# بررسی اثر سمیت سلولی عامل باندینگ عاجی AdheSE

**دکتر سپیده بانوا[†]*- دکتر کاوه نجیب فرد**- دکتر محمد حسین قهرمانی***- دکتر سید ناصر استاد*****

*استادیار گروه آموزشی دندانپزشکی ترمیمی دانشکده دندانپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی تهران

**دندانپزشک

***استادیار گروه آموزشی سم‌شناسی و داروشناسی دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی تهران

****دانشیار گروه آموزشی سم‌شناسی و داروشناسی دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی تهران

**Title:** Cytotoxic effect of a dentin bonding agent: AdheSE

**Authors:** Banava S. Assistant Professor*, Najibfard K. Dentist, Ghahremani MH. Assistant Professor**, Ostad SN. Associate Professor**

**Address:***Department of Restorative Dentistry, Faculty of Dentistry, Islamic Azad University, Tehran

**Department of Toxicology and Pharmacology, Faculty of Pharmacy, Medical Sciences/ University of Tehran

**Background and Aim:** An important requirement for a dentin bonding agent is biological compatibility. Since dentin bonding agents are placed in cavity preparations with subgingival extensions, with direct contact to gingival and mucosal tissues, tissue response to these materials must be investigated. The aim of this study was to examine the cytotoxicity of AdheSE, a self etching adhesive, on human gingival fibroblasts.

**Materials and Methods:** In this experimental in vitro study, primary human gingival fibroblasts were exposed to different dilutions of primer & bond of AdheSE (Vivadent, Liechtenstein). The toxicity of the primer was tested in 30 seconds, 300 seconds and 24 hours. The cytotoxicity of the bond was analyzed in uncured mode after 20 seconds, 5 minutes and 24 hours. In cured mode, tested materials were analyzed after 24 and 48 hours. Cytotoxic effects were evaluated using MTT, cell counting and DNA condensation assays. Data were analyzed by two way repeated measure ANOVA with $p<0.05$ as the level of significance.

**Results:** MTT Assay revealed that uncured AdheSE Bond was toxic only in $10^{-1}$ dilution and the difference with control group was significant ($P<0.05$). By increasing the time to 300sec. and 24h, dilutions of $10^{-2}$ and $10^{-4}$ were the most cytotoxic respectively. Cytotoxicity of uncured primer after 30 sec. and 300 sec. began from $10^{-2}$ and after 24h began from $10^{-2}$ and reached to $10^{-1}$. AdheSE in cured mode showed significant difference with control group in 1:2 ($P<0.001$),1:4 & 1:6 ($P<0.01$) dilutions. In cell counting assay only the 1:2 dilution was significantly more toxic than control group. Apoptosis (a morphological and biochemical distinct form of cell death that regulates cell turnover) comprised in less than 5% of total death in both cured and uncured adhesives.

**Conclusions:** Based on the results of this study, by increasing the exposure time, smaller amounts of bonding could be cytotoxic. Cytotoxicity was related to material, dilution, time of exposure and curing. It would be necessary to identify the toxic ingredients of this adhesive and replace them by more biocompatible components.

**Key Words:** Cytotoxicity; Dentin bonding agent; Gingival fibroblasts; AdheSE

## چکیده

**زمینه و هدف:** زیست‌سازگاری یکی از مهمترین ویژگی‌های هر عامل باندینگ است. از آنجا که عوامل باندینگ عاجی در حفرات دندانی با گسترش زیر لثه‌ای، در تماس نزدیک با بافتهای لثه‌ای و مخاطی قرار می‌گیرند، بنابراین سنجش واکنش بافتی به این مواد امری ضروری است. مطالعه حاضر با هدف ارزیابی آزمایشگاهی اثر سمیت سلولی عامل باندینگ عاجی AdheSE بر سلول‌های فیبروبلاست لثه انسانی انجام شد.

**روش بررسي:** در ایـن تحقیـق آزمایشگاهی، سمیـت سلولـی ادهزیـو عاجـی AdheSE (باند و پرایمر) (Vivadent, Liechtenstein) به صورت پلیمریزه

[†] مؤلف مسؤول: نشانی: تهران- خیابان پاسداران- کوچه نیستان دهم- دانشکده دندانپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی تهران- گروه آموزشی دندانپزشکی ترمیمی
تلفن: ۱- ۲۲۵۶۴۵۷۰ نشانی الکترونیک: sbanava@yahoo.com



[ Downloaded from jdm.tums.ac.ir on 2024-11-30 ]

نشده و پلیمریزه شده، مورد بررسی قرار گرفت. جزء پرایمر به مدت ۳۰ ثانیه، ۳۰۰ ثانیه و ۲۴ ساعت و جزء باند به صورت پلیمریزه نشده به مدت ۲۰ ثانیه، ۳۰۰ ثانیه و ۲۴ ساعت، و هر دو به صورت پلیمریزه شده به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت در رقت‌های مختلف در مجاورت سلول‌های فیبروبلاست لثه انسانی اولیه قرار گرفتند. سمیت سلولی ترکیبات مورد مطالعه بـا آزمایشهای MTT، شمـارش سلولـی و DNA condensation مورد ارزیابی قرار گرفت. جهت آنالیز آماری داده‌های حاصله، از آنالیز ANOVA دو طرفه برای داده‌های تکراری استفاده و $p<0/05$ به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

**یافته‌ها:** آزمایش MTT، نشان داد که سمیت AdheSE Bond پلیمریزه نشده، پس از ۲۰ ثانیه مجاورت، تنها در رقت ۱–۱۰ اختلاف معنی‌داری با گروه کنترل داشت ($P<0/001$) و با افزایش زمان مجاورت به ۳۰۰ ثانیه و ۲۴ ساعت، بیشترین میزان سمیت به ترتیب در رقت‌های ۳–۱۰ و ۴–۱۰ مشاهده گردید. اثر سمیت سلولی پرایمر AdheSE به صورت پلیمریزه نشده، پس از ۳۰ و ۳۰۰ ثانیه مجاورت از رقت ۲–۱۰، و پس از ۲۴ ساعت مجاورت از رقت ۳–۱۰ شروع شد و در رقت ۱–۱۰ به حداکثر میزان خود رسید. آزمایش MTT نشان داد که جزء باند AdheSE در حالت پلیمریزه شده در ۲۴ ساعت در رقت‌های ۱:۲ ($P<0/001$)، ۱:۴ و ۱:۶ ($P<0/01$)، اختلاف معنی‌داری با گروه کنترل نشان داد، در حالی که در آزمایش شمارش سلولی، این اختلاف تنها در رقت ۱:۲ معنی‌دار بود ($P<0/001$). با انجام آزمایش DNA condensation مشخص شد که آپوپتوز (شکل مشخصی از مرگ سلولی به لحاظ مورفولوژیکی و بیوشیمیایی، که turnover سلولی را تنظیم می‌کند) در تمامی ترکیبات مورد مطالعه چه به صورت پلیمریزه نشده و چه به صورت پلیمریزه شده، کمتر از ۵٪ کل مرگ سلولی رخ داده را به خود اختصاص داد.

**نتیجه‌گیری:** عامل باندینگ عاجی AdheSE در هر دو جزء خود دارای اثر سمیت سلولی بر روی سلول‌های فیبروبلاست لثهٔ انسانی بود. میزان سمیت، با رقت، زمان مجاورت و پلیمریزاسیون ارتباط داشت. ضروری است که اجزاء سمی این ماده شناسایی شده و با موادی با سازگاری نسجی بهتر جایگزین شوند.

**کلید واژه‌ها:** سمیت سلولی؛ عامل باندینگ عاجی؛ فیبروبلاست‌های لثه؛ AdheSE

وصول: ۸۵/۰۲/۲۳ اصلاح نهایی: ۸۵/۰۶/۰۵ تأیید چاپ: ۸۵/۱۰/۳۰

## مقدمه

در چند سال گذشته کاربرد سیستم‌های ادهزیو همراه با مواد هم‌رنگ دندان جهت ترمیم ضایعات پوسیدگی و سایر نقایص دندانی در ناحیه قدامی و خلفی دهان بسیار افزایش یافته است (۱). عوامل باندینگ عاجی علاوه بر فراهم کردن گیر و قدرت چسبندگی بالا در ترمیمهای کامپوزیتی، سبب برقراری سیل لبه‌ای مطلوب بین دیواره‌های مینایی و عاجی حفره و رزین کامپوزیت می‌گردند (۲). این مواد مانند سایر مواد دندانی، باید علاوه بر دارا بودن خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خوب، سازگاری نسجی مناسبی داشته و سبب آسیب، تغییرات سلولی، سمیت سلولی و القاء پاسخ التهابی یا ایمنی نگردند (۳). بنابراین در انتخاب یک عامل باندینگ عاجی ایده‌آل باید به مواردی چون کارایی کلینیکی خوب و آسان، ارزان بودن، افزایش چسبندگی بین مادهٔ ترمیمی و ساختمان دندان، خصوصیات فیزیکی کافی و مناسب و از همه مهمتر سازگاری نسجی آن توجه نمود (۵،۴). این ویژگی عامل مهمی در تأیید یک مادهٔ دندانی توسط مراکز معتبری مانند ADA و FDA می‌باشد، زیرا هنگام کاربرد عوامل باندینگ عاجی در حفرات دندانی، به ویژه حفراتی که نزدیک لثه هستند، تماس این مواد با لثه، امری اجتناب ناپذیر است و از طرفی چون این ترکیبات برای مدت طولانی در تماس نزدیک با بافتهای مجاور مانند پالپ و پریودنشیوم قرار می‌گیرند، می‌توانند با توجه به وجود ترکیبات شیمیایی مختلف در ساختمان خود سبب بروز اثر سمیت سلولی گردند. به همین دلیل لزوم بررسی اثرات سمی ناشی از مواد مونومرهای موجود در مورد تمام عوامل باندینگ جدید وجود دارد (۶).

تاکنون چندین نسل از عوامل باندینگ عاجی با ترکیب شیمیایی و روند کاربرد کلینیکی مختلف فراهم شده‌اند که ادهزیوهای self etching-primer به دلیل حذف مرحله اچینگ و کاربرد کلینیکی ساده‌تر مقبولیت بیشتری یافته‌اند. اگرچه در تحقیقات پیشین سمیت سلولی عوامل باندینگ عاجی متنوعی بر سیستم‌های کشت سلولی مختلف مورد بررسی قرار گرفته است، ولی در مورد سمیت سلولی ادهزیوهای self etching-primer مطالعات بسیار اندکی انجام شده است و کمبود اطلاعاتی در این زمینه به وضوح وجود دارد.

در مطالعات گذشته به طور مکرر مسئله بروز آسیب بافت لثه در اثر کاربرد عوامل باندینگ عاجی، کانون بحث بوده است (۷). از جملهٔ این عوارض می‌توان به بروز واکنشهای آلرژیک (۸–۱۰)، واکنش‌های لیکنوئیدی (۱۱)، سفید شدن مخاط (۱۳،۱۲) و ایجاد تغییر رنگ به صورت تار و محو (nebulous discoloration) در مخاط دهان و لثه اشاره کرد (۱۴). بروز درماتیت تماسی و حساسیت نیز از دیگر عوارض کاربرد این مواد می‌باشد (۸–۱۱، ۱۵–۱۸). بروز سمیت سلولی ناشی از



[ Downloaded from jdm.tums.ac.ir on 2024-11-30 ]

کامپوزیت‌ها و ادهزیوهای عاجی که در چندین مطالعه به اثبات رسیده است، ممکن است علاوه بر التهاب یا نکروز مخاط دهان، موجب واکنشهای آلرژیک شود (۲۰،۱۹)، بنابراین مطالعاتی برای بررسی اثر این مواد بر فیبروبلاست‌های لثهٔ انسانی انجام شده است (۲۱،۳).

ممکن است سیستم‌های ادهزیو به دلیل وجود ترکیبات رزینی مانند HEMA، UDMA، Bis-GMA، TEGDMA، MDP، Methyl methacrylate، Glutaraldehyde و کامفوروکینون (CQ)، سبب بروز تغییرات سلولی و سمیت شوند (۲۸–۸،۱۲،۴،۳).

با توجه به اهمیت موضوع سازگاری نسجی در انتخاب مواد دندانی و از جمله عوامل باندینگ عاجی و همچنین کمبود اطلاعات در زمینهٔ سمیت سلولی عامل باندینگ عاجی AdheSE که از نوع self-etching primer می‌باشد، مطالعه حاضر جهت ارزیابی اثرات این ماده بر تغییرات سلولی به صورت آزمایشگاهی در آزمایشگاه کشت سلولی گروه سم‌شناسی و داروشناسی دانشکدهٔ داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تهران در سال ۱۳۸۳-۱۳۸۴ انجام شد.

## روش بررسي

مطالعه حاضر به صورت تجربی آزمایشگاهی بر روی سلول‌های فیبروبلاست لثهٔ انسانی انجام شد. اثر دو جزء باند و پرایمر عامل باندینگ عاجی AdheSE (Vivadent, Liechtenstein) بر تغییرات سلول‌های فیبروبلاست لثهٔ انسانی مورد بررسی قرار گرفت. اثر این ترکیبات به صورت پلیمریزه شده و پلیمریزه نشده، با رقت‌های مختلف و در زمانهای مجاورت متفاوت ارزیابی شد.

### کشت سلول‌های فیبروبلاست لثه انساني

در این مطالعه از کشت اولیهٔ سلول‌های فیبروبلاست لثهٔ انسانی استفاده شد که در تحقیق قبلی با استفاده از تکنیک explantation بافت، از نمونه‌های بیوپسی بافت لثهٔ بیمارانی که جهت جراحی دندان عقل نهفته به بخش جراحی فک و دهان دانشکدهٔ دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران مراجعه کرده بودند، تهیه شده بود (۲۹).

محیط کشت مورد استفاده برای این سلول‌ها، DMEM (Biochrom AG, Germany) بود که به آن ۱۰٪ FBS (Sigma, USA) و ۱٪ آنتی‌بیوتیک (۱۰۰۰۰ U/ml پنی‌سیلین و ۱۰ mg/ml استرپتومایسین) (PAN, Germany) اضافه شد. کشت‌های سلولی در داخل انکوباتور در هوای مرطوب حاوی ۵٪ CO2 و دمای ۳۷°C نگهداری شدند. لازم به ذکر است که شمارهٔ پاساژ تمامی کشت‌های سلولی استفاده شده در این تحقیق بین ۳ تا ۸ بود.

### مواد مورد آزمایش و آماده‌سازي آنها

ترکیبات موجود در عامل باندینگ عاجی مورد آزمایش در جدول ۱ آورده شده است. سمیت سلولی ادهزیو عاجی AdheSE (باند و پرایمر) که از نوع self etching-primer می‌باشد، در حالت پلیمریزه نشده و پلیمریزه شده مورد ارزیابی قرار گرفت. اثر سمیت سلولی این ماده در دو جزء AdheSE Bond و AdheSE Primer به صورت پلیمریزه نشده در رقت‌های $10^{-7}$ تا $10^{-1}$ به فاصلهٔ یک log مورد بررسی قرار گرفت. ابتدا این مواد در الکل اتیلیک $96^{O}$ حل شدند و سپس با انجام رقیق‌سازی سریالی و با استفاده از Phosphate Buffer Serum (PBS)، به رقت‌های مورد نظر رسانده شدند.

**جدول ۱- ترکیبات موجود در AdheSE**

| اجزاء | کارخانه سازنده |
|---|---|
| پرایمر: | **Vivadent, Lichtenstein** |
| Phosphonic acid acrylate<br>Bis-acrylamide | |
| آب | |
| باند: | |
| Bis-GMA/GDMA<br>HEMA و ذرات سیلیکای منتشر<br>Comphorquinon and stabilizer | |

در بخش دیگری از تحقیق اثر سمیت سلولی عامل باندینگ عاجی مورد مطالعه، به صورت پلیمریزه شده در رقت‌های ۱:۱۰، ۱:۸، ۱:۶، ۱:۴ و ۱:۲ مورد بررسی قرار گرفت. به منظور تهیهٔ این رقت‌ها، از آنجا که AdheSE شامل دو جزء (پرایمر و باند) بود، مشابه کلینیک و طبق دستور کارخانهٔ سازنده ابتدا سطح یک لامل شیشه‌ای استریل با ۱۰µl از پرایمر مرطوب و پس از چند دقیقه اضافه‌های آن توسط یک اپلیکاتور استریل حذف شد، به طوری که لایهٔ نازک سیال ایجاد شده بر روی لامل مورد نظر محو گردید، سپس ۱۰µl از AdheSE Bond در وسط لامل شیشه‌ای مذکور قرار داده شد و توسط دستگاه لایت کیور (Dentamerica, USA) با شدت نور ۴۵۰ $mW/cm^2$ و با



[ Downloaded from jdm.tums.ac.ir on 2024-11-30 ]

فاصلهٔ کمتر از نیم میلیمتر، طبق دستور کارخانه سازنده به مدت ۱۰ ثانیه پلیمریزه شد. پس از پلیمریزاسیون، نمونهٔ مورد آزمایش در یک محفظهٔ استریل قرار داده شد و به آن ۲ml محیط DMEM خالص (فاقد سرم) اضافه گردید. سپس نمونهٔ مذکور به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور قرار گرفت. این عمل به منظور جمع‌آوری موادی که از ادهزیو، پس از پلیمریزه شدن آزاد می‌شوند، انجام گرفت. پس از ۴۸ ساعت، عصارهٔ حاصله در یک سرنگ استریل جمع‌آوری و از یک فیلتر ۰/۲۲μm عبور داده شد. عصارهٔ استریل به دست آمده با استفاده از محیط DMEM خالص رقیق‌سازی شد و رقت‌های مذکور تهیه گردیدند.

## آزمایش‌های سمیت سلولی

برای سنجش سمیت سلولی عامل باندینگ عاجی مورد مطالعه از آزمایشهای MTT، شمارش سلولی وDNA condensation استفاده شد. سلول‌هایی که عامل باندینگ بر آنها اثر داده نشد و فقط در تماس با محیط کشت دارای ۱٪ الکل $96^{O}$ بودند و سلول‌هایی که تنها در معرض محیط کشت و DMEM خالص به یک نسبت بودند، به ترتیب به عنوان گروه کنترل در حالت پلیمریزه نشده و پلیمریزه شده در نظر گرفته شدند.

– آزمایشMTT: این آزمایش مؤید فعالیت میتوکندری در سلول می‌باشد و رابطه مستقیم با رشد سلول و بقاء سلولی دارد که طبق پروتکل رنگ MTT انجام شد (۳۰، ۳۱). ابتدا محلول 3-(4,5- Dimethyl-2-thiazolyl) -2,5-diphenyl -2H- terazoliumbromide (MTT) (Merck,Germany) در PBS با غلظت ۵ میلیگرم در میلی‌لیتر تهیه شد. سلول‌های فیبروبلاست در پلیت‌های ۹۶ خانه کاشته شدند ($10^{3}$ × ۶ سلول در هر چاهک). پس از ۲۴ ساعت انکوبه شدن، مواد مورد آزمایش با رقت‌های مورد نظر به چاهک‌های مربوطه اضافه و پس از اتمام تیمار دارویی در زمانهای مجاورت مورد نظر (در حالت پلیمریزه نشده پس از ۲۰ و ۳۰۰ ثانیه و ۲۴ ساعت و در حالت پلیمریزه شده پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت)، محیط کشت حاوی ترکیبات مورد آزمایش تعویض و با محیط کشت تازه حاوی MTT با غلظت ۰/۵ میلیگرم در میلی‌لیتر جایگزین شد. سپس سلول‌ها به مدت ۳ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷°C و ۵٪ $CO_2$ قرار گرفتند.

کریستال‌های نامحلول formazan تولید شده توسط سلول‌های زنده با استفاده از dimethyl sulfoxide (Merck- Germany) (DMSO- حل شد و کمیت formazan حاصله به روش اسپکتوفتومتری توسط دستگاه Microplate reader ( Anthos- Austria) در طول موج ۵۷۰nm تعیین گردید.

– آزمایش شمارش سلولی: در این آزمایش از رنگ‌آمیزی تریپان بلو برای بررسی میزان تغییر در نفوذپذیری غشاء سلولی جهت اندازه‌گیری سمیت سلولی استفاده شد. رنگ مذکور تنها زمانی می‌تواند به داخل سلول نفوذ کند که غشاء سلولی به سبب اثر سمیت سلولی آسیب دیده باشد. برای انجام این آزمایش سلول‌های فیبروبلاست لثهٔ انسانی در پلیت‌های ۲۴ خانه کاشته شدند ($10^{4}$× ۳ سلول در هر چاهک). پس از ۲۴ ساعت انکوبه شدن، مواد مورد آزمایش با رقت‌های مورد نظر به چاهک‌های مربوطه اضافه و پس از اتمام تیمار دارویی در زمانهای مجاورت مورد نظر (در حالت پلیمریزه نشده پس از ۲۰ و ۳۰۰ ثانیه و ۲۴ ساعت و در حالت پلیمریزه شده پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت)، سلول‌ها توسط محلول تریپان بلو ۰/۴٪ رنگ‌آمیزی شده و سلول‌های زنده بر روی لام نئوبار و در زیر میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۱۰ برابر شمارش شدند و سپس غلظت سوسپانسیون سلولی محاسبه گردید.

– آزمایش DNA condensation: این آزمایش به عنوان یک تست تأییدی برای مرگ سلولی و همچنین ردیابی سلول‌های آپوپتوتیک و به دنبال آن تعیین نوع مرگ سلولی رخ داده توسط عوامل باندینگ عاجی مورد آزمایش، انجام گرفت. این آزمایش طبق پروتکل رنگ Hoechst 33258 انجام گرفت (۳۲). سلول‌های فیبروبلاست لثهٔ انسانی در ظروف chamber slide کاشته شدند ($10^{5}$× ۱ سلول در هر چاهک). پس از ۲۴ ساعت انکوبه شدن، ترکیبات مورد آزمایش به صورت پلیمریزه نشده و پلیمریزه شده به چاهک‌های مربوطه اضافه و پس از ۳۰۰ ثانیه و ۲۴ ساعت مجاورت در حالت پلیمریزه نشده و ۲۴ ساعت مجاورت در حالت پلیمریزه شده، رنگ‌آمیزی Hoechst انجام شد و سلول‌ها در زیر میکروسکوپ فلورسنت و با استفاده از نور UV مورد بررسی قرار گرفتند. طی این رنگ‌آمیزی، سلول‌های زنده هستهٔ آبی کمرنگ (پراکنده) از خود نشان دادند، ولی سلول‌های مرده به طریق آپوپتوز به دلیل متراکم شدن



[ Downloaded from jdm.tums.ac.ir on 2024-11-30 ]

هسته، هسته‌ای کوچک و با رنگ آبی پرنور و درخشان که ناشی از خاصیت فلوئورسان رنگ Hoechst می‌باشد، به نمایش گذاشتند. در هر field، ۵ ناحیه به صورت تصادفی انتخاب و تحت شمارش قرار گرفت. شمارش سلول‌های زنده و مرده و نسبت آنها با کل سلول‌های یک field، مقیاس اندازه‌گیری مرگ سلولی بود.

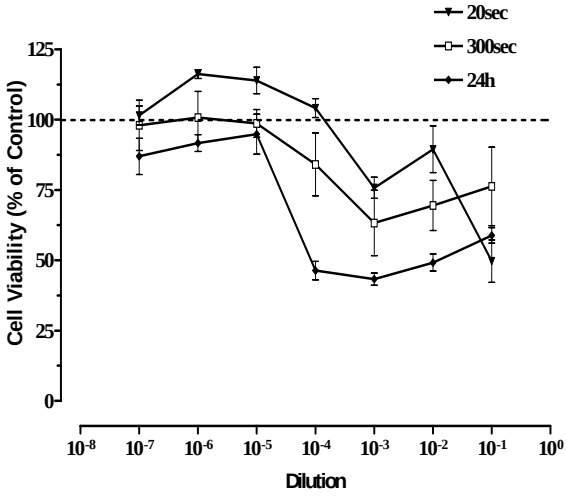
هر آزمایش حداقل سه مرتبه به طور مستقل برای هر ماده به صورت پلیمریزه شده و پلیمریزه نشده، در هر رقت و در هر یک از زمانهای مجاورت تکرار و هر بار حداقل به صورت ۳ تایی (triplicate) انجام شد. در این مطالعه جهت آنالیز آماری داده‌های حاصله، از آنالیز ANOVA دو طرفه برای داده‌های تکراری و متعاقباً از آنالیز واریانس یک طرفه برای داده‌های تکراری و آنالیز واریانس یک طرفه به همراه post test به طریق Tukey استفاده و $p<۰/۰۵$ به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

## یافته‌ها

در مورد اجزاء باندینگ AdheSE مقایسه سمیت سلولی بر حسب زمان‌های مجاورت و رقت‌های مختلف صورت گرفت. نتیجه آنالیز واریانس داده‌های تکرار (Repeated Measure Anova) نشان داد که اثر متقابل بین رقت‌های مختلف و زمان‌های مجاورت وجود دارد. به این منظور در مرحله بعد مقایسه سمیت سلولی در هر زمان مجاورت بین رقت‌های مختلف و نیز در هر رقت بین زمان‌های مختلف صورت گرفت.

**نتایج آزمایش MTT**:

در نمودار ۱، اثر سمیت سلولی ترکیب AdheSE Bond به صورت پلیمریزه نشده در زمان‌ها و رقت‌های مختلف مشاهده می‌شود. این ماده با زمان مجاورت ۲۰ ثانیه در رقت‌های $۱۰^{-۳}$، $۱۰^{-۲}$ و $۱۰^{-۱}$ دارای اثر سمیت سلولی بوده که این اثر تنها در رقت $۱۰^{-۱}$ اختلاف معنی‌داری با گروه کنترل نشان داد ($P<۰/۰۰۱$). میزان سمیت سلولی ناشی از این ماده در رقت مذکور معادل ۵۰/۴٪ بود. همچنین این ماده در رقت‌های $۱۰^{-۶}$ و $۱۰^{-۵}$ تا حدی بر روی سلول‌ها اثر القائی داشت که از نظر آماری معنی‌دار نبود. هنگامی‌که این ترکیب به مدت ۳۰۰ ثانیه با سلول‌ها مجاورت داده شد، اثر سمیت سلولی از رقت $۱۰^{-۴}$ شروع شد و در رقت $۱۰^{-۳}$ به حداکثر میزان خود یعنی ۳۶/۸٪ رسید. از این رقت به بعد افزایش اثری مشاهده نشد و منحنی به حالت plateau درآمد.




**نمودار ۱- درصد بقاء سلولی به دنبال اثر AdheSE Bond به صورت پلیمریزه نشده به تفکیک رقت‌ها و زمان‌های مختلف با استفاده از آزمایش MTT.**

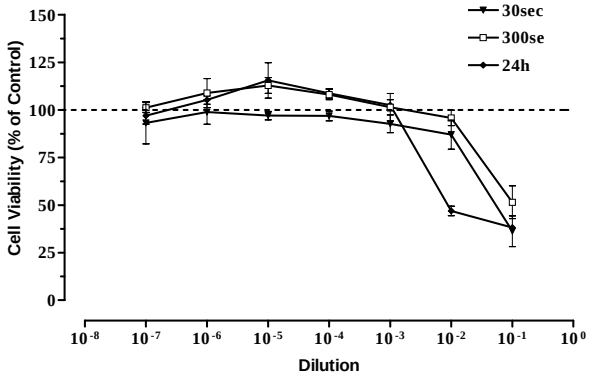
این ماده با این زمان مجاورت در رقت‌های $۱۰^{-۷}$، $۱۰^{-۶}$ و $۱۰^{-۵}$ فاقد هرگونه اثری بر روی سلول‌ها بود. پس از ۲۴ ساعت مجاورت این ماده با سلول‌ها، مشاهده شد که از رقت $۱۰^{-۵}$ به بعد اثر سمیت سلولی بروز کرده، به طوری که در رقت $۱۰^{-۴}$ بیش از ۵۰٪ اثر سمیت سلولی مشاهده گردید. رقت‌های بعدی یعنی $۱۰^{-۳}$، $۱۰^{-۲}$ و $۱۰^{-۱}$، تغییر محسوسی را در میزان سمیت سلولی نشان ندادند. میزان سمیت سلولی این ماده در رقت‌های $۱۰^{-۷}$، $۱۰^{-۶}$ و $۱۰^{-۵}$ اختلاف معنی‌داری با گروه کنترل نداشت. اختلاف میزان سمیت سلولی با زمان مجاورت ۳۰۰ ثانیه در مقایسه با زمان مجاورت ۲۴ ساعت، تنها در رقت $۱۰^{-۴}$ معنی‌دار بود ($P<۰/۰۵$).

در مقایسهٔ زمان‌های ۲۰ ثانیه و ۲۴ ساعت نیز همین وضعیت مشاهده شد ($P<۰/۰۰۱$). از سوی دیگر با افزایش زمان مجاورت از ۲۰ به ۳۰۰ ثانیه، هیچ‌گونه اختلاف معنی‌داری در میزان سمیت سلولی مشاهده نشد. در رقت $۱۰^{-۴}$ با افزایش زمان مجاورت از ۲۰ ثانیه به ۳۰۰ ثانیه میزان سمیت سلولی از صفر به ۱۶٪ افزایش یافت و پس از ۲۴ ساعت مجاورت، این اثر به بیش از ۵۰٪ رسید که با گروه کنترل،۲۰ ($P<۰/۰۰۱$) و ۳۰۰ ثانیه ($P<۰/۰۵$)، اختلاف معنی‌داری داشت. به این ترتیب با افزایش زمان مجاورت، میزان سمیت سلولی



[ Downloaded from jdm.tums.ac.ir on 2024-11-30 ]

افزایش یافت. اثر سمیت سلولی جزء پرایمر عامل باندینگ عاجی AdheSE در نمودار ۲ نشان داده شده است. در زمان‌های مجاورت ۳۰ و ۳۰۰ ثانیه، رقت $10^{-2}$ نقطهٔ آغاز اثرات سمی این ترکیب بوده و افزایش زمان مجاورت به ۲۴ ساعت، تنها موجب شد که اثرات سمی از یک رقت پایین‌تر یعنی $10^{-3}$ بروز کنند که البته از نظر آماری معنی‌دار نبود. میزان سمیت سلولی این ترکیب در رقت $10^{-1}$، پس از ۳۰ ثانیه به ۶۳/۸٪ رسید. افزایش زمان مجاورت از ۳۰ به ۳۰۰ ثانیه، تأثیر چندانی بر سمیت این ترکیب نداشته و اثرات مشابه بودند. میزان سمیت سلولی این ترکیب در رقت $10^{-1}$ و در زمان مجاورت ۳۰۰ ثانیه، ۴۸/۵٪ بود. از سوی دیگر پس از ۲۴ ساعت مجاورت، اثر سمیت سلولی از رقت $10^{-3}$ شروع شد و در رقت $10^{-2}$ به ۶۱/۹٪ رسید. این اثر از رقت$10^{-2}$ تا رقت $10^{-1}$ تغییر محسوسی را نشان نداد.

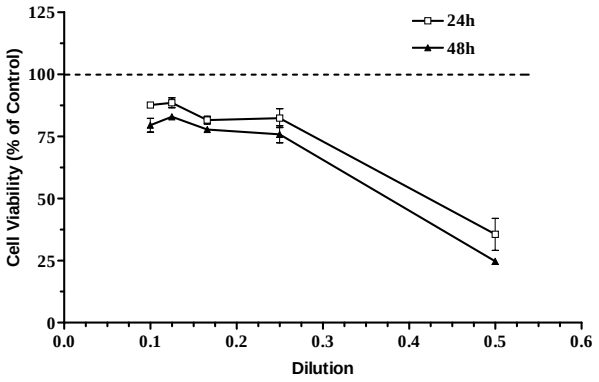



**نمودار ۲- درصد بقاء سلولی به دنبال اثر AdheSE Primer به صورت پلیمریزه نشده به تفکیک رقت‌ها و زمان‌های مختلف با استفاده از آزمایش MTT.**

اثرات سمی این ترکیب در زمان‌های مجاورت ۳۰ و ۳۰۰ ثانیه، تنها در رقت $10^{-1}$ تفاوت معنی‌داری با گروه کنترل داشت ($P<0/001$). از طرفی اختلاف میزان سمیت سلولی این ماده با زمان مجاورت ۳۰ ثانیه در مقایسه با زمان مجاورت ۳۰۰ ثانیه، در هیچ‌یک از رقت‌ها معنی‌دار نبود. در حالی که در ۲۴ ساعت مجاورت سلول‌ها با این ترکیب، رقت $10^{-2}$ تنها رقتی بود که اختلاف معنی‌داری با گروه‌های ۳۰ و ۳۰۰ ثانیه نشان داد ($P<0/01$). در رقت $10^{-2}$ پس از ۳۰ و ۳۰۰ ثانیه و ۲۴ ساعت به ترتیب ۱۳/۱٪، ۴/۲٪ و ۵۳/۲٪ سمیت سلولی مشاهده شد که نشانگر اثر زمان مجاورت بر میزان سمیت سلولی در این رقت می‌باشد. لازم به ذکر است که میزان سمیت سلولی در رقت $10^{-5}$ وابسته به زمان نبوده و در هر سه زمان مورد آزمایش تقریباً به یک اندازه بود.

با مقایسهٔ نتایج حاصل از آزمایش MTT مشخص شد که به طور کلی سمیت جزء باند عامل باندینگ عاجی AdheSE نسبت به جزء پرایمر بیشتر بود.

اثر سمیت سلولی عامل باندینگ عاجی AdheSE به صورت پلیمریزه شده با رقت‌های مختلف و در زمان‌های مجاورت ۲۴ و ۴۸ ساعت، در نمودار ۳ نشان داده شده است. این ترکیب پس از ۲۴ ساعت مجاورت در تمامی رقت‌ها سایتوتوکسیک بود، ولی اوج این اثر در رقت ۱:۲ مشاهده شد. این ترکیب در رقت ۱:۲ پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت به ترتیب ۶۴/۵٪ و ۷۵/۴٪ سمیت سلولی نشان داد. اثر سمیت سلولی این ماده در رقت‌های ۱:۴، ۱:۶، ۱:۸ و۱:۱۰، پس از گذشت ۲۴ ساعت به ترتیب ۱۷/۷٪، ۱۸/۵٪، ۱۱/۵٪ و ۱۲/۴٪ بود.




**نمودار ۳- درصد بقاء سلولی به دنبال اثر AdheSE به صورت پلیمریزه شده به تفکیک رقت‌ها و زمان‌های مختلف با استفاده از آزمایش MTT.**

از نظر آماری میزان سمیت سلولی این ترکیب در ۲۴ ساعت در رقت‌های ۱:۲ ($P<0/001$)، ۱:۴ و ۱:۶ ($P<0/01$)، اختلاف معنی‌داری با گروه کنترل داشت. با افزایش زمان مجاورت از ۲۴ ساعت به ۴۸ ساعت، میزان سمیت سلولی افزایش مختصری را نشان داد که اختلاف آن با گروه ۲۴ ساعت معنی‌دار نبود ($P>0/05$). به این ترتیب افزایش زمان مجاورت، تأثیر چندانی در میزان سمیت سلولی نداشت.

با مقایسهٔ نتایج حاصل از بررسی سمیت سلولی ترکیب AdheSE Bond به صورت پلیمریزه شده و پلیمریزه نشده توسط

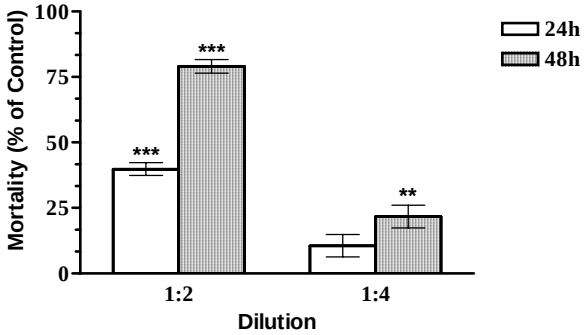


[ Downloaded from jdm.tums.ac.ir on 2024-11-30 ]

آزمایش MTT، مشخص شد که این ترکیب به صورت پلیمریزه نشده به مراتب سمیت بیشتری نسبت به حالت پلیمریزه شده ایجاد می‌کند.

### نتایج آزمایش شمارش سلولی

در بررسی تأثیر این ترکیبات به صورت پلیمریزه نشده بر سلول‌های فیبروبلاست لثهٔ انسانی، به علت رسوب این مواد در کف چاهک‌ها و ناتوانی تریپسین در جداسازی سلول‌ها، آزمایش شمارش سلولی در این حالت قابل انجام نبود. اثر سمیت عامل باندینگ عاجی AdheSE به صورت پلیمریزه شده بر فیبروبلاست‌های لثهٔ انسانی در نمودار ۴ نشان داده شده است. پس از ۲۴ ساعت مجاورت، این ماده در رقت‌های ۱:۴ و ۱:۲ سبب بروز اثر سمیت سلولی شد که این اثر از نظر آماری تنها در رقت ۱:۲ تفاوت معنی‌داری با گروه کنترل داشت (P<۰/۰۰۱). میزان سمیت سلولی مشاهده شده در این رقت ۳۹/۸٪ بود.



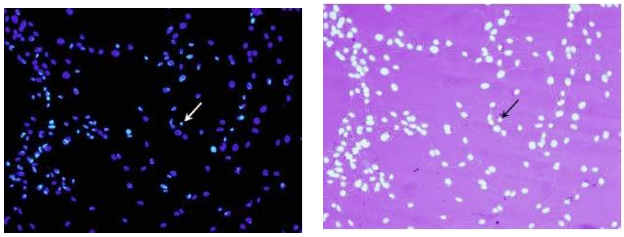

**نمودار ۴- درصد کشندگی سلولی ترکیب AdheSE به صورت پلیمریزه شده به تفکیک رقت‌ها و زمان‌های مختلف با استفاده از آزمایش شمارش سلولی.**

در بخش دیگری از این مطالعه هنگامی که سلول‌ها به مدت ۴۸ ساعت در مجاورت با این ترکیب قرار داده شدند، مشاهده شد که این ماده در هر دو رقت ۱:۴ و ۱:۲ سایتوتوکسیک بوده و میزان اثرات سمی به ترتیب معادل ۲۱/۷٪ و ۷۹٪ بود. اثرات سمی این ترکیب در رقت‌های فوق اختلاف معنی‌داری را با گروه کنترل نشان داد. از سوی دیگر میزان سمیت سلولی با افزایش زمان مجاورت از ۲۴ به ۴۸ ساعت تنها در رقت ۱:۲ تفاوت معنی‌داری داشت (P<۰/۰۰۱) که نشانگر تأثیر زمان بر میزان سمیت سلولی این ترکیب در این رقت می‌باشد. اختلاف میزان سمیت این ترکیب در رقت ۱:۴، در زمانهای ۲۴ و ۴۸ ساعت، از نظر آماری معنی‌دار نبود (نمودار ۴).

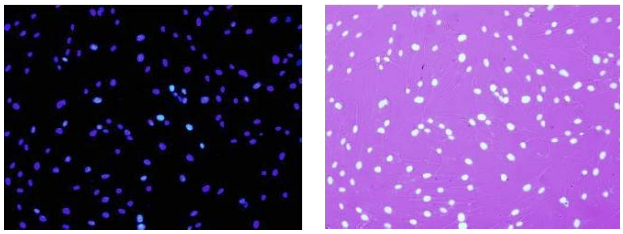
لازم به توضیح است که بر اساس مطالعهٔ pilot مشخص شد که ترکیب AdheSE به صورت پلیمریزه شده در رقت‌های پایینتر از دو رقت مذکور در هر دو زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت، مشابه گروه کنترل بود، بنابراین اثر سمیت سلولی ترکیب AdheSE تنها در این دو رقت (۱:۴ و ۱:۲) مورد بررسی قرار گرفت.

### نتایج آزمایش DNA condensation

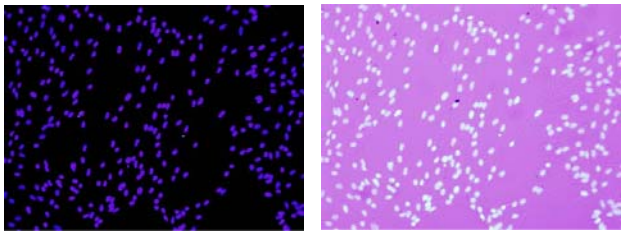
این آزمایش نشان داد که در تمامی ترکیبات مورد مطالعه چه به صورت پلیمریزه شده و چه به صورت پلیمریزه نشده میزان آپوپتوز مشاهده شده کمتر از ۵٪ بود، که هیچ‌گونه شباهتی با مدلهای القاء آپوپتوز نداشت (اشکال۱-۳). اشکال ۱ و ۲ نمونه‌هایی از تصاویر مربوط به آزمایش DNA condensation با بزرگنمایی ۲۰x می‌باشند. نمونه‌ای از سلول‌های آپوپتوتیک در شکل ۱ توسط فلش مشخص شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود، سلول‌های آپوپتوتیک بسیار کمیاب می‌باشند.



**شکل ۱- نمای سلول‌های فیبروبلاست لثه انسانی پس از مجاورت با AdheSE Bond**



**شکل ۲- نمای سلول‌های فیبروبلاست لثه انسانی پس از مجاورت با AdheSE Primer**



**شکل ۳- نمای سلول‌های فیبروبلاست لثه انسانی در گروه شاهد**



[ Downloaded from jdm.tums.ac.ir on 2024-11-30 ]

با مشاهدهٔ سلول‌ها در زیر میکروسکوپ با نور معمولی، تغییر شکل و کوتاه شدن استطاله‌های سلولی به خصوص در مورد AdheSE Bond به وضوح دیده می‌شود. در حین انجام این آزمایش دیده شد که سلول‌های فیبروبلاست لثهٔ انسانی برخلاف بسیاری از سلول‌های دیگر از لحاظ اندازهٔ هسته با یکدیگر متفاوت بودند. به طوری که سلول‌های بالغ، هستهٔ بزرگتر و سلول‌های جوانتر هستهٔ کوچکتری داشتند. این امر کار ردیابی سلول‌های آپوپتوتیک را با مشکل مواجه ساخت، بنابراین به جهت اطمینان بیشتر از نتایج حاصله، سلول‌های رنگ‌آمیزی شده با رنگ Hoechst 33258، علاوه بر نور UV در زیر میکروسکوپ فلورسنت، توسط نور معمولی نیز مورد بررسی قرار گرفتند. تصاویر سمت چپ با نور UV و تصاویر سمت راست با نور معمولی تهیه شده‌اند.

## بحث و نتیجه گیری

یکی از روش‌های ارزیابی سازگاری نسجی مواد دندانی مورد استفاده در دندانپزشکی، سنجش سمیت سلولی آنها در شرایط آزمایشگاهی است. اگرچه آزمایش‌های کاربردی معتبرتر می‌باشند، ولی بررسی سمیت سلولی به صورت آزمایشگاهی و در شرایط کاملاً کنترل شده و تکرارپذیر سبب می‌شود که تأثیر زمان، رقت، پلیمریزاسیون و اجزاء تشکیل دهنده به دقت مورد ارزیابی قرار گیرد.

تفاوت یافته‌های مطالعات کشت سلولی، می‌تواند به دلیل عواملی مانند نوع سلول، مواد مورد آزمایش و اهداف نهایی بیولوژیک باشد (۳۳). یکی از برتریهای تحقیق حاضر آن است که در آن از کشت اولیه سلول‌های فیبروبلاست لثه انسانی به دست آمده از explantation نمونه‌های حاصل از بیوپسی بافت لثه استفاده شد (۲۹). کشت اولیه این سلول‌ها دارای فنوتیپ طبیعی‌تر بود و واکنش آنها با آنچه که در شرایط کلینیکی بروز می‌کند، ارتباط دقیقتر و نزدیکتری داشت، بنابراین ارتباط دادن آنها به بافت مربوطه آسانتر است. علاوه بر این، کشت اولیه این سلول‌ها از نظر وضعیت متابولیک بسیار نزدیک به بافت مبدأ بوده و تقریباً تغییری را نشان نمی‌دهد. از این رو با استفاده از کشت‌های اولیه در مطالعات آزمایشگاهی، شرایط تحقیق بسیار به شرایط کلینیکی نزدیک می‌شود (۱، ۳۴).

در تحقیقاتی که تاکنون انجام شده است، سلول‌های فیبروبلاست موش شامل رده‌های سلولی L-929 (۲۴، ۳۵–۳۷) و Balb/c 3T3 (۲۲، ۳۸)، سلول‌های شبه ادنتوبلاست موش (رده سلولی MDPC-23) (۳۹)، سلول‌های پالپ انسانی (۴۰، ۴۱) و سلول‌های لیگامان پریودنتال انسانی (۴۲) نیز جهت ارزیابی سازگاری نسجی عوامل باندینگ عاجی مورد استفاده قرار گرفته‌اند. سلول‌های L-929 نسبت به فیبروبلاست‌های لیگامان پریودنتال انسانی، دستگاه‌های گلژی کمتری داشته و به همین جهت نسبت به اثرات محیطی مقاومت کمتری نشان می‌دهند و اثر سمیت مواد را بیش از واقعیت نشان می‌دهند. بدین ترتیب سلول‌های فیبروبلاست لثه انسانی مانند فیبروبلاست‌های لیگامان پریودنتال نسبت به فیبروبلاست‌های موش جهت آزمایش اثرات سمی مواد بر روی آنها، مناسب‌تر می‌باشند (۴۳).

در پژوهش کنونی اثر سمیت سلولی رقت‌های مختلف ادهزیو مورد مطالعه به صورت پلیمریزه نشده و پلیمریزه شده در زمان‌های مختلف بررسی شد. اگرچه از نظر کلینیکی نمی‌توان غلظتی از ماده را که به بافت می‌رسد تعیین کرد، ولی به دلیل عدم وجود یک برآورد واقعی از غلظتی از ماده که در حالت پلیمریزه شده و پلیمریزه نشده به بافت لثه می‌رسد، معمولاً بررسی اثر ادهزیوها در غلظت‌های متفاوتی صورت می‌گیرد تا غلظت‌هایی که می‌توانند موجب برانگیختن آسیب سلولی شوند، مشخص گردند. در مطالعه مشابهی که در سال ۲۰۰۲ به منظور بررسی اثر سمیت سلولی عوامل باندینگ عاجی به صورت cure شده بر سلول‌های پالپ انسانی اولیه توسط آزمایش MTT انجام شد، تمامی ترکیبات مورد آزمایش بر روی سلول‌های مذکور دارای اثرات سمی بود، همچنین قابلیت ایجاد سمیت سلولی بستگی به نوع مادهٔ مورد آزمایش داشت. رقتی که در این تحقیق مورد آزمایش قرار گرفت، معادل رقت ۱:۴ در مطالعه حاضر بود. با مقایسه نتایج حاصل از این تحقیق و مطالعه ما، مشخص شد که در این رقت در زمان مجاورت ۲۴ ساعت، Clearfil SE Bond تفاوت معنی‌داری با AdheSE نداشت، در حالی که Single Bond، Prime & Bond NT، Heliobond و Syntac Single Component به طور قابل ملاحظه‌ای سمیت بیشتری نشان دادند (۴۰).

در مطالعه مشابه دیگری با استفاده از آزمایش MTT اثر سمیت سلولی سه عامل باندینگ عاجی به صورت cure نشده بر سلول‌های پالپ انسانی مورد بررسی قرار گرفت. یکی از نقاط مشترک این تحقیق



[ Downloaded from jdm.tums.ac.ir on 2024-11-30 ]

و مطالعه حاضر، بررسی اثرات سمی مواد مورد آزمایش در رقت $10^{-3}$ بود که بالاترین میزان سمیت سلولی هر سه ماده به کار رفته در این تحقیق و AdheSE Bond در زمان مجاورت ۲۴ ساعت، در این رقت مشاهده شد. البته با مقایسه نتایج حاصل از این تحقیق و مطالعه حاضر، AdheSE Bond سمیت کمتری را نسبت به این سه عامل باندینگ عاجی (Syntac Sprint، Prime & Bond 2.1 و Single Bond) نشان داد (۴۱).

در مطالعه‌ای که سمیت سلولی چند سیستم باندینگ عاجی از نسلهای چهار و پنج به صورت پلیمریزه نشده و در رقت‌های مختلف بر روی فیبروبلاست‌های L-929 توسط آزمایش MTT مورد بررسی قرار گرفت، مشاهده شد که تمامی ترکیبات مورد آزمایش به صورت رقیق نشده سایتوتوکسیک بوده و با کاهش رقت، سمیت آنها به تدریج کاهش می‌یابد (۳۶). نتایج تحقیق حاضر نیز با وجود متفاوت بودن نوع ادهزیو و سلول به کار رفته، مشابه تحقیق مذکور بود، ضمن آن که مطالعه کنونی بر روی سلول‌های فیبروبلاست انسانی و با استفاده از سه آزمایش جهت ارزیابی سمیت سلولی انجام شده بود که دقت یافته‌ها را افزایش داد.

از آنجا که هنگام کاربرد کلینیکی، ادهزیو هم به صورت پلیمریزه نشده و هم پلیمریزه شده در تماس با بافتهای مجاور قرار می‌گیرد، بنابراین در این تحقیق ارزیابی اثر سمیت سلولی ادهزیو مورد بررسی در هر دو حالت انجام شد. زمان مجاورت سلول‌ها با ادهزیو نیز بر اساس زمان پیشنهادی کارخانه سازنده صورت گرفت. علاوه بر آن انتخاب زمان مجاورت ۳۰۰ ثانیه نیز در این مطالعه به این علت بود که زمان کار جهت تکمیل روند باندینگ، ۵ دقیقه در نظر گرفته شد (۴۲). زمان ۲۴ ساعت نیز با توجه به مطالعات مشابه و در نظر گرفتن این که اکثر مواد باند نشده، ظرف مدت یک روز از رزین‌های پلیمریزه شده آزاد می‌شوند، انتخاب گردید (۴۴).

در تحقیقی اثر سمیت سلولی شش عامل باندینگ عاجی به صورت پلیمریزه شده و پلیمریزه نشده بر سلول‌های L-929 توسط آزمایش شمارش سلولی مورد بررسی قرار گرفت. طبق این تحقیق تمامی مواد مورد آزمایش اثر سمیت سلولی وابسته به دوز داشتند که با افزایش زمان مجاورت از ۲۴ به ۷۲ ساعت، افزایش یافت. همچنین در آزمایش عوامل باندینگ عاجی به صورت پلیمریزه شده، تعداد سلول‌های زنده نسبت به آزمایش این مواد به صورت پلیمریزه نشده، به طور قابل ملاحظه‌ای بالاتر بود (۳۵). در مطالعه حاضر علیرغم متفاوت بودن عوامل باندینگ عاجی مورد آزمایش با تحقیق مذکور، نتایج مشابهی حاصل شد. به طوری که در اینجا نیز ادهزیو مورد آزمایش اثر سمیت سلولی وابسته به دوز داشت و با افزایش زمان مجاورت، این اثر افزایش یافت. همچنین اجزاء باندینگ عاجی به صورت پلیمریزه نشده به مراتب سمیت بالاتری نسبت به حالت پلیمریزه شده بروز دادند.

سیستم‌های ادهزیو به دلیل وجود برخی ترکیبات شیمیایی و آزاد شدن آنها و نیز اثر متقابلشان بر یکدیگر سبب بروز سمیت سلولی می‌شوند. مونومر Bis-GMA بالاترین میزان سمیت سلولی را دارا است و پس از آن به ترتیب مونومرهای UDMA، TEGDMA و HEMA قرار می‌گیرند. آزاد شدن این ترکیبات رزینی ممکن است، با آزار بافت لثه در شرایط کلینیکی مرتبط باشند (۲۲). اکثر مونومرها در غلظت‌های بالا می‌توانند سنتز پروتئین را متوقف کرده و باعث القاء مرگ سلولی شوند (۳۸). تفاوت مشاهده شده در میزان سمیت سلولی پرایمر و باند ادهزیو مورد بررسی در مطالعه حاضر، احتمالاً به نسبت سهم آنها از مونومرهای مختلف می‌باشد. اگرچه در تحقیق حاضر پرایمر اسیدی بود، ولی نسبت به جزء باند سمیت کمتری نشان داد، ضمن این که به نظر می‌رسد، دی‌متاکریلات‌های موجود در جزء باند AdheSE در سمیت بیشتر این ترکیب نسبت به پرایمر نقش داشته‌اند. البته این مسئله نیاز به بررسی اثر اجزاء تشکیل دهنده این ادهزیو در تحقیقات بعدی دارد.

نشت مونومرهای پلیمریزه نشده به درون یک فاز آبی مجاور نیز می‌تواند سبب بروز سمیت سلولی گردد (۲۳، ۴۵). مونومرهای آب دوست مانند HEMA سایتوتوکسیک بوده، ولی نسبت به مونومرهای آب‌گریزی مانند Bis-GMA یا UDMA، سمیت کمتری نشان می‌دهند (۲۲). مونومرهای آب‌گریز نمی‌توانند تحت شرایط آبی در شرایط کلینیکی، به خوبی منتشر شوند. با این حال زمانی که این مونومرها به صورت مخلوط با HEMA به کار می‌روند، انتشار آنها آسان می‌شود، زیرا HEMA خاصیت آب‌دوستی را در کل ترکیب افزایش می‌دهد. تحت این شرایط برخی از مونومرهای آب‌گریز، ممکن است سبب آسیب سلول‌ها شود.

بررسی Hanks و همکاران نشان داد، سمیت سلولی مونومرهای



[ Downloaded from jdm.tums.ac.ir on 2024-11-30 ]

آب‌گریز در شرایط آزمایشگاهی، در حضور HEMA افزایش پیدا می‌کند (۴۶)، ضمن این که HEMA یا TEGDMA می‌توانند بر سیستم ایمنی نیز تأثیر بگذارند (۴۷). کامفوروکینون که یک آغاز کننده نوری است، می‌تواند از طریق تولید رادیکال‌های آزاد و متعاقب آن گونه‌های اکسیژن واکنشی، سبب القاء سمیت سلولی گردد (۴۸-۵۰). نقش کامفوروکینون نه تنها به عنوان یک عامل سایتوتوکسیک (۲۸، ۴۸-۵۰)، بلکه به عنوان یک موتاژن (۲۷) به ثبت رسیده است. از این رو نشت این ترکیب می‌تواند علت سمی بودن ادهزیوها را تا حدودی توجیه نماید.

در تحقیق حاضر جهت افزایش دقت مطالعه، سه آزمایش سمیت سلولی انجام شد. پیشنهاد شده است که هر ماده توسط تعدادی از آزمایشهای مختلف in vitro و in vivo به طور کامل مورد ارزیابی قرار گیرد (۲۷). آزمایش MTT متابولیسم یا عملکرد سلول را مورد ارزیابی قرار می‌دهد که اساس آن تعیین کمیت فعالیت بیوشیمیایی سلول‌ها می‌باشد و به کمک آن می‌توان فعالیت تعدادی از آنزیم‌های سلولی را مورد بررسی و ارزیابی قرار داد (۳، ۳۱، ۳۲)، ولی نتایج حاصل از آن به طور صد در صد نشانگر مرگ سلولی نبود، بنابراین برای رسیدن به نتایج قطعی‌تر، نیاز به آزمایشهای مکمل می‌باشد. آزمایش شمارش سلولی نیز که در این تحقیق به کار رفت، بر این اصل استوار است که نقص در نفوذپذیری غشاء، معادل مرگ سلولی و یا بسیار نزدیک به آن می‌باشد. با آزمایش نفوذپذیری غشاء، زنده یا مرده بودن سلول‌ها در زیر میکروسکوپ تعیین می‌گردد (۳).

در مطالعات کشت سلولی که معمولاً جهت ارزیابی سازگاری نسجی مورد استفاده قرار می‌گیرند، اهداف مختلفی از جمله مرگ سلولی مورد توجه می‌باشند. دو مکانیسم مرگ سلولی شرح داده شده عبارت بودند از نکروز و آپوپتوز. در شرایط کلینیکی، نکروز سلولی با ایجاد التهاب در بافت مرتبط می‌باشد، همچنین آپوپتوز می‌تواند توسط یک سیگنال پیش التهابی آغاز گردد (۵۱). از این رو مکانیسم‌های مرگ سلولی مشاهده شده در شرایط آزمایشگاهی، می‌توانند نشانگر اثرات مشاهده شده در شرایط کلینیکی باشند.

از آنجا که در آزمایشهای سمیت سلولی، احتمالاً مرگ سلولی ایجاد شده در کوتاه مدت از طریق نکروز و در بلند مدت از طریق آپوپتوز صورت می‌گیرد، و با توجه به این که تراکم کروموزومی یکی از مارکرهای اصلی در آپوپتوز می‌باشد، جهت ردیابی سلول‌های آپوپتوتیک نیاز به انجام آزمایش DNA condensation بود. بر این اساس در پژوهش کنونی برای کسب نتایج دقیقتر، علاوه بر آزمایش MTT و شمارش سلولی، آزمایش DNA condensation نیز برای تأیید مرگ سلولی و ردیابی سلول‌های آپوپتوتیک انجام شد. میزان بروز آپوپتوز در مطالعه حاضر مشابه تحقیق اشاره شده در مطالعه Lehmann و همکاران بود (۳۴).

با توجه به نتایج به دست آمده، پیشنهاد می‌شود در هنگام کاربرد کلینیکی ادهزیوها تا آنجا که ممکن است از تماس عوامل باندینگ عاجی با بافت لثه جلوگیری شود. به این منظور می‌توان از وسایل محافظی چون رابردم استفاده نمود. همچنین بهتر است به منظور کاهش پخش ادهزیوها به بافت لثه، اضافه ادهزیو توسط اپلیکاتورها از حفره برداشته شود و پوار هوا به کار نرود. این عمل ضمن جلوگیری از پخش ادهزیو به بافت لثه، از نازک شدن بیش از حد لایهٔ ادهزیو و پلیمریزه نشدن آن نیز جلوگیری می‌کند (۳، ۵۲). علاوه بر این می‌توان بعد از اتمام درمان، دندان و بافت لثه مجاور را شستشو داد تا از غلظت بقایای به جا مانده از عوامل باندینگ عاجی کاسته شود.

از آنجا که پلیمریزه نمودن نوری عوامل باندینگ عاجی، رزین‌ها را در یک فاز جامد پلیمریزه می‌نماید، از این رو مقدار مونومرهای آزاد به طور قابل توجهی تقلیل یافته و به دنبال آن قابلیت ایجاد تحریکات مضر به طور اساسی کاهش پیدا می‌کند (۵۳)، بنابراین انجام پلیمریزاسیون عوامل باندینگ عاجی پیش از کاربرد ماده ترمیمی ضروری است (۳، ۵۲، ۵۴). همچنین پیشنهاد می‌شود، سمیت اجزاء سمی ادهزیو مورد بررسی، شناسایی و با موادی با سازگاری نسجی بهتر جایگزین شود.

اطلاعات حاصل از آزمایش‌های سمیت سلولی انجام گرفته در شرایط آزمایشگاهی، مرتبط با وضعیت شرایط کلینیکی بود، ولی مستقیماً قابل قیاس نمی‌باشد. به هر حال تا زمانی که اثرات جانبی عوامل باندینگ عاجی به طور کامل مورد مطالعه قرار گیرند، باید به منظور کاهش احتمال بروز تحریک لثه، احتیاط‌های لازم در کاربرد کلینیکی این مواد به عمل آید.

به طور کلی بر اساس یافته‌های مطالعه حاضر می‌توان نتیجه گرفت که: عامل باندینگ عاجی AdheSE دارای اثر سمیت سلولی بر



[ Downloaded from jdm.tums.ac.ir on 2024-11-30 ]

سلول‌های فیبروبلاست لثه انسانی است. اثر سمیت سلولی این ماده در دو جزء پرایمر و باند آن متفاوت می‌باشد. سمیت سلولی جزء باند با پلیمریزاسیون کاهش می‌یابد. با افزایش غلظت این ادهزیو، سمیت سلولی افزایش یافته و با افزایش زمان مجاورت این ادهزیو با سلول‌های فیبروبلاست لثه انسانی، سمیت سلولی افزایش نشان داد. پیشنهاد می‌شود در پژوهش‌های آینده، سمیت ادهزیوها شناسایی شده و اجزاء سمی آنها با موادی با سازگاری نسجی بهتر جایگزین شود، در غیر این صورت باید با روش‌های پیشنهادی، از نشت اجزائی که منجر به سمیت سلولی می‌گردند، جلوگیری نمود و یا آن را به حداقل رساند.

## تشکر و قدردانی

این مقاله نتیجه طرح تحقیقاتی مصوب مرکز تحقیقات دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران به شماره قرارداد ۲۱۳۴ مورخ ۱۳۸۳/۱۲/۲۵می‌باشد که بدینوسیله قدردانی می‌گردد.

## منابع:

**1-** Szep S, Kunkel A, Ronge K, Heidemann D. Cytotoxicity of modern dentin bonding adhesives-in vitro testing on gingival human fibroblasts. J Biomed Mater Res 2002; 63(1): 53-60.
**2-** Retief DH, Mandras RS, Russell CM. Shear bond strength required to prevent microleakage at the dentin/restoration interface. Am J Dent 1994; 7(1): 44-46.
**3-** Craig RG, Powers JM. Restorative Dental Materials. 11th ed. USA: Mosby Inc.; 2002. chapter 5: 133-50, 270-78.
**4-** Wataha JC, Hanks CT, Strawn SE, Fat JC. Cytotoxicity of components of resins and other dental restorative materials. J Oral Rehabil 1994; 21(4): 453-62.
**5-** Hebling J, Aparecida EM, Costa CAS. Biocompatibility of an adhesive system applied to exposed human dental pulp. J Endod 1999; 25(10): 676-82.
**6-** Yoshii E. Cytotoxic effects of acrylates and methacrylates: Relationships of monomer structure and cytotoxicity. J Biomed Mater Res 1997; 37(4): 517-24.
**7-** Redlich M, Harary D, Shoshan S. Gingival response to a new multipurpose dental adhesive: a histologic study in dogs. J Prosthet Dent 1996; 76: 379-85.
**8-** Clemmense S. Sensitizing potential of 2- hydroxyl ethylmethacrylate. Contact Dermatitis 1985; 12(4): 203-8.
**9-** Katsuno K, Manabe A, Itoh K, Hisamitsu H, Wakumoto S, Nakayama S, Yoshida T. A delayed hypersensitivity reaction to dentin primer in the guinea pig. J Dent 1995; 23(5): 295-99.
**10-** Fisher AA. Allergic sensitization of the skin and oral mucosa to acrylic denture materials. J Am Med Assoc 1954; 156(3): 238-42.
**11-** Lind PO. Oral lichenoid reactions related to composite restorations preliminary report. Acta Odontol Scand 1988; 46(1): 63-5.
**12-** Yamada T, Inokoshi S, Tkatsu T, Hosoda H. Irritation effect of various bonding resins or dentin conditioner on oral mucosa. Adhesive Dentistry 1989; 7: 177.
**13-** Horiguchi S, Yamada T, Inokoshi S, Fujitani M, Tkatsu T. Irritation effect of current resin bonding systems on oral mucous membrane. The Japanese Journal of Conservative Dentistry 1995; 38: 679.
**14-** Manabe A, Katsuno K, Kurihara A, Itoh K, Hisamitsu H, Wakumoto S, Yoshida T. Adverse effect of dentin bonding agent on the oral mucosa of guinea pigs. J Oral Rehabil 2001; 28: 88-94.
**15-** Kanerva L, Turjanmaa K, Estlander T, Jolanki R. Occupational allergic contact dermatitis caused by 2-hydroxyethyl methacrylate (2-HEMA) in a new dentin adhesive. American Journal of Contact Dermatitis 1991; 2: 24.
**16-** Kanerva L, Estlander T, Jolanki R. Occupational skin allergy in the dental profession. Dermatol Clin 1994; 12(3): 517-32.
**17-** Kanerva L, Estlander T, Jolanki R. Allergic contact dermatitis from dental composite resins due to aromatic epoxy acrylates and aliphatic acrylates. Contact Dermatitis 1989; 20(3): 201-11.
**18-** Glenn JF. Compatibility of various materials with oral tissue. I: the components in composite restorations. Comments on Dr. Bowen's presentation. J Dent Res 1979; 58(5): 1504-6.
**19-** Rathburn MA, Craig RG, Hanks CT, Filisko FE. Cytotoxicity of a Bis-GMA dental composite before and after leaching in organic solvents. J Biomed Mater Res 1991; 25(4): 443-57.
**20-** Hanks CT, Wataha JC, Parsell RR, Strawn SE. Delineation of cytotoxic concentrations of two dentin bonding agents in vitro. J Endod 1992; 18(12): 589-96.
**21-** Huang FM, Chou MY, Chang YC. Dentin bonding agents induce c-fos and c-jun protooncogenes expression in human gingival fibroblasts. Biomaterials 2003; 24(1): 157-63.
**22-** Ratanasathien S, Wataha JC, Hanks CT, Dennison JB. Cytotoxic interactive effects of dentin bonding components on mouse fibroblasts. J Dent Res 1995; 74(9): 1602-6.
**23-** Geurtsen W, Lehmann F, Spahl W, Leyhausen G. Cytotoxicity of 35 dental resin composite monomers/additives in permanent 3T3-and three human primary fibroblast cultures. J Biomed Mater Res 1998; 41: 474-80.
**24-** Kaga M, Noda M, Ferracane JL, Nakamura W, Oguchi H, Sano H. The in-vitro cytotoxicity of elutes from dentin bonding resins and their effects on tyrosine phosphorylation of L929 cells. Dent Mater 2001; 17: 333-9.
**25-** Gerzina TM, Hume WR. Diffusion of monomers from bonding resin composite combinations through dentin in-vitro. J Dent 1996; 24(1-2): 125-8.
**26-** Atsumi T, Murata J, Kamiyanagi I, Fujisawa S, Ueha T. Cytotoxicity of photosensitizers camphorquinone and 9-fluorenone with visible light irradiation on a human submandibular-duct cell line in-vitro. Arch Oral Biol 1998; 43(1): 73-81.
**27-** Heil J, Reifferscheid G, Waldmann P, Leyhansen G, Geurtsen W. Genotoxicity of dental materials. Mutat Res 1996; 368(3-4): 181-94.
**28-** Geursten W, Spahl W, Muller K, Leyhausen G. Variability of cytotoxicity and leaching of substances from five dentin adhesives. J Biomed Mater Res 1999; 48: 772-7.



[ Downloaded from jdm.tums.ac.ir on 2024-11-30 ]

**29-** Beshkar M. Investigation the role of estradiol-17β and progestrone in the modulation of cyclooxygenase-2 expression in vitro using human gingival fibroblasts. Faculty of Dentistry of Tehran University of Medical Sciences 2004; Registration No. 4233.
**30-** Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods 1983; 65(1-2): 56-63.
**31-** Masters JRW. Animal Cell Culture. 3rded. Oxford University Press; 2000. chapter 1: 1-35, chapter 7: 175-210.
**32-** Freshney RI. Culture of Animal Cells, a Manual of Basic Technique. 4thed. Canada: Wiley-Liss Inc; 2000. chapters: 1, 4, 5, 7, 8, 10, 11, 18-21.
**33-** Schmalz G. Use of cell cultures for toxicity testing of dental materials-advantages and limitations. J Dent 1994; 22(Suppl. 2): S6-S11.
**34-** Lehmann F, Leyhausen G, Geurtsen W. Cytotoxic alterations in different fibroblast cultures caused by matrix monomers. J Dent Res 1993; 72: 219.
**35-** Koliniotou-Koubia E, Dionysopoulos P, Koulaouzidou EA, Kortsaris AH, Papadogiannis Y. In-vitro cytotoxicity of six dentin bonding agents. J Oral Rehabil 2001; 28(10): 971-5.
36- Hashieh IA, Cosset A, Franquin JC, Camps J. In-vitro cytotoxicity of one-step dentin bonding systems. J Endod 1999; 25(2): 89-92.
**37-** Schedle A, Franz A, Rausch-Fan X, Spittler A, Lucas T, Samorapoompichit P, Sperr W, Bolts-Nitulescu G. Cytotoxic effects of dental composites, adhesive substances, compomers and cements. Dent Mater 1998; 14(6): 429-40.
**38-** Hanks CT, Strawn SE, Wataha JC, Craig RG. Cytotoxic effects of resin components on cultured mammalian fibroblasts. J Dent Res 1991; 70(11): 1450-5.
**39-** de Souza Costa CA, Vaeten MA, Edwards CA, Hanks T. Cytotoxic effects of current dental adhesive systems on immortalized odontoblast cell line MDPC-23. Dent Mater 1999; 15(6): 434-41.
**40-** Huang FM, Chang YC. Cytotoxicity of dentin-bonding agents on human pulp cells in-vitro. Int Endod J 2002; 35(11): 905-9.
**41-** Chen RS, Liu CC, Tseng WY, Jeng JH, Lin CP. Cytotoxicity of three dentin bonding agents on human dental pulp cells. J Dent 2003; 31(3): 223-9.
**42-** Kinomoto Y, Carnes DL, Ebisu S. Cytotoxicity of dentin conditioners and primers on human periodontal ligament cells in-vitro. Am J Dent 2003; 16(2): 125-8.
**43-** Al-Nazhan S, Spangberg L. Morphological cell changes due to chemical toxicity of a dental material: an electron microscopic study on human periodontal ligament fibroblasts and L929 cells. J Endod 1990; 16(3): 129-34.
**44-** Ferracane JL, Condon JR. Rate of elution of leachable components from composite. Dent Mater 1990; 6(4): 282-7.
**45-** Gerzina TM, Hume WR. Diffusion of monomers from bonding resin-resin composite combinations through dentin in vitro. J Dent 1996; 24: 125-8.
**46-** Hanks CT, Wataha JC, Sun Z. In-vitro models of biocompatibility: a review. Dent Mater 1996; 12(3): 186-93.
**47-** Rakich DR, Wataha JC, Lefebvre CA, Weller RN. Effect of dentin bonding agents on the secretion of inflammatory mediators from macrophages. J Endod 1999; 25(2): 114-7.
**48-** Atsumi T, Ishihara M, Kadoma Y, Tonosaki K, Fujisawa S. Comparative radical production and cytotoxicity induced by camphorquinone and 9-fluorenone against human pulp fibroblasts. J Oral Rehabil 2004; 31(12): 1155-64.
**49-** Atsumi T, Murata J, Kamiyanagi I, Fujisawa S, Ueha T. Cytotoxicity of photosensitizers camphorquinone and 9-fluorenone with visible light irradiation on a human submandibular-duct cell line in-vitro. Arch Oral Biol 1998; 43(1): 73-81.
**50-** Atsumi T, Iwakura I, Fujisawa S, Ueha T. The production of reactive oxygen species by irradiated camphorquinone-related photosensitizers and their effect on cytotoxicity. Arch Oral Biol 2001; 46(5): 391-401.
**51-** O'Connell J, Houston A, Bennett MW, O'Sullivan GC, Shanahan F. Immune privilege or inflammation? Insights into the Fas ligand enigma. Nat Med 2001; 7(3) 271-4.
**52-** Summitt JB, Robbins JW, Schwartz RS. Fundamentals of Operative Dentistry. 2nd ed. USA: Quintessence Publishing Co.; 2001. p. 220-21
**53-** Ferrance JL. Elution of leachable components from composites. J Oral Rehabil 1994; 21(4) 441-52.
**54-** Roberson TM, Heymann HO, Swift EJ. Sturdevant's Art & Science of Operative Dentistry. 4thed. USA: Mosby Inc.; 2001. chapters: 4, 5, 11.

[ Downloaded from jdm.tums.ac.ir on 2024-11-30 ]