

## ارزیابی *In vitro* کوتاه مدت آزاد سازی عنصر و سمیت سلولی آلیاژهای پایه نیکل، مورد استفاده در دندانپزشکی

محمد علی صغیری\*، سید خطیب الاسلام صدر فزاد\*\*، علی محمد صغیری\*\*\*، مهرداد لطفی\*\*\*\*، نیلوفر پهرامبان\*\*\*\*\*

### خلاصه:

سابقه و هدف: آلیاژهای دندانی در تماش نزدیک با بافت‌های دهان قرار دارند. به نتیجه پدیده خوردگی (Corrosion) امکان ایجاد تغییراتی در بافت‌های اطراف دهان وجود دارد. آلیاژها به دلیل خواص مناسب و کاربرد متعدد در پرتوزن، از جایگاه ویژه‌ای برخوردارند. به علت مجاورت آنها با بافت‌های دهان لازم است دارای سازگاری حیاتی بوده و سمعی نباشند. وجود بعضی از عنصر آلیاژی همانند نیکل و بربیلیوم به مواد اثبات خوبی همچون جلوگیری از اکسیداسیون نامطلوب، تقویت استحکام اتصال و محاسب نیکر، معایب همچون آزادسازی در محیط دهان و ایجاد سمیت بافتی را دارد. مجریان این پژوهش برآن شدند تا با توجه به مقادیر متفاوت عنصر بربیلیوم در سه آلیاژ به نام سوپرکست و پیرون ۹۹ و پراباند ۲ و ایجاد خاصیت منحصر بفرد در کامش لایه لایه شدن در سطح، عنصر ذکر شده (بلیمینیتیک) مقایسه از لحاظ سمیت سلولی سه آلیاژ ذکر شده را بر روی سلولهای فیبروبلاست موش L929 با استفاده از تست MTT انجام دهند.

مواد و روشها: مطالعه به روش توصیفی انجام گرفت. از هر آلیاژ ۱۲ بیسک به قطر ۵ میلیمتر و ضخامت ۲/۵ میلیمتر تهیه و در محیط کشت RPMI به مدت ۴۸ و ۷۲ ساعت قرار داده شد (ایجاد محیط Extract). سیس محیط‌های Extract (عصاره) هرآلیاژ پارو رقت ۲۰۰ میکرولیتر و ۴۰ میکرولیتر تهیه گردید و سمیت آنها با تست MTT بررسی شد و با گروه کنترل شامل محیط کشت بدون نمونه و محیط کشت حاوی نمونه تقلون مقایسه گردید. عنصر نیکل، کروم، مس، روی و نقره آزاد شده از هر آلیاژ با استفاده از دستگاه جذب اتمی اندازه گیری شدند.

یافته‌ها: پس از ۴۸ ساعت ملاحظه گردید، نمونه‌های آلیاژ از نظر سمیت نسبت به هم و نسبت به گروه کنترل، اختلاف معنی دار نداشتند ( $P>0.05$ ). پس از ۷۲ ساعت، نمونه‌ها با هم تفاوت معنی دار نداشتند ولی نسبت به گروه کنترل اختلاف معنی دار ملاحظه گردید. همچنین بین نمونه‌های هرآلیاژ پارو رقت ۲۰۰ میکرولیتر و ۴۰ میکرولیتر تفاوت معنی دار وجود نداشت. بیشترین آزاد سازی نیکل و کروم از پراباند ۲ و بیشترین آزاد سازی روی از سوپرکست صورت گرفت.

نتیجه گیری: از این تحقیق می‌توان نتیجه گرفت، سه نمونه آلیاژ نیکل - کروم مورد مطالعه از نظر سمیت، تفاوتی با یکی‌گر نداشتند. با افزایش زمان مجاورت سلولها با نمونه‌های آلیاژ فوق، درجاتی از سیتو توکسیتی ملاحظه گردید.

کلید واژه‌ها: "آلیاژهای پایه نیکل"، "بربیلیوم"، "زیست سازگاری"، "سیتو توکسیتی"

Email: [MSAGHIRI@AOL.COM](mailto:MSAGHIRI@AOL.COM)

مقدمه Mitchell و Tufekci در سال ۲۰۰۲ [2] روی ۲ نمونه آلیاز دارای پالادیوم زیاد (High palladium) از نظر آزادی سازی بالادیوم و گالیوم انجام گرفت، مشاهده گردید که آزاد شدن عنصر مزبور به میزان زیادی به فاز ساختمانی آلیاز بستگی دارد [3,4]. از نظر سازگاری حیاتی، خوردگی آلیاز زمانی خواهد بود که عنصر آزاد شده روی بافت‌های اطراف تاثیر بگذارند سازگاری حیاتی عبارت است از توانایی ماده در بروز پاسخ بیولوژیک مناسب در هنگام کاربرد آن می‌باشد این تعریف بصورت تداخل بین میزان، ماده و عملکرد ماده می‌باشد. [9] این و اکنشها بستگی به میزان، ماده و نیروهایی که به ماده وارد می‌شوند، دارد. بعبارتی ماده اثراتی روی میزان می‌گذارد و میزان هم عکس العملهایی روی ماده دارد. Wataha. وجود عنصر در ۱۰ نمونه آلیاز از گروه Au-pt-pd بررسی نمود [4, 6, 9, 18, 26] و نتیجه گرفت که میزان آزاد سازی عنصر به ترکیب و ساختمان میکروسکوپی

امروزه آلیاژهای مورد استفاده در دندانپزشکی به دلیل خواص متفاوت دارای تنواعات تولیدی بسیار زیادی هستند و با توجه به اینکه در محیط دهان مایعات بیولوژیکی همچون بزاق وجود دارد و از طرفی pH مرتباً در حال تغییر است طبیعتاً میزان خوردگی نیز افزایش می‌یابد. هر آلیاز ترکیبی از فلزات مختلف است و نوع و مقدار فلزات تشکیل دهنده در تعیین خصوصیات آن موثر می‌باشد. اصولاً آلیاژهای دندانی براساس ترکیب‌شان توصیف می‌شوند. ترکیب عنصر به دوشیوه بیان می‌گردد: ۱- درصد وزنی ۲- درصد اتمی یا درصد اتمهای هر عنصر عدالتاً کارخانه‌های سازنده و سازمان استاندارد از درصد وزنی برای توصیف آلیاژها استفاده می‌کنند [1,2]. راه دیگر جهت توصیف آلیاز بر اساس فاز ساختمانی است. فاز ساختمانی آلیاز در پدیده خوردگی و سازگاری حیاتی بسیار مهم است. در تحقیقی که توسط

### (1) Phase structure

- \* عضو هیئت علمی دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه آزاد (تهران) و محقق، پژوهشگاه صنعتی شریف (تهران) و محقق، پژوهشگاه مواد و انرژی، مسئول مقاله
- \*\* استاد دانشکده مهندسی و علم مواد دانشگاه صنعتی شریف (تهران) و پژوهشگاه مواد و انرژی
- \*\*\* دانشکده کامپیوتر، دانشگاه مهندسی امیرکبیر و پژوهشگاه مواد و انرژی (تهران)
- \*\*\*\* دانشیار دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز (تبریز)
- \*\*\*\*\* دانشکده مهندسی پزشکی، دانشگاه آزاد واحد علوم و تحقیقات و پژوهشگاه مواد و انرژی (تهران)
- # توسعه مسئول

ویرون ۹۹<sup>۳</sup>، وراباند<sup>۴</sup><sup>۵</sup> و با توجه به مقادیر متفاوت بریلیوم در آنها، از نظر سمیت سلولی بصورت *In vitro* مورد مقایسه و ارزیابی قرار گیرند. در مقادیر کافی، عناصر آزاد شده، بویژه مس و نیکل و بریلیوم می‌توانند باعث التهاب در بافت‌های پریودنتال و مخاط دهان شوند. اگر چه مدارکی دال بر تغییر پاسخهای اینمی در نتیجه آزادسازی یون‌های فلزی مختلف به صورت *in vitro* وجود دارد اما نقش این یون‌ها در بیماری‌های التهابی نظر پریودنتیت هنوز ناشناخته است. واکنشهای آلرژیک نسبت به آلیازهای فلزی نیز به اثبات رسیده است. نیکل بویژه به عنوان عامل آلرژی‌زای مهمی شناخته شده است. با این وجود در مورد موتاژنیک، کارسینوژنیک و ژنوتوكسیک یودن آلیازهای دندانپزشکی برای انسان هنوز گزارشی منتشر نشده است [۶]. آزمونهای مربوط به زیست‌سازگاری شامل سه گروه آزمایش اولیه، ثانویه و کاربردی می‌باشند. آزمونهای اولیه شامل روش‌های *in vitro* برای سیتو توکسیسیتی، لیز غشاء (همولیز)، موتاژنیس، کارسینوژنیس در سطح سلولی و اختلالات فیزیولوژیک حاد *in vitro* و مرگ در حد کل موجود زنده است.

بر اساس نتایج این آزمونهای اولیه، موادی که نتایج بهتری داشته‌اند، با یک آزمون یا تعداد بیشتری از آزمونهای ثانویه در حیوانات کوچک از جهت بروز واکنش‌های التهابی با اینمی (مانند تحریک پوستی، واکنش در ایمپلنتاسیون استخوانی و یا زیر جلدی و آزمونهای افزایش حساسیت) مورد بررسی قرار می‌گیرند.

#### مواد و روش‌ها:

در این پژوهش، براساس استاندارد ایزو ISO 10993-۱۲ نمونه از هر آلیاز تهیه گردید و جهت بررسی در دو زمان ۴۸ و ۷۲ ساعت به دو گروه شش تایی تقسیم شدند. سپس هر گروه شش تایی با دو رقت متفاوت به دو گروه سه تایی تقسیم گردیدند.

جدول ۱: ترکیب شیمیایی سه نمونه آلیاز نیکل-کروم  
کاتالوگ کارخانه‌های سازنده ویر حسب درصد)

Vera bond II	Wirron9 9	Super cast	عناصر آلیاز
77.5	65	77	Ni
12.5	22.5	14	Cr
9	9.5	5	Mo

<sup>۳</sup>) wirron 99

<sup>۴</sup>) Verabond II

آلیاز، خصوصیات ذاتی خود عنصر و شرایط محیطی بستگی دارد [۲۴].

Convington و همکاران طی تحقیقی که در سال ۱۹۸۵ ارائه دادند، تأثیر pH محیط روی آزاد سازی عناصر نیکل و بریلیوم از یک آلیاز فلز پایه را بررسی نمودند و دریافتند که هر قدر pH پایین تر و مدت تماس آلیاز با محیط بیشتر باشد، آزاد سازی نیکل و بریلیوم بیشتر می‌شود [۹] به طور خلاصه چند عامل، آزادسازی عناصر از آلیازها را کنترل می‌کنند که شامل: طبیعت شیمیایی عناصر، محیط متابولریک عناصر [۹] pH شرایط بیومکانیکی مربوط به تنفس، فشار و کشش، کیفیت و Treatment سطح سایش، تمیزکردن و پالیش آلیاز، ترکیب الکتروولیت و پتانسیل الکتروشیمیایی بدکار رفته می‌باشند [۱]. مطالعات Sjogren نیز نشان داد که انجام سند بلاست و پرداخت باعث می‌شود تا عناصر کمتری آزاد گردند و بنابراین سمیت سلولی کاهش می‌یابد. از آنجا که بقای درمان در حال حاضر، اهمیت بیشتری پیدا کرده، سازگاری نسجی مواد مورد استفاده، حیاتی تر شده است. بطور کلی مقاومت آلیاز در برابر خوردگی با کاهش میزان فلزات نوبل کاهش می‌یابد. مطالعات انجام شده، نشان داده اند که استفاده از آلیازهای فلز پایه<sup>۲</sup> باعث ایجاد عوارضی از قبیل سرطان زایی در حیوانات کوچک و ایجاد حساسیت باقی در انسان شده است که به دلیل خوردگی و آزاد سازی عناصری نظیر نیکل، بریلیوم و کروم می‌باشد. برای به حداقل رساندن خطرات بیولوژیک، دندانپزشکان باید آلیازهای انتخاب کنند که دارای حداقل آزاد سازی عناصر باشد (حداقل خوردگی). سمیت موضعی و سیستمیک، آلرژی و سرطان زایی همگی در نتیجه عناصری است که حین خوردگی از آلیاز به محیط دهان آزاد می‌شود. آلیازهای High noble علی رغم ویژگی‌های مطلوب از قبیل سهولت ریخته گری، سهولت پرداخت، انعطاف مارزین ... از قیمت بالایی برخوردارند. به همین دلیل آلیازهای متنوعی از نوع فلز پایه به بازار عرضه شده اند. در کشور ما اکثر آلیازهای مورد استفاده در پروتز ثابت از نوع فلز پایه است.

هدف از انجام این تحقیق آن است که با توجه به دستورالعملهای موجود در کتب مواد دندانی و استانداردهای مختلف و مطالعات قبلی و نیز با در نظر گرفتن امکانات موجود، سازگاری حیاتی سه نمونه از آلیازهای نیکل-کروم (سوپرکست<sup>۳</sup>)

<sup>2</sup>) Base metal

<sup>3</sup>) Super cast

۷. قرار دادن مجدد در استون و در دستگاه اولتراسونیک ۱۰ دقیقه.

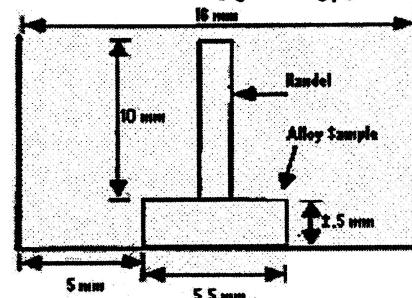
۸. بردن نمونه ها به زیر هود لامینار (PEMED)، شستشو با آب مقطر استریل و خشک کردن آنها. پس از آماده سازی، نمونه های مورد آزمایش به پلیت ۲۴ خانه یا چاهک سلولی mattek corporation منتقل شدند و به هر چاهک ۵ cc محیط کشت RPMI-1640 Gibco اضافه گردید.

محیط کشت RPMI شامل پودر RPMI استریپتومایسین، پنی سلین، آمفوتوریسین B، بی کربنات سدیم و سرم جنین گاوی (FCS) (Gibco) می باشد. سپس درب آن را محکم بسته و درون فویل آلومینیوم پیچیده و به دستگاه Aamerex instruments Shaker منتقل گردید. نمونه ها بمدت ۵ روز در دمای ۳۷ درجه در این دستگاه تحت لرزش قرار گرفتند با این کار آزاد سازی بیشتر عناصر ازآلیاژ صورت گرفت.

سلولهای فیبروبلاست موش (L929) که از آزمایشگاه immunologic Lab دریتسدا، مریلند، آمریکا تهیه شده بودند، در ظرف ۹۶ خانه (mattek) قرار داده شدند به گونه ای که ۱۰۰۰ سلول در ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت داخل هر خانه (چاهک سلولی) قرار داده شد. سپس ۲۴ ساعت داخل انکوباتور amerex instruments قرار گرفت تا سلولها به کف چاهک سلولی بچسبند. (ویژگی سلولهای فیبروبلاست آن است که به جداره ظرف می چسبند)، پس از گذشت ۲۴ ساعت محیط کشت بوسیله سمپلر<sup>۶</sup> (ساخت Gilson فرانسه) از چاهکهای ۹۶ خانه آسپیره گردید و محیط کشت حاوی عناصر آزاد شده که در ظرف ۲۴ خانه تهیه گردیده بودند به پلیت ۹۶ خانه حاوی سلولهای فیبروبلاست با دو رقت ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت حاوی عناصر آزاد شده و ۰/۱٪ میکرو لیتر محیط کشت حاوی عناصر آزاد شده و ۱۶۰ میکرولیتر محیط کشت معمولی) افزوده شده و به مدت ۴۸ ساعت و ۷۲ ساعت محیطهای فوق در مجاورت سلولهای فیبروبلاست داخل انکوباتور قرار گرفتند. پس از گذشت زمان لازم، پلیت ۹۶ خانه

4	1	--	Nb
--	--	1.6	Be
--	0.5	--	Fe
--	0.2	--	C
0.5	1	--	Si
--	0.5	--	Ce

نمونه ها بر اساس استاندارد ISO 10993 و بر اساس مطالعات گذشته بصورت دیسکهایی به قطر ۵/۵ میلیمتر و ضخامت ۲/۵ میلیمتر تهیه شدند. برای سهولت کار دسته ای به قطر ۲ و ارتفاع ۳ میلیمتر تهیه گردید. برای این منظور ابتدا دیسکهایی بالبعاد فوق از جنس آکریل فوری تهیه و سپس به روش حذف مو م ریخته شده و پرداخت گردیدند.



شکل ۱: تصویر شماتیک نمونه ساخته شده

از آنجا که تفلون دارای پاسخ سیتو توکسیک منفی می باشد، از آن بعنوان کنترل منفی استفاده شد. نمونه های تفلون در ابعاد مشابه سایر نمونه ها تهیه گردید. همچنین گروه کنترل دیگری که حاوی محیط کشت و سلول می باشد. برای مقایسه با گروههای مورد آزمایش در نظر گرفته شد، تعداد هر یک از گروههای کنترل نیز ۱۲ عدد می باشد. پس از انجام مراحل پرداخت، قبل از آزمایش، مراحل تمیز کردن نمونه های آلیاژ و تفلون به ترتیب زیر صورت گرفت:

۱. قرار گرفتن در فسفات بافر سالین (pH=۷/۴) و گذاشتن داخل دستگاه اولتراسونیک Blue Wave (Ultronics) به مدت ۳۰ دقیقه
۲. شستشو با آب مقطر.
۳. قرار گرفتن در اتانول ۷۰٪ و گذاشتن داخل دستگاه اولتراسونیک (۵ دقیقه).
۴. شستشو با آب مقطر.
۵. قرار گرفتن در استون و گذاشتن در دستگاه اولتراسونیک (۱۰ دقیقه).
۶. شستشو با آب مقطر و خشک کردن آن.

<sup>۶</sup> محیط های طراحی شده در انتیتو (RPM)

<sup>۷</sup> Biologic-32 Med lab MSC, Bethesda, MD, USA  
Owner of lab: aladjvardi@aol.com  
(Code: JCRB0648 cell line: L929

Scientific name :Mus muscles)

<sup>۸</sup> سلولهای است که در آزمایشگاههای کشت سلولی جهت آسپریاسیون با وارد کردن محیط کشت به کار می رود