

دانشور

پزشکی

بررسی سمیت سلولی ذرات نانو هیدروکسی آپاتیت بر سلول‌های فیبروبلاست رده L929

نویسندگان: حسین شاهون¹، رویا حامدی^{2*}، زهرا یادگاری³، وحید حسینی⁴،
ناصر ولایی⁵

- 1- متخصص جراحی دهان، فک و صورت، استادیار و مدیر گروه بخش جراحی فک و صورت دانشکده دندانپزشکی دانشگاه شاهد
 - 2- دانشجوی دانشکده دندانپزشکی دانشگاه شاهد
 - 3- کارشناس ارشد ایمونولوژی، آزمایشگاه بیولوژی سلولی و مولکولی دهان دانشکده دندانپزشکی دانشگاه شهید بهشتی
 - 4- دانشجوی دانشکده دندانپزشکی دانشگاه شاهد
 - 5- مشاور آمارحیاتی دانشگاه آزاد اسلامی
- *نویسنده مسئول: رویا حامدی
Email: hhamed@shahed.ac.ir

چکیده

مقدمه و هدف: هیدروکسی آپاتیت $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2\text{HA}$ یکی از مهمترین بیوسرامیک‌ها برای کاربردهای پزشکی و دندانپزشکی است. ولی حلالیت پایین ذرات منجر به کاهش اثر آن در ساخت استخوان (osteconductivity) شده است و در نتیجه ذرات نانو هیدروکسی آپاتیت (Nano-HA) با داشتن سطح تماس بیشتر و حلالیت بالاتر نسبت به HA معمولی، مورد توجه بسیاری از محققان به عنوان یک پیوند موثر و جدید استخوانی واقع شده است. اما مطالعات متعددی تناقض‌هایی را در زمینه سازگاری زیستی این ذرات نشان دادند. هدف از مطالعه حاضر بررسی سمیت سلولی (Cytotoxicity) ذرات نانو هیدروکسی آپاتیت بر روی سلول‌های فیبروبلاست رده L929 می باشد.

مواد و روش‌ها: این مطالعه به صورت تجربی انجام گرفت. پس از استریل نمودن ذرات Nano-HA آن را با غلظت‌های 15.75، 32، 65، 125، 250، 500، 1000، 2000، 4000، 8000 (Parts Per Million) تهیه کرده و روی 10000 سلول فیبروبلاست رده L929 اثر داده و در پایان میزان حیات سلول‌ها در زمان‌های 2، 24، 48 و 72 ساعت با استفاده از تست MTT مورد ارزیابی قرار گرفت. سپس در صد سمیت سلولی نسبت به گروه کنترل در هر غلظت و زمان محاسبه گردید و داده‌های بدست آمده با تست ANOVA آنالیز گشت.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که با افزایش غلظت و گذشت زمان فعالیت حیاتی سلول‌ها کاهش یافته است، ولی این کاهش از لحاظ آماری معنی دار نبود ($P > 0.05$). نتیجه گیری: نتایج عدم خاصیت سمیت سلولی ذرات Nano-HA را در مجاورت با سلول‌های فیبروبلاست رده L929 نشان داد.

واژگان کلیدی: نانو هیدروکسی آپاتیت، سمیت سلولی، سلول‌های فیبروبلاست رده L929، MTT

وصول: 1389/12/7

آخرین اصلاحات:

1390/2/31

1390/2/31

مقدمه

هیدروکسی آپاتیت $HA^*(Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2)$ یک ماده ی زیستی مهم و جزء اصلی بخش معدنی استخوان و دندان می باشد [1-3] که به دلیل داشتن قرابت شیمیایی و بیولوژیکی با ساختمان استخوان و دندان به عنوان یکی از مهمترین بیوسرامیک ها برای کاربردهای پزشکی و دندانپزشکی خصوصا در زمینه ی جایگزینی بافت استخوانی مطرح است [4-8] اما پروسه ی ساخت آن به دما و فشار بالای نیاز دارد که منجر به کاهش تخلخل و افزایش دانسیته ی آن شده و در نتیجه منجر به کاهش حلالیت این ماده در محیط و کاهش اثر ذرات در تحریک ساخت استخوان (osteocoductivity) می شود [9] و در حقیقت بیشتر به عنوان یک فیلر جهت پرکردن نقایص استخوانی بکار می رود [10-18]. از طرفی ذرات نانو هیدروکسی آپاتیت (Nano-HA) به دلیل داشتن سطح تماس بیشتر و حلالیت بالاتر، قدرت و کارایی بالاتری نسبت به HA دارند [19] و تحقیقات فراوانی در زمینه ی استفاده از ذرات Nano-HA در درمان ضایعات استخوانی پر یودنتال [5]، افزایش osteointegration در ایمپلنت ها [7]، ترمیم سوراخ دندانی [8]، افزایش ترمیم نقایص استخوانی در ارتوپدی [9] و هم چنین سیستم های انتقال دارو و واکسن صورت گرفته است [10]. اما از آنجایی که برای معرفی یک ماده و کاربرد آن در کلینیک، در درجه اول به ارزیابی سمیت این مواد در محیط *in vitro* نیاز است [20-22]، مطالعات متعددی بر روی سازگاری زیستی (Biocompatibility) این ماده صورت گرفته است ولی نتایج حاصل از این مطالعات تناقض هایی را در این زمینه نشان می دهد [11-15] برای بررسی این تناقضات مطالعات بیشتر و دقیق تر ضروری به نظر می رسد. بنابراین در این مطالعه از سلول های فیروبلاست L929 استفاده گردید که از پرکاربردترین رده های سلولی نامیرا جهت ارزیابی سمیت سلولی (Cytotoxicity) است که به علت ثبات نسبی خصوصیات سلول ها در نسل های مختلف باعث بالا رفتن اعتبار و تکرار پذیری نتایج نسبت

به رده ی سلولی اولیه می گردد. همچنین در استاندارد جهانی مواد دندانپزشکی (ISO-10993:5) این رده ی سلولی جهت انجام تست تعیین سمیت سلولی مواد توصیه گردیده است [16]. در مطالعه حاضر اثر سمیت سلولی پارتیکل های Nano-HA (با ابعاد زیر 100 nm و میله ای شکل) روی سلول های فیروبلاست رده ی L929 مورد بررسی قرار گرفت تا در صورت توکسیک نبودن، این بیومتریال به عنوان یکی از جایگزین های موثر بافت استخوانی مورد استفاده قرار گیرد.

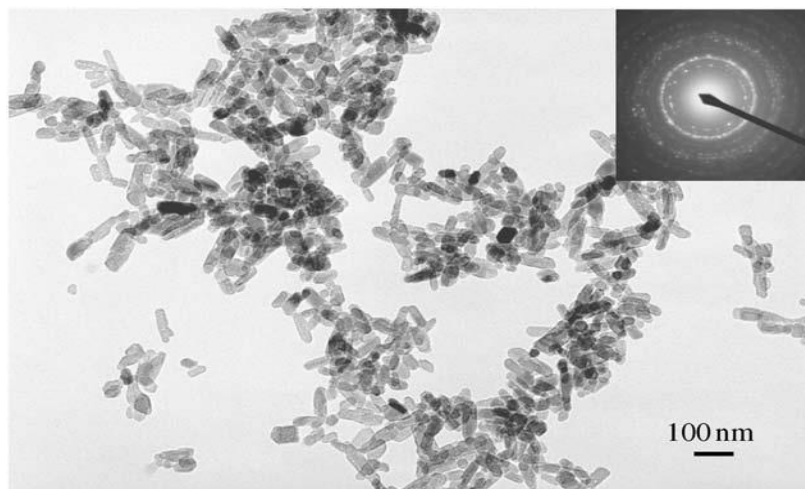
* Hydroxy Apatite

مواد و روش ها

مطالعه به روش تجربی (Experimental) و در دانشگاه شهید بهشتی و شاهد در سال 89 و 90 به منظور تعیین سائیتو توکسیسیته ی ذرات نانوهیدروکسی آپاتیت بر روی سلول های فیروبلاست رده ی L929 انجام گرفت.

1-تهیه و استریل کردن ذرات Nano-HA

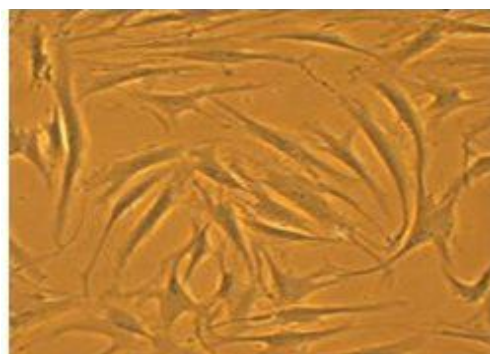
در این مطالعه از ذرات میله ای شکل Nano-HA با ابعاد زیر 100 nm (تصویر 1) با خلوص 99٪ ساخت شرکت آلمانی NANOSHEL (Batch No#20090621) استفاده شد. با استفاده از نور ماورای بنفش به مدت 24 ساعت، پارتیکل های Nano-HA استریل گشت.



تصویر 1. TEM (Transmission electron micrograph) از پارتيكل هاي Nano-HA با مقياس 100 نانومتر

CO₂ به ميزان 5٪ و رطوبت 98٪ تکثير گرديدند و پس چهار بار پاساژ دادن آنها با استفاده از Trypsin-EDTA تعداد کافي از آنها برای انجام آزمایش فراهم گرديد. سلول ها توسط لام هموسيتومتر (نتوبار) شمارش شدند و با استفاده از رنگ تريپان بلو در صد سلولهای زنده پيش از 95٪ تعيين گرديد. پس از آن تعداد 10000 سلول به صورت یک لایه (monolayer) درون هر چاهک از پليت های 96 خانه ای مخصوص کشت سلولی قرار داده شد. برای هر کدام از غلظت های مواد مورد آزمایش ، حداقل سه چاهک از 4 پليت (برای زمان های مختلف 2، 24، 48 و 72 ساعت) اختصاص داده شد و 3 چاهک نیز برای گروه کنترل اختصاص داده شد.

2- کشت سلول های فیبروبلاست رده ی L929 کرایوتیوب سلولی تهیه شده از انسيستوپاستور ايران دربرگیرنده سلول های فیبروبلاست رده سلولی L929 موش پس از خارج شدن از وضعیت منجمد، درفلاسکهای مخصوص کشت سلولی کشت داده شدند(تصویر3). جهت کشت این سلولها از محیط کشت (DMEM (Grand Island,NY) همراه 100 واحد بين المللی در میلی لیتر از آنتی بیوتیک پنی سیلین (Sigma, USA) و 100 میکرو گرم در میلی لیتر استرپتومایسین (Sigma, USA) استفاده گرديد.علاوه بر محیط کشت،جهت غنی سازی محیط (FBS(Fetal Bovin Serum (GIBCO, USA) به میزان 10٪ به محیط کشت اضافه شد که در این حالت به آن محیط کشت کامل یا Complete Media گفته می شود.سپس این سلولها در شرایط آزمایشگاهی شامل دمای 37°C ،



شکل 2- سلول های فیبروبلاست رده ی L929 کشت داده شده در فلاسک

بزرگنمایی (200 میکروسکوپ نوری)

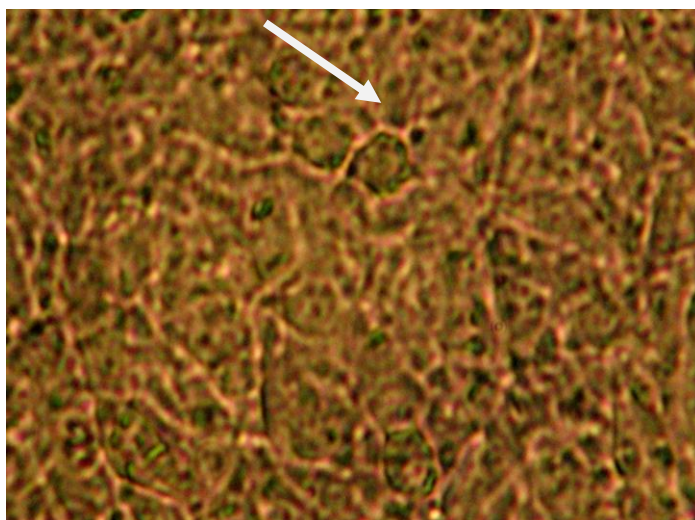
4 ساعت به انکوباتور برگردانده شد. در این شرایط فقط سلولهایی که زنده بوده و میتوکندری فعال دارند قادر هستند به کمک آنزیمهای میتوکندریایی نمک MTT را احیا نموده و تبدیل به بلورهای فورمازون نمایند. پس از سپری شدن 4 ساعت، پلیت را بیرون آورده و با کشیدن محیط روئی به چاهک ها ایزوپروپانل اسیدی اضافه گشته تا کریستال های بنفش رنگ فورمازون ایجاد شده در سلول هایی که زنده مانده اند (شکل 2)، حل شده و مایع رنگی یکنواختی ایجاد شود. این مایع رنگی را به چاهک های یک پلیت الایزا منتقل و جذب آن با استفاده از دستگاه ELISA READER در طول موج 570 nm با فیلتر رفرانس 620 نانومتر خوانده شد. درصد حیات سلولی از تقسیم میانگین میزان جذب غلظت مورد نظر به میانگین جذب گروه کنترل در همان زمان ضربدر 100 بدست آمد و با کم کردن این عدد از 100 میزان درصد سمیت سلولی بدست آمد. نتایج به دست آمده با استفاده از آزمون ANOVA جذب نوری چاهک های Nano-HA مورد قضاوت آماری قرار گرفت.

3- قرارگیری ذرات Nano-HA در مجاورت سلول های فیبروبلاست رده ی L929

پس از 24 ساعت از کشت 10000 سلول در هر چاهک پلیت های کشت 96 خانه ای، محیط کشت رویی سلولها تخلیه گردید. سپس ذرات Nano-HA با غلظت های 2000، 500، 1000، 250، 125، 65، 32، 5.75 ppm 8000، 4000 (Part Per Million) در چاهک های پلیت 96 خانه روی سلول ها اثر داده شد و درسه چاهک کنترل محیط کشت کامل به عنوان یک ماده صددرصد بدون خاصیت سم سلولی ریخته شد.

4- ارزیابی میزان حیات سلول های فیبروبلاست رده ی L929

وایتالیتی سلول ها در زمان های 2، 24، 48 و 72 ساعت پس از مجاورت با ذرات با استفاده از تست MTT مورد سنجش قرار گرفت. به این ترتیب که بعد از گذشت زمان های مورد نظر، محیط های کشت سلولی را از انکوباتور (فشار CO₂ 5%، رطوبت 98٪، دمای 37 درجه) خارج کرده و یک دهم حجم روئی سلول ها به هر چاهک محلول (Dimethylthiazol-2yl 2-5 diphenyl (tetrazolium bromide) اضافه گشت و پلیت به مدت



تصویر 2- پیکان بلور های فورمازون تشکیل شده در مجاورت سلول های فیبروبلاست L929 را نشان می دهد.

یافته ها

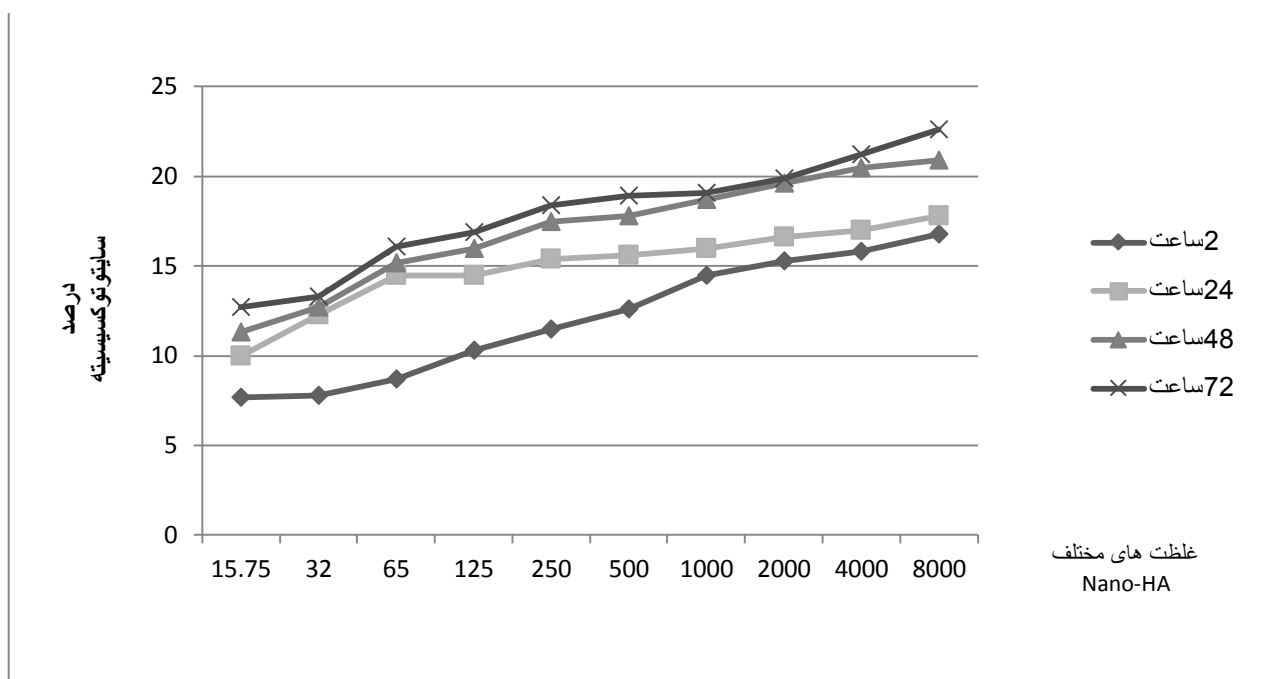
تحقیق روی 10 گروه تجربی و 1 گروه شاهد مجموعاً 33 نمونه صورت گرفت و در آن غلظت های 15.75، 32، 65، 125، 250، 500، 1000، 2000، 4000، 8000 ppm از Nano-HA به مدت 2، 24، 48 و 72 ساعت با سلول های فیرو بلاست رده ی L929 مجاورت داده شد. میزان فعالیت حیاتی سلول ها بر حسب زمان های پیگیری به تفکیک مقادیر مختلف Nano-HA در جدول 1 نشان داده شده است. آزمون ANOVA نشان

داد که میزان فعالیت حیاتی سلول ها در گروه های 10 گانه و زمان های پیگیری اختلاف معنی دار آماری نداشته است ($P > 0.05$). همچنین با گذشت زمان در تمام گروه ها میانگین فعالیت حیاتی سلول ها کاهش یافت و کمترین میانگین فعالیت حیاتی سلول ها مربوط به غلظت 8000 ppm بعد از گذشت 72 ساعت بود (0.108 ± 0.004).

جدول 1- میانگین جذب نوری و انحراف معیار آنها بر حسب زمان های پیگیری به تفکیک غلظت های مختلف Nano-HA

72 ساعت	48 ساعت	24 ساعت	2 ساعت	زمان
				غلظت Nano-HA (ppm)
0.14±0.012	0.16±0.005	0.256±0.03	0.65±0.06	کنترل
0.122±0.002	0.14±0.006	23.0±0.015	0.6±0.045	15.75
0.121±0.007	0.139±0.006	0.224±0.007	0.59±0.009	32
0.117±0.006	0.135±0.008	0.219±0.01	0.59±0.012	65
0.116±0.01	0.134±0.007	0.218±0.011	0.58±0.006	125
0.114±0.002	0.132±0.003	0.216±0.009	0.57±0.007	250
0.113±0.009	0.131±0.005	0.216±0.004	0.56±0.006	500
0.113±0.001	0.13±0.002	0.215±0.005	0.55±0.01	1000
0.112±0.008	0.128±0.002	0.213±0.010	0.55±0.007	2000
0.11±0.003	0.127±0.005	0.212±0.006	0.54±0.012	4000
0.108±0.004	0.126±0.003	0.21±0.005	0.54±0.01	8000

در نمودار 1 مقایسه ی بین درصدهای سایتوتوکسیک بر حسب زمان های پیگیری به تفکیک غلظت های مختلف Nano-HA نشان داده شده است. درصد حیات سلولی از تقسیم میانگین میزان جذب غلظت مورد نظر به میانگین جذب گروه کنترل در همان زمان ضربدر 100 بدست آمد و با کم کردن این عدد از 100 میزان درصد توکسیسیته حاصل شد. بر اساس نتایج به دست آمده حداکثر درصد توکسیسیته ی نسبت به گروه شاهد بعد از گذشت 72 ساعت و در غلظت 8000 ppm، معادل 22.6٪ گردید.



نمودار 1. مقایسه ی درصد های سایتوتوکسیک بر حسب زمان های پیگیری به تفکیک غلظت های مختلف Nano-HA - با افزایش غلظت ذرات Nano-HA و نیز گذشت زمان ، درصد سایتوتوکسیسیته افزایش می یابد ولی از نظر آماری تفاوت معنی داری بین گروه ها وجود ندارد.

بحث

زمان نیز میانگین فعالیت حیاتی سلول ها کاهش یافت ولی این کاهش در فعالیت حیاتی سلول ها از لحاظ آماری تفاوت معنی داری را نشان نداد [23] ولذا نتایج مطالعه ی اخیر نیز در تایید نتیجه ی مطالعه ی فوق نشان داد که این ماده دارای سازگاری زیستی قابل قبولی می باشد .

همچنین در مطالعه ای که توسط Yantae و همکاران در سال 2009 صورت گرفت و در آن سازگاری زیستی اشکال میله ای و کروی Nano-HA را در غلظت های 1 تا 100 ppm بر روی استئوبلاست ها از طریق تست MTT و بعد از گذشت 72 ساعت مورد بررسی قرار دادند نیز نتیجه گیری کردند که این ماده دارای سازگاری زیستی قابل قبولی می باشد [24]. البته در مطالعه ی Yantae بازه ی زمانی محدود بوده و تنها تا غلظت ppm 100 مورد تحقیق قرار گرفت. از طرفی مطالعه ی Hsieh-MF و همکاران در سال 2009 نیز نشان دادند که پارتیکل های Nano-HA تا غلظت ppm 5000 کمترین سمیت را برای استئوبلاست دارا هستند [25] و نتایج مطالعه ی ما هم به طور مشابه بیانگر سازگاری

نتیجه پژوهش نشان داد که با افزایش غلظت-Nano-HA از 15.75 تا 8000 ppm و نیز گذشت زمان از 2 تا 72 ساعت میزان توکسیسیته افزایش یافته، ولی این کاهش در فعالیت حیاتی سلول ها از نظر آماری معنی دار نیست ($P > 0.05$). بنابراین ، ذرات Nano-HA در مجاورت با سلول های فیرو بلاست رده ی L929 سازگاری قابل قبولی دارد. همچنین با توجه به استاندارد بین المللی مواد دندان پزشکی (ISO-10993:5) موادی که درصد سمیت آنها از 25% کمتر باشد جزو مواد غیر سمی (Non Toxic) محسوب می شوند، که در مطالعه ما در همه موارد میزان آن از 25% کمتر بود.

در مطالعه ای که توسط شاهون و همکاران در سال 2011 صورت گرفت و در آن سازگاری زیستی اشکال میله ای Nano-HA را در غلظت های مشابه با مطالعه ی اخیر ، بر روی سلول های تک هسته ای خون محیطی انسان و بعد از گذشت 2 ، 24 ، 48 و 72 ساعت با استفاده از تست MTT مورد بررسی قرار دادند ، نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که با افزایش غلظت و

فیروبلاست ها به مقدار کمتری وارد سلول می شود. بنابراین می توان این گونه نتیجه گیری کرد که اگر پارتیکل Nano-HA وارد سلول شود، می تواند در غلظت های بالاتر سمی باشد ولی به شکل خارج سلولی حتی تا غلظت 8000 ppm برای سلول های تک هسته ای خون محیطی انسانی و همین طور فیروبلاست ها و 5000 ppm برای استئوبلاست ها دارای سازگاری زیستی قابل قبولی باشد. همچنین به کار بردن اشکال مختلف ذرات نیز بر روی سطح تماس ذرات و لذا مقدار حلالیت و قدرت ذرات موثر می باشد و نیز می تواند بر روی سایتوتوکسیک بودن پارتیکل ها موثر باشد [8-6].

بنا بر این با توجه به اهمیت موضوع پیشنهاد می شود تا مطالعات بیشتری نظیر بررسی واکنش های ایمونولوژیکی و مولکولی و هم چنین بررسی سایتوتوکسیسته این ماده در مدل های *in vivo* توسط محققین دیگر انجام و پیگیری شود.

نتیجه گیری

همان طور که در نتایج به دست آمده ملاحظه می شود، هیچ کدام از دوزهای مورد استفاده در این تحقیق دارای خاصیت سمیت سلولی برای سلولهای L929 نبود و Nano-HA ماده ای سازگار با حیات سلول های فیروبلاست رده ی L929 می باشد.

تقدیر و تشکر

از حمایت مالی مرکز تحقیقات دندانپزشکی و معاونت محترم پژوهشی دانشگاه شاهد و آزمایشگاه بیولوژی مولکولی دانشکده دندانپزشکی دانشگاه شهید بهشتی در اجرای این تحقیق صمیمانه سپاسگزاری می شود.

زیستی ذرات Nano-HA است. اما در مطالعه ای که توسط Molskin و همکاران در سال 2009 صورت گرفت و در آن سایتوتوکسیسته ی پارتیکل های Nano-HA به شکل کلونید و ژل را در غلظت های 500، 31، 62، 125، 250 بر روی ماکروفاژ های مشتق از مونوسیت از طریق تست MTT بعد از 24 ساعت مورد ارزیابی قرار دادند ، نشان دادند که پارتیکل های Nano-HA در فرم ژل در تمامی غلظت ها توکسیک بوده و فرم کلونید آن فقط در غلظت های بالاتر از 125 توکسیک است [26]. اما در این مطالعه پارتیکل های Nano-HA به شکل سوسپانسیون به کار رفت و سمیت آن روی سلول های فیروبلاست رده ی L929 بررسی گشت. همچنین در سال 2004، J.Huang و همکاران اثر سازگاری زیستی Nano-HA میله ای شکل را در غلظت های 10، 100 و 1000 ppm را بر روی ماکروفاژ های مشتق از مونوسیت از طریق تست LDH بعد از 24 ساعت ارزیابی کردند و نشان دادند که در غلظت Nano-HA ، 100 ppm توانائی آسیب زدن به غشا سلولی و آزاد کردن LDH را دارد [27]. از طرفی Scheel و همکاران در سال 2009 در مطالعه ای ماکروفاژهای رده ی Murine RAT 264,7 را در معرض Nano-HA در غلظت های 500، 100، 50، 1000 و 5000 ppm قرار دادند و سایتوتوکسیسته ی ذرات را از طریق X-TT بررسی کردند و نتیجه گیری کردند که غلظت های بالاتر از 500 ppm توکسیک بود [28]. بنابراین نتایج این سه مطالعه با نتیجه حاصل از مطالعه ی فعلی تفاوت دارد و این تناقض ها در نتایج ممکن است به دلیل ویژگی های خاص ذرات مورد استفاده ، نوع سلول مورد بررسی و نیز تفاوت در روش های بکار رفته باشد. به طوری که ممکن است علت توکسیک بودن ذرات برای ماکروفاژ ها در غلظت های بالاتر از 125 ppm به دلیل فاگو سیت کردن ذرات و افزایش غلظت کلسیم در سیتوپلاسم سلول ها باشد، اما در مورد استئوبلاست ها ، سلول های تک هسته ای خون محیطی انسانی و

منابع

- 15-Grigor'ian AS, Grigor'iants LA, Podoinikova MN. A comparative analysis of the efficacy of different types of filling materials in the surgical elimination of tooth perforations (experimental morphological research). *J Stomatologi* 2000;79:79-92.
- 16-Gerlach KL, Niehues D. Treatment of jaw cysts with a new kind of nonparticulate hydroxylapatite. *J Mund Kiefer Gesichtschir* 2007;14:59-79.
- 17-Schwarz F, Bieling K, Latz T, Nuesry E, Becker J. Healing of intrabony peri-implantitis defects following application of a nanocrystalline hydroxyapatite (Ostim™) or a bovine-derived xenograft (Bio-Oss™) in combination with a collagen membrane (Bio-Gide™). A case series. *J Clin Periodontol* 2006;14:99-109.
- 18-Mater S, Mater M. Electrospun titanium dioxide nanofibers containing hydroxyapatite and silver nanoparticles as future implant materials. *J Biomed Mater Res* 2010;21:2551-9.
- 19-Ferraz MP, Mateus AY, Sousa JC, Monteiro FJ. Nanohydroxyapatite microspheres as delivery system for antibiotics: release kinetics, antimicrobial activity, and interaction with osteoblasts. *J Biomed Mater Res* 2008;23:56-100.
- 20-Matsumoto T, Okazaki M, Inoue M, Yamaguchi S, Kusunose T, Toyonaga T, et al. Hydroxyapatite nanoparticles as a controlled release carrier of protein. *J Biomaterials* 2004;17:37-92.
- 21-Uchida A, Shinto Y, Araki N, Ono K. Slow release of anticancer drugs from porous calcium hydroxyapatite ceramic. *J Orthopedic Research* 2002;10:3:440-507.
- 22-Zhou G, Li Y, Xiao W, Zhang L, Zuo Y, Xue J, Jansen JA. Synthesis, characterization, and antibacterial activities of a novel nanohydroxyapatite/zinc oxide complex. *J Biomed Mater Res* 2007;82:49-100.
- 23-Shahoon H, Hamed R, Yadegari Z, Valai N. Evaluation of hydroxyapatite nano particles, on the human peripheral blood mononuclear cells: An In vitro Study. *J Medwell* 2010;512:764-768.
- 24-Yantao Z, Yumei Z, Dagang G. Synthesis and cellular Biocompatibility of Two Kinds of HAP with Different Nanocrystal Morphology. *J Wiley interscience* 2009;24:548-689.
- 25-Hsieh MF, Li JK, Huang SH, Sperling RA, Parak W. Tracking of cellular uptake of hydrophilic Cd/Zn quantum dots/hydroxyapatite composites nanoparticles in MC3T3-E1 osteoblast cells. *J Nanosci Nanotechnol* 2009;9:2:27-62.
- 26-Motkin M, Wright D.M, Muller K, Kyle N, Gard T.G, Porter A. Hydroxyapatite nano and microparticles: Correlation of particle properties with cytotoxicity and biostability. *J Biomaterials* 2009;30:337-397.
- 27-Huang J, Scherbar AM, van Berlo, Schins RP. Evaluation of cytotoxic effects and oxidative stress with hydroxyapatite dispersion of different physicochemical properties in rat NR8383 cells and primary macrophages. *J Toxic in vitro* 2004;23:520-630.
- 28-Scheel J, Weimans S, Thiemann A. Exposure of the murine RAW 264.7 macrophage cell line to hydroxyapatite dispersions of various composition and morphology: assessment of cytotoxicity and activation. *J Toxic in vitro* 2009;23:531-548.
- 1-javascript:AL_get(this, 'jour', 'Acta Biomater. '); Thein-Han WW, Shah Ji, Misra RD. Superior in vitro biological response and mechanical properties of an implantable nanostructured biomaterial: Nanohydroxyapatite-silicone rubber composite. *J materials in medicine* 2011;57:567-600.
- 2-Puvvada N, Panigrahi PK, Pathak A. Nanoscale. Room temperature synthesis of highly hemocompatible hydroxyapatite, study of their physical properties and spectroscopic correlation of particle size. *J ADA* 2010;12:261-289.
- 3-Nam YH, Kim JI, Um SJ, Lee SK, Son CH. Absence of hyper-responsiveness to methacholine after specific bronchial provocation tests in a worker with hydroxyapatite-induced occupational asthma. *J Allergy Asthma Immunol Res* 2011;32:135-157.
- 4-Shahoon H, Ghazanfari T, Valaie N, Safaee M. Evaluation of Human Endochondral Bone Matrix Gelatin cytotoxicity on the human peripheral WBC mononuclear cells. *J Shahed University March* 2010;56:86-99.
- 5-Beud H, Adrian K. Clinical effects of nanocrystalline hydroxyapatite paste in the treatment of intrabony periodontal defects. *J clin oral invest* 2009;52:28-68.
- 6-Tamai N, Myoui A, Tomita T, Nakase T, Tanaka J, Ochi T. Novel hydroxyapatite ceramics with an interconnective porous structure exhibit superior osteoconduction in vivo. *J Biomed Mater Res* 2002;59:110-117.
- 7-Wojciech S, Masahiro Y. Processing and properties of hydroxyapatite-based biomaterials for use as hard tissue replacement implants. *J The Materials Gateway* 2004;21:665-736.
- 8-Yovana P, Cristina C, Cristina R, Maria P. Comparative study of nanohydroxyapatite microspheres for medical applications. *J InterScience DOI* 2007;23:262-307.
- 9-Huber FX, McArthur N, Hillmeier J, Kock HJ, Baier M. Void filling of tibia compression fracture zones using a novel resorbable nanocrystalline hydroxyapatite paste in combination with a hydroxyapatite ceramic core: first clinical results. *J Orthop Trauma Surg* 2006;26:533-540.
- 9-Thorwarth M, Schultze-Mosgau S, Kessler P, Wiltfang J, Schlegel KA. Bone regeneration in osseous defects using resorbable nanoparticulate hydroxyapatite. *J Oral Maxillofac Surg* 2005;63:1626-1633.
- 10-Kim K, Dean D, Lu A, Mikos AG, Fisher JP. Early osteogenic signal expression of rat bone marrow stromal cells is influenced by both hydroxyapatite nanoparticle content and initial cell seeding density in biodegradable nanocomposite scaffolds. *J Acta Biomater* 2011;73:1249-64.
- 11-Webster TJ, Ergun C, Doremus RH, Siegel RW, Bizios R. Enhanced functions of osteoblasts on nanophase ceramics. *Biomaterials*. *J Biomaterials* 2000;21:1803-1810.
- 12-Krejci CB, Bissada NF, Farah C, Greenwell H. Clinical-evaluation of porous and nonporous hydroxyapatite in the treatment of human periodontal bony defects. *J Periodontol*. 2007;58:521-528.
- 13-Kasaj A, Röhrig B, Zafiroopoulos GG, Willershausen B. Clinical evaluation of nanocrystalline hydroxyapatite paste in the treatment of human periodontal bony defects—a randomized controlled clinical trial: 6-month results. *J Periodontol* 2008;79:394-400.