تحقیقی

مجله دندانپزشکی جامعه اسلامی دندانپزشکان/ دوره ۲۰، شماره ۴، زمستان ۱۳۸۷، ۳۲۴-۳۲۹

بررسی سمیّت مرجان شاخ گوزنی در محیط کشت سلول‌های فیبروبلاست

دکتر حمیدرضا عظیمی[۱]- دکتر طوبی غضنفری[۲]

۱- استادیار گروه آموزشی جراحی دهان و فک و صورت دانشکده دندانپزشکی دانشگاه شاهد

۲- دانشیار گروه آموزشی ایمونولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه شاهد

چکیده

زمینه و هدف: *مرجانها گونه‌ای از جانداران هستند که اسکلت آهکی آنها به عنوان پیوند مورد توجه قرار گرفته است. برای پیوند کردن هر ماده خارجی در بدن انسان، اولین موضوعی که باید از آن اطمینان حاصل کرد عدم وجود سمیّت آن ماده می‌باشد. هدف از این مطالعه بررسی سمیّت مرجان شاخ گوزنی در محیط کشت سلول‌های فیبروبلاست است.*

روش بررسی: *در این مطالعه تجربی ابتدا مرجان به صورت پودر به قطر کمتر از صد میکرون درآمده و در اتوکلاو استریل گردید. سلول‌های فیبروبلاست از انستیتو پاستور خریداری شد، سوسپانسیون مرجان با اضافه کردن پودر مرجان به محیط کشت حاوی RPMI 90%, FBS 10% با غلظت یک، دو، پنج، ده، بیست، پنجاه و۰/۵ میلی گرم در صد سی‌سی تهیه و به محیط کشت سلول‌های فیبروبلاست اضافه شد. از هر غلظتی سه نمونه تهیه گردید. پلیت‌های۹۶ خانه حاوی محیط کشت، سلول‌ها و مرجان به مدت ۲۴-۴۸ و ۷۲ساعت در انکوباتور در دمای ۳۷ و دی اکسیدکربن ۵٪ قرار داده شد و سپس ماده MTT به محیط اضافه شد. با استفاده از دستگاه Elisa reader میزان جذب نوری نمونه‌ها تعیین شد میزان جذب نوری به میزان جذب ماده MTT توسط سلول‌ها بستگی دارد که نمایانگر فعالیت حیاتی سلول‌ها می‌باشد. داده‌ها با آزمون ANOVA مورد تحلیل قرار گرفتند.*

یافته‌ها: *جذب نوری در گروه کنترل مشابه جذب نوری در محیط کشت سلول‌های فیبروبلاست حاوی غلظتهای مختلف مرجان می‌باشد. میزان فعالیت حیاتی سلول‌ها بر اساس میزان جذب نوری محاسبه می شود. پس از ۲۴ ساعت میزان جذب نور در گروه شاهد ۰/۰۱ می‌باشد که به عنوان وضعیت مطلوب در نظرگرفته می‌شود. میزان جذب نور در مقادیر مختلف مرجان (۰/۰۵، یک، دو، پنج، ده و پنجاه) بسیار نزدیک به گروه شاهد می‌باشد، به استثنای مقدار بیست میلی‌گرم که متوسط جذب نور ۰/۰۰۴ می‌باشد. به عبارت دیگر فعالیت حیاتی به ۴۰٪ کاهش یافته است. پس از ۴۸ ساعت در مقدار ده میلی‌گرم جذب نور به ۵۰ ٪ کاهش یافته و در بقیه مقادیر میزان جذب نور نزدیک به گروه شاهد می‌باشد. پس از ۷۲ ساعت نیز مقدار بیست میلی‌گرم نیز جذب نور به ۴۰٪ و مقدار یک میلی‌گرم به ۵۰ ٪ کاهش یافته است. آزمون ANOVA نشان داد که در زمانهای ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تفاوت معنی‌داری در میزان جذب نوری گروههای کنترل و گروههای هفتگانه وجود ندارد.*

نتیجه‌گیری: *مرجان شاخ گوزنی، سمیّتی برای سلول‌های فیبروبلاست ندارد.*

کلید واژه‌ها: *مرجان شاخ گوزنی – سلول‌های فیبروبلاست – سلول‌های خون محیطی – سمیت.*

وصول مقاله: ۱۳۸۶/۹/۴ اصلاح نهایی: ۱۳۸۷/۳/۲۸ پذیرش مقاله: ۱۳۸۷/۹/۵

نویسنده مسئول: گروه آموزشی جراحی دهان و فک و صورت دانشکده دندانپزشکی دانشگاه شاهد e.mail:rezaman2223@yahoo.com

مقدمه

یکی از مسائلی که در جراحیهای ناحیه دهان دندانپزشکان و چراحان دهان و فک با آن مواجه می‌باشند نقایص استخوانی و کمبود بافت استخوانی است که ناشی از عوامل مختلفی می‌باشند و از بین این عوامل می‌توان به سندروم‌ها(۱)، ایمپلنت(۲) تروماها(۳)، جراحی سرطانها، جراحیهای پیش از پروتز و عوامل دیگر اشاره کرد. لذا برای حل این مشکل جراحان از روشهای مختلفی بهره می‌برند که از بین آنها می‌توان‌به اتوگرافت،استئوتومی(۴)و بیومتریال‌ها(هیدروکسی

[Downloaded from jida.ir on 2022-10-03]

اپاتیت و بیواوس) اشاره کرد. ماده‌ای که در این مطالعه مورد توجه قرارگرفته است نوعی مرجان می‌باشد. مرجانها گروهی از جانداران دریایی هستند که دارای اسکلت آهکی هستند. در مقالات خارجی گزارشهایی مبنی بر استفاده از مرجانها برای ترمیم نقایص استخوانی وجود دارد. Li در ۱۹۹۶ از اسکلت نوعی مرجان برای ترمیم ضایعات استخوانی کاسه چشم استفاده کرد.(۵)، Kim و همکاران در سال ۲۰۰۵ از مرجان برای ترمیم ضایعات پریودنتال استفاده کرد.(۶)، عظیمی و توفیقی تأثیر مرجان شاخ گوزنی را در ترمیم استخوان آهیانه خرگوش مورد بررسی قرار دادند.(۷)، از نظر پراکندگی زیستی در کشور ایران مرجانها بیشتر در نواحی جنوبی شامل قشم، تنب کوچک، سیری و فرور کوچک یافت می‌شوند.(۸)، مرجانها گونه‌های بسیار زیادی را دارا می‌باشند که هر کدام دارای خصوصیات منحصر به فرد خود هستند و از سویی دیگر آب و هوا و شرایط اقلیمی هر منطقه می‌تواند بر خصوصیات آنها مؤثر باشد. لذا برای پاسخ به این سؤال که آیا می‌توان مرجان شاخ گوزنی بومی نواحی خلیج فارس را به عنوان ماده جایگزین استخوان در بدن انسان پیوند زد؟ نیاز به مطالعه جهت بررسی واکنش بیولوژیک نسبت به ماده مرجان می‌باشد.

روشهای مختلفی برای این منظور وجود دارد عبارتند از روش کشت سلول(۹) و یا روشMono layer agar overlay که توسط Guss ابداع شد.(۱۰)، Theiszovaو همکاران در سال ۲۰۰۵ برای ارزیابی سمیّت هیدروکسی اپاتیت از سلول‌های فیبروبلاست(۱۱) و Teresa و همکاران درسال ۲۰۰۳ برای ارزیابی سمیّت سلولی سیلرهای داخل کانال از ماکروفاژها استفاده کردند.(۱۲)

هدف از این مطالعه بررسی سمیّت مرجان شاخ گوزنی در محیط کشت سلول‌های فیبروبلاست می‌باشد.

روش بررسی

در این مطالعه تجربی از سلول‌های فیبروبلاست لثه انسان (HGF2PL2 cell line)و پودر مرجان استفاده گردید. مرجان مورد استفاده از گونه مادرپورا می‌باشد. برای مشخص کردن مواد تشکیل دهنده آن از دستگاه XRD استفاده شد که مشخص‌گردید که بیش‌از ۹۹٪ آن را کربنات‌کلسیم از نوع اراگونیت تشکیل داده و دارای درصد بسیار مختصری سدیم فلوراید می‌باشد. مرجان به صورت خشک خریداری شده در هاون کوبیده می‌شود تا به صورت پودر درآید و با گذراندن پودر از صافیهای فلزی ذرات مرجان به قطر کمتر از صد میکرون جدا شدند. پودر حاصل با قرار گرفتن در مجاورت اشعه ماورای بنفش به مدت ۲۴ ساعت استریل می‌گردد. با ریختن مقادیر مختلفی از پودر مرجان در محیط کشت سوسپانسیون مرجان ساخته شد.

در این مطالعه محیط کشت مورد استفاده عبارت بود از ۹۰٪ محیط RPMI که توسط انستیتو Roswell parl Memorial طراحی شده و ۱۰٪ FBS(Fetal bovine serum) به عنوان سرم استفاده گردید.(۱۳)، از بین انواع سرم‌های موجود سرم جنین گاو به علت مقدار زیاد عوامل رشد و حجم کم گاماگلوبولین به عنوان یک افزودنی استاندارد معمولاً۱۰٪ حجم کل محیط انتخاب می‌گردد.(۱۴)، وقتی اطمینان حاصل شد که سلول‌های مورد استفاده با محیط آزمایشگاه هماهنگ شده‌اند یعنی شروع به رشد و تکثیر کرده‌اند آنگاه باید اقدام به تکثیر (پاساژ) فلاسک سلول کرد. با استفاده از محلول تریپسین می‌باید اقدام به جدا کردن سلول‌ها از سطح فلاسک کرد.(۱۵)، سپس نوبت به انتقال سلول‌ها به پلیت ۹۶ خانه جهت انجام آزمایش می‌رسد. در این مرحله پس از انجام مراحل یک پاساژ معمولی به جای انتقال محلول حاوی سلول به یک فلاسک جدید، اقدام به انتقال آنها به یک لوله مخصوص کشت سلول می‌شود. سپس اقدام به شمارش تعداد سلول‌های موجود در محلول کرده که برای انجام این کار از لام مخصوص به نام نئوبار استفاده می‌شود. یکی از شیوه‌های عملی مرسوم در جهت شمارش تعداد سلول‌های موجود در نمونه شمردن تعداد سلول‌ها در یک میلی‌متر مکعب از فضای موجود در روی لام می‌باشد.(۱۶)، حال با یک تناسب ساده می‌توان حجم مطلوب از محلول دارای سلول را به صورتی که بتواند در هر خانه از پلیت تعداد پانزده هزار سلول را تأمین نماید، تعیین کرد.

در این مطالعه جهت سهولت کار در هر خانه حجم برابر دویست لاندا در نظر گرفته شد. بنابراین ابتدا حجم مایع دارای سلول مشخص شده و پس از کسر کردن از عدد دویست مقدار محیط RPMI دارای ۱۰٪ FBS را که باید به هر خانه اضافه شود محاسبه می‌گردد. پس‌ازآن به هر خانه،

[Downloaded from jida.ir on 2022-10-03]

محیط کشت (90%RPMI و ۱۰٪FBS) را اضافه کرده و بعد از آن مقدار مایع حاوی سلول اضافه می‌شود. جهت هر مقدار مرجان که بعداً باید اضافه شود و همچنین کنترل هر کدام یک ردیف شامل سه خانه در نظر گرفته شد.

یک پلیت ۹۶ خانه را اختیار کرده و در اولین خانه از ردیف اول آن صد لاندا محیط کشت(گروه کنترل) ریخته می‌شود و در چاهکها ی بعدی آن رقتهای مختلفی که از سوسپانسیون مرجان و محیط کشت که شرح داده شد به صورت زیر ریخته می‌شود:

در چاهک دوم رقت ۱/۲ یا پنجاه میلی‌گرم در صد میلی‌لیتر
چاهک سوم رقت ۱/۵ یا بیست میلی‌گرم در صد میلی‌لیتر
چاهک چهارم رقت ۱/۱۰ یا ده میلی‌گرم در صد میلی‌لیتر
چاهک پنجم رقت ۱/۲۰ یا پنج میلی‌گرم در صد میلی‌لیتر
چاهک ششم رقت ۱/۵۰ یا دو میلی‌گرم در صد میلی‌لیتر
چاهک هفتم رقت ۱/۱۰۰ یا یک میلی‌گرم در صد میلی‌لیتر
چاهک هشتم رقت ۱/۲۰۰ یا ۰/۵ میلی‌گرم در صد میلی‌لیتر وجود خواهد داشت.

در مرحله بعد پلیت‌ها در انکوباتور به مدت ۴۸،۲۴ و ۷۲ ساعت کشت داده می‌شود.

MTT یانمک تترازولیوم توسط میتوکندری‌ها به فورامازون ابی تبدیل می‌شود که قادر به عبور از غشا سلول نیست و در سلول تجمع می‌یابد. با اضافه کردن اسید ایزوپروپانول غشا سلول‌ها لیز شده و فورومازون آزاد می‌شود.(۱۷) MTT قبلاً با غلظت مطلوب در آزمایشگاه تهیه شده و در فریزر و در دمای بیست درجه زیر صفر نگهداری می‌شد که قبل از شروع به کار مدت کوتاهی در انکوباتور گرم شده و سپس مورد استفاده قرار می‌گیرد. ازمحلول تهیه شده میزان ۱/۱۰ حجم کل محیط که معادل بیست لاندا می‌شود به هر چاهک اضافه می‌گردد. سپس چهار ساعت در انکوباتور قرار داده می‌شود. پس از آن محلول رویی را برداشته و به هر خانه دویست لاندا ایزوپروپانول اسیدی اضافه می‌شود که باید یک شب بماند. این ترکیب کریستال‌های موجود در کف هر خانه را در خود حل می‌کند. پس از آن مایع رویی که حاوی کریستال‌های رنگی شده است را با استفاده از سمپلر به خانه‌های پلیت الیزا منتقل می‌گردند و با استفاده از دستگاه Elisa reader (طول موج ۴۹۲ نانومتر) مقدار جذب نوری هر خانه که نمادی از تعداد سلول‌های زنده در هرخانه در زمانهای ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت می‌باشد را اندازه‌گیری کرده که مقایسه آن با گروه کنترل نشان‌دهنده مقدار رشد و تکثیر سلول‌ها در مجاورت مرجان می‌باشد. بررسیهای آماری با آزمون ANOVA انجام شد.

یافته‌ها

مطالعه روی ۶۳ نمونه و در سه مقطع و از هر نمونه سه تکرار انجام گرفت. میزان سمیّت برحسب مقادیر مرجان پس از ۲۴ ساعت در جدول ۱ ارائه گردید که نشان می‌دهد اختلاف آنها ناچیز بوده و آزمون ANOVA نشان داد که اختلاف به لحاظ آماری معنی‌دار نیست. (P< ۰/۷)

توضیح: میزان فعالیت حیاتی درگروه شاهد به عنوان فعالیت ۱۰۰٪ در نظر گرفته شده که با بستن تناسب می‌توان میزان فعالیت حیاتی سایر گروهها را محاسبه کرد. به عنوان مثال در جدول ۱ فعالیت حیاتی در گروه پنجاه میلی‌گرم (۰/۰۰۹) با بستن تناسب ۹۰٪ محاسبه می‌شود. در واقع ۹۰٪ سلول‌ها زنده بوده و ۱۰٪ آنها از بین رفته‌اند.

جدول ۱: میزان فعالیت حیاتی سلول‌های فیبروبلاست برحسب مقادیر مختلف مرجان شاخ گوزنی پس از ۲۴ ساعت

مقادیرمرجان(میلی‌گرم)	میزان فعالیت حیاتی
گروه شاهد (بدون مرجان)	۰/۰۱ ± ۰/۱۰۷
۵۰	۰/۰۰۹ ± ۰/۱۲۷
۲۰	۰/۰۰۴ ± ۰/۱۱
۱۰	۰/۰۱۴ ± ۰/۱۱۹
۵	۰/۰۰۸ ± ۰/۱۲۳
۲	۰/۰۱ ± ۰/۱۱
۱	۰/۰۱ ± ۰/۱۱
۰/۵	۰/۰۰۹ ± ۰/۱۱

میزان فعالیت حیاتی سلول‌های فیبروبلاست در مجاورت مرجان در ۴۸ ساعت در جدول ۲ ارائه شده و نشان می‌دهد که میزان فعالیت حیاتی در گروههای هفتگانه مشابه بوده و آزمون ANOVA نشان می‌دهد که معنی‌دار نیست.

[Downloaded from jida.ir on 2022-10-03]

جدول ۲: فعالیت حیاتی سلول‌های فیبروبلاست لثه در مجاورت با مرجان پس از ۴۸ ساعت

مقادیرمرجان(میلی‌گرم)	میزان فعالیت حیاتی
گروه شاهد (بدون مرجان)	۰/۰۰۴ ± ۰/۰۹۷
۵۰	۰/۰۱ ± ۰/۱۱۲
۲۰	۰/۰۰۳ ± ۰/۰۹۳
۱۰	۰/۰۰۲ ± ۰/۰۸۹
۵	۰/۰۰۵ ± ۰/۱۱۲
۲	۰/۰۰۳ ± ۰/۱۰۵
۱	۰/۰۰۴ ± ۰/۱۱۷
۰/۵	۰/۰۰۷ ± ۰/۱۱۳

میزان فعالیت حیاتی سلول‌های فیبروبلاست در مجاورت مرجان در ۷۲ ساعت در جدول ۳ ارائه شده و نشان می‌دهد که میزان فعالیت حیاتی در گروههای هفتگانه مشابه بوده و آزمون ANOVA نشان می‌دهد که معنی‌دار نیست.

جدول ۳: فعالیت حیاتی سلول‌های فیبروبلاست در مجاورت مرجان پس از ۷۲ ساعت

مقادیرمرجان(میلی‌گرم)	میزان فعالیت حیاتی
گروه شاهد (بدون مرجان)	۰/۰۱ ± ۰/۱۲۱
۵۰	۰/۰۱ ± ۰/۱۲۹
۲۰	۰/۰۰۴ ± ۰/۰۹۱
۱۰	۰/۰۰۶ ± ۰/۱۲۶
۵	۰/۰۰۸ ± ۰/۱۴۶
۲	۰/۰۰۹ ± ۰/۱۲۳
۱	۰/۰۰۵ ± ۰/۱۳۴
۰/۵	۰/۰۰۷ ± ۰/۱۴

بحث

همان‌طور که در مقدمه ذکر شد هدف این مطالعه کاربرد مرجان به عنوان جایگزین بافت استخوانی می‌باشد. با توجه به اینکه استخوان توسط بافتهای نرم پوشیده شده و یکی از سلول‌های مهم این بافتها فیبروبلاست‌ها می‌باشند، لذا سازگاری‌سلول‌های فیبروبلاست بامرجان نشانگر سازگاری این ماده با بدن باشد. به دلایل ذکر شده در اکثر مطالعات که هدف آنها بررسی سازگاری مواد مختلف می‌باشند از این سلول‌ها استفاده می‌شود.

در طی ۲۴ ساعت اول در مقادیر پنجاه، ده و پنج در مقایسه با گروه شاهد فعالیت سلول‌ها به میزان کمی افزایش یافته است اما معنی‌دار نمی‌باشد.

پس از ۴۸ ساعت وجود مرجان نه تنها سمیّتی برای رشد سلول‌ها نداشته بلکه در دو غلظت یک و پنج میلی‌گرم در میلی‌لیتر فعالیت سلول‌ها افزایش یافته است. تماس مرجان با سلول‌های فیبروبلاست پس از ۷۲ ساعت نشان می‌دهد که در مقادیر پنج، پنجاه و نیم میلی‌گرم افزایش فعالیت حیاتی سلول‌ها و در میزان بیست میلی‌گرم نیز شاهد کاهش فعالیت سلول‌ها بوده که معنی‌دار نمی‌باشند.

با توجه به نتایج به دست آمده از میزان جذب نوری سلول‌های فیبروبلاست در مجاورت مرجان شاخ گوزنی پس از گذشت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت می‌توان به این نکته پی‌برد که مجاورت سلول‌های فیبروبلاست با پودر مرجان شاخ گوزنی نه تنها سمیّتی نداشته بلکه در مواردی شاهد افزایش میزان فعالیت سلولی به طور معنی‌دار نیز باید بود.

Ferrari و همکاران سلول‌های فیبروبلاست به دست آمده از سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان را علامت گذاری کرده و آنها را بر روی یک داربست از مرجان سوار کرده و سپس این مجموعه را در بافت عضلانی موش کاشته‌اند و پس از سی روز پیگیری به این نتیجه رسیده‌اند که سلول‌های فیبروبلاست به فعالیت خود ادامه می‌دهند.(۱۸)،در این بررسی مانند مطالعه حاضر از سلول‌های فیبروبلاست استفاده شده و نتیجه آن نیز مشابه می‌باشد.

مرجانهای مورد استفاده به عنوان جایگزین استخوان از گروه مرجانهای سخت می‌باشند اما همه آنها قابل استفاده نیستند.

Nasser و همکاران در مطالعه‌ای که بر روی نوعی از مرجان سخت از گونه Montipora انجام دادند ترکیبات دی استیلنی را یافتند که برای سلول‌های تومورهای Solid انسان سمّی و کشنده می‌باشند.(۱۹)، این مطالعه بیانگر این موضوع است که هر نوع مرجان با اسکلت آهکی سازگاری نسجی ندارد.

Shabana و همکاران سلول‌های فیبروبلاست لثه انسان را در مجاورت مرجان کشت دادند و اظهار کردند که پس از هشت هفته سلول‌ها رشد طبیعی داشته و به طور نرمال گسترده شده‌اند و با توجه به ارزیابی سلول‌ها توسط میکروسکوپ

[Downloaded from jida.ir on 2022-10-03]

الکترونی اجزای داخل سلولی مثل ریبوزوم‌هاو میتوکندری‌ها فعالیت نرمال داشته‌اند.(۲۰)

Fericani و همکاران مرجانهای نشان‌دار شده را به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در محیط کشت سلول‌های فیبروبلاست و منوسیت‌ها قرار دادند و نتیجه‌گیری کردند که این سلول‌ها با مکانیسم لیزوزوم‌های داخل سلولی قادر به حل کردن مرجان می‌باشند که نشان‌دهنده عدم سمیّت مرجان برای سلول‌های فوق بوده است.(۲۱)

در مطالعات Shbanaو Fericani نیز از فیبربلاست‌ها استفاده شده و نتایج آن سازگاری نسجی مرجان با سلول‌های فیبروبلاست را نشان می‌دهد.

نتیجه‌گیری

۱-مرجان شاخ گوزنی ماده‌ای سازگار با سلول‌های فیبروبلاست است.

۲-افزایش غلظت مرجان شاخ گوزنی تغییری در سازگاری آن با سلول‌های فیبروبلاست ایجاد نمی‌کند.

۳-افزایش زمان تماس مرجان شاخ گوزنی تا ۷۲ ساعت تغییری در سازگاری آن با سلول‌های فیبروبلاست ایجاد نمی‌کند.

۴-بعضی از انواع مرجانها با اسکلت آهکی دارای اثرات سمّی می‌باشند.

REFERENCES

1. Kurian K,Shanmugam S,Mathew B,Elongavan.Facial hemiatrophy- A report of 5 cases. Indian. J Dent Res. 2003 Oct-Dec;14(4):238-45.
2. Velich N,Nemeth Z,TothC,Szabo G.Long term result with different bone substitutes used for sinus floor elevation.J Craniofac Surg. 2004 Jan ;15(1):38-41.
3. Donkor P,Bankas D,Boakye G,Ansha S,Acheampong A.The use of free autogenous rib grafts in Maxillofacial Reconstruction .Ghana Med J. 2006 Dec;40(4):127-131.
4. Koo S, Dibart S, Weber HP.Ridge-splitting technique with simultaneous implant placement.Compend Contin Educ Dent.2008Mar; 29(2):106-10.
5. Li D, Liu J, MinY. Orbital rim reconstruction with coral porous hydroxyapatite. .Zhonghua Yan Ke Za Zhi.1996 May; 32(3):179-81.
6. Kim CS, Choi SH, Cho KS, Chai JK , Wikesjo UM,Kim CK.Periodental healing in one–wall intra bony defects in dogs following implantation of autogenous bone or coral- derived biomaterial.J Clin Perodontol.2005Jun;32(6): 583-9.
7. Azimi HR, Tofigi H. [The histological study of the efficacy of the coral (madrepora) particles on parietal bone healing of rabbit]. Dent J of Shahid Beheshti Univ of Med Sci.2007Winter;24(4):485-491.(Persian)
8. Sajadih MA.Corals use in dentistry.1996. Available at: database. Irandoc.ac.ir. February 10, 2007.
9. Polyzois GL.In vitro evaluation of dental materials.Clin Mater.1994; Jan 16(1):21-60.
10. Guess WL,Rosenbluth SA,Sshmidt B,Autian J.Agar diffusion method for toxiciyy screening of plastic on culture celle monolayers. J Pharm Sci .1965 Oct;54(10):1545-7.
11. Theiszova M, Jantova S, Dragunova J, Grznarova 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 Dec;149(2):393-6.

[Downloaded from jida.ir on 2022-10-03]

12. Sonia Teresa de Oliviera Mandes, Antonio Paulino Ribeiro Sobrinho, Andre Teixeira de Carvalho, 1Maria llma de Souza Cortes. Leda Quercia Vieria. In Vitro evaluation of the cytotoxicity of two root canal sealers on macrophage activity. J Of Endod.2003Feb;l29(2): 95-98.
13. Davis JM.Basic cell culture. [S.L]: Oxford University Press; 2002.
14. Brunius G, Modeer T.Effect of phenytoin intracellular 45 ca+ accumulation in gingival fibvroblast in vitro.J Oral Pathol Med .1989;Sept;18(8):485-9.
15. Rafael F.Methods in cellular immunology. 2th ed.St Louis: C.V Mosby Co; 2001, 515-516.
16. Leslie Hudson. Practical immunology. 3th ed. St Louis: The C.V Mosby Co;[S.T]: 2001, 94-97.
17. Rosa Maria Osorio, Arthur Hefti, Frank j, Vertucci, Amy L, Shawley. Cytotoxicity of endodontic materials. J Endod. 1998Feb; l24(2):91-96.
18. Ferrari D, Hannouche K, Qudina , Bourguignon A, Meuier L, Sedel H, Petite. In vivo tracking of bone marrow fibroblasts with flurescent carbocyanine dye. J Biomed Mater Res.2001; 56:361-367.
19. Naseer Alam, Bok Hee Bae, Jongki Hong O, Lee Kwang Sick Im and Jee H. Jung: cytotoxic Diacetylenes from the stony coral Montipora species. J Nat Prod. 2001 Aug; 64(8): 1059-1063.
20. Shabana A,H. Ouhayoun J.P,Boulekbache.H.Sautier J.M .Forest N.Ultrastructural study of the effects of coral skeleton on cultured Human Gingival Fibroblasts in Three-Dimentional Collagen lattices. J Mater Science. 1991 Feb; 2(7):162-167.
21. Fricain, R. Bareille, F. Rouais, B. Basse-Cathalinat and B. Dupuy"In vitro" dissolution of coral in peritoneal or fibroblast cell cultures. J Dent Res.1988 Feb; 77(2): 406-411.

[Downloaded from jida.ir on 2022-10-03]