بررسی میزان بیان (expression) فیبرونکتین، کلاژن نوع I و TGF-β توسط سلول‌های فیبروبلاست لیگامان پریودونتال انسانی در مجاورت مواد پر کننده انتهای ریشه

دکتر حسن رزمی[†]*- دکتر سید ناصر استاد- دکتر سارا فیاضی*****

*دانشیار گروه آموزشی اندودنتیکس دانشکده دندانپزشکی و عضو مرکز تحقیقات دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی تهران

**دانشیار گروه آموزشی سم شناسی دانشکده دارو سازی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی تهران

***استادیار گروه آموزشی اندودنتیکس دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان

Title: Evaluation of fibronectin, type I collagen and TGF-β expression by human periodontal ligament fibroblasts exposed to root end filling materials

Authors: Razmi H. Associate Professor*, Ostad N. Associate Professor**, Fayyazi S. Assistant Professor***

Address: *Department of Endodontics, School of Dentistry, Tehran University of Medical Sciences

**Department of Toxicology, School of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences

***Department of Endodontics, School of Dentistry,Rafsanjan University of Medical Sciences

Background and Aim: Several materials have been introduced for retrograde fillings, pulp capping and sealing root perforations, but their biological effect on vital tissues and cells is not clear. The purpose of this study was to evaluate the reaction of human periodontal ligament fibroblasts to four root canal filling materials: Pro Root MTA, Root MTA, Portland cement and amalgam.

Materials and Methods: In this experimental study, impacted or semi impacted third molar teeth were extracted in aseptic conditions and tissues around the roots were used to obtain fibroblast cell line. After proliferation, cells were cultured in chamber slides and extracts of materials were added to wells. Fibronectin, type I collagen and TGF-β expression were measured by immunocytochemistry method. Data were analyzed by SPSS 11.0 using one way ANOVA and Tukey test. $P<0.05$ was considered as the limit of significance.

Results: Collagen I expression was higher in Pro Root MTA group after 24 hours ($p<0.05$) and in Portland cement group and positive controls after 48 hours. Portland cement group showed the highest expression of collagen after 1 week. There was no significant difference in fibronectin expression after 24 hours. After 1 week the highest expression of fibronectin was seen in Portland cement, Root MTA and Pro Root MTA groups. TGF-β expression was higher in amalgam, Root MTA and Pro Root MTA specimens after 24 hours and was the highest in Pro Root MTA group after 48 hours.

Conclusion: Based on the results of this study, Portland cement and Root MTA are comparable with Pro Root MTA and better than amalgam regarding their effects on human periodontal ligament fibroblasts.

Key Words: Type I collagen; Fibronectin; TGF-β; Portland cement; MTA; Root MTA; Amalgam; Fibroblasts; Periodontal ligament

چکیده

زمینه و هدف: مواد مختلفی به عنوان پرکننده انتهای ریشه، پوشش پالپ یا ترمیم پرفوراسیون‌ها معرفی شده‌اند.اثرات بیولوژیک این مواد بر روی سلول‌ها و بافت‌های زنده روشن نیست. هدف از این مطالعهin vitro ارزیابی عملکرد سلول‌های فیبروبلاست لیگامان پریودونتال انسانی (HPDLF) در مجاورت چهار ماده مورد مصرف در درمان‌های اندو شامل Pro Root MTA، Root MTA، سیمان پرتلند و آمالگام بود.

روش بررسی: در این مطالعه آزمایشگاهی دندان‌های عقل نهفته یا نیمه نهفته سالم در شرایط آسپسی خارج شده و در محیط کشتDMEM غنی شده قرار گرفتند و برای کشت سلول‌های HPDLF از نسوج اطراف ریشه آنها استفاده شد. پس از کشت وتکثیر، سلول‌هابه تعداد ۴۰۰۰۰ در هر چاهک در chamber slide

[†] مؤلف مسؤول: نشانی: تهران- خیابان انقلاب- دانشگاه علوم پزشکی تهران- دانشکده دندانپزشکی- گروه آموزشی اندودنتیکس

تلفن: ۶۶۴۰۲۶۴۰ دورنگار: ۶۶۴۰۱۱۳۲ نشانی الکترونیک: hrazmi@tums.ac.ir

کاشته شدند و در مجاورت عصاره مواد مختلف قرار گرفتند. رنگ‌آمیزی در زمان‌های ۲۴ ساعت، ۴۸ ساعت و یک هفته انجام شد و هرآزمایش سه بار تکرار گردید (هر چاهک تحت تاثیر یک نوع ماده در یک زمان خاص قرار گرفت). متغیر های بررسی شده شامل میزان بیان کلاژن نوع I، فیبرونکتین و β -TGF بود که توسط روش ایمونوسیتوشیمی به همراه نرم افزارOlysia Bioreport بررسی گردید. نتایج با روش آنالیز واریانس یک طرفه و تست Tukey توسط نرم‌افزار SPSS 11 تحت بررسی آماری قرار گرفت. $p<0/05$ به عنوان سطح معنی‌داری درنظر گرفته شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که بیان کلاژن نوعI در مدت زمان ۲۴ ساعت در گروه Pro Root MTA به صورت معنی‌داری بیشتر از بقیه مواد بودوپس از ۴۸ ساعت بیشترین بیان کلاژن نوعI در گروه سیمان پرتلند و بعد از آن در گروه کنترل مثبت مشاهده گردید و پس از یک هفته نیز گروه سیمان پرتلند بیشترین میزان بیان کلاژن را نشان داد. پس از ۲۴ ساعت بیان فیبرونکتین بین گروه‌های مختلف تفاوت آماری معنی‌داری با یکدیگر نداشت ولی پس از ۴۸ ساعت بیشترین میزان بیان فیبرونکتین درگروه Pro Root MTA مشاهده شد. پس از یک هفته نیز بیشترین میزان بیان فیبرونکتین در گروه‌های سیمان پرتلند، Root MTA و Pro Root MTA مشاهده گردید. بیان β -TGF پس از ۲۴ ساعت در گروه‌های آمالگام، Root MTA و Pro Root MTA بیشتر بود ($p<0/05$) و پس از ۴۸ ساعت این میزان در گروه Pro Root MTA بیشتر از بقیه گروه‌ها بود. پس از یک هفته گروه‌های سیمان پرتلند، کنترل مثبت و Pro root MTA بیشترین میزان بیان β -TGF را نشان دادند.

نتیجه‌گیری: با توجه به بررسی‌های به عمل آمده می‌توان نتیجه گرفت که Root MTA وسیمان پرتلند از نظر اثر برروی سلول‌های HPDLF قابل مقایسه با Pro Root MTA بوده و همچنین در بسیاری شرایط برتر از آمالگام بودند.

کلید واژه‌ها: کلاژن نوع I؛ فیبرونکتین؛ β -TGF؛ مواد پر کننده انتهای ریشه؛ سیمان پرتلند؛ MTA؛ Root MTA؛ آمالگام؛ فیبروبلاست؛ لیگامان پریودونتال

وصول: ۸۶/۰۲/۱۹ اصلاح نهایی: ۸۶/۰۸/۲۰ تأیید چاپ: ۸۶/۱۲/۲۷

مقدمه

مواد مختلفی برای پر کردن انتهای ریشه در جراحی‌های اندودنتیک و هم چنین ترمیم پرفوراسیون‌ها توصیه شده‌اند. مطالعات متعدد مواد مختلفی را به عنوان ماده ایده آل جهت retrofilling توصیه نموده‌اند. طی یک قرن گذشته آمالگام به دلیل کاربرد آسان و قابل دسترس بودن به عنوان رایج‌ترین و پر مصرف‌ترین ماده جهت پر کردگی retrofill مورد استفاده قرار گرفته است. این ماده به خوبی توسط بافت نرم تحمل می‌شود، رادیواپک است و مهروموم آپیکالی ابتدایی خوبی ایجاد می‌کند (۱). مواد دیگری نیز چون IRM ,Super EBA, Pro Root MTA، رزین‌های کامپوزیتی و گلاس آیونومر اخیراً توصیه شده‌اند.

MTA (mineral trioxide aggregate) اولین بار توسط ترابی‌نژاد و همکاران در دانشگاه لومالیندا معرفی گردید (۲). این ماده به عنوان یک ترکیب مناسب برای پرکردگی انتهای ریشه و بستن فضای داخلی کانال معرفی شده است (۳-۶). این ماده حاوی ذرات بسیار ریز هیدروفیل می‌باشد و اجزا اصلی موجود در آن عبارتند از تری کلسیم سیلیکات، تری کلسیم آلومینات، تری کلسیم اکسید و سیلیکات اکسید. به علاوه مقادیر کمی از دیگر اکسیدهای فلزی در ماده وجود دارد که خصوصیات فیزیکی و شیمیایی ماده مربوط به آنهاست (۸،۷،۴).

از معایب Pro Root MTA طولانی بودن زمان سفت شدن (setting time) و امکان جابه‌جایی یا تغییر شکل آن در حفره آماده شده در انتهای ریشه و نیز قیمت بالای آن می‌باشد (۹).

Root MTA، ماده‌ای دیگر است که اخیراً در ایران به عنوان جانشینی برای Pro Root MTA مطرح شده است. این ماده به رنگ سفید و از نظر خواص فیزیکی مشابه Pro Root MTA است و در دانشکده دندانپزشکی تبریز ساخته و ارائه شده است. این ماده در مقایسه با Pro Root MTA خارجی قیمت ارزان‌تری داشته و دسترسی به آن ساده‌تر است (۱۰). در تحقیق لطفی و فیاض‌پور برروی Root MTA و Pro Root MTAاختلاف ریزنشت بین این دو ماده معنی‌دار نبود (۱۱). همچنین در مطالعه‌ای دیگر ریزنشت بین Pro Root MTA وRoot MTA با آمالگام معنی‌دار بود ولی دو گروه Pro Root MTA و Root MTA با هم تفاوت آماری معنی‌داری نداشتند (۱۲). همچنین در مطالعه رزمی و همکاران برروی پاسخ بافتی به سه ماده Pro Root MTA, Root MTA و سیمان پرتلند در گربه تفاوت آماری معنی‌داری بین سه گروه از جهت میزان التهاب، وجود کپسول فیبروز و شدت فیبروز وجود نداشت (۱۳).

ماده دیگری که در مطالعات مختلف به عنوان جایگزینی برای Pro Root MTA مطرح شده، سیمان پرتلند است. ترکیب اصلی این

سیمان شامل کریستال‌های معدنی مصنوعی می‌باشد که مهمترین آنها کلسیم سیلیکات و آلومینیوم سیلیکات است (۳). در مطالعهEstrela و همکاران سیمان پرتلند از نظر اجزا شیمیایی کاملاً مشابه Pro Root MTA بود، به‌جز اینکهPro Root MTA در ترکیب خود دارای اکسید بیسموت نیز می‌باشدکه باعث رادیواپسیتی آن می‌گردد (۱۴).

در مطالعه حاضر، هدف ارزیابی عملکرد سلول‌های فیبروبلاست لیگامان پریودونتال انسانی (HPDLF) در مجاورت مواد مذکور بود.

روش بررسی

در این مطالعه تجربی آزمایشگاهی تعداد ۲۰ دندان عقل نهفته و نیمه نهفته مربوط به بیماران مراجعه کننده به بخش جراحی فک و صورت دانشکده دندان پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران انتخاب شد. محدوده سنی بیماران ۲۵-۱۸ سال بود. بیماران از لحاظ سیستمیک کاملاً سالم بوده و هیچ کدام از دندان‌ها دچار علائم پری کورونیت و التهاب نبودند. شرایط انتخاب دندان‌ها بدین صورت بود که با توجه به رادیوگرافی پانورکس حداقل $\frac{۲}{۳}$ از ریشه دندان تشکیل شده باشد و قرارگیری دندان در استخوان فک طوری باشد که با حداقل تروما، به راحتی با جراحی خارج شود. این مرحله توسط استادیاران یا دستیاران بخش جراحی فک و صورت دانشکده دندانپزشکی تهران انجام شد.

قبل از خارج کردن دندان از بیماران خواسته شد تا به مدت ۵ دقیقه سه بار محلول دهانشویه یددار ۱ ٪ (Povidone Iodine تولیدارو-تهران/ایران) را در دهان بگردانند تا فلورمیکروبی به حداقل برسد. نمونه‌های سالم دندانی خارج شده بدون تماس با بزاق بیمار، بلافاصله توسط فورسپس جراحی داخل ظرف محتوی محیط کشت غنی DMEM (10% FBS–1% Penicillin, Streptomycin) قرار داده شد. سپس نمونه‌ها به دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تهران، آزمایشگاه تحقیقات سلولی و مولکولی، گروه کشت سلولی منتقل و مراحل جداسازی نمونه‌ها در محیط استریل laminar air flow انجام گرفت. ابتدا نمونه‌ها با پنس به آرامی از ظرف حاوی محیط کشت خارج و سه بار در ظروف کشت حاوی محلول نمکی HBSS شسته شدند تا عاری از دبری‌ها و لخته خون شوند. سپس به کمک تیغ بیستوری شماره ۱۲ مبادرت به جدا سازی نسج لیگامان پریودنتال از $\frac{۲}{۳}$ انتهای ریشه به صورت خراشیدن نسج گردید. توده های نسج داخل ظروف ۲۵ml حاوی ۴ml محیط کشت غنی DMEM قرار داده شد. نمونه‌های جدا شده در انکوباتور تحت حرارت^{0}C ۳۷ و فشار CO_2٪۵ قرار داده شدند. بعد از یک هفته جهت مشاهده رشد فیبروبلاست‌ها در ظروف کشت، نمونه‌ها توسط میکروسکوپ inverted با درشت نمایی شئی ۱۰X تحت بررسی قرار گرفتند. محیط کشت سلولی هر هفته تعویض می‌شد. بدین صورت که محیط کشت مصرف شده نمونه‌ها در محیط استریل laminar air flow آسپیره شده و ظرف با محلولPBS شسته و آسپیره می‌گردید. سپس مقدار مناسب محیط کشت تازه به ظروف اضافه می‌شد. در صورت عدم مشاهده سلول‌های رویش یافته بعد از دو هفته ظروف حاوی نمونه‌ها از مطالعه حذف می‌شدند.

- تهیه عصاره

برای تهیه عصاره مواد مورد آزمایش و قرار دادن آنها در محیط کشت از روش غیرمستقیم استفاده شد. در این روش ۱۰۰mg ازPro Root MTA (Dentsply Tulsa, USA) با ۳۵ml H_2O_2 مخلوط گردید و به صورت قطعات ۵×۵ میلی‌متر در ۲ml محیط DMEM (در ظرف ۳۵mm) قرار داده شد (۱۵). بعد از ۲۴ ساعت مایع DMEM کشیده شد و در سانتریفوژ ۶۰۰۰rpm به مدت ۵ دقیقه قرار گرفت تا ذرات معلق از آن حذف شود. مایع باقیمانده در سطح کشیده شده و از این به بعدمحلول تست ۱ در زمان ۲۴ ساعت نامیده شد. (محلول تست ۱ در زمان ۲۴ ساعت عصاره Pro Root MTA در زمان ۲۴ ساعت می‌باشد). همین عمل در زمان ۴۸ ساعت و یک هفته نیز انجام و محلول تست ۱ در زمان‌های مزبور تهیه شد.

همین عمل برای Root MTA و سیمان Portland نیز انجام شد و محلول تست‌های ۲ و ۳ در زمان‌های مختلف (۲۴، ۴۸ ساعت و یک هفته) تهیه گردید (تست ۲ عصاره Root MTA و تست ۳ عصاره سیمان Portland در محیط کشت می‌باشد). در مورد آمالگام (Cinalux، شهید فقیهی- ایران) نیز ۱۰۰mg ماده پس از مخلوط کردن و قبل از setting اولیه (در۸ دقیقه اول بعد از مخلوط کردن) در ۲ml محیط کشت DMEM قرار داده شد. بقیه مراحل مشابه MTA بود. به این ترتیب محلول تست شماره ۴ در زمان‌های مختلف تهیه شد (۱۶).

- ایمونوسیتوشیمی

در مطالعه حاضر برای بررسی فیبرونکتین از کیت ایمونوسیتوشیمی LSAB2 (Dako-UK) و برای بررسی کلاژن I و β -TGF از horseradish peroxidase(HRP) conjugated affinity purified secondary antibody استفاده شد. مراحل کار به صورت زیر بود:

۱- برای هر نمونه از یک chamber slide (well ۴) استفاده شد که تعداد ۴۰۰۰۰ سلول فیبروبلاست (HPDLF) از پاساژهای ۶-۳ در هر well کاشته شد. سلول‌ها برای چسبیدن به کف چاله، ۲۴ ساعت در انکوباتور 37^0C، ۲۵٪ CO_2 قرار گرفتند.

۲- بعد از ۲۴ ساعت محیط هر well کشیده شد و محلول‌های تست و در مورد گروه کنترل، محیط کشت DMEM به میزان ۵۰۰µm به هر well اضافه شد.

Well ۳،۲،۱	تست۱	۵۰۰ µm	
Well ۶،۵،۴	تست۲	۵۰۰ µm	
Well ۹،۸،۷	تست۳	۵۰۰ µm	
Well ۱۲،۱۱،۱۰	تست۴	۵۰۰ µm	
Well ۱۵،۱۴،۱۳	DMEM	۵۰۰ µm	(Control +)
Well ۱۸،۱۷،۱۶	DMEM	۵۰۰ µm	(Control -)
Well ۲۰،۱۹	DMEM	۵۰۰ µm	(hematoxiline)

این عمل در سه زمان مختلف (۲۴ ساعت/ ۴۸ ساعت/ یک هفته) انجام شد، یعنی برای زمان ۲۴ ساعت، بعد از گذشت ۲۴ ساعت از قرار دادن محلول تست و برای زمان ۴۸ ساعت بعد از گذشت ۴۸ ساعت و برای زمان یک هفته بعد از گذشت ۱ هفته از قرار دادن محلول تست مربوطه قدم‌های بعدی (۳ به بعد) انجام گرفت.

۳- بعد از طی زمان مربوط (۲۴ ساعت/ ۴۸ ساعت/ یک هفته) مرحله ثابت سازی با محلول fixative (متانول ۸۰٪ ، استن ۲۰٪) انجام شد.

۴- پس از تکمیل مرحله ثابت‌سازی برای جلوگیری از فعالیت پراکسیداز اندوژن یا سودوپراکسیداز، نمونه‌ها در دمای اتاق با پراکسید هیدروژن ۳٪ به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شدند.

۵- well ها دو بار با محلول tris شسته شدند (هر بار ۵ دقیقه).

۶- نمونه‌ها ۱ ساعت در دمای اتاق با ۱٪ Bovine serum albumin انکوبه شدند، که این ماده اتصال غیراختصاصی آنتی بادی‌های اولیه و ثانویه را بلاک می‌کند.

۷- نمونه‌های ۱، ۴، ۷، ۱۰ و ۱۳ با آنتی بادی اولیه فیبرونکتین با رقت $\frac{۱}{۴۰۰}$ انکوبه شدند (هر well با۱۰۰µm محلول آنتی بادی رقیق شده $\frac{۱}{۴۰۰}$). نمونه‌های ۲، ۵، ۸، ۱۱و ۱۴ با آنتی بادی اولیه کلاژن نوع I با رقت $\frac{۱}{۴۰}$ انکوبه شدند (هر well با ۱۰۰µm محلول آنتی بادی رقیق شده $\frac{۱}{۴۰}$). نمونه‌های شماره ۳ و ۶ و ۹ و ۱۲ و ۱۵ با آنتی بادی اولیه β -TGF با رقت $\frac{۱}{۱۰۰}$ انکوبه شدند (هر well ۱۰۰µm محلول آنتی بادی رقیق شده $\frac{۱}{۱۰۰}$). به بقیه نمونه‌ها (۲۰-۱۶) ۱۰۰µm PBS، اضافه شد. نمونه‌ها در دمای 4^0C یخچال به مدت ۱۲ ساعت قرار داده شدند.

به نمونه‌های کنترل (۱۶ تا ۲۰) آنتی بادی اولیه اضافه نشد ولی تمام مراحل مشابه بقیه نمونه‌ها روی آنها انجام شد. از آنجایی که هر گونه رنگ‌آمیزی مشاهده شده در این گروه‌ها نشان دهنده اتصال غیر اختصاصی آنتی بادی ثانویه می‌باشد، این تست ویژگی آزمایش ما را تعیین می‌کند (گروه کنترل منفی).

۸- نمونه‌های ۱، ۴، ۷، ۱۰، ۱۳ و ۱۶ به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق با biotinylated secondary antibody انکوبه شدند.

نمونه‌های ۲، ۳، ۵، ۶، ۸، ۹، ۱۱، ۱۲، ۱۴، ۱۵، ۱۷ و ۱۸ با HRP secondary antibody انکوبه شدند.

۹- نمونه‌های ۱، ۴، ۷، ۱۰ و ۱۳ با Streptavidin–horse radish peroxidase solution در دمای اتاق به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شدند.

۱۰- تمام نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق با محلول کروموژن DAB انکوبه شدند.

۱۱- پوشش شیشه‌ای نمونه‌ها حذف شد.

همانطور که گفته شد به نمونه‌های شماره ۱۳،۱۴و۱۵ که گروه کنترل مثبت بودند به جای محلول تست محیط کشت DMEM اضافه گردید تا وضعیت بیان آنتی ژن‌های مزبور توسط سلول‌ها در حالت طبیعی بررسی شود.

نمونه‌های ۱۶، ۱۷ و ۱۸ که گروه کنترل منفی آزمایش‌ها بودند برای ارزیابی صحت و اختصاصی بودن آنتی بادی ثانویه در نظر گرفته شدند. در این نمونه‌ها مرحله اضافه نمودن آنتی بادی اولیه حذف گردید، بنابراین انتظار می‌رود در صورت صحت آزمایش گروه‌های

کنترل منفی ما هیچگونه رنگ‌آمیزی را نشان ندهند. تمام آزمایشات ۳ بار تکرار شد.

- منحنی رشد سلول‌ها

رشد سلول‌ها در محیط کشت معمولاً طبق الگوی استاندارد می‌باشد. پس از طی کردن فازlag یا سکون، متعاقب کاشت سلول‌ها، دوره رشد یا exponential دنبال می‌شودکه فاز log نیز نامیده می‌شود. سلول‌ها بر اساس سرعت رشد و متابولیسم خاص خود، در طی دوره زمانی مشخص نیاز به تعویض محیط و پاساژ دارند.

برای دستیابی به منحنی رشد، نیاز به شمارش سلول‌ها در دوره‌های زمانی خاص می‌باشد. به همین منظور سلول‌ها با رقت 10^6 در ظرف well ۲۴ کاشته شدند. بعد از ۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶، ۱۲۰ ساعت تعداد سلول‌ها در well ۳ از کل well ها شمارش گردید و میانگین بدست آمده روی نمودار نشان داده شد. این عمل در ۳ نمونه سلولی بدست آمده از سه فرد مختلف انجام شد.

- آنالیز تصویری نیمه کمی

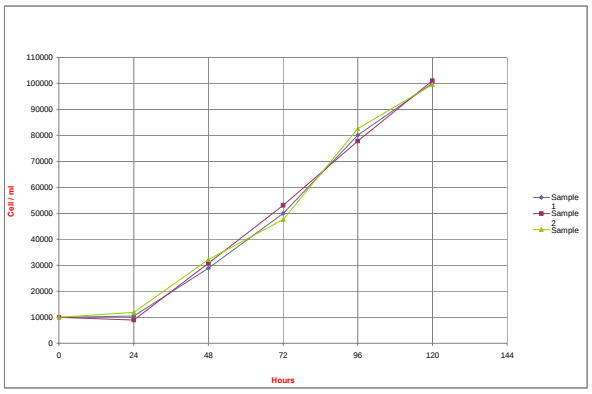
تصاویر دیجیتالی از رنگ‌آمیزی ایمونوسیتوشیمی سلول‌ها بدست آمد و با نرم افزار Olysia Bioreport Imaging آنالیز شد. شدت (intensity) رنگ‌آمیزی در چهار کوادرانت هر لام، تعیین شد. هر چه عددی که توسط نرم افزار به عنوان intensity بیان می‌شود بزرگ‌تر باشد نشان دهنده رنگ‌آمیزی کمتر نمونه‌ها می‌باشد یعنی هر چه متغیرهای مورد نظر بیان کمتری داشته باشند عدد مذکور بزرگتر خواهد بود.

- آنالیز آماری

آنالیز اطلاعات با نرم‌افزار SPSS 11 در سطح ۰/۰۵ با روش آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) انجام گردید. میانگین اعداد بدست آمده برای گروه کنترل منفی و مثبت نیز تعیین گردید و برای Post Test از تست Tukey استفاده شد.

یافته‌ها

همانطور که ذکر شد پس از شمارش سلول‌ها در زمان‌های معین نمودار پتانسیل رشد سلول‌ها در هر سه نمونه رسم گردید (نمودار۱). بررسی هم‌زمان نمودارهای مذکور نشان داد که خواص رشدی فیبروبلاست‌های بافت لیگامان پریودونتال در افراد مختلف تقریباً یکسان می‌باشد.



نمودار۱- منحنی رشد سلول‌ها در ۳ نمونه مختلف

فازexponential رشد این سلول‌ها بین ۲۴ تا ۹۶ ساعت بعد از کشت بود. در فاز exponential (log) سلول‌ها در بهترین وضعیت سلامت‌شان می‌باشند و توانایی تطابق با محیط جدید را دارند.

این زمان برای تزاید سلول‌ها و بررسی های سلولی استفاده می‌شود. همانطور که در نمودار مشخص می‌باشد در ۲۴ ساعت اول کشت سلول‌ها در فاز lag یا سکون می‌باشند که رشد کمی دارند و در حال تطابق با محیط جدید می‌باشند. بنابراین اضافه نمودن مواد مورد آزمایش به سلول‌ها بعد از ۲۴ ساعت اول صورت می‌گیرد.

- نتایج مربوط به بیان کلاژن نوع I:

آنالیز واریانس دو طرفه نشان داد که زمان و نوع ماده بر روی میزان بیان کلاژن تاثیر معنی‌دار دارد و لذا آنالیز واریانس یک طرفه زمان‌های مختلف ۲۴ ساعت، ۴۸ ساعت و یک هفته انجام شد. طبق بررسی با تست tukey نتایج زیر حاصل آمد:

در مدت زمان ۲۴ ساعت بیان کلاژن در گروه Pro Root MTA به صورت معنی‌داری بیشتر از بقیه مواد بود. بیان کلاژن در گروه‌های آمالگام، سیمان پرتلند و گروه کنترل مثبت تفاوت معنی‌داری با یکدیگر نداشت و در هر سه آنها از گروه کنترل منفی و Root MTA به صورت معنی‌داری بیشتر بود. گروه کنترل منفی و Root MTA تفاوت معنی‌داری با هم نداشتند (جدول۱). در مدت زمان ۴۸ ساعت گروه سیمان پرتلند میزان بالاتری از بیان کلاژن را نسبت به بقیه گروه‌ها نشان داد، بعد از آن گروه کنترل مثبت بیشتر از بقیه مواد بیان کلاژن را نشان داد و سپس به ترتیب گروه Pro Root MTA و Root MTA بیشترین بیان کلاژن ($p<0/05$) را

نشان دادند (جدول۲). در مدت زمان یک هفته، گروه سیمان پرتلند بیشترین میزان بیان کلاژن را نشان داد و بعد از آن به ترتیب گروه Pro Root MTA، Root MTA، کنترل مثبت، آمالگام و گروه کنترل منفی قرارداشتند. گروه سیمان پرتلند بیان کلاژن بالاتری از بقیه گروه‌ها داشت($p<۰/۰۵$)که البته این تفاوت با گروه Pro Root MTA معنی‌دار نبود ($p=۰/۱۲$) (جدول۳).

جدول۱- مقایسه میزان بیان کلاژن با تعیین زیر گروه‌های آماری tukey post test (۲۴ ساعت)

مواد	N	سطح معنی‌داری=۵٪		
		۱	۲	۳
Pro Root MTA	۷	۱۲۴/۱۸		
آمالگام	۱۳		۱۴۰/۰۸	
سیمان پرتلند	۸		۱۴۰/۴۷	
کنترل مثبت	۷		۱۴۶/۳۱	
کنترل منفی	۷			۱۷۵/۴۰
Root MTA	۹			۱۸۱/۷۶
Sig.		۱/۰۰	۰/۵۹	۰/۵۷

جدول۲- مقایسه میزان بیان کلاژن با تعیین زیر گروه‌های آماری tukey post test (۴۸ ساعت)

مواد	N	سطح معنی‌داری=۵٪				
		۱	۲	۳	۴	۵
سیمان پرتلند	۱۰	۱۰۴/۳۰				
کنترل مثبت	۷		۱۴۰/۰۵			
Pro Root MTA	۵			۱۴۸/۷۶		
Root MTA	۷				۱۶۰/۵۶	
آمالگام	۱۰					۱۶۸/۹۸
کنترل منفی	۶					۱۷۱/۳۹
Sig.		۱/۰۰	۱/۰۰	۱/۰۰	۱/۰۰	۰/۹۵

جدول۳- مقایسه میزان بیان کلاژن با تعیین زیر گروه‌های آماری tukey post test (یک هفته)

مواد	N	سطح معنی‌داری=۵٪			
		۱	۲	۳	۴
سیمان پرتلند	۱۰	۸۵/۷۹			
Pro Root MTA	۸	۱۱۱/۵۱	۱۱۱/۵۱		
Root MTA	۱۵		۱۱۸/۷۲	۱۱۸/۷۲	
کنترل مثبت	۹		۱۳۷/۸۱	۱۳۷/۸۱	
آمالگام	۱۵			۱۴۳/۸۷	
کنترل منفی	۷				۱۷۴/۴۵
Sig.		۰/۱۲	۰/۱۱	۰/۱۴	۱/۰۰

- نتایج مربوط به بیان فیبرونکتین:

میزان بیان فیبرونکتین بین گروه‌های سیمان پرتلند، کنترل مثبت، آمالگام،Pro Root MTA و Root MTA در زمان ۲۴ ساعت تفاوت آماری معنی‌داری با یکدیگر نداشتند (p=۰/۳۱) (جدول۴). در زمان ۴۸ ساعت میزان بیان فیبرونکتین در گروه Pro Root MTA بالاتر از Root MTA، کنترل مثبت و منفی بود (p=۰/۰۹) ولی با گروه‌های سیمان پرتلند و آمالگام تفاوت معنی‌داری نداشت (جدول۵). در زمان یک هفته میزان بیان فیبرونکتین در گروه‌های مختلف به ترتیب از زیاد به کم به صورت زیر بود:

سیمان پرتلند، Root MTA، Pro Root MTA، آمالگام، کنترل مثبت و کنترل منفی. میزان بیان فیبرونکتین در گروه سیمان پرتلند با گروه Root MTA و Pro Root MTA تفاوت آماری معنی‌داری نداشت (P=۰/۲۶) ولی با گروه‌های آمالگام، کنترل منفی و کنترل مثبت تفاوت آماری معنی‌داری داشت (p<۰/۰۵). اختلاف بین Root MTA، Pro Root MTA، آمالگام و کنترل مثبت معنی‌دار نبودند (p=۰/۱۷) (جدول۶).

جدول۴- مقایسه میزان بیان فیبرونکتین با تعیین زیر گروه‌های آماری tukey post test (۲۴ ساعت)

مواد	N	سطح معنی‌داری=۵٪	
		۱	۲
سیمان پرتلند	۸	۱۲۲/۶۲	
کنترل مثبت	۶	۱۲۴/۴۳	
آمالگام	۳	۱۳۱/۲۱	
Pro Root MTA	۱۲	۱۴۲/۲۲	۱۴۲/۲۲
Root MTA	۸	۱۴۵/۵۸	۱۴۵/۵۸
کنترل منفی	۴		۱۷۴/۶۶
Sig.		۰/۳۱	۰/۰۶

جدول۵- مقایسه میزان بیان فیبرونکتین با تعیین زیر گروههای آماریtukey post test (۴۸ ساعت)

مواد	N	سطح معنی‌داری=۵٪			
		۱	۲	۳	۴
Pro Root MTA	۱۰	۱۲۶/۴۱			
سیمان پرتلند	۸	۱۳۹/۵۱	۱۳۹/۵۱		
آمالگام	۱۰	۱۴۰/۵۲	۱۴۰/۵۲		
Root MTA	۸		۱۵۲/۳۰	۱۵۲/۳۰	
کنترل مثبت	۵			۱۵۶/۶۰	
کنترل منفی	۵				۱۷۵/۹۵
Sig.	۰	۰/۰۹	۰/۱۶	۰/۹۶	۱/۰۰

جدول۶- مقایسه میزان بیان فیبرونکتین با تعیین زیر گروه‌های آماری (یک هفته)

مواد	N	سطح معنی‌داری=۵٪		
		۱	۲	۳
سیمان پرتلند	۷	۱۱۲/۶۳		
Root MTA	۱۱	۱۲۸/۷۰	۱۲۸/۷۰	
Pro Root MTA	۸	۱۳۳/۰۴	۱۳۳/۰۴	
آمالگام	۹		۱۴۲/۷۴	
کنترل مثبت	۹		۱۵۱/۳۵	۱۵۱/۳۵
کنترل منفی	۳			۱۷۶/۶۷
Sig.		۰/۲۶	۰/۱۷	۰/۰۹

- نتایج مربوط به بیان β-TGF:

میزان بیان β-TGF در زمان ۲۴ ساعت در گروه‌های آمالگام، Pro Root MTA و Root MTA بیشتر از بقیه گروه‌ها بود، مشخصاً گروه آمالگام دارای اختلاف معنی‌داری با سایر گروه‌ها بود (p<۰/۰۵). میزان بیان β-TGF در ۴۸ ساعت در گروه Pro Root MTAبیشتر از بقیه گروه‌ها بود (p<۰/۰۵). میزان بیان β-TGF درزمان یک هفته در گروه‌های سیمان پرتلند، کنترل مثبت وPro Root MTA از بقیه گروه‌ها بالاتر بود و بعد از آن به ترتیب Root MTA، آمالگام و کنترل منفی قرار داشتند. گروه کنترل مثبت و سیمان پرتلند به طور معنی‌داری از Pro Root MTA، Root MTA، آمالگام، و کنترل منفی بیشتر بود (p<۰/۰۵). ولی گروه کنترل مثبت با سیمان پرتلند تفاوت آماری معنی‌داری را نشان نداد (p=۰/۹۴).

گروه‌های Root MTA، Pro Root MTA و آمالگام نیز با یکدیگر تفاوت آماری معنی‌داری نداشتند (p=۰/۴۵) (جداول۷-۹).

جدول۷- مقایسه میزان بیان β-TGF با تعیین زیر گروه‌های آماری (۲۴ساعت)

مواد	N	سطح معنی‌داری=۵ ٪	
		۱	۲
آمالگام	۴	۱۶۱/۰۴	
Pro Root MTA	۶	۱۶۶/۶۹	۱۶۶/۶۹
Root MTA	۸	۱۷۰/۷۵	۱۷۰/۷۵
سیمان پرتلند	۸		۱۷۴/۷۲
کنترل منفی	۷		۱۷۵/۴۰
کنترل مثبت	۷		۱۷۷/۸۵
Sig.		۰/۱۲	۰/۰۵

جدول۸- مقایسه میزان بیان β-TGF با تعیین زیر گروه‌های آماری (۴۸ساعت)

مواد	N	سطح معنی‌داری=۵ ٪		
		۱	۲	۳
Pro Root MTA	۹	۱۵۰/۲۸		
کنترل منفی	۶		۱۶۶/۵۱	
سیمان پرتلند	۶		۱۷۰/۱۳	۱۷۰/۱۳
کنترل مثبت	۷		۱۷۱/۳۷	۱۷۱/۳۷
آمالگام	۶			۱۷۳/۰۸
Root MTA	۱۴			۱۷۴/۹۷
Sig.		۱/۰۰	۰/۱۳	۰/۱۳

جدول۹- مقایسه میزان بیان β-TGF با تعیین زیر گروه‌های آماری (یک هفته)

مواد	N	سطح معنی‌داری=۵ ٪			
		۱	۲	۳	۴
سیمان پرتلند	۱۲	۱۰۱/۰۵			
کنترل مثبت	۹	۱۱۰/۱۴			
Pro Root MTA	۱۰		۱۳۷/۸۷	۱۳۷/۸۷	
Root MTA	۸			۱۳۹/۹۶	
آمالگام	۱۲			۱۵۶/۱۶	۱۵۶/۱۶
کنترل منفی	۹				۱۷۷/۴۵
Sig.		۰/۹۴	۰/۰۷	۰/۴۵	۰/۲۸

بحث و نتیجه‌گیری

در این مطالعه، برای مشابه‌سازی بیشتر شرایط مطالعه با شرایط in vivo از سلول‌های HPDLF که به نظر می‌رسد از نظر مورفولوژی و بیان پروتئین‌های مختلف تفاوت‌هایی با دیگر انواع فیبروبلاست‌ها مثل L929 وفیبروبلاست‌های لثه (HGF) دارند استفاده نمودیم (۱۷-۱۹). در بررسی اثرات مواد مختلف بر روی سلول‌های HPDLF عصاره مواد در محیط کشت (DMEM) تهیه شد تا از اثرات مضر مستقیم مواد بر روی سلول‌ها مثل لیز و نکروز سلولی جلوگیری شود (۲۰).

گروه کنترل مثبت بروز کلاژن، TGF-β و فیبرونکتین را به عنوان متغیرهای مطالعه در مدت زمان ۲۴ ساعت، ۴۸ ساعت و یک هفته در حالت طبیعی در سلول‌های HPDLF نشان داد. در بررسی فلوسیتومتری توسط Kuru و همکاران برروی خواص فیبروبلاست‌های لثه و پریودونتال لیگامنت، بیان فیبرونکتین و کلاژن نوع I در حالت طبیعی در این سلول‌ها نشان داده شد (۲۱).

گروه کنترل منفی نیز برای نشان دادن اختصاصی بودن روش مطالعه استفاده می‌شود. در این گروه هرگونه رنگ‌آمیزی نشان دهنده رنگ گرفتن غیر اختصاصی پروتئین‌های دیگر توسط آنتی بادی ثانویه می‌باشد (چون آنتی بادی اولیه وجود ندارد). در مطالعه حاضر با آنالیز واریانس یک طرفه و Tukey post test بیان کلاژن نوع I پس از یک هفته در گروه سیمان پرتلند بالاتر از گروه کنترل مثبت، Root MTA، آمالگام و کنترل بود که البته گروه سیمان پرتلند با MTA تفاوت آماری معنی‌داری نداشت. با توجه به خصوصیات بسیار مشابه فیزیکی و شیمیایی سیمان پرتلند و Pro Root MTA تشابه اثر عصاره این دو ماده بر روی سلول‌های HPDLF دور از ذهن نمی‌باشد.

در تحقیق مشابهی، Nakayama و همکاران رفتار سلول‌های شبه استئوبلاست را از جهت مورفولوژی و بیان کلاژن نوع I و mRNA پروتئین‌های وابسته استخوانی در مجاورت Pro Root MTA بررسی نمودند. کلسیم آزاد شده از Pro Root MTA هیدراته شده پس از سه روز ۱۳۰ppm در سالین بود. فعالیت آلکالین فسفاتاز در مجاورت MTA مشابه گروه کنترل بود. پرولیفراسیون سلولی و بیان mRNA کلاژن نوع I به صورت معنی‌داری پایین تر بود در حالیکه بیان mRNA استئوپونتین پس از ۳ روز به صورت معنی‌داری بالاتر از گروه کنترل بود. در این بررسی MTA بدون مهار رشد سلولی، تمایز سلول‌های شبه استئوبلاست را مهار نمود (۲۲).

در مقایسه با مطالعه ما که میزان بیان کلاژن نوع I در گروه Pro Root MTA و سیمان پرتلند بالاتر از گروه کنترل مثبت بود، به این نتیجه می‌رسیم که این اختلاف می‌تواند در نتیجه شرایط آزمایش و نوع سلول‌های استفاده شده باشد. بیان کلاژن در سیتوپلاسم نواحی اطراف هسته دیده شد وبیان فیبرونکتین و TGF-β در سیتوپلاسم به صورت منتشر بود. نکته جالب توجه در این بررسی میزان بیان بیشتر کلاژن و فیبرونکتین در مدت زمان یک هفته در گروه سیمان پرتلند نسبت به گروه کنترل مثبت می‌باشد که نشانگر وضعیتی است که در آن محیط اطراف سلول‌ها و مواد مورد آزمایش نه تنها سمی و مضر نبودند بلکه شرایط مطلوبی پدید آوردند که سلول‌ها به رشد و تکثیر خود ادامه دادند و میزان بیان مواد مورد نظر بیشتر از حالت طبیعی (کنترل مثبت) گردید.

TGF-β یکی از سایتوکین‌های مهم و کلیدی بدن می‌باشد که در اعمال مختلفی مثل امبریوژنز، التهاب، تنظیم پاسخ ایمنی و بهبود زخم دخیل می‌باشد. TGF-β توسط سلول‌های مختلف مثل پلاکت‌ها، سلول‌های التهابی نظیر ماکروفاژها و لنفوسیت‌ها، فیبروبلاست‌ها، کندروسیت‌ها و استئوبلاست‌ها بیان می‌گردد. این سایتوکین می‌تواند بیان کلاژن نوع I، فیبرونکتین و استئونکتین و همچنین بیان ماتریکس استخوانی را تحریک کند و سنتز متالوپروتئینازهای بافتی را کاهش دهد (۲۳). در مطالعه حاضر میزان بیان TGF-β بین گروه‌های مواد و کنترل مثبت و منفی در ۲۴ ساعت تفاوت آماری معنی‌داری نداشت و چون گروه کنترل منفی، فاقد هرگونه رنگ‌آمیزی اختصاصی بود، نتایج نشان‌دهنده آن است که در بقیه گروه‌ها نیز بیان TGF-β وجود نداشته است یا حداقل در سطح معنی‌داری نبوده است. در زمان ۴۸ ساعت بیان TGF-β در گروه Pro Root MTA به صورت معنی‌داری بالاتر از بقیه گروه‌ها بود.

بعد از یک هفته میزان بیان TGF-β در گروه‌های مختلف (به جز گروه آمالگام) به صورت معنی‌داری بیشتر از گروه کنترل منفی بود. همچنین میزان بیان TGF-β در گروه سیمان پرتلند به شکل معنی‌داری از Pro Root MTA، Root MTA و آمالگام بیشتر بود. با توجه به اینکه میزان بیان کلاژن و فیبرونکتین در گروه سیمان پرتلند

(پس از یک هفته) بیشتر از بقیه گروه‌ها بود می‌توان نتیجه گرفت که یکی از دلایل بیان بیشتر به علت بیان بیشتر β-TGF در این گروه باشد که تولید و سنتز ماتریکس خارج سلولی را تحریک می‌کند. با توجه به اینکه منبع اصلی β-TGF سلول‌های التهابی و استخوانی است، وجود میزان کم β-TGF در کشت‌های HPDLF دور از انتظار نمی‌باشد.

در سال ۲۰۰۲، Abdullah وهمکاران واکنش پذیرش نسجی دو نوع سیمان پرتلند (تقویت شده و معمولی) را توسط مشاهده سیتومورفولوژی سلول‌های استئوسارکوم (Saos–2) در مجاورت مواد مورد آزمایش، بررسی کردند. همچنین اثر این مواد در بروز نشانه‌های ریمادلینگ استخوانی بررسی شد. پس از تماس مستقیم گلاس آینومر، MTA و سیمان پرتلند (عادی و تقویت شده) بر روی سلول‌ها پس از ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، مورفولوژی سلول توسط میکروسکوپ الکترونی اسکن‌کننده (SEM) مشاهده و بررسی شد. در بررسی SEM سلول‌های مجاور MTA و دو نوع سیمان پرتلند همگی سالم و چسبیده به سطح بودند ولی سلول‌های مجاور گلاس آینومر گرد و غیرزنده بودند. در اندازه‌گیری سیتوکین‌های آزاد شده توسط سلول ها، سطح β IL1, IL_6, IL_{18}, OC در سیمان پرتلند معمولی و MTA در هیچ مورد اختلاف معنی‌داری نداشتند (۲۴). با توجه به بررسی‌های به عمل آمده می‌توان نتیجه گرفت که Root MTA و سیمان پرتلند از نظر اثر برروی سلول‌های HPDLF قابل مقایسه باPro Root MTA بوده و همچنین در بسیاری شرایط برتر از آمالگام می‌باشند، لذا می‌توان سیمان پرتلند و MTA ایرانی را به عنوان جایگزین‌های ارزانتر برایMTA خارجی مورد بررسی قرار داد. در این زمینه البته مطالعات in vivo بیشتری لازم است و برای کاربری کلینیکی تأیید FDA و سایر مراکز ذی‌صلاح ضروری می‌باشد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی مصوب دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران به شماره قرارداد ۱۱۰۹۸/ ۱۳۲ مورخ ۸۴/۱۲/۱۸ می‌باشد. همچنین از پرسنل آزمایشگاه کشت سلولی دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تهران قدردانی می‌گردد.

منابع:

۱۲– پریرخ، مسعود (استاد راهنما)؛ قاسم زاده، علی. مقایسه ریز نشت رنگ در Pro root MTA , Root MTA و آمالگام در پر کردگی حفرات رتروگرید. شماره ۴۲۸، دندانپزشکی، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی کرمان. ۸۱ – ۱۳۸۰.

1- Cohen S, Burns RC.Pathways of the Pulp, 8th ed. London: Mosby 2002.

2- Torabinejad M, Watson TF, Pitt Ford TR.Sealing ability of a mineral trioxide aggregate when used as a root end filling material. J Endod. 1993 Dec;19(12):591-5.

3- Torabinejad M, Hong CU, Pitt Ford TR, Kettering JD. Cytotoxicity of four root end filling materials. J Endod. 1995 Oct;21(10):489-92.

4- Torabinejad M, Hong CU, Pitt Ford TR, Kettering JD. Histologic assessment of mineral trioxide aggregate as a root-end filling in monkeys. J Endod. 1995 Oct;21(10):489-92.

5- Torabinejad M, Pitt Ford TR. Root end filling materials: a review. Endod Dent Traumatol. 1996 Aug;12(4):161-78.

6- Torabinejad M, Rastegar AF, Kettering JD, Pitt Ford TR. Bacterial leakage of mineral trioxide aggregate as a root-end filling material. J Endod. 1995 Mar;21(3):109-12.

7- Torabinejad M, Chivian N. Clinical applications of mineral trioxide aggregate. J Endod. 1999 Mar;25(3):197-205.

8- Schwartz RS, Mauger M, Clement DJ, Walker WA 3rd. Mineral trioxide aggregate: a new material for endodontics. J Am Dent Assoc. 1999 Jul;130(7):967-75.

9- Torabinejad M, Hong CU, McDonald F, Pitt Ford TR. Physical and chemical properties of a new root-end filling material. J Endod. 1995 Jul;21(7):349-53

۱۰– وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی کشور، واحد تولید مواد، سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران (۱۳۷۹/۱۰/۱۰) (مرکز آذربایجان شرقی).

۱۱– لطفی، مهرداد (استاد راهنما)؛فیاض پور، بهزاد. مقایسه ریز نشت چهار ماده پر کننده انتهای ریشه. پایان نامه شماره ۵۹۱ رشته دندانپزشکی. دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز. ۸۱ – ۱۳۸۰.

13- Razmi H,Zarrabian M ,Sharifian MR, Sharifi D,Sasani F, Ramezankhani N .A histological evaluation on tissue reaction to three implanted materials (MTA,Root MTA, and Portland cement type I) in the mandible of cats. J dent 2004;3(1) : 62-69.

14- Estrela C, Bammann LL, Estrela CRA, Silva RS,Jesus JD. Antimicrobial and chemical study of MTA, Portland cement, calcium hydroxide paste, Sealapex and Dycal. Braz Dent J 2000 11(1): 3 – 9.

15- Hernandez EP, Botero TM, Mantellini MG, McDonald NJ, Nör JE. Effect of ProRoot MTA mixed with chlorhexidine on apoptosis and cell cycle of fibroblasts and macrophages in vitro. Int Endod J. 2005 Feb;38(2):137-43.

16- Lin CP, Chen YJ, Lee YL, Wang JS, Chang MC, Lan WH, Chang HH, Chao WM, Tai TF, Lee MY, Lin BR, Jeng JH. Effects of root-end filling materials and eugenol on mitochondrial dehydrogenase activity and cytotoxicity to human periodontal ligament fibroblasts . J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2004 Nov 15;71(2):429-40.

17- Somerman MJ, Archer SY, Imm GR, Foster RA. A comparative study of human periodontal ligament cells and gingival fibroblasts in vitro. J Dent Res. 1988 Jan;67(1):66-70.

18- Mariotti A, Cochran DL. Characterization of fibroblasts derived from human periodontal ligament and gingiva. J Periodontol. 1990 Feb; 61(2): 103-11.

19- Palaiologou AA, Yukna RA, Moses R, Lallier TE.Gingival,

dermal, and periodontal ligament fibroblasts express different extracellular matrix receptors. J Periodontol. 2001 Jun;72(6):798-807.

20- Saidon J, He J, Zhu Q, Safavi K, Spångberg LS. Cell and tissue reactions to mineral trioxide aggregate and Portland cement. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2003 Apr;95(4):483-9.

21- Kuru L, Parkar MH, Griffiths GS, Newman HN, Olsen I.Flow cytometry analysis of gingival and periodontal ligament cells. J Dent Res. 1998 Apr;77(4):555-64.

22- Nakayama A, Ogiso B, Tanabe N, Takeichi O, Matsuzaka K, Inoue T.Behaviour of bone marrow osteoblast-like cells on mineral trioxide aggregate: morphology and expression of type I collagen and bone-related protein mRNAs. Int Endod J. 2005 Apr;38(4):203-10.

23- Ignotz RA, Endo T, Massagué J. Regulation of fibronectin and type I collagen mRNA levels by transforming growth factor-beta. J Biol Chem. 1987 May 15;262(14):6443-6.

24- Abdullah D, Pitt Ford TR, Papaioannou S, Nicholson J, McDonald F. An evaluation of accelerated Portland cement as a restorative material. Biomaterials. 2002 Oct;23(19):4001-10.