطح معنی‌داری = ۵٪		
		۱	۲	۳
Pro Root MTA	۹	۱۵۰/۲۸		
کنترل منفی	۶		۱۶۶/۵۱	
سیمان پرتلند	۶		۱۷۰/۱۳	۱۷۰/۱۳
کنترل مثبت	۷		۱۷۱/۳۷	۱۷۱/۳۷
آمالگام	۶			۱۷۳/۰۸
Root MTA	۱۴			۱۷۴/۹۷
Sig.		۱/۰۰	۰/۱۳	۰/۱۳

جدول ۹- مقایسه میزان بیان β -TGF با تعیین زیر گروه‌های آماری (یک هفته)

مواد	N	سطح معنی‌داری = ۵٪			
		۱	۲	۳	۴
سیمان پرتلند	۱۲	۱۰۱/۰۵			
کنترل مثبت	۹		۱۱۰/۱۴		
Pro Root MTA	۱۰		۱۳۷/۸۷	۱۳۷/۸۷	
Root MTA	۸			۱۳۹/۹۶	
آمالگام	۱۲			۱۵۶/۱۶	۱۵۶/۱۶
کنترل منفی	۹				۱۷۷/۴۵
Sig.		۰/۹۴	۰/۰۷	۰/۴۵	۰/۲۸

بحث و نتیجه گیری

در این مطالعه، برای مشابه سازی بیشتر شرایط مطالعه با شرایط *in vivo* از سلول های HPDLF که به نظر می رسد از نظر مورفولوژی و بیان پروتئین های مختلف تفاوت هایی با دیگر انواع فیروبلاست ها مثل L929 و فیروبلاست های لته (HGF) دارند استفاده نمودیم (۱۷-۱۹). در بررسی اثرات مواد مختلف بر روی سلول های HPDLF عصاره مواد در محیط کشت (DMEM) تهیه شد تا از اثرات مضر مستقیم مواد بر روی سلول ها مثل لیز و نکروز سلولی جلوگیری شود (۲۰).

گروه کنترل مثبت بروز کلاژن، $TGF-\beta$ و فیبرونکتین را به عنوان متغیرهای مطالعه در مدت زمان ۲۴ ساعت، ۴۸ ساعت و یک هفته در حالت طبیعی در سلول های HPDLF نشان داد. در بررسی فلوسیتومتری توسط Kuru و همکاران بر روی خواص فیروبلاست های لته و پریدونتال لیگامنت، بیان فیبرونکتین و کلاژن نوع I در حالت طبیعی در این سلول ها نشان داده شد (۲۱).

گروه کنترل منفی نیز برای نشان دادن اختصاصی بودن روش مطالعه استفاده می شود. در این گروه هرگونه رنگ آمیزی نشان دهنده رنگ گرفتن غیر اختصاصی پروتئین های دیگر توسط آنتی بادی ثانویه می باشد (چون آنتی بادی اولیه وجود ندارد). در مطالعه حاضر با آنالیز واریانس یک طرفه و Tukey post test بیان کلاژن نوع I پس از یک هفته در گروه سیمان پرتلند بالاتر از گروه کنترل مثبت، Root MTA، آمالگام و کنترل بود که البته گروه سیمان پرتلند با MTA تفاوت آماری معنی داری نداشت. با توجه به خصوصیات بسیار مشابه فیزیکی و شیمیایی سیمان پرتلند و Pro Root MTA تشابه اثر عصاره این دو ماده بر روی سلول های HPDLF دور از ذهن نمی باشد.

در تحقیق مشابهی، Nakayama و همکاران رفتار سلول های شبه استئوبلاست را از جهت مورفولوژی و بیان کلاژن نوع I و mRNA پروتئین های وابسته استخوانی در مجاورت Pro Root MTA بررسی نمودند. کلسیم آزاد شده از Pro Root MTA هیدراته شده پس از سه روز ۱۳۰ ppm در سالیین بود. فعالیت آلکالین فسفاتاز در مجاورت MTA مشابه گروه کنترل بود. پرولیفراسیون سلولی و بیان mRNA کلاژن نوع I به صورت معنی داری پایین تر بود در حالیکه بیان mRNA استئوپونتین پس از ۳ روز به صورت معنی داری بالاتر از گروه

کنترل بود. در این بررسی MTA بدون مهار رشد سلولی، تمایز سلول های شبه استئوبلاست را مهار نمود (۲۲).

در مقایسه با مطالعه ما که میزان بیان کلاژن نوع I در گروه Pro Root MTA و سیمان پرتلند بالاتر از گروه کنترل مثبت بود، به این نتیجه می رسیم که این اختلاف می تواند در نتیجه شرایط آزمایش و نوع سلول های استفاده شده باشد. بیان کلاژن در سیتوپلاسم نواحی اطراف هسته دیده شد و بیان فیبرونکتین و $TGF-\beta$ در سیتوپلاسم به صورت منتشر بود. نکته جالب توجه در این بررسی میزان بیان بیشتر کلاژن و فیبرونکتین در مدت زمان یک هفته در گروه سیمان پرتلند نسبت به گروه کنترل مثبت می باشد که نشانگر وضعیتی است که در آن محیط اطراف سلول ها و مواد مورد آزمایش نه تنها سمی و مضر نبودند بلکه شرایط مطلوبی پدید آوردند که سلول ها به رشد و تکثیر خود ادامه دادند و میزان بیان مواد مورد نظر بیشتر از حالت طبیعی (کنترل مثبت) گردید.

$TGF-\beta$ یکی از سایتوکین های مهم و کلیدی بدن می باشد که در اعمال مختلفی مثل امبریونز، التهاب، تنظیم پاسخ ایمنی و بهبود زخم دخیل می باشد. $TGF-\beta$ توسط سلول های مختلف مثل پلاکت ها، سلول های التهابی نظیر ماکروفاژها و لنفوسیت ها، فیروبلاست ها، کندروسیت ها و استئوبلاست ها بیان می گردد. این سایتوکین می تواند بیان کلاژن نوع I، فیبرونکتین و استئونکتین و همچنین بیان ماتریکس استخوانی را تحریک کند و سنتز متالوپروتئینازهای بافتی را کاهش دهد (۲۳). در مطالعه حاضر میزان بیان $TGF-\beta$ بین گروه های مواد و کنترل مثبت و منفی در ۲۴ ساعت تفاوت آماری معنی داری نداشت و چون گروه کنترل منفی، فاقد هرگونه رنگ آمیزی اختصاصی بود، نتایج نشان دهنده آن است که در بقیه گروه ها نیز بیان $TGF-\beta$ وجود نداشته است یا حداقل در سطح معنی داری نبوده است. در زمان ۴۸ ساعت بیان $TGF-\beta$ در گروه Pro Root MTA به صورت معنی داری بالاتر از بقیه گروه ها بود.

بعد از یک هفته میزان بیان $TGF-\beta$ در گروه های مختلف (به جز گروه آمالگام) به صورت معنی داری بیشتر از گروه کنترل منفی بود. همچنین میزان بیان $TGF-\beta$ در گروه سیمان پرتلند به شکل معنی داری از Pro Root MTA، Root MTA و آمالگام بیشتر بود. با توجه به اینکه میزان بیان کلاژن و فیبرونکتین در گروه سیمان پرتلند

غیرزنده بودند. در اندازه‌گیری سیتوکین‌های آزاد شده توسط سلول‌ها، سطح β IL1, IL6, IL18, OC در سیمان پرتلند معمولی و MTA در هیچ مورد اختلاف معنی‌داری نداشتند (۲۴). با توجه به بررسی‌های به عمل آمده می‌توان نتیجه گرفت که Root MTA و سیمان پرتلند از نظر اثر بر روی سلول‌های HPDLF قابل مقایسه با Pro Root MTA بوده و همچنین در بسیاری شرایط برتر از آمالگام می‌باشند، لذا می‌توان سیمان پرتلند و MTA ایرانی را به عنوان جایگزین‌های ارزاتر برای MTA خارجی مورد بررسی قرار داد. در این زمینه البته مطالعات *in vivo* بیشتری لازم است و برای کاربری کلینیکی تأیید FDA و سایر مراکز ذی‌صلاح ضروری می‌باشد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی مصوب دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران به شماره قرارداد ۱۳۲/۱۱۰۹۸ مورخ ۸۴/۱۲/۱۸ می‌باشد. همچنین از پرسنل آزمایشگاه کشت سلولی دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تهران قدردانی می‌گردد.

(پس از یک هفته) بیشتر از بقیه گروه‌ها بود می‌توان نتیجه گرفت که یکی از دلایل بیان بیشتر به علت بیان بیشتر β -TGF در این گروه باشد که تولید و سنتز ماتریکس خارج سلولی را تحریک می‌کند. با توجه به اینکه منبع اصلی β -TGF سلول‌های التهابی و استخوانی است، وجود میزان کم β -TGF در کشت‌های HPDLF دور از انتظار نمی‌باشد.

در سال ۲۰۰۲، Abdullah و همکاران واکنش پذیرش نسجی دو نوع سیمان پرتلند (تقویت شده و معمولی) را توسط مشاهده سیتومورفولوژی سلول‌های استئوسارکوم (Saos-2) در مجاورت مواد مورد آزمایش، بررسی کردند. همچنین اثر این مواد در بروز نشانه‌های ریمادلینگ استخوانی بررسی شد. پس از تماس مستقیم گلاس آینومر، MTA و سیمان پرتلند (عادی و تقویت شده) بر روی سلول‌ها پس از ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، مورفولوژی سلول توسط میکروسکوپ الکترونی اسکن‌کننده (SEM) مشاهده و بررسی شد. در بررسی SEM سلول‌های مجاور MTA و دو نوع سیمان پرتلند همگی سالم و چسبیده به سطح بودند ولی سلول‌های مجاور گلاس آینومر گرد و

منابع:

- 1- Cohen S, Burns RC. Pathways of the Pulp, 8th ed. London: Mosby 2002.
- 2- Torabinejad M, Watson TF, Pitt Ford TR. Sealing ability of a mineral trioxide aggregate when used as a root end filling material. *J Endod.* 1993 Dec;19(12):591-5.
- 3- Torabinejad M, Hong CU, Pitt Ford TR, Kettering JD. Cytotoxicity of four root end filling materials. *J Endod.* 1995 Oct;21(10):489-92.
- 4- Torabinejad M, Hong CU, Pitt Ford TR, Kettering JD. Histologic assessment of mineral trioxide aggregate as a root-end filling in monkeys. *J Endod.* 1995 Oct;21(10):489-92.
- 5- Torabinejad M, Pitt Ford TR. Root end filling materials: a review. *Endod Dent Traumatol.* 1996 Aug;12(4):161-78.
- 6- Torabinejad M, Rastegar AF, Kettering JD, Pitt Ford TR. Bacterial leakage of mineral trioxide aggregate as a root-end filling material. *J Endod.* 1995 Mar;21(3):109-12.
- 7- Torabinejad M, Chivian N. Clinical applications of mineral trioxide aggregate. *J Endod.* 1999 Mar;25(3):197-205.
- 8- Schwartz RS, Mauger M, Clement DJ, Walker WA 3rd. Mineral trioxide aggregate: a new material for endodontics. *J Am Dent Assoc.* 1999 Jul;130(7):967-75.
- 9- Torabinejad M, Hong CU, McDonald F, Pitt Ford TR. Physical and chemical properties of a new root-end filling material. *J Endod.* 1995 Jul;21(7):349-53
- ۱۰- وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی کشور، واحد تولید مواد، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران (۱۳۷۹/۱۰/۱۰) (مرکز آذربایجان شرقی).
- ۱۱- لطفی، مهرداد (استاد راهنما); قیاض پور، بهزاد. مقایسه ریز نشت چهار ماده پر کننده انتهای ریشه. پایان نامه شماره ۵۹۱ رشته دندانپزشکی. دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز. ۸۱ - ۱۳۸۰.
- ۱۲- پریخ، مسعود (استاد راهنما); قاسم زاده، علی. مقایسه ریز نشت رنگ در Root MTA, Pro root MTA, و آمالگام در پرکردگی حفرات تروگرید. شماره ۴۲۸، دندانپزشکی، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی کرمان. ۸۱ - ۱۳۸۰.
- 13- Razmi H, Zarrabian M, Sharifian MR, Sharifi D, Sasani F, Ramezankhani N. A histological evaluation on tissue reaction to three implanted materials (MTA, Root MTA, and Portland cement type I) in the mandible of cats. *J dent* 2004;3(1): 62-69.
- 14- Estrela C, Bammann LL, Estrela CRA, Silva RS, Jesus JD. Antimicrobial and chemical study of MTA, Portland cement, calcium hydroxide paste, Sealapex and Dycal. *Braz Dent J* 2000 11(1): 3 - 9.
- 15- Hernandez EP, Botero TM, Mantellini MG, McDonald NJ, Nör JE. Effect of ProRoot MTA mixed with chlorhexidine on apoptosis and cell cycle of fibroblasts and macrophages in vitro. *Int Endod J.* 2005 Feb;38(2):137-43.
- 16- Lin CP, Chen YJ, Lee YL, Wang JS, Chang MC, Lan WH, Chang HH, Chao WM, Tai TF, Lee MY, Lin BR, Jeng JH. Effects of root-end filling materials and eugenol on mitochondrial dehydrogenase activity and cytotoxicity to human periodontal ligament fibroblasts. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2004 Nov 15;71(2):429-40.
- 17- Somerman MJ, Archer SY, Imm GR, Foster RA. A comparative study of human periodontal ligament cells and gingival fibroblasts in vitro. *J Dent Res.* 1988 Jan;67(1):66-70.
- 18- Mariotti A, Cochran DL. Characterization of fibroblasts derived from human periodontal ligament and gingiva. *J Periodontol.* 1990 Feb; 61(2): 103-11.
- 19- Palaiologou AA, Yukna RA, Moses R, Lallier TE. Gingival,

dermal, and periodontal ligament fibroblasts express different extracellular matrix receptors. *J Periodontol.* 2001 Jun;72(6):798-807.

20- Saidon J, He J, Zhu Q, Safavi K, Spångberg LS. Cell and tissue reactions to mineral trioxide aggregate and Portland cement. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2003 Apr;95(4):483-9.

21- Kuru L, Parkar MH, Griffiths GS, Newman HN, Olsen I. Flow cytometry analysis of gingival and periodontal ligament cells. *J Dent Res.* 1998 Apr;77(4):555-64.

22- Nakayama A, Ogiso B, Tanabe N, Takeichi O, Matsuzaka

K, Inoue T. Behaviour of bone marrow osteoblast-like cells on mineral trioxide aggregate: morphology and expression of type I collagen and bone-related protein mRNAs. *Int Endod J.* 2005 Apr;38(4):203-10.

23- Igotz RA, Endo T, Massagué J. Regulation of fibronectin and type I collagen mRNA levels by transforming growth factor-beta. *J Biol Chem.* 1987 May 15;262(14):6443-6.

24- Abdullah D, Pitt Ford TR, Papaioannou S, Nicholson J, McDonald F. An evaluation of accelerated Portland cement as a restorative material. *Biomaterials.* 2002 Oct;23(19):4001-10.