# فعالیت حیاتی سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی انسان در مجاورت با ذرات نانوهیدروکسی آپاتیت

دکتر حسین شاهون ۱*
رویا حامدی ۲
زهرا یادگاری ۳
ناصر ولایی ۴

۱- استادیار گروه جراحی فک و صورت دانشکده دندانپزشکی دانشگاه شاهد
۲- دانشجوی دانشکده دندانپزشکی دانشگاه شاهد
۳- کارشناس ارشد ایمونولوژی دانشکده دندانپزشکی دانشگاه شهید بهشتی
۴- مشاور آمار حیاتی دانشگاه آزاد اسلامی

* نشانی نویسنده مسئول: تهران- بلوار کشاورز- خیابان وصال شیرازی- خیابان ایتالیا غربی- دانشکده دندانپزشکی دانشگاه شاهد

تلفکس: ۸۸۹۶۷۶۱۸-۰۲۱

نشانی الکترونیکی:
hhamedi@shahed.ac.ir

## چکیده

**زمینه:** هیدروکسی آپاتیت ($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$)(HA) یکی از مهم‌ترین بیوسرامیک‌ها برای کاربردهای پزشکی و دندانپزشکی است. ولی حلالیت پایین ذرات منجر به کاهش اثر آن در ساخت استخوان (osteoconductivity) شده 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 گرفت مؤثر و جدید استخوانی واقع شده است. اما مطالعات متعددی نشان دادند که تناقض‌هایی در زمینه‌ی سازگاری زیستی این ذرات وجود دارد. هدف از مطالعه حاضر بررسی سایتوتوکسیسیته‌ی ذرات نانوهیدروکسی آپاتیت بر روی سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی انسان می‌باشد.

**روش کار:** این مطالعه به صورت تجربی انجام گرفت. پس از استریل نمودن ذرات Nano-HA آن را با غلظت‌های ۱۵.۷۵، ۳۲، ۶۵، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۲۰۰۰، ۴۰۰۰، ۸۰۰۰ ppm تهیه کرده و بر روی ۱۰۵ سلول تک هسته‌ای خون محیطی انسان اثر داده و در پایان وایتالیتی سلول‌ها در زمان‌های ۷، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت با استفاده از تست MTT مورد ارزیابی قرار گرفت. سپس با استفاده از دستگاه ELISA READER میزان جذب نوری سنجیده شد و داده‌های به دست آمده با تست ANOVA آنالیز گشت.

**یافته‌ها:** نتایج نشان داد که با افزایش غلظت و نیز زمان فعالیت حیاتی سلول‌ها کاهش یافت، ولی این کاهش از لحاظ آماری معنی‌دار نبود ($P>0.05$) و کمترین میزان فعالیت حیاتی سلول‌ها در غلظت 8000 ppm بعد از گذشت ۷۲ ساعت می‌باشد (۰.۰۰۵±۰.۲۲۰) اما در گروه کنترل در ۷۲ ساعت برابر با ۰.۰۰۷±۰.۲۵۹ است.

**نتیجه‌گیری:** نتایج سازگاری ذرات Nano-HA را در مجاورت با سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی انسان نشان داد.

**واژگان کلیدی:** هیدروکسی آپاتیت، نانو هیدروکسی آپاتیت، سایتوتوکسیسیته، سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی انسان، میزان جذب نوری، سازگاری زیستی.

تاریخ دریافت مقاله: ۸۹/۱۰/۲۸ تاریخ اصلاح نهایی: ۹۰/۱۰/۲۱ تاریخ پذیرش مقاله: ۹۰/۹/۲۰

## مقدمه

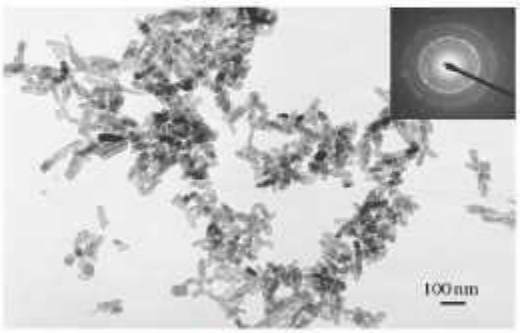
هیدروکسی آپاتیت HA* ($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$) یک ماده‌ی زیستی مهم و جزء اصلی بخش معدنی استخوان و دندان می‌باشد [۳-۱] که به دلیل داشتن قرابت شیمیایی و بیولوژیکی با ساختمان استخوان و دندان به عنوان یکی از مهم‌ترین بیوسرامیک‌ها برای کاربردهای پزشکی و دندانپزشکی خصوصاً در زمینه‌ی جایگزینی بافت استخوانی مطرح است [۸-۴] اما پروسه‌ی ساخت آن به دما و فشار بالایی نیاز دارد که منجر به کاهش تخلخل و افزایش دانسیته‌ی آن شده و در نتیجه منجر به کاهش حلالیت این ماده در محیط و کاهش اثر ذرات در تحریک ساخت استخوان (osteocoductivity) می‌شود [۹] و در حقیقت بیشتر به عنوان یک فیلر جهت پر کردن نقایص استخوانی به کار می‌رود [۱۳-۱۰]. 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 [۱۴] و تحقیقات فراوانی در زمینه‌ی استفاده از ذرات Nano-HA در درمان ضایعات استخوانی پریودنتال [۵]، افزایش osteointegration در ایمپلنت‌ها [۷]، ترمیم پرفوراسیون دندانی [۸]، افزایش رژنراسیون دیفکت‌های استخوانی در ارتوپدی [۹] و همچنین سیستم‌های انتقال دارو و واکسن صورت گرفته است [۱۵]. 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 [۱۸-۱۶]، مطالعات متعددی بر روی سازگاری زیستی این ماده صورت گرفته است ولی نتایج حاصل از این مطالعات تناقض‌هایی را در زمینه‌ی سازگاری زیستی این ذرات (Biocompatibility) نشان می‌دهد [۱۵-۱۱]. بنابراین در این مطالعه اثر سایتوتوکسیک پارتیکل‌های Nano-HA (با ابعاد زیر 100 nm و میله‌ای شکل) بر روی سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی انسان HPBMCs** به عنوان سلول‌های دفاعی بدن مورد بررسی قرار گرفت تا در صورت توکسیک نبودن، این بیومتریال به عنوان یکی از جایگزین‌های مؤثر بافت استخوانی مورد استفاده قرار گیرد.

## مواد و روش‌ها

مطالعه به روش تجربی (Experimental) و در دانشگاه شهید بهشتی و شاهد در سال ۸۸ و ۸۹ به منظور تعیین سایتوتوکسیسیته‌ی ذرات نانوهیدروکسی آپاتیت بر روی سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی انسان انجام گرفت.

### ۱- تهیه و استریل کردن ذرات Nano-HA

در این مطالعه از پارتیکل‌های Nano-HA با ابعاد زیر 100 nm و میله‌ای شکل (تصویر ۱) با خلوص ۹۹٪ ساخت شرکت آلمانی (NANOSHEL) Batch No#20090621 استفاده شد. با استفاده از نور ماورای بنفش به مدت ۲۴ ساعت، پارتیکل‌های Nano-HA استریل گشت.




**تصویر ۱-TEM (Transmission electron micrograph) از پارتیکل‌های Nano-HA با مقیاس ۱۰۰ نانومتر**

### ۲- جداسازی و کشت سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی انسان (HPBMCs)

برای انجام آزمایش از 10 cc خون هپارینه فرد داوطلب سالم غیر سیگاری استفاده شد. نمونه با بافر Hanks به نسبت ۱-۱ رقیق گردید و سپس 5cc خون به آرامی روی 3cc فایکول ۱۰۷۷ (sigma) ریخته شد. سپس لوله را داخل سانتریفوژ قرار داده و با نیروی 500 g به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. در این مرحله

رنگ حیاتی تریپان بلو مخلوط گشت و با میکروسکوپ نوری و لام هموسیتومتر، سلول‌ها شمارش گردید و در چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه توزیع شد.

### ۳- قرارگیری ذرات Nano-HA در مجاورت HPBMCs

در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه‌ای کشت سلولی تعداد ۱۰۵ سلول قرار داده شد و پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون (فشار ۵ درصد CO2، رطوبت ۹۸ درصد، دمای ۲۳۷ درجه) محیط کشت روئی تخلیه گردید. سپس ذرات Nano-HA با غلظت‌های ۱۵.۷۵، ۳۲، ۶۵، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۲۰۰۰، ۴۰۰۰، ۸۰۰۰ ppm در چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه روی سلول‌ها اثر داده شد و در سه چاهک کنترل محیط کشت کامل به عنوان یک ماده صدرصد غیر توکسیک ریخته شد.

### ۴- ارزیابی وایتالیتی HPBMCs

وایتالیتی سلول‌ها در زمان‌های ۲، ۲۴ ، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از مجاورت با ذرات با استفاده از تست MTT مورد سنجش قرار گرفت. به این ترتیب که بعد از گذشت زمان‌های مورد نظر، محیط‌های کشت سلولی را از انکوباتور (فشار 5% CO2، رطوبت ۹۸٪ دمای ۳۷ درجه) خارج کرده و یک‌دهم حجم روئی سلول‌ها به هر چاهک محلول Dimethylthiazol-2yl 2-5 (MTT) diphenyl tetrazolium bromide اضافه گشت و پلیت به مدت ۴ ساعت به انکوباتور برگردانده شد. پس از سپری شدن ۴ ساعت، پلیت را بیرون آورده و با کشیدن محیط روئی به چاهک‌ها ایزوپروپانل اسیدی اضافه گشته تا کریستال‌های بنفش رنگ فومارازون ایجاد شده در سلول‌هایی که زنده مانده‌اند (شکل ۲)، حل شده و مایع رنگی یکنواختی ایجاد شود. این مایع رنگی را به چاهک‌های یک پلیت الایزا منتقل و جذب آن با استفاده از دستگاه ELISA READER در طول موج 570 nm با فیلتر رفرانس ۶۲۰ نانومتر خوانده شد. سپس با استفاده از آزمون ANOVA جذب نوری چاهک‌های Nano-HA مورد قضاوت اماری قرار گرفت.

**تصویر ۲- پیکان بلورهای فومارازون تشکیل شده در مجاورت HPBMCs را نشان می‌دهد.**

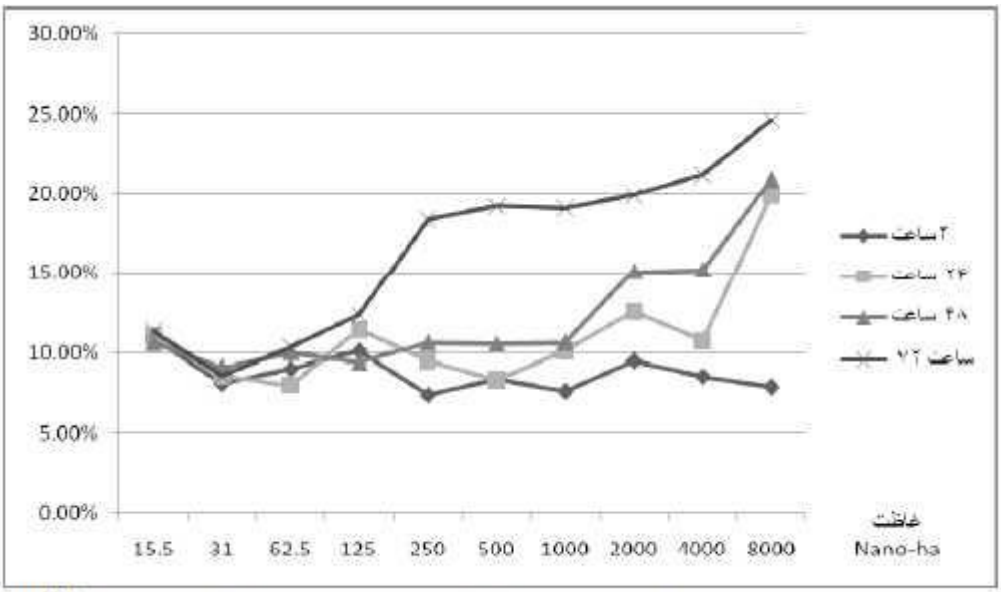
## یافته‌ها

تحقیق روی ۱۰ گروه تجربی و ۱ گروه شاهد مجموعاً ۱۱ گروه صورت گرفت و در آن غلظت‌های ۱۵.۵، ۳۱.۲۵، ۶۲.۵، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۲۰۰۰، ۴۰۰۰، ۸۰۰۰ ppm از Nano-HA به مدت ۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت با HPBMCs مجاورت داده شد. میانگین فعالیت حیاتی سلول‌ها بر حسب زمان‌های پیگیری به تفکیک مقادیر مختلف Nano-HA در جدول ۱ آمده است. آزمون ANOVA نشان داد که میزان فعالیت حیاتی سلول‌ها در گروه‌های ۱۰ گانه و زمان‌های پیگیری اختلاف معنی‌دار آماری نداشته است ($P>0.05$). نتایج نشان داد که با گذشت زمان در تمام گروه‌ها میانگین فعالیت حیاتی سلول‌ها کاهش می‌یابد و کمترین میانگین فعالیت حیاتی سلول‌ها مربوط به غلظت 8000 ppm بعد از گذشت ۷۲ ساعت می‌باشد (۰.۰۰۵±۰.۲۲۰).

| جدول ۱- میزان و انحراف معیار فعالیت حیاتی سلول‌ها بر حسب زمان‌های پیگیری به تفکیک مقادیر مختلف HA- Nano | | | | |
|---|---|---|---|---|
| زمان / غلظت Nano-HA | ۲ ساعت | ۲۴ ساعت | ۴۸ ساعت | ۷۲ ساعت |
| ۱۵۵ | ۰.۳۲۷ ±۰.۰۰۳ | ۰.۲۹۹±۰.۰۰۵ | ۰.۲۹۵ ±۰.۰۰۹ | ۰.۲۵۹±۰.۰۰۷ |
| ۳۱ | ۰.۳۳۷ ±۰.۰۰۳ | ۰.۳۰۶ ±۰.۰۱۲ | ۰.۳۰۰±۰.۰۰۵ | ۰.۲۶۷±۰.۰۰۶ |
| ۶۲.۵ | ۰.۳۳۴±۰.۰۰۵ | ۰.۳۰۹±۰.۰۰۲ | ۰.۲۹۷±۰.۰۰۳ | ۰.۲۶۲±۰.۰۰۲ |
| ۱۲۵ | ۰.۳۳۰±۰.۰۰۶ | ۰.۲۹۸±۰.۰۰۹ | ۰.۲۹۹±۰.۰۰۹ | ۰.۲۵۶±۰.۰۰۲ |
| ۲۵۰ | ۰.۳۴۰±۰.۰۰۲ | ۰.۳۰۴±۰.۰۰۴ | ۰.۲۹۵±۰.۰۰۷ | ۰.۲۳۸ ±۰.۰۰۲ |
| ۵۰۰ | ۰.۳۳۶±۰.۰۰۲ | ۰.۳۰۸±۰.۰۰۹ | ۰.۲۹۵±۰.۰۰۵ | ۰.۲۳۶±۰.۰۰۴ |
| ۱۰۰۰ | ۰.۳۳۹±۰.۰۰۱ | ۰.۳۰۲ ±۰.۰۰۷ | ۰.۲۹۳±۰.۰۰۲ | ۰.۲۳۶±۰.۰۰۶ |
| ۲۰۰۰ | ۰.۳۳۲±۰.۰۰۳ | ۰.۲۹۴±۰.۰۰۶ | ۰.۲۸۱±۰.۰۰۲ | ۰.۲۳۴±۰.۰۰۴ |
| ۴۰۰۰ | ۰.۳۳۶±۰.۰۰۲ | ۰.۳۰۰±۰.۰۰۵ | ۰.۲۸۰±۰.۰۰۸ | ۰.۲۳۰ ±۰.۰۰۲ |
| ۸۰۰۰ | ۰.۳۳۸ ±۰.۰۰۳ | ۰.۲۶۹ ±۰.۰۰۹ | ۰.۲۶۱±۰.۰۰۳ | ۰.۲۲۰±۰.۰۰۴ |

جدول شماره‌ی ۲ و نمودار ۱ درصد تغییرات سایتوتوکسیسیته نسبت به گروه کنترل به تفکیک مقادیر مختلف Nano-HA را نشان می‌دهد، حداکثر درصد توکسیسیته‌ی نسبت به گروه شاهد بعد از گذشت ۷۲ ساعت و در غلظت ppm 8000، برابر ۲۴.۶ ٪ است.

| جدول ۲- درصد سایتوتوکسیسیته نسبت به گروه کنترل به تفکیک مقادیر مختلف Nano-HA | | | | |
|---|---|---|---|---|
| زمان / غلظت Nano-HA | ۲ ساعت | ۲۴ ساعت | ۴۸ ساعت | ۷۲ ساعت |
| ۱۵۵ | ٪۱۰.۹ | ٪۱۱ | ٪۱۰.۶ | ٪۱۱.۳ |
| ۳۱ | ٪۸.۱ | ٪۸.۶ | ٪۹.۱ | ٪۸.۶ |
| ۶۲.۵ | ٪۹ | ٪۸ | ٪۱۰ | ٪۱۰.۳ |
| ۱۲۵ | ٪۱۰.۱ | ٪۱۱.۴ | ٪۹.۴ | ٪۱۲.۳ |
| ۲۵۰ | ٪۷.۴ | ٪۹.۵ | ٪۱۰.۶ | ٪۱۸.۴ |
| ۵۰۰ | ٪۸.۴ | ٪۸.۳ | ٪۱۰.۵ | ٪۱۹.۲ |
| ۱۰۰۰ | ٪۷.۶ | ٪۱۰.۱ | ٪۱۰.۶ | ٪۱۹.۱ |
| ۲۰۰۰ | ٪۹.۵ | ٪۱۲.۵ | ٪۱۵.۱ | ٪۱۹.۹ |
| ۴۰۰۰ | ٪۸.۵ | ٪۱۰.۷ | ٪۱۵.۲ | ٪۲۱.۲ |
| ۸۰۰۰ | ٪۷.۹ | ٪۱۹.۹ | ٪۲۰.۹ | ٪۲۴.۶ |




**نمودار ۱- مقایسه‌ی درصدهای سایتوتوکسیک بر حسب زمان‌های پیگیری به تفکیک غلظت‌های مختلف Nano-HA**

با افزایش غلظت ذرات Nano-HA و نیز گذشت زمان، درصد سایتوتوکسیسیته افزایش می‌یابد ولی از نظر آماری تفاوت معنی‌داری بین گروه‌ها وجود ندارد.

## بحث

نتیجه پژوهش نشان داد که با افزایش غلظت Nano-HA از ۱۵.۵ تا ۸۰۰۰ ppm و نیز گذشت زمان از ۲ تا ۷۲ ساعت میزان توکسیسیته افزایش یافته، ولی این کاهش در فعالیت حیاتی سلول‌ها از نظر آماری معنی‌دار نیست ($P>0.05$). بنابراین، ذرات Nano-HA در مجاورت با HPBMCs سازگاری قابل قبولی دارد.

IC50 (the half maximal inhibitory concentration) غلظتی از یک ماده است که منجر به مهار رشد سلولی یا مرگ سلولی به میزان ۵۰٪ سلول‌های اولیه می‌گردد و این مطالعه نشان داد که حداکثر میزان توکسیسته در غلظت 8000 ppm برابر با ۲۴.۶٪ است و لذا برای بدست آوردن غلظتی از Nano-HA که ۵۰٪ از سلول‌های اولیه را از بین می‌برد، نیاز به انجام مطالعه‌ای دیگر یا در نظر گرفتن شرایط مطالعه‌ی اخیر می‌باشد.

در مطالعه‌ای که توسط Yantae و همکاران در سال ۲۰۰۹ صورت گرفت و در آن سازگاری زیستی اشکال میله‌ای و کروی Nano-HA را در غلظت‌های ۱ تا ۱۰۰ ppm بر روی استئوبلاست‌ها از طریق تست MTT بعد از گذشت h72 مورد بررسی قرار دادند و نتیجه‌گیری کردند که هر دو شکل ذرات در هیچ غلظتی توکسیک نبود [۱۹]. نتایج اخیر نیز در تأیید نتیجه‌ی فوق نشان داد که این ماده دارای سازگاری زیستی قابل قبولی می‌باشد.

البته در مطالعه‌ی Yantae بازه‌ی زمانی محدود بوده و تنها تا غلظت 100 ppm تحقیق انجام شده است. از طرفی مطالعه‌ی Hsieh-MF و همکاران در سال ۲۰۰۹ نیز نشان داد که پارتیکل‌های Nano-HA تا غلظت 5000 ppm کمترین سمیت را برای استئوبلاست دارا هستند [۲۰] و نتایج مطالعه‌ی ما هم به طور مشابه بیانگر سازگاری زیستی ذرات Nano-HA است. اما در مطالعه‌ای که توسط Motskin و همکاران در سال ۲۰۰۹ صورت گرفت و در آن سایتوتوکسیسیته‌ی پارتیکل‌های Nano-HA به شکل کلوئید و ژل را در غلظت‌های ppm 31-62-125-250-500 بر روی ماکروفاژهای مشتق از مونوسیت از طریق تست MTT بعد از ۲۴ h مورد ارزیابی قرار دادند، نشان دادند که پارتیکل‌های Nano-HA در فرم ژل در تمامی غلظت‌ها توکسیک بوده و فرم کلوئید آن فقط در غلظت‌های بالاتر از 125 ppm توکسیک بود [۲۱]. اما در این مطالعه پارتیکل‌های Nano-HA را به شکل سوسپانسیون به کار رفت و سمیت آن روی سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی بررسی گردید. همچنین در سال ۲۰۰۴ J.Huang و همکاران اثر

سازگاری زیستی Nano-HA میله‌ای شکل را در غلظت‌های ۱-۱۰-۱۰۰ ppm را بر روی ماکروفاژهای مشتق از مونوسیت از طریق تست LDH بعد از ۲۴ h مورد بررسی قرار دادند و نشان دادند که در غلظت Nano-HA, 100 ppm توانائی آسیب زدن به غشا سلولی و آزاد کردن LDH را دارد [۲۲]. از طرفی آقای Scheel و همکاران در سال ۲۰۰۹ در مطالعه‌ای ماکروفاژهای رده‌ی Murine RAT 264.7 را در معرض Nano-HA در غلظت‌های ۵۰-۱۰۰-۵۰۰-۱۰۰۰-۵۰۰۰ ppm قرار دادند و سایتوتوکسیسیته‌ی ذرات را از طریق X-TT بررسی کردند و نتیجه‌گیری کردند که غلظت‌های بالاتر از 500 ppm توکسیک بود [۲۳]. نتایج این سه مطالعه با نتیجه حاصل از مطالعه‌ی فعلی تفاوت دارد و این تناقض‌ها در نتایج ممکن است به دلیل ویژگی‌های خاص ذرات مورد استفاده و نوع سلول مورد بررسی و نیز تفاوت در روش‌های به کار رفته باشد [۱۸]. به طوری که ممکن است علت توکسیک بودن ذرات برای ماکروفاژها در غلظت‌های بالاتر از ۱۲۵ ppm به دلیل فاگوسیت کردن ذرات و افزایش غلظت کلسیم در سیتوپلاسم سلول‌ها باشد، اما در مورد استئوبلاست‌ها و سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی به مقدار کمتری وارد سلول می‌شود. بنابراین می‌توان این گونه نتیجه‌گیری کرد که اگر پارتیکل Nano-HA وارد سلول شود، می‌تواند در غلظت‌های بالاتر توکسیک باشد ولی به شکل خارج سلولی حتی تا غلظت ۸۰۰۰ ppm برای لنفوسیت‌ها و ۵۰۰۰ ppm برای استئوبلاست‌ها توکسیک نمی‌باشد. از طرفی شاید به کار بردن اشکال مختلف ذرات که بر روی سطح تماس ذرات و لذا مقدار حلالیت و قدرت ذرات مؤثر است [۶-۸]، بر روی سایتوتوکسیک بودن پارتیکل‌ها نیز مؤثر باشد.

بنابراین با توجه به اهمیت موضوع پیشنهاد می‌شود تا مطالعات بیشتری نظیر بررسی واکنش‌های ایمونولوژیکی و مولکولی و هم چنین بررسی سایتوتوکسیسیته این ماده در مدل‌های in vivo توسط محققین دیگر انجام و پیگیری شود.

## نتیجه گیری

همان طور که در نتایج به دست آمده ملاحظه می‌شود، جذب نوری هر ۱۰ غلظت سه بار اندازه‌گیری شد و میانگین آن ثبت شد. علاوه بر میانگین، انحراف معیار و ANOVA هم به عمل آمد. هیچ کدام از دوزهای مورد استفاده توکسیک نبود. بنابراین در مجموع می‌توان این گونه نتیجه گرفت که Nano-HA ماده‌ای سازگار با سلول‌های سفید تک هسته‌ای خون محیطی انسان است.


### 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 می‌شود.