● مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی کرمان، دورهٔ بیست‌ودوم، شمارهٔ ۳، ص ۲۸۷-۲۸۰، ۱۳۹۴

مقالهٔ پژوهشی

# بررسی سمیت سلولی دو ماده پر کننده کانال ریشه استفاده شده در دندان‌پزشکی بر روی سلول‌های فیبروبلاست L929 به روش MTT (Methylthiazol tetrazolium): پودر کلسیم هیدروکسید تقویت شده با کلرهگزیدین در مقایسه با پودر کلسیم هیدروکسید

سحر یغمایی[1]، یزدان شنتیایی[2*]، مجید کاظم[2]، شکوفه نوری[3]، کاوه یغمایی[4]، صادق رستمی‌نسب[5]، گلبرگ کلاهی اهری[6]

**خلاصه**

**مقدمه:** موضوع اصلی در درمان ریشه، میکروب‌زدایی کانال ریشه می‌باشد که نیازمند خارج نمودن تمامی محتویات موجود در کانال به عنوان منبع تجمع میکروب‌ها است. این هدف از طریق ابزارهای مکانیکی، مواد شستشو دهنده و داروهای پر کننده بین جلسات درمان محقق می‌گردد. برای کاهش یا حذف باکتری‌ها از کانال ریشه مواد مختلفی در طول درمان استفاده می‌شود. هدف پژوهش حاضر، بررسی سمیت سلولی پودر کلسیم هیدروکسید تقویت شده با کلرهگزیدین در مقایسه با پودر کلسیم هیدروکسید بود.

**روش:** این مطالعه به روش تجربی- آزمایشگاهی بر روی سلول‌های فیبروبلاست L929 بر اساس کشت سلولی و تأثیر مستقیم مواد بر رده سلولی تحت کشت و مشاهده نتایج انجام شد. ماده مورد آزمایش در بازه زمانی ۱، ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت توسط آزمون MTT (Methylthiazol tetrazolium) مورد ارزیابی قرار گرفت. در این مطالعه از سلول‌های L929 (که هیچ ماده‌ای دریافت نکردند) به عنوان شاهد منفی استفاده شد. داده‌های مربوط به ماده موردنظر توسط دستگاه ELISA Reader خوانده شد و سپس به کمک نرم‌افزار SPSS تجزیه و تحلیل گردید. آزمون ANOVA یک طرفه جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها استفاده شد.

**یافته‌ها:** هر دو ماده در غلظت‌های ۰/۰۱۶-۰/۰۰۰۲۵ درصد موجب سرکوب تکثیر شدند. سمیت سلولی مواد مورد آزمایش در رقت‌های گوناگون و زمان‌های مختلف (۱، ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت) تفاوت معنی‌داری داشت ($P < ۰/۰۵$). پودر کلسیم هیدروکسید تقویت شده با کلرهگزیدین و پودر کلسیم هیدروکسید ۰/۰۱۶ درصد در بازه زمانی ۷۲ ساعت به ترتیب سمیت سلولی ۷۵ و ۴۵ درصد را از خود نشان داد.

**نتیجه‌گیری:** سمیت سلولی کلسیم هیدروکسید تقویت شده با کلرهگزیدین در مقایسه با پودر کلسیم هیدروکسید بیشتر است. بدین ترتیب می‌توان از کلسیم هیدروکسید تقویت شده با کلرهگزیدین که دارای اثرات ضد میکروبی قوی‌تری از کلسیم هیدروکسید خالص می‌باشد، به عنوان پانسمان بین جلسات درمان ریشه با احتیاط بیشتری (به طوری که کمتر به ناحیه پری‌اپیکال نفوذ کند) استفاده کرد.

**واژه‌های کلیدی:** سمیت سلولی، کلسیم هیدروکسید تقویت شده با کلرهگزیدین، پودر کلسیم هیدروکسید، آزمون MTT، مواد ضد میکروبی کانال ریشه

۱- دستیار، بیماری‌های دهان، فک و صورت، دانشکده دندان‌پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران ۲- دانشیار، گروه اندودنتیکس، دانشکده دندان‌پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران ۳- استادیار، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران ۴- استادیار، گروه پروتزهای دندانی، دانشکده دندان‌پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران ۵- کارشناس ارشد، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران ۶- کارشناس ارشد، گروه بیوشیمی، دانشگاه پیام نور، واحد مرکز، تهران، ایران

* نویسنده مسؤول، آدرس پست الکترونیک: y.shantiaee@gmail.com

دریافت مقاله: ۱۳۹۲/۸/۳۰ دریافت مقاله اصلاح شده: ۱۳۹۳/۵/۲۲ پذیرش مقاله: ۱۳۹۳/۵/۲۴

**مقدمه**

اهمیت نقش میکروارگانیسم‌ها در گسترش بیماری‌های پالپ و بافت اطراف دندان بر روی حیوانات و انسان‌ها ثابت شده است (۳-۱). عدم توانایی در پاکسازی کامل کانال و باقی ماندن پالپ و مواد عفونی در کانال ریشه، ماده مغذی مناسبی برای رشد باکتری‌های باقی مانده در کانال می‌باشد. بنابراین به یک ماده شیمیایی جهت حذف بافت از کانال ریشه و کشتن باکتری‌ها نیاز است. مطالعات نشان داده‌اند که مواد پر کننده بین جلسات باید دارای چهار خصوصیت «فعالیت ضد میکروبی، سمی نبودن برای بافت اطراف، حلال بودن در آب و توانایی حل کردن مواد آلی» باشد. کلرهگزیدین و هیدروکسید کلسیم به طور گسترده‌ای در عفونت‌زدایی کانال‌ها استفاده می‌شود (۴).

Delany و همکاران اثرات ضد باکتریایی مایع کلرهگزیدین را در کانال ریشه آلوده بررسی کردند و کاهش رشد قابل توجه در میکروارگانیسم‌ها را مشاهده نمودند (۵). مطالعه Grossman و Meiman اهمیت تجزیه کنندگی مواد پر کننده بین جلسات و حذف بافت پالپ را نشان داد (۶). Okino و همکاران گزارش کردند که مایع کلرهگزیدین توانایی حل کردن بافت پالپ را ندارد (۷). White و همکاران مدت زمان لازم برای حداکثر فعالیت ضد میکروبی کلرهگزیدین را ۷۲ ساعت بیان کردند (۸). مکانیزم سمیت کلرهگزیدین هنوز به طور کامل مشخص نیست (۱۱-۹). این ماده در عملکرد میتوکندری دخالت کرده، سبب مرگ سلول می‌گردد (۱۳، ۱۲). به تازگی مایع کلرهگزیدین در غلظت‌های مختلف به عنوان شستشو دهنده داخل کانال استفاده می‌شود (۱۶-۱۴).

پودر کلسیم هیدروکسید به عنوان داروی داخل کانال بین جلسات دارای خواص مطلوبی مانند حلالیت بافت نکروز، PH بالا (که جلوی پیشرفت تحلیل را می‌گیرد) و خواص ضد میکروارگانیسمی می‌باشد، اما این ماده روی گونه‌های انتروکوک فکالیس، کاندیدا آلبیکنس (در موارد شکست درمان ریشه مشاهده می‌شود) و کلبسیلا پنومونیه تأثیر مطلوبی ندارد. از طرف دیگر، مایع کلرهگزیدین خواص مطلوبی همچون وسیع‌الطیف بودن آثار ضد میکروارگانیسمی و دوام اثر دارد و روی گونه‌های ذکر شده نیز مؤثر است و حلالیت بافتی ندارد، اما سمیت سلولی در آن مشاهده شده است (۱۹-۱۷).

در تحقیقات مختلف از مخلوط کلسیم هیدروکسید با کلرهگزیدین برای افزایش خواص ضد میکروبی کلسیم هیدروکسید استفاده شده است (۲۲-۲۰). با این ایده، کاظم در شرایط ویژه آزمایشگاه از ترکیب پودر کلسیم هیدروکسید و کلرهگزیدین ۲ درصد پودری ساخت که در سازمان ثبت اختراعات و اکتشافات ایران با شماره ۶۵۵۷۵ به ثبت رسیده است. برای استفاده از این پودر کافی است آن را با آب مقطر یا نرمال سالین مخلوط کرد. در این صورت ماده حاصل شده اثر قوی‌تری نسبت به هیدروکسید کلسیم علیه انتروکوک فکالیس و کاندیدا آلبیکنس خالص دارد (۲۵-۲۳).

در تحقیق حاضر تصمیم گرفته شد که با اضافه کردن کلرهگزیدین به کلسیم هیدروکسید ضمن استفاده از خواص مطلوب کلسیم هیدروکسید، آثار ضد میکروارگانیسمی آن تقویت گردد. این فرمولاسیون در تحقیقات آزمایشگاهی اولیه موفق بوده است، اما سمیت سلولی خاصیت مهمی برای بافت زنده می‌باشد که در این تحقیق مورد بررسی قرار گرفت.

**روش بررسی**

کشت سلول‌ها: سلول‌های فیبروبلاست رده سلولی L۹۲۹ موش از انستیتو پاستور ایران خریداری و در محیط RPMI (Roswell Park Memorial Institute) با ۱۰ درصد FBS (Fetal bovine serum)، پنی‌سیلین غنی شده و آنتی‌بیوتیک

استرپتومایسین مخلوط شد. حیات سلولی توسط رنگ تریپان آبی (Trypan blue) ۱ درصد (ساخت Merck, Germany) بررسی و حیات سلولی بالای ۹۵ درصد به عنوان زنده (Vital) محسوب گردید. ۱۰۰۰۰ سلول به صورت یک لایه (Monolayer) درون هر چاهک از پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای قرار داده شد و پلیت‌های کشت داده شده در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۹۸ درصد و دی‌اکسید کربن ۵ درصد انکوبه شد.

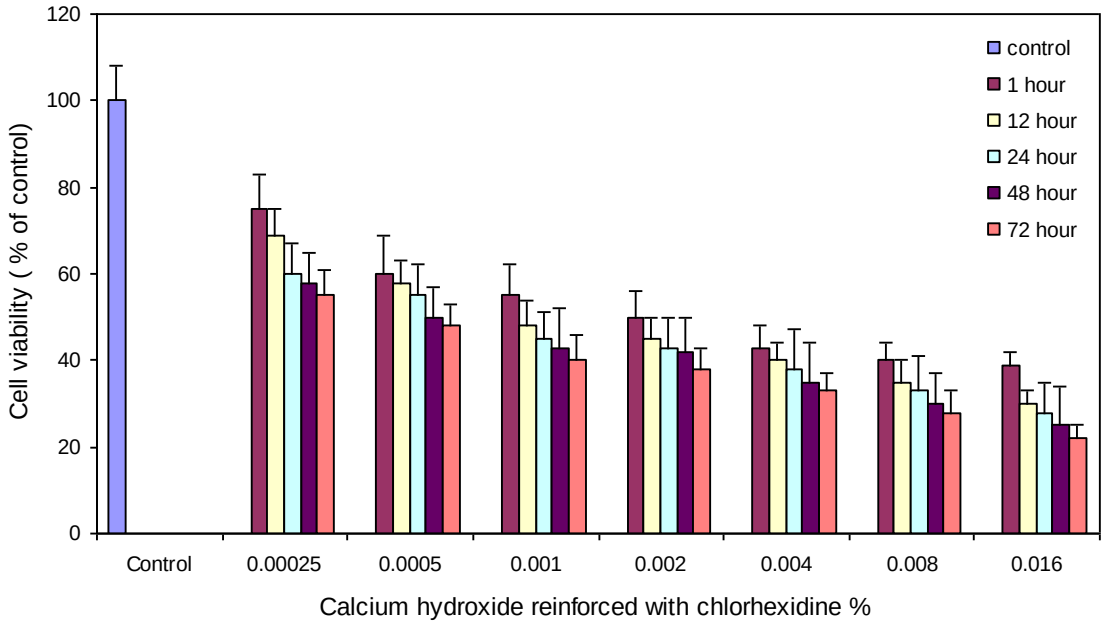
آماده‌سازی مواد: کلسیم هیدروکسید تقویت شده با کلرهگزیدین (پودر کلسیم هیدروکسید تحت شرایط خاص دما، رطوبت و نور با کلرهگزیدین ۲ درصد ترکیب شده بود) در کف پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای ریخته شد. محیط کشت RPMI complete به گروه شاهد منفی اضافه و پلیت‌ها به مدت ۱، ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۹۸ درصد و دی‌اکسید کربن ۵ درصد انکوبه شد.

آزمون سمیت:MTT نمک زرد رنگ تترازولیوم محلول در آب است که توسط آنزیم سوکسینات دهیدروژناز موجود در میتوکندری‌های سلول‌های زنده و فعال، احیاء شده و به فورمازان نامحلول (آبی رنگ) تبدیل می‌شود. این ترکیب با حلال آلی حل می‌شود که شدت رنگ آن در ۵۷۰ نانومتر متناسب با میزان سلول‌های زنده است. ابتدا سلول های موجود در فلاسک شمارشده، سلول ها با دانسیته مشخص (۵۰۰۰ سلول به هر چاهک) به پلیت ۹۶ تایی منتقل می‌شود. به هر چاهک پلیت ۹۶ تایی ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت کامل همراه با سلول افزوده می‌شود. سپس سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت در این شرایط انکوبه می‌شود تا سلول‌ها کاملا به کف ظرف چسبیده و در فاز رشد لگاریتمی قرار گیرند. سپس چاهک‌های کنترل و آزمایش را انتخاب کرده و دوز های مختلفی از کلسیم هیدروکسید تقویت شده با کلرهگزیدین و کلسیم هیدروکسید به چاهک‌های تست اضافه می‌کنیم و پلیت را تا زمان مورد نیاز جهت تأثیر غلظت‌های مختلف کلسیم هیدروکسید تقویت شده با کلرهگزیدین و کلسیم هیدروکسید انکوبه می‌کنیم. پس از زمان مورد نظر (۱،۱۲،۲۴،۴۸،۷۲ساعت)، محیط با سرنگ و سوزن به دقت خارج کرده به هر چاهک ۲۰ میکرو لیتر محلول MTT اضافه و به مدت ۴ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه و میزان دی‌اکسیدکربن ۵ درصد انکوبه می‌شود. بعد از این زمان به هر چاهک ۲۰۰ میکرولیتر DMSO افزوده شده و سپس میزان جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه میکروپلیت ریدر خوانده می‌شود. میزان جذب به‌طور مستقیم با تعداد سلول‌های زنده متناسب است.

## نتایج

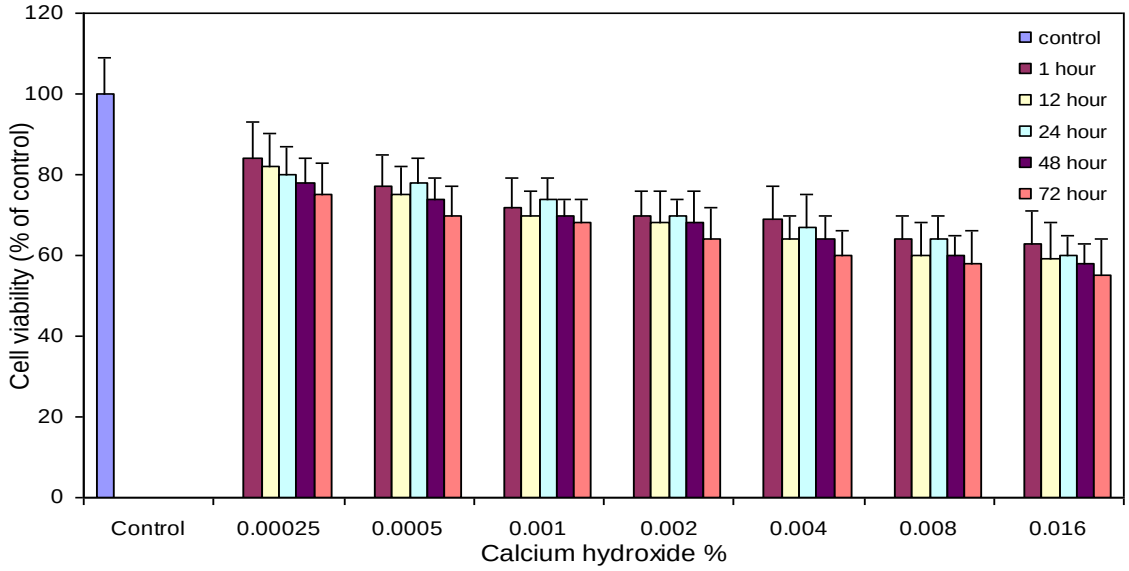
خاصیت سمیت سلولی ماده کلسیم هیدروکسید تقویت شده با کلرهگزیدین در غلظت‌های مختلف و در بازه زمانی متفاوت مورد آزمایش قرار گرفت و نتایج زیر به دست آمد.

۱- سمیت سلولی پودر کلسیم هیدروکسید تقویت شده با کلرهگزیدین: میانگین حیات سلولی پودر کلسیم هیدروکسید تقویت شده با کلرهگزیدین در غلظت‌های ۰/۰۱۶، ۰/۰۰۸، ۰/۰۰۴، ۰/۰۰۲، ۰/۰۰۱، ۰/۰۰۰۵ و ۰/۰۰۰۲۵ درصد و زمان‌های ۱، ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت توسط آزمون MTT به دست آمد. گروه‌های آزمون نیز بر اساس آزمون آماری ANOVA یک طرفه با گروه شاهد مورد مقایسه قرار گرفت (شکل ۱). بر این اساس، بین سمیت سلولی در گروه‌های آزمون و گروه شاهد از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری وجود داشت ($P < ۰/۰۵$).




**شکل ۱.** *اثرات سمیت سلولی پودر کلسیم هیدروکسید تقویت شده با کلرهگزیدین بر سلول‌های فیبروبلاست L۹۲۹ در مدت زمان ۱، ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت*

۲- سمیت سلولی پودر کلسیم هیدروکسید: میانگین حیات سلولی پودر کلسیم هیدروکسید در غلظت‌های ۰/۰۱۶، ۰/۰۰۸، ۰/۰۰۴، ۰/۰۰۲، ۰/۰۰۱، ۰/۰۰۰۵ و ۰/۰۰۰۲۵ درصد و زمان‌های ۱، ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت توسط آزمون MTT محاسبه شد. گروه‌های آزمون نیز بر اساس آزمون آماری ANOVA یک طرفه با گروه شاهد مورد مقایسه قرار گرفت (شکل ۲). بر این اساس، میزان تفاوت سمیت سلولی بین گروه‌های آزمون و گروه شاهد از لحاظ آماری معنی‌دار بود ($P < ۰/۰۵$).




**شکل ۲.** *اثرات سمیت سلولی پودر کلسیم هیدروکسید بر سلول‌های فیبروبلاست L۹۲۹ در مدت زمان ۱، ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت*

**بحث**

عوامل زنده و غیر زنده علت اصلی بیماری‌های پالپ و پری‌آپیکال هستند. عوامل زنده شامل میکروارگانیسم‌های مختلفی از جمله باکتری‌ها، مخمرها و ویروس‌ها می‌باشند. وقتی یک تغییر پاتولوژیک در بافت دندان رخ می‌دهد، فضای کانال ریشه مکان مناسبی برای تجمع عوامل مختلف از جمله انواع گونه‌های باکتریایی، مواد سمی و محصولات فرعی آن‌ها به شمار می‌رود. در بررسی‌های انجام شده بر روی حیوانات و انسان‌ها نشان داده شده است که بیماری‌های مربوط به بافت دندان در عدم حضور باکتری‌ها پیشرفت نمی‌کند (۳-۱).

ماده شیمیایی مورد استفاده برای پاکسازی مؤثر کانال ریشه باید بتواند علاوه بر نابود کردن باکتری‌ها، سمیت کمی داشته باشد. پودر کلسیم هیدروکسید در بیشتر موارد در درمان کانال ریشه استفاده می‌شود (۲۶). دلایل اصلی استفاده از این ماده، توانایی تجزیه بافت نکروزی (مرده) و خاصیت ضد میکروبی آن می‌باشد. کلرهگزیدین نیز به عنوان ماده ضد میکروبی شناخته شده است. مطالعات میکروبیولوژی نشان می‌دهد که تعدادی از میکروارگانیسم‌ها به طور قابل توجهی توسط پودر کلسیم هیدروکسید کاهش می‌یابند؛ در حالی که بعضی از آن‌ها به کلرهگزیدین حساس هستند (۲۷).

نتایج برخی مطالعات، اثرات سمی کلرهگزیدین را بر روی سلول‌های فیبروبلاست و استافیلوکوکوس نشان داده است. غلظت باکتری کشی کلرهگزیدین برای سلول‌های فیبروبلاست سمی است و در غلظت غیر سمی آن، باکتری‌ها زنده باقی می‌مانند (۳۰-۲۸). Boyce و همکاران نشان دادند که کلرهگزیدین برای سلول‌های انسانی و باکتری‌ها سمی است (۲۸). بر اساس مطالعه Agarwal و همکاران، کلرهگزیدین سبب تخریب غشای سلول‌های نوتروفیل خون محیطی در مدت ۵ دقیقه (۰/۰۰۰۵ درصد) می‌شود (۲۹). Giannelli و همکاران سمیت کلرهگزیدین را در سلول‌های اندوتلیال و فیبروبلاست مورد بررسی قرار دادند و گزارش کردند که کلرهگزیدین در یک دوز و زمان معین بر حیات سلول‌ها تأثیر می‌گذارد و اثر سمی آن سبب القای آپوپتوز و نکروز سلول می‌شود (۳۰).

Soares و همکاران آسیب‌های مزمن پری‌اپیکال در ۲۶ ریشه پری‌مولار را در دو سگ، القا و داخل کانال را با خمیر کلسیم هیدروکسید و کلرهگزیدین ۲ درصد پانسمان کردند. بعد از ۲۱ روز پانسمان را از کانال خارج کرده، نتیجه گرفتند که افزودن کلرهگزیدین ۲ درصد به کلسیم هیدروکسید به عنوان یک پانسمان درون کانالی، ترمیم بافت‌های پری‌اپیکال را در سگ‌ها به تأخیر می‌اندازد (۳۱).

در این تحقیق از غلظت‌های گوناگون مواد در زمان‌های مختلف استفاده و تفاوت قابل ملاحظه‌ای در مرگ سلول‌ها در زمان‌های مختلف مشاهده شد. اطلاعات در دسترس نشان می‌دهد که پودر کلسیم هیدروکسید کمترین خطر سمیت را برای سلول‌ها داشته است ($P < ۰/۰۵$) (شکل ۲). سمیت سلولی در غلظت ۰/۰۱۶ درصد و در بازه زمانی ۷۲ ساعت برای کلسیم هیدروکسید و کلسیم هیدروکسید تقویت شده با کلرهگزیدین به ترتیب ۴۵ و ۷۵ درصد گزارش شد که تفاوت زیادی با هم دارند (شکل‌های ۱ و ۲). به نظر می‌رسد سمیت سلولی کلسیم هیدروکسید به مراتب پایین‌تر از ترکیب آن با کلرهگزیدین باشد.

بنابراین می‌توان از کلسیم هیدروکسید تقویت شده با کلرهگزیدین (که اثرات ضد میکروبی قوی‌تری از کلسیم هیدروکسید خالص دارد)، در درمان کانال ریشه با احتیاط بیشتری (به طوری که کمتر به ناحیه پری‌اپیکال نفوذ کند) استفاده کرد.

## References


1. Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1965; 20: 340-9.
2. Moller AJ, Fabricius L, Dahlen G, Ohman AE, Heyden G. Influence on periapical tissues of indigenous oral bacteria and necrotic pulp tissue in monkeys. *Scand J Dent Res* 1981; 89(6): 475-84.
3. Sundqvist G. Ecology of the root canal flora. *J Endod* 1992; 18(9): 427-30.
4. Mohammadi Z, Abbott PV. The properties and applications of chlorhexidine in endodontics. *Int Endod J* 2009; 42(4): 288-302.
5. Delany GM, Patterson SS, Miller CH, Newton CW. The effect of chlorhexidine gluconate irrigation on the root canal flora of freshly extracted necrotic teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1982; 53(5): 518-23.
6. Grossman LI, Meiman BW. Solution of pulp tissue by chemical agents. *Journal of Endodontics* 1982; 8(Suppl): S10-S12.
7. Okino LA, Siqueira EL, Santos M, Bombana AC, Figueiredo JA. Dissolution of pulp tissue by aqueous solution of chlorhexidine digluconate and chlorhexidine digluconate gel. *Int Endod J* 2004; 37(1): 38-41.
8. White RR, Hays GL, Janer LR. Residual antimicrobial activity after canal irrigation with chlorhexidine. *J Endod* 1997; 23(4): 229-31.
9. Oncag O, Hosgor M, Hilmioglu S, Zekioglu O, Eronat C, Burhanoglu D. Comparison of antibacterial and toxic effects of various root canal irrigants. *Int Endod J* 2003; 36(6): 423-32.
10. Faria G, Celes MR, De RA, Silva LA, Silva JS, Rossi MA. Evaluation of chlorhexidine toxicity injected in the paw of mice and added to cultured l929 fibroblasts. *J Endod* 2007; 33(6): 715-22.
11. Paunio KU, Knuttila M, Mielitynen H. The effect of chlorhexidine gluconate on the formation of experimental granulation tissue. *J Periodontol* 1978; 49(2): 92-5.
12. Hidalgo E, Dominguez C. Mechanisms underlying chlorhexidine-induced cytotoxicity. *Toxicol In Vitro* 2001; 15(4-5): 271-6.
13. Chang YC, Huang FM, Tai KW, Chou MY. The effect of sodium hypochlorite and chlorhexidine on cultured human periodontal ligament cells. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2001; 92(4): 446-50.
14. Leonardo MR, Tanomaru FM, Silva LA, Nelson FP, Bonifacio KC, Ito IY. In vivo antimicrobial activity of 2% chlorhexidine used as a root canal irrigating solution. *J Endod* 1999; 25(3): 167-71.
15. Dunavant TR, Regan JD, Glickman GN, Solomon ES, Honeyman AL. Comparative evaluation of endodontic irrigants against Enterococcus faecalis biofilms. *J Endod* 2006; 32(6): 527-31.
16. Heling I, Steinberg D, Kenig S, Gavrilovich I, Sela MN, Friedman M. Efficacy of a sustained-release device containing chlorhexidine and Ca(OH)2 in preventing secondary infection of dentinal tubules. *Int Endod J* 1992; 25(1): 20-4.
17. Fava LR, Saunders WP. Calcium hydroxide pastes: classification and clinical indications. *Int Endod J* 1999; 32(4): 257-82.
18. Verma S, Goel M, Bala S, Singh M. Issues Of Biocompatibility Associated

With Commonly Used Endodontic Irrigants: A Review. *Indian Journal of Dental Sciences* 2012; 4(4): 109-13.
19. Hamed SJ, AL-Yasiri IK, Ali NT, Al-Feron MA. Antibacterial Activity of Calcium Hydroxide Combined with Chlrohexidine or Sodium Hypochlorite against Gram Positive and Gram Negative Bacteria. *Journal of Natural Sciences Research* 2014; 4(12): 55-62.
20. Siren EK, Haapasalo MP, Waltimo TM, Orstavik D. In vitro antibacterial effect of calcium hydroxide combined with chlorhexidine or iodine potassium iodide on Enterococcus faecalis. *Eur J Oral Sci* 2004; 112(4): 326-31.
21. Delgado RJ, Gasparoto TH, Sipert CR, Pinheiro CR, Moraes IG, Garcia RB, et al. Antimicrobial effects of calcium hydroxide and chlorhexidine on Enterococcus faecalis. *J Endod* 2010; 36(8): 1389-93.
22. Gondim JO, Moreira Neto JJ, Silva Gomes DA, Azevedo ER, Jeremias F, Aparecida Giro EM. In Vivo study of an intracanal dressing of calcium hydroxide/chlorhexidine in necrotic primary teeth. *Braz J Oral Sci* 2014; 13(1): 70-5.
23. Torabinejad M, Handysides R, Khademi AA, Bakland LK. Clinical implications of the smear layer in endodontics: a review. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2002; 94(6): 658-66.
24. Bystrom A, Sundqvist G. Bacteriologic evaluation of the efficacy of mechanical root canal instrumentation in endodontic therapy. *Scand J Dent Res* 1981; 89(4): 321-8.
25. Al-Sabawi NA. Physical, Chemical, and Antimicrobial Prop-erties of Chlorhexidine Combine with Calcium Hydroxide as Intracanal Medicament. *Al-Rafidain Dent J* 2013; 3(3): 388-95.
26. Andreasen JO. Relationship between surface and inflammatory resorption and changes in the pulp after replantation of permanent incisors in monkeys. *J Endod* 1981; 7(7): 294-301.
27. Podbielski A, Boeckh C, Haller B. Growth inhibitory activity of gutta-percha points containing root canal medications on common endodontic bacterial pathogens as determined by an optimized quantitative in vitro assay. *J Endod* 2000; 26(7): 398-403.
28. Boyce ST, Warden GD, Holder IA. Cytotoxicity testing of topical antimicrobial agents on human keratinocytes and fibroblasts for cultured skin grafts. *J Burn Care Rehabil* 1995; 16(2 Pt 1): 97-103.
29. Agarwal S, Piesco NP, Peterson DE, Charon J, Suzuki JB, Godowski KC, et al. Effects of sanguinarium, chlorhexidine and tetracycline on neutrophil viability and functions in vitro. *J Periodontal Res* 1997; 32(3): 335-44.
30. Giannelli M, Chellini F, Margheri M, Tonelli P, Tani A. Effect of chlorhexidine digluconate on different cell types: a molecular and ultrastructural investigation. *Toxicol In Vitro* 2008; 22(2): 308-17.
31. Soares JA, Leonardo MR, da Silva LA, Tanomaru FM, Ito IY. Effect of rotary instrumentation and of the association of calcium hydroxide and chlorhexidine on the antisepsis of the root canal system in dogs. *Braz Oral Res* 2006; 20(2): 120-6.

# Comparative Evaluation of the Cytotoxicity of Two Materials: Calcium Hydroxide Powder, Calcium Hydroxide Reinforced with Chlorhexidine onL929 Fibroblasts by MTT Assay

**Sahar Yaghmaei, D.D.S.[1], Yazdan Shantiaee, D.D.S.[2*], Majid Kazem, D.D.S.[2], Shokoofe Noori, Ph.D.[3], Kaveh Yaghmaei, D.D.S.[4], Sadegh Rostaminasab, M.Sc.[5], Golbarg Kolahi Ahari, M.Sc.[6]**

1. Resident, Dapartment of Oral Medicine, Dental School, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
2. Associate Proessor, Dapartment of Endodontics, Dental School, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
3. Assistant Professor, Dapartment of Clinical Biochemistry, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
4. Assistant Professor, Dapartment of Prosthodontics, Dental School, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran
5. Master of Clinical Biochemistry, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
6. Master of Biochemistry, Payam -e- Noor University, Central Branch, Tehran, Iran

* Corresponding author; e-mail: y.shantiaee@gmail.com

(Received: 21 Nov. 2013 Accepted: 15 August 2014)

## Abstract

**Background&Aims**: Themajor objective of root canal treatment is to disinfect the entire root canal system, which requires that all contents of the root canal system be eliminated as possible sources of infection. This goal may be accomplished using mechanical instrumentation and chemical irrigation. To reduce or eliminate bacteria various irrigation solutions have been applied during the treatment. This research aimed to determine thecytotoxicity of calcium hydroxide powder as compared with calcium hydroxide reinforced with chlorhexidine.

**Method:** This study was carried out using on experimental-laboratory method on L929 fibroblasts based on cell culture and the direct effect of materials on cell line culture .The material to be tested were evaluated every 1,12,24,48and 72 hours by MTT(Metheyltetrazilium bromide) test.In this study L929 cells which not treated with any materials were used as negative control.The data related to the given materials were read by Elias(enzyme-linked immunosorbent assay) instrument. And then were analyzed with SPSS software and one-way ANOVA.

**Results:** Both materials in 0.016 up to 0.00025 concentrations suppressed proliferation. There was a significant difference in various dilutions and different time periods (1,12,24,48,72 hours)($p<0.05$).Calcium hydroxide reinforced with chlorhexidineand calcium hydroxide powderin 0.016 concentration and 72 hour showed 75% and 45% cell cytotoxicity,respectively.

**Conclusion:** Cell cytotoxicity of calcium hydroxide reinforced with chlorhexidine is more than that of other materials. Since calcium hydroxide reinforced with chlorhexidine have a higher antimicrobial effect,it is cautiously recommended as a sealing material between treatment(provided that it slightly penetrate to periapical tissues )

**Keyword**: cytotoxicity, calcium hydroxide powder, calcium hydroxide reinforced with chlorhexidine , MTT assay

Journal of Kerman University of Medical Sciences, 2015; 22(3): 280-287