مقایسه سمیت دوبایومتریال مرجان مادرپورا و BMG نوع انسانی بر سلول‌های منونوکلئر خون محیطی انسان

دکتر حسین شاهون*، دکتر حمیدرضا عظیمی**، دکتر فاطمه مشهدی‌عباس***، دکتر مهسا نعمت‌اللهی****

چکیده

سابقه و هدف *روش جراحان جهت درمان بیمارانی که به دلایل متعدد دچار نقایص استخوانی هستند استفاده از پیوندهای استخوانی است. محدودیت کاربرد بالینی اتوگرافت و آلوگرافت توسعه روزافزون استفاده از مواد جایگزین پیوند استخوان مانند* ***(bone matrix BMG gelatin)*** *نوع انسانی و مرجان مادرپورا را سبب شده است. مطالعه حاضر با تکیه بر اهمیت روند ترمیم نقایص استخوانی و اهمیت پاسخ سلولی و فشار سلول‌های استخوان ساز و خونی با هدف بررسی مقایسه‌ای اثر سایتوتوکسیک دو بایومتریال* ***BMG*** *انسانی و مرجان مادرپورا بر روی سلول‌های منونوکلئر خون محیطی صورت گرفت.*

مواد و روشها: *در مطالعه تجربی حاضر پس از تهیه خون محیطی به روش فایکول، تهیه* ***BMG*** *نوع انسانی و مرجان مادرپورا و استریلیزاسیون هر دو بایومتریال،* ***BMG*** *و مرجان مادرپورا در غلظت های ۱۰، ۲۰ و ۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر تقسیم شدند و بر ۱۰۰۰۰۰سلول منونوکلئر خون محیطی که در چاهک‌های ۲۴ خانه کشت داده شده بودند. در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت اثر داده شده، در انکوباتور قرارداده شدند. برای اندازه‌گیری سمیت سلولی هر دو نمونه از ماده* ***MTT*** *استفاده شد. با استفاده از دستگاه* ***Elisa Readir*** *میزان جذب نوری در طول موج ۵۴۰ نانومتر برای هرنمونه سه باراندازه‌گیری ومیانگین آن خوانده شد. داده‌های آماری بااستفاده ازانحراف معیار وآزمون ناپارامتری ویلکوکسون رنک-سام وآزمون من ویتنی یو مورد بررسی قرار گرفتند.*

یافته‌ها: *: فعالیت حیاتی سلول‌ها در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در مجاورت* ***BMG*** *انسانی به طور معناداری در تمام غلظت‌های ایجاد شده از دارو افزایش یافته بود (P<۰/۰۰۵) . درحالی که در مورد مرجان مادرپورا، سلول‌های خونی پس از ۲۴ ساعت در دوز ۵۰ میلی گرم و پس از ۴۸ ساعت در دوز ۱۰ میلی گرم و پس از ۷۲ ساعت در دوزهای ۲۰ و ۵۰ میلی گرم منجر به کاهش فعالیت حیاتی سلول‌های مونونوکلئر خون محیطی شده بودند.*

نتیجه‌گیری: *با افزایش غلظت بایومتریال* ***BMG*** *انسانی در محیط کشت، میزان سلول‌های منونوکلئر خونی بیشتر شده بود که این نشان‌دهنده سازگاری مطلوب* ***BMG*** *با سلول‌های منونوکلئر خونی بود در حالی که مرجان مادرپورا برای همین رده از سلول های خونی دارای سمیت بود. گرچه برای قضاوت به مطالعه بیشتر با سلول‌های متفاوت نیاز است.*

کلید واژگان: *سمیت، ماتریکس،* ***BMG*** *انسانی، مرجان مادرپورا، سلول‌های منونوکلئر خون.*

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۹/۹/۲ تاریخ اصلاح نهایی: ۱۳۸۹/۲/۱۰ تاریخ تأیید مقاله: ۱۳۹۰/۳/۱

مجله دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دوره ۲۹، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۰، ۱۶۲-۱۵۵

مقدمه

یکی از چالش برانگیزترین مسائل مطرح در علم پزشکی در قرن حاضر، ترمیم نقایص بافتی است. بافت استخوان نیز از این قاعده مستثنی نیست. از آنجا که گرافت‌های استخوانی به طور پیشرونده طی مراحل درمان جذب می‌شوند ودر واقع آنچه که دربازسازی استخوان در این روش مطرح است ماندگاری سلول‌های استخوانی می‌باشد و نیز امکان

*نویسنده مسئول: استادیار گروه جراحی دهان و فک و صورت، دانشکدهٔ دندانپزشکی، دانشگاه شاهد. e-mail: shahoon@shahed.ac.ir

** استادیار گروه جراحی دهان و فک و صورت، دانشکدهٔ دندانپزشکی، دانشگاه شاهد.

***استادیار گروه آسیب‌شناسی دهان و فک و صورت، دانشکدهٔ دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی.

****دندانپزشک.

دسترسی به آنها پیوسته با مشکلات خاص خود همراه است، همچنین بدلیل محدودیت کاربرد بالینی اتوگرافت‌ها بدلیل افزایش زمان عمل، پس زدن گرافت، محدودیت دهنده استخوان، عفونت و درد و در نهایت مرگ و میر احتمالی، استفاده از آلوگرافت‌ها و مواد مصنوعی جایگزین شونده استخوان مانند آلوپلاست‌ها و پلیمرها از ارزش و کارایی روزافزونی در جراحی‌های مربوطه برخوردارشده‌اند (۷-۱). ازآنجا که این مواد از نظر خواص فیزیکی وشیمیایی دارای شباهت‌های نزدیکی با مواد معدنی طبیعی استخوان هستند، درصورت استفاده باعث تحریک کمتر بافت میزبان وسلول‌های دخیل در روند ترمیم استخوان می‌گردند (۱۱-۸). سلول‌های منونوکلئر خون از جمله سلول‌هایی هستند که با ایجاد آماس در ناحیه تحت عمل پیوند استخوان، می‌توانند باعث تسهیل روند استخوان‌سازی از طریق تولید بافت فیبروز شوند و از آنجا که ترمیم و رژنرسانس هر بافتی به تکثیر سلولی و ساخت ماده زمینه‌ای جدید در ناحیه صدمه دیده وابسته است، یکی از دغدغه‌های جامعه جراحان اثر سمیت بایومتریال‌های بکاربرده شده در ناحیه نقیصه استخوانی به منظور تایید قابل استفاده بودن آن ماده در ناحیه مذکور می‌باشد (۱۲و۱۳). بنابراین هدف اصلی پژوهش حاضر، بر پایه بررسی امکان تحریک کمتر بافت میزبان و درنتیجه بروز کمتر واکنش‌های آماسی متعاقب استفاده از بایومتریالهایی همچون مرجان مادرپورا و BMG انسانی در جراحی های ترمیم استخوان بود زیرا اولین سلول‌های مواجه شده با مواد خارجی مانند بایومتریال‌ها سلول‌های آماسی مانند مونونوکلئرهای خون محیطی هستند و سازگاری این سلول‌ها بابایومتریال‌ها بیانگر سازگاری بدن می‌باشد.

مواد و روشها

این مطالعه به روش تجربی صورت گرفت و جمع آوری داده‌ها نیز با جذب نوری ELISA READER و تکمیل پرسشنامه در دانشکده پزشکی دانشگاه شاهد طی ۴ مرحله انجام شد.

مرحله اول- تهیه محیط کشت سلول‌های منونوکلئر خون: ۵-۴ میلی لیتر فایکول در لوله ریخته شد. سپس ۱۰ میلی لیتر هپارین با سرنگی هپارینه به لوله اضافه گردید. در ادامه ۱۰ میلی لیتر خون از یک فرد داوطلب سالم و نرمال تهیه و آرام از کنار دیواره لوله خالی گردید به طوری که نسبت خون به فایکول ۲ به ۱ شده، خون روی فایکول قرار گرفت. سپس با کمک سانتریفوژدیسپنسر (کارخانه Eppendorf، هامبورگ- آلمان) با دور rmp ۲۸۰۰، لوله مذکور به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ شد. لایه وسط درلوله سانتریفوژشده که شامل سلول‌های منونوکلئر بود به آرامی توسط ساکشن دستی جدا شده، در لوله‌ای جداگانه قرار داده شد. سپس cc ۵ سرم فیزیولوژی قابل تزریق به آن اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه با سانتریفوژ با دور rmp ۱۵۰۰ سانتریفوژ گردید. پس از افزودن ۱ میلی‌لیتر RPMI+۱۰٪ fbs، قطره‌ای از مایع حاوی سلول‌های تک هسته‌ای روی لام شمارش قرار داده شده، سلول‌ها شمارش و میانگین آنها محاسبه شد. این مرحله از تحقیق یک بار جهت بررسی سمیت BMG انسانی و باردیگر جهت بررسی سمیت مرجان مادرپورا انجام گردید.

مرحله دوم- استریل سازی و کشت BMG نوع انسانی بر سلول‌های منونوکلئر خون محیطی: پس از تهیه پودر BMG نوع انسانی(۱) که حاصل تلاش دانشمندان ایرانی است و در سازمان ثبت شرکت‌ها و مالکیت صنعتی به عنوان اختراع ثبت گردیده، با کسب مجوز کمیته اخلاق پزشکی از دانشگاه شاهد به شماره (۳۵۴۶۶) دارای نتایج موفقیت‌آمیزی در مطالعات انسانی بوده است و در مقدمه به معرفی آن پرداخته شد، ۱۰۰ میلی‌گرم از این بایومتریال بر روی یک پلیت در باز در ظرفی به حجم یک لیتر قرار گرفت. در ظرفی جداگانه و درباز، آب اکسیژنه ۳۰٪ با حجم ۱۰ میلی لیتر قرار داده شده، درکنار پلیت BMG انسانی قرار گرفت.

سپس درب ظرف یک لیتری مذکور به طور کامل بسته و ایزوله گردید. این ظرف در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و در فشار ۱ اتمسفر قرار گرفت. پودر BMG نوع انسانی برای ۳ سیکل ۱۲ دقیقه‌ای پیوسته، جهت استریلیزاسیون در مجاورت آب اکسیژنه قرارگرفت و درنهایت جهت اطمینان از عاری بودن پودر BMG از هرگونه عامل بیماری‌زا مانند قارچ و باکتری و مخمر، در محیط آگار خونی از این پودر کشت میکروبی تهیه گشت که نتیجه آن، صحت استریلیزاسیون را تایید می‌کرد.

مرحله سوم- استریل سازی و کشت مرجان مادرپورا بر سلول‌های منونوکلئر خون محیطی: پس از تهیه پودر مرجان مادرپورا (۲) که شامل قطعات ۰/۵- ۰/۲۵ میلی‌متری بود، ۱۰۰ میلی گرم مرجان بوسیله اتوکلاو (اسکولاپ، آلمان) و در دمای ۱۲۱ و در فشار PSI ۱۵، استریل گشت. جهت

تایید صحت استریلیزاسیون، از پودر مذکور در محیط آگار خونی کشت میکروبی تهیه شد. نتایج موید استریل بودن پودر مرجان مادرپورا بودند..

مرحله چهارم: ابتدا BMG انسانی به وزن‌های ۱۰، ۲۰ و ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تقسیم و بر ۱۰۰۰۰۰ سلول منونوکلئر خون محیطی که در چاهک‌های پلیت ۲۴ خانه کشت داده شده بود، در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت اثر داده شد. مرجان مادرپورا نیز به وزن‌های ۵۰،۲۰ و۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تقسیم و بر ۱۰۰۰۰۰ سلول منونوکلئر خون محیطی که در چاهک‌های پلیت ۲۴ خانه کشت داده شده بود، در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت اثر داده شد. سپس جهت اندازه‌گیری میزان سمیت سلولی از MTT استفاده شد. MTT یا نمک تترازولیوم ماده‌ای است که توسط میتوکندری‌ها به فورامازون آبی رنگ تبدیل می‌شود. این ماده قادر به عبور از غشائ سلول نبوده، درسلول تجمع می‌یابد. این ماده از قبل با غلظت مطلوب ۱۰۰ میلی‌گرم درمیلی‌لیتر در آزمایشگاه تهیه شده، در فریزر و در دمای (۲۰-) درجه نگهداری می‌شد. قبل از شروع کار، جهت گرم شدن، این ماده برای مدت کوتاهی به انکوباتور ۲۲ لیتری (Mobin Teb Laboratory equipment- ایران) با دمای ۳۷ درجه منتقل شد. از محلول MTT تهیه شده به میزان ۰/۱ حجم کل هرکدام از محیط‌های کشت، به هرچاهک اضافه و ۴ ساعت در انکوباتور قرار داده شد. سپس محلول رویی باقیمانده برداشته شد. درهر چاهک کشت سلولی حاوی BMG انسانی ۱۰۰ میلی‌لیتر و در هر چاهک کشت سلولی حاوی مرجان مادرپورا ۲۰۰ میلی‌لیتر ایزوپروپانول اسیدی اضافه گردید تا کریستال‌های بنفش رنگ ایجاد شده توسط سلول‌هایی که زنده مانده بودند حل شده، مایع یکرنگی ایجاد گردد. قابل ذکر است فورمازون آبی رنگ تجمع یافته در سلول توسط MTT با اضافه کردن اسید ایزوپروپانول بدلیل غشائ سلولی، آزاد می‌شود. اسید ایزوپروپانول کریستال‌های موجود درکف هرخانه را در خود حل می‌کرد. سپس مایع رویی که حاوی کریستال‌های رنگی شده بود با استفاده از سمپلر به خانه‌های پلیت الیزا منتقل می‌شد و بعد با استفاده از ELISA Reader (Index Instrument، انگلستان) مقدار جذب نوری هرخانه که نمادی از تعداد سلول‌های زنده در هر خانه در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بود، در طول موج ۵۴۰ نانومتر اندازه‌گیری می‌شد. اولین ردیف چاهک پلیت‌های ۲۴ خانه شامل محیط کشت سلولی بدون هیچ ماده‌ای بود که به آن گروه کنترل می‌گویند و مقایسه آن با گروه‌های کشت حاوی بایومتریال مورد نظر نشان‌دهنده مقدار رشد و تکثیر سلول‌ها در مجاورت آن بایومتریال است.

نتایج حاصل از جذب نوری نمونه های حاوی دارو در مقایسه با گروه کنترل سمیت سلولی برای هر نمونه سه بار اندازه‌گیری و میانگین آن خوانده شد. داده‌های آماری با استفاده از انحراف معیار وآزمون ناپارامتری ویلکوکسون رنک-سام وآزمون من ویتنی یو مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته‌ها

نتایج بررسی فعالیت حیاتی سلول‌ها در ۲۴ ساعت:

همانگونه که در جدول شماره ۱ مشخص است غلظت‌های مختلف BMG انسانی باعث افزایش معنی‌دار فعالیت حیاتی سلول‌ها نسبت به گروه کنترل شده بود. میزان جذب نوری به عنوان شاخص فعالیت حیاتی در گروه شاهد برابر ۰/۱۹۱ ±۰/۰۱۳ و در گروه ۱۰ میلی گرم برابر ۰/۲۶۴±۰/۰۴۵ بود و آزمون آماری نشان داد که در گروه ۱۰ میلی‌گرمی فعالیت حیاتی سلول‌ها، نسبت به گروه کنترل ۲۸/۸ درصد افزایش داشته است که این افزایش از نظر آماری معنی دار بود.

این درحالی بود که در دوزهای ۵۰، ۲۰ و ۱۰ میلی گرم از ماده مرجان مادرپورا جذب نوری یا به عبارت دیگر همان میزان فعالیت حیاتی سلول‌ها کاهش یافته بود. اما با درنظرگرفتن T-test در جدول ۱ در دوزهای ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم که برابر با ۰/۱۲۳ و ۰/۰۸۵ بوده، هر دو بزرگتر از ۰/۰۵ بودند، بنابراین این کاهش فعالیت معنی‌دار نبود. اما در دوز ۵۰ میلی گرم با توجه به میزان عددی تست که ۰/۰۰۸ بوده، کمتر از ۰/۰۵ شده بود، نشانگر کاهش فعالیت سلول‌ها در دوز ۵۰ میلی گرم پس از ۲۴ ساعت بود.

نتایج بررسی فعالیت حیاتی سلول‌ها در ۴۸ ساعت:

همانگونه که جدول شماره ۲ نشان می‌دهد غلظت‌های متفاوت از BMG انسانی باعث افزایش معنی‌دار فعالیت حیاتی سلول‌ها نسبت به گروه کنترل شد. میزان جذب نوری به عنوان شاخص فعالیت حیاتی در گروه شاهد برابر ۰/۳۶± ۰/۳۱ و در گروه ۱۰ میلی‌گرمی برابر ۰/۰۶± ۰/۴۳ بود. آزمون آماری در گروه ۱۰ میلی‌گرمی ۴۱/۲ درصد افزایش در فعالیت حیاتی سلول‌ها نسبت به گروه کنترل را نشان داد که این افزایش از لحاظ آماری معنادار بود ($P<0/005$).

در گروه‌های ۲۰ و ۵۰ میلی‌گرمی به ترتیب ۹۳/۵۴ و ۱۲۵/۸ درصد افزایش فعالیت حیاتی سلول‌ها، نسبت به گروه کنترل مشاهده شد که این افزایش نیز از نظر آماری معنادار بود.

اما در مورد مرجان مادرپورا همان طور که در جدول شماره ۱ مشخص است در دوزهای ۲۰ و ۵۰ کاهش جذب نوری دیده شد که با درنظرگرفتن اندازه تست در دوز ۱۰ میلی‌گرم که ۰/۰۳ یعنی کمتر از ۰/۰۵ گزارش شد، تنها کاهش فعالیت سلول‌ها در دوز ۱۰ میلی گرم معنادار بود و کاهش در سایر دوزها معنی دار نبود.

نتایج بررسی فعالیت حیاتی سلول‌ها در ۷۲ ساعت:

همان گونه که در جدول شماره ۲ مشخص است غلظت‌های مختلف از BMG انسانی باعث افزایش معنی‌دار فعالیت حیاتی سلول‌ها نسبت به گروه کنترل شده‌اند. میزان جذب نوری به عنوان شاخص فعالیت حیاتی در گروه شاهد برابر ۰/۱ ±۰/۳۷ و در گروه ۱۰ میلی گرمی برابر ۱/۴۵ ±۰/۰۴۹ بود. آزمون آماری نشان داد که فعالیت حیاتی سلول‌ها در گروه ۱۰ میلی گرمی ۷۵ درصد (۷/۵ برابر) نسبت به گروه کنترل افزایش داشته که این افزایش از لحاظ آماری معنادار بود(P<۰/۰۰۵) . در گروه‌های ۲۰ و ۵۰ میلی گرمی این افزایش به ترتیب ۱۱/۵ و ۱۳/۵ برابر بود که این افزایش از نظر آماری معنا دار بود.

پس از ۷۲ ساعت با توجه به جدول شماره ۱، بایومتریال مرجان مادرپورا در دوزهای ۵۰، ۲۰ و ۱۰ میلی‌گرم منجر به کاهش فعالیت سلولی شده بودند که فقط دوزهای ۲۰ و ۵۰ میلی‌گرم به طور معناداری کاهش فعالیت را نشان دادند (P<۰/۰۰۵). در مجموع مجاورت مرجان مادرپورا با سلول‌های منونوکلئر خون محیطی دوبار در دوز ۵۰ میلی گرمی در زمان‌های ۲۴ و ۷۲ ساعت و یکبار در دوز ۲۰ میلی گرمی در زمان ۷۲ ساعت و یکبار در دوز ۱۰ میلی گرمی در زمان ۴۸ ساعت به طور معنادار به کاهش فعالیت سلول‌ها منجر شده بود (جداول۱و۲).

جدول ۱- فعالیت سلولی سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی در مجاورت مرجان مادرپورا در ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت

ساعت	کنترل	۱	۲	۳	میانگین	انحراف معیار	
۲۴	Control	۰/۳۷	۰/۴۴۳	۰/۴۱	۰/۴۰۷۶۶۷	۰/۰۳۶۵۵۶	
	۵۰ mg/ml	۰/۳	۰/۲۹۹	۰/۲۴۲	۰/۲۸۰۳۳۳	۰/۰۳۳۲۰۱	۰/۰۰۸۳۹۸
	۲۰ mg/ml	۰/۲۶۲	۰/۳۶۷	۰/۲۶۴	۰/۳۰۰۶۶۷	۰/۰۶۵۲۴۸	۰/۰۸۵۵۷۸
	۱۰ mg/ml	۰/۳۰۹	۰/۳۶۴	۰/۳۷۷	۰/۳۵	۰/۰۳۶۰۹۷	۰/۱۲۳۷۹۲
۴۸	Control	۰/۲۰۲	۰/۲۰۶	۰/۱۹۴	۰/۲۰۰۶۶۷	۰/۰۰۶۱۱	
	۵۰ mg/ml	۰/۲۰۳	۰/۱۸۶	۰/۱۴۷	۰/۱۷۸۶۶۷	۰/۲۸۷۱۱	۰/۳۱۴۵۳۴
	۲۰ mg/ml	۰/۱۶۱	۰/۱۷۷	۰/۱۳۴	۰/۱۵۷۳۳۳	۰/۰۲۱۷۳۳	۰/۰۶۵۲۲۲
	۱۰ mg/ml	۰/۱۹۱	۰/۱۸۷	۰/۱۸۳	۰/۱۸۷	۰/۰۰۴	۰/۰۳۹۱۸۳
۷۲	۵۰ mg/ml	۰/۱۴۲	۰/۱۴۴	۰/۱۳۶	۰/۱۴۰۶۶۷	۰/۰۰۴۱۶۳	۰/۰۰۳۶۵۳
	۲۰ mg/ml	۰/۱۱۷	۰/۱۱۷	۰/۱۱۴	۰/۱۱۶	۰/۰۰۱۷۳۲	۰/۰۰۲۹۴۵
	۱۰ mg/ml	۰/۱۵۴	۰/۱۴۱	۰/۱۶	۰/۱۵۱۶۶۷	۰/۰۰۹۷۱۳	۰/۰۲۸۵۶۲

جدول۲-میزان جذب نوری سلولهای تک هسته ای خون محیطی برحسب زمانهای پیگری و تفکیک مقادیر مختلف HECBMG

زمان پیگیری / مقادیر HECBMG	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت
کنترل	۰/۱۹۱ ± ۰/۰۱۳	۰/۳۱ ± ۰/۰۳۶	۰/۱ ± ۰/۳۷
۱۰ mg/ml	۰/۲۶۴ ± ۰/۰۴۵	۰/۴۳ ± ۰/۰۶	۱/۴۵ ± ۰/۰۴۹
۲۰ mg/ml	۰/۳۴۱ ± ۰/۰۷	۰/۶ ± ۰/۰۱	۱/۲۵ ± ۰/۱۳۲
۵۰ mg/ml	۰/۴۵۴ ± ۰/۰۷	۰/۷ ± ۰/۱۰۸	۱/۴۵ ± ۰/۰۵

بحث

با توجه به نیاز روز افزون به بایومتریال‌های استخوان‌ساز و هزینه بالای این مواد لازم است که بایومتریال‌های متعددی با هزینه‌های مناسب تهیه و در دسترس قرار گیرند .تا با توجه به کاربرد، امکان انتخاب بهترین گزینه درمانی برای بیماران دارای نقص استخوانی فراهم گردد (۱۴). هدف از مطالعه حاضر بررسی اثر سمیت سلولی بایومتریال‌های BMG انسانی و مرجان مادرپورا بر روی سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی بود تا درصورت توکسیک نبودن، ازاین بایومتریال‌ها به عنوان جایگزین بافت استخوانی استفاده شود. بنابراین با توجه به اینکه یکی ازپارامترهای سلولی مطرح در ارتباط با روند استخوان‌سازی، سلول‌های منونوکلئر خون محیطی می‌باشند، سازگاری نسبی این سلول‌ها با ماده BMG می‌تواند نشانگر سازگاری نسبی این ماده با بدن باشد (۱۵). از آنجا که برای معرفی یک ماده و کاربرد آن در کلینیک در درجه اول به ارزیابی سمیت سلولی این مواد در محیط in vitro نیاز است و از آنجا که سلول‌های منونوکلئر خون محیطی به عنوان یکی از مهمترین رده‌های سلولی آغازگر روند استخوان‌سازی از اهداف مهم اکثر مطالعاتی محسوب می‌شونئ که هدف آنها بررسی سازگاری بایومتریال‌های استخوان ساز است، در مطالعه حاضر نیز از این سلول‌ها استفاده شد (۱۶).

Nakamora و همکاران (۲۰۰۸) BMG انسانی را در مجاورت سلول‌های منونوکلئر خون محیطی قرار دادند و با روش MTT طی بررسی فعالیت حیاتی سلول‌ها در ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پی بردند که BMG انسانی هیچ گونه سمیتی برای این رده از سلول‌ها نداشته است. این نتایج دقیقاً مشابه نتایج حاصل از مطالعه حاضر می‌باشند (۱۷).

Ferri Cani و همکاران (۱۹۹۸) نیز مرجان‌های مادرپورای نشان‌دار شده را به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در محیط کشت سلول‌های فیبروبلاست و منوسیت قراردادند. نتیجه حاصل مبین آن بود که این سلول‌ها با مکانیسم لیزوزم‌های داخل سلولی قادر به حل کردن مرجان می‌باشند کهاین خاصیت نشان‌دهنده عدم سمیت مرجان مادرپورا برای سلول‌های فوق بود درحالی که نتایج حاصل از مجاورت مرجان مادرپورا با سلول‌های منونوکلئرخونی در مطالعه، عکس این نتیجه را نشان می‌دادند که علت آن می‌تواند تفاوت در نوع رده سلولی باشد (۱۸). این درحالی است که Gepstain و همکاران (۱۹۸۷) BMG نوع انسانی را در محیط کشت فیبروبلاست قرار دادند. نتایج حاصل از نظر سمیت سلولی، تفاوت معنادار زیادی نداشتند. تفاوت مشاهده شده ممکن است بعلت تفاوت در نوع رده سلولی در آزمایش Gepstain، همچنین تفاوت در کیفیت بررسی نتایج بدلیل روش متفاوت انجام تحقیق در مقایسه با مطالعه حاضر بوده باشد (۱۹).

از طرفی تحقیقات متعددی وجود دارند که همگی عدم سمیت مرجان مادرپورا را گزارش کرده‌اند. به عنوان نمونه Issahakians و همکاران (۱۹۸۹) سلول‌های فیبروبلاست لثه انسان را درمجاورت مرجان کشت دادند و اظهار کردند که پس از ۸ هفته سلول‌ها رشد طبیعی داشته، به طور نرمال گسترده شده‌اند. همچنین با توجه به ارزیابی سلول‌ها توسط میکروسکوپ الکترونی، اجزاء داخل سلولی مانند ریبوزوم‌ها و میتوکندری‌ها فعالیت نرمال داشتنه‌اند (۲۰). همچنین Ferrari و همکاران (۲۰۰۱) سلول‌های فیبروبلاست بدست آمده از سلول‌های فرانشیمی مغز استخوان را علامتگذاری کرده، آنها را بر روی یک داربست از مرجان سوارکردند. سپس این مجموعه را در بافت عضلانی موش کاشتند و پس از ۳۰ روز پیگیری به این نتیجه رسیدند که سلول‌های فیبروبلاست به فعالیت خود ادامه می‌دهند. نتایج تمامی این تحقیقات در تناقض با نتایج حاصل از مجاورت مرجان مادرپورا و سلول‌های منونوکلئر خون محیطی در مطالعه حاضر بود که علت این امر می‌تواند بعلت تفاوت در نوع رده

سلولی، روش تحقیق و روش کسب نتایج در مطالعات مذکور در مقایسه با تحقیق حاضر باشد (۲۱).

در تحقیقی مشابه، Okamoto و همکاران (۱۹۹۱) سلول‌های منونوکلئر خون محیطی بدست آمده از سلول‌های فزانشیم مغز استخوان افراد سالم از لحاظ سیستمیک را علامت گذاری و روی داربست BMGانسانی سوارکرده، در عضله موش کاشتند. نتایج حاکی از آن بود که سلول‌های منونوکلئر خونی به فعالیت خود ادامه داده‌اند و این دقیقاً مشابه نتایج حاصل از مطالعه حاضر بود گرچه دراین تحقیق دوزاژ خاصی برای BMG ذکرنشده بود و در ضمن این تحقیق درمحیط in vivo صورت گرفته بود در حالی که تحقیق حاضر در محیط in vivo بود (۲۲).

Guess و همکاران (۱۹۶۵) نیز طی یک بررسی یک هفته‌ای عدم سمیت BMG انسانی برای سلول‌های منونوکلئر خونی را بیان کردند که این نتیجه نیز در تایید نتایج تحقیق حاضر بود (۲۳).

درتحقیقی که Nasser و همکاران (۲۰۰۱) بر روی نوعی مرجان از گونه مونتیپورا انجام دادند ترکیبات دی‌استیلینی را یافتند که برای سلول‌های تومورهای Solid انسان سمی و کشنده بود. گرچه نتایج این تحقیق تا حدودی مشابه نتایج حاصل از مطالعه حاضر مبنی بر سمیت کم مرجان مادرپورا بر روی سلول‌های منونوکلئر خون محیطی بود اما تفاوت در نوع مرجان همچنین رده سلولی که تحقیق Nasser بر روی آن صورت گرفته بود می‌تواند علت این ناهمخوانی در نتایج بوده باشد (۲۴).

به طور کلی تفاوت در رده‌های سلولی، روش تحقیق و طول زمان، سه عامل مهم درتعیین ساتیوتوکسیسته BMG و مرجان مادرپورا هستند، بنابراین بطور قطع جهت تعیین سمیت و عدم سمیت این دو ماده به تحقیقات متعددی نیاز است که مکمل نتایج حاصل در مطالعه حاضر خواهد بود.

نتیجه‌گیری

با افزایش غلظت بایومتریال BMG انسانی در محیط کشت، میزان سلول‌های منونوکلئر خونی بیشتر شده بود که نشان‌دهنده سازگاری مطلوب BMG با سلول‌های منونوکلئر خونی بود در حالی‌که مرجان مادرپورا برای همین رده از سلول‌های خونی دارای سمیت بود. گرچه برای قضاوت قطعی به مطالعه بیشتر با سلول‌های متفاوت در زمان‌های کوتاه‌تر و یا طولانی‌تر و باروش‌هایی متفاوت نیاز است.

تقدیر و تشکر

در اینجا نویسندگان برخود فرض می‌دانند از همکاری معاونت محترم پژوهشی ومرکزتحقیقات دانشگاه شاهد که حمایت مالی این طرح را به عهده داشتند، سپاسگزاری نمایند.

References

1. Shahoon H, Mashhadi abbas F, Kharrazifard MJ, Nematolahi M: Histological evaluation of human bone matrix gelatin with auto graft in the reconstructive of parietal bone defect in rat: J Dent Sch 2009;27:52-60. [Persian]

2. Azimi H, Jalali Nadoushan MR, Tofighi H. The histological study of the efficacy of the madrepora particles on parietal bone healing of rabbit. J Dent Sch 2007;24:488-495. [Persian]

3. Chalmers J, Gray DH, Rush J. Observation on the induction of bone in soft tissue. Bone Joint Surg 1978;57:36-45.

4. Subbaiah R, Thomas B. Efficacy of a bioactive alloplast, in the treatment of human periodontal osseous defects-a clinical study. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2011;16:e239-244.

5. Almasri M, Altalibi M. Efficacy of reconstruction of alveolar bone using an alloplastic hydroxyapatite tricalcium phosphate graft under biodegradable chambers. Br J Oral Maxillofac Surg 2010;81:106104.

6. Hiramatsu K, Sasagawa S, Outani H, Nakagawa K, Yoshikawa H, Tsumaki N. Generation of hyaline cartilaginous tissue from mouse adult dermal fibroblast culture by defined factors. J Clin Invest 2011;121:640-57.

7. Zong C, Xue D, Yuan W, Wang W, Shen D, Tong X, Shi D, Liu L, Zheng Q, Gao C, Wang J. Reconstruction of rat calvarial defects with human mesenchymal stem cells and osteoblast-like cells in poly-lactic-co-glycolic acid scaffolds. Eur Cell Mater. 2010;20:109-20.

8. Yan WQ, Oka M, Nakamura T. Bone bonding in bioactive glass ceramics with bone matrix gelatin. J Biomed Mater Res 1998; 42:258-265.

9. Takaoka K, Nakahara H. Ectopic bone induction on and in Porous hydroxyl apatite combined with collagen and bone morphogenetic protein. Clin Orthop 1988; 234:250-254.

10. Scott CK, Hightower JA. The matrix of endochondral bone differs from the matrix of the intramembranous bone. Calcif Tissue Int 1991; 49:349-354.

11. Moghadam H. Histomorphometric evaluation of bone regeneration using allogenic and alloplastic bone substitutes. Oral Maxillofacial Surg 2004; 62:202-213.

12. Shahoon H, Sobhani A, Eslami B: Matrix gelatin& effect of rabit analysis: medical council of I.R.I;2003;21:44-50 [Persian].

13. Rabia AB, Deny YM, Samman N, Hägg U.. The effect of demineralized bone matrix in the healing of intramembranous bone grafts in rabbit skull defects. JDent Res 1996Apr; 75 (4):1045-1051.

14. Honsy M, Sharawy M. Osteoinduction in rhesus monkeys using demineralized bone powder allografts. J Oral Maxillofacial Surg. 1985;43:837-844.

15. .Dunn CA, Johne Q, Taba MJr, Franceschi RT, Rutherford RB, Giannobile WV. Biological effects induced by nano silver particles. Mol Ther. 2005;11:294-299.

16. Dunn CA, Johne Q,Taba MJr: BMP gene delivery for alveolar bone engineering at dental implant defects. Mol Ther 2005;11:294-299.

17. Braydich-Stolle L, Hussain S, Schlager JJ, Hofmann MC. In vitro cytotoxicity of nanoparticles in mammalian germline stem cells. Toxicol Sci 2005;88:412-419 (Epub 2005 Jul 13).

18. Yin Z, Zhang L, Wang J. Repair of articular cartilage defects with "two-phase" tissue engineered cartilage constructed by autologous marrow mesenchymal stem cells and "two-phase" allogenic bone matrix gelatin. Zhongguo Xiu Fu Chong Jain Wai Ke Za Zhi 2005: 19: 652-657.

19. Ferrari A, Hannouche D, Oudina K, Bourguignon M, Meunier A, Sedel L, Petite H. In vivo tracking of bone marrow fibroblasts with fluorescent carbocyanine dye. J Biomed Mater Res 2001; 56:361-367.

20. Theiszová M, Jantová S, Dragúnová J, Grznárová P, Palou M: Comparison the cytotoxicity of hydroxyapatite measured by direct cell counting and MTT test in murine fibroblast NIH-3T3 cells: Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub 2005;149:393-396.

21. Nakamura K, Takagi T. Calcification preceeding new bone formation induced by demineralized bone matrix gelatin. Arch Histol Cytol 1992;55:31-43.

22. Ferricane JC, Bareille R, Rouais F, Basse-cathlinat B, Dupuy B. In vitro dissolution of coral in peritoneal or fibroblast cell cultures : J Dent Res 1998;77:406-411

23. Gepstein R, Weiss RE, Hallel T. Bridging large defects in bone by demineralized bone matrix in the form of a powder. A radiographic, histological, and radioisotope-uptake study in rats. J Bone Joint Surg Am 1987;69:984-992.

24. Issahakian S, Ouhayoun JP. Clinical and histological evaluation of a new filling material: natural coral]. J Periodontol. 1989;8:251-9.

25. Ferrari A, Hannouche D, Oudina K, Bourguignon M, Meunier A, Sedel L, Petite H. In vivo tracking of bone marrow fibroblasts with fluorescent carbocyanine dye. J Biomed Mater Res 2001;56:361-367.

26. Okamoto Y, Horisaka Y, Matsumoto N, Yoshimura Y, Kawada J, Yamashita K, Takagi T. Muscle tissue Raction toimplantation of bone matrix gelatin. Clin Orthop Relat Res 1991;263:242-253.
27. Guess WL, Rosenbluth SA, Schmidt B, Autian J. Agar diffusion method for toxicity screening of plastic on culture Celle mono layers: J Pharm Sci 1965;54:1545-1547.
28. Alam N, Bae BH, Hong J, Lee CO, Im KS, Jung JH. Cytotoxic Diacetylenes from the stony coral Montipora species. J Nat Prod. 2001;64:1059-1063.