

بررسی سمیت سلولی Pro Root MTA و سیمان پرتلند بر روی سلول های فیروبلاست L929

دکتر سیده زهرا شاکری^۱ دکتر مهرنوش قبادی^۲ دکتر محمدرضا شریفیان^۳ دکتر پوریا صفائی^{۴*}

۱- دندانپزشک

۲- استادیار گروه اندودنتیکس و عضو مرکز تحقیقات مواد دندانپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد دندانپزشکی تهران

۳- دانشیار گروه آموزشی اندودنتیکس، دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران

۴- دستیار تخصصی اندودنتیکس، دانشگاه آزاد اسلامی واحد دندانپزشکی تهران

خلاصه:

سابقه و هدف: MTA ماده ای است که کاربردهای مختلف در درمانهای اندودنتیکس دارد. گزارش شده که خواص فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیک سیمان پرتلند بسیار شبیه Pro Root MTA است. این سوال مطرح می‌باشد که آیا میزان سمیت سلولی سیمان پرتلند مشابه MTA است و یا آن که ماده ای با سمیت سلولی می‌باشد. مطالعه حاضر با هدف ارزیابی سمیت سلولی سیمان پرتلند در مقایسه با Pro Root MTA بر روی سلول های فیروبلاست L929 موش انجام شد.

مواد و روش ها: در این مطالعه تجربی، عصاره تهیه شده از سیمان پرتلند و Pro Root MTA در زمان های لحظه مخلوط کردن و ۴ و ۲۴ ساعت و ۷ روز پس از سخت شدن مواد به پلیت های ۹۶ خانه که شامل سلول های کشت داده شده فیروبلاست L929 بود، انتقال داده شد. جهت گروه کنترل مثبت آب مقطر و جهت گروه کنترل منفی محیط کشت سلولی به سلول های فیروبلاست اضافه گردید. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون، نمونه ها به روش Crystal Violet رنگ آمیزی شدند و دانسیته نوری (OD) هر یک خوانده شد. داده های این مطالعه با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون Tukey HSD با سطح معنی داری ($P \leq 0.05$) مورد تحلیل آماری قرار گرفت.

یافته ها: Pro Root MTA در تمام زمان های آزمایش و سیمان پرتلند در زمان های ۴ و ۲۴ ساعت پس از زمان مخلوط کردن اختلاف آماری معنی داری با گروه کنترل مثبت داشتند ($P \leq 0.001$) و با گروه کنترل منفی اختلاف معنی داری نداشتند. سیمان پرتلند در زمان های ۲۴ ساعت و ۷ روز پس از زمان مخلوط کردن اختلاف آماری معنی داری با گروه کنترل مثبت، گروه کنترل منفی و MTA داشت. ($P \leq 0.05$)

نتیجه گیری: به نظر می‌رسد سیمان پرتلند در زمان های پیگیری ۲۴ ساعت و ۷ روز پس از سخت شدن نسبت به MTA میزان کمی سمیت سلولی نشان میدهد. هر چند جهت نتیجه گیری نهایی نیاز به مطالعات بیشتری می‌باشد.

کلید واژه ها: سمیت سلولی، MTA، سیمان پرتلند، فیروبلاست، Pro root

وصول مقاله: ۹۳/۸/۱۷ اصلاح نهایی: ۹۴/۲/۱۵ پذیرش مقاله: ۹۴/۲/۱۷

مقدمه:

ها و کاربردهای دیگر استفاده می‌شود.^(۱) از خصوصیت MTA رزتراسیون بافت سمنتوم، استخوان و بافت همبند فیروز می‌باشد.^(۱،۲) رزتراسانس سمنتوم جدید روی MTA یک پدیده منحصر به فرد می‌باشد که در صورت استفاده از دیگر مواد پرکننده انتهای ریشه گزارش نشده است.^(۳) مطالعات وسیع و گزارش های کلینیکی متعدد نشان داده‌اند که اگر مورد مصرف MTA درست باشد، می‌تواند ماده قابل اعتمادی برای بسیاری از مشکلات اندودنتیک محسوب گردد.^(۱) یکی از عواملی که

انسداد کامل سیستم کانال ریشه و مهر و موم نمودن ارتباط بین آن و بافت های اطراف از مهمترین اجزاء درمان موفق ریشه می‌باشد. جهت رسیدن به این هدف مواد مختلفی ارائه شده اند که یکی از موفق ترین این مواد در چند سال اخیر MTA می‌باشد. MTA در موارد مختلفی مانند پر کردن انتهای ریشه، درمان پالپ زنده، ایجاد سد اپیکال، مهر و موم کردن پرفوریشن

نویسنده مسئول مکاتبات: دکتر پوریا صفائی، دستیار تخصصی اندودنتیکس، دانشگاه آزاد اسلامی واحد دندانپزشکی تهران، پست الکترونیک: dr.pooria.safai@gmail.com

استفاده از MTA را محدود کرده، قیمت گران آن است. اخیراً طی مطالعاتی عنوان شده که سیمان پرتلند دارای خواص فیزیکی، مکانیکی و بیولوژیک مشابه MTA می باشد. در صورتی که این ادعا درست باشد، می توان به ماده ای ارزان با کیفیت مشابه دست یافت.^(۴-۶) برای استفاده از یک ماده در دندانپزشکی ابتدا باید خواص بیولوژیک آن از جمله سمیت سلولی مورد بررسی قرار گیرد.^(۷) بر اساس بیشتر مطالعات اخیر سمیت سلولی سیمان پرتلند مشابه MTA میباشد.^(۸، ۹) در حالی که تحقیقاتی هم نشان میدهد که سمیت سلولی سیمان پرتلند کمتر از MTA است.^(۱۰) با توجه به تناقضات موجود در این زمینه، تحقیق حاضر با هدف ارزیابی سمیت سلولی این Pro Root MTA و سیمان پرتلند بر روی فیبروبلاست های L929 موش به روش سنجش Crystal Violet انجام شد.

مواد و روش ها:

این تحقیق به صورت تجربی در شرایط آزمایشگاهی انجام گرفت. گروه های مورد مطالعه Pro Root MTA (Dentsply Tulsa, Oklahoma, USA) و سیمان پرتلند نوع I کارخانه سیمان تهران، تهران، ایران) می باشد و تعداد ۹۶ نمونه برای هر گروه در نظر گرفته شد. وجود هر گونه آلودگی میکروبی محیط کشت سلولی و سخت نشدن نمونه های سیمان پرتلند و MTA به عنوان معیارهای خروج از مطالعه در نظر گرفته شد.

کشت سلول ها

پس از تهیه فیبروبلاست های L929 موش از بانک سلولی ایران (انستیتو پاستور) بر اساس راهنمای کشت سلول بانک سلولی ایران، اقدام به پاساژ جهت تکثیر سلول ها شد. ابتدا با استفاده از ۱ میلی لیتر محلول تریپسین-ورسن (Merck, Kenilworth, USA) با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد جهت جدا کردن سلول ها از فلاسک اقدام گردید. سپس به میزان ۳۰ میلی لیتر از محیط کشت سلولی RPMI

(Gibco BRL, San Francisco, USA) ۱۶۴۰ به فلاسک اضافه شد و فلاسک محتوی سلول ها به شدت تکان داده شد تا سلول ها به صورت کامل از کف ظرف جدا شوند. سپس به میزان ۳ میلی لیتر سرم جنین گاوی ۱۰ درصد، (Gibco BRL San Francisco, USA)، ده هزار واحد پنی سیلین و ده میلی گرم استرپتومایسین (جابر ابن حیان، تهران، ایران) ۳۰ AntiPPLO (Gibco BRL, San Francisco, USA) و ۳۰ Fungizone (Gibco BRL, San Francisco, USA) به محتویات فلاسک اضافه شد و در نهایت PH محیط با استفاده از محلول بیکربنات سدیم در حد ۷ تنظیم گردید. محلول حاصل به دو فلاسک ۲ سانتی متر ۲۵۰ انتقال داده شد. فلاسک ها جهت رشد سلول ها به مدت ۴ روز در انکوباتور (SANYO, Osaka, Japan) همراه با ۵ درصد CO₂ و در حرارت ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شدند.^(۱۱)

سپس بعد از ۵ بار پاساژ سلول ها، با استفاده از لام نئوبار و رنگ تریپان بلو بر اساس راهنمای کشت سلول بانک سلولی ایران، جمعیت سلول های زنده در حد ۵×۱۰^۵ سلول در میلی لیتر تنظیم گردید. سپس ۲۰۰ μl از محیط کشت به گوده پلیت ۹۶ خانه (Nunc, New York, USA) منتقل شد و پلیت تا ایجاد یک لایه کامل سلولی در کف گوده ها در انکوباتور قرار داده شد.

تهیه مدل ساختگی ریشه

جهت مشابه سازی مراحل سخت شدن مواد مورد آزمایش با محیط In vivo اقدام به ساخت مدل های ساختگی مشابه ریشه یک دندان نابالغ شد تا مراحل قرار دادن و سخت شدن آنها مشابه شرایط جاگذاری این مواد در انتهای ریشه باشد. بدین منظور از Tip های ۰/۲-۱۰ میکرولیتر کریستالین Socorex (SocorexIsba, Ecunlens, Swiss) استفاده شد. نوک Tip از محل معین بریده شد و اتوکلاو گردید.

تهیه عصاره (Extract)

جهت تهیه نمونه های Pro Root MTA و سیمان پرتلند نوع I سه قسمت پودر با یک قسمت مایع (برای مخلوط

انتقال عصاره مواد بر روی سلول ها

عصاره‌های به دست آمده در هر مقطع زمانی، توسط سمپلر واجد tip فیلتردار استریل (Eppendorf, Hamburg, Germany) بر روی گوده های حاوی سلول تک لایه انتقال داده شد. سپس پلیت به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور Co2 دار در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفت و پس از طی این مدت اقدام به رنگ آمیزی سلولها شد.

در این مرحله در گروه کنترل مثبت از ۲۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل و در گروه کنترل منفی از ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت حاوی FCS ۵ درصد، آنتی بیوتیک، Antiplo و Fungizone به همراه یک عدد ریشه مصنوعی (بدون مواد پر کننده) استفاده شد.

سنگش Crystal violet

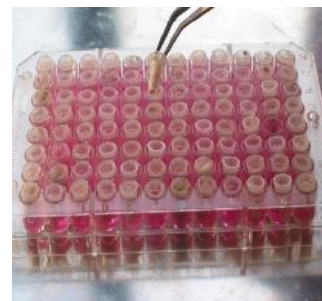
پس از تخلیه محیط روی سلولها، ۲۰۰ میکرولیتر فرمالین (Merck, Kenilworth, USA) در هر گوده ریخته شد و به مدت ۲۵ دقیقه در ۳۰۰ دور/دقیقه عمل shaking انجام شد. پس از تخلیه فرمالین سلول ها با آب مقطر فراوان شسته شده و توسط هوای ملایم خشک شدند (کار شستشو و خشک کردن سه بار تکرار شد). سپس ۲۰۰ میکرولیتر از محلول کریستال ویوله ۱٪ (Merck, Kenilworth, USA) حاوی اسید فسفریک (یک قسمت رنگ ، ۲ قسمت اسید فسفریک) در هر گروه ریخته شده و به مدت ۲۵ دقیقه عمل shaking انجام شد. مجدداً توسط آب مقطر فراوان شستشو انجام شد (شکل ۳) و پس از خشک کردن، ۲۰۰ میکرولیتر اسید استیک ۱۰٪ (Merck, Kenilworth, USA) روی سلول ها ریخته شد و به مدت ۱۰ دقیقه عمل Rotating انجام شد و پس از این مرحله دانسیته نوری (OD) هر گوده در طول موج ۵۴۰ نانومتر و رفرنس ۶۹۰ نانومتر در دستگاه Statfax 2100 (Awareness technology, Palm city USA, اسپکتروفتومتری انجام شد و داده ها ثبت گردید.

کردن سیمان پرتلند از آب مقطر استفاده شد) مخلوط شد و در داخل ریشه مصنوعی قرار گرفت و توسط پلاگر بر روی پلیت متراکم شد و یک تکه پنبه مرطوب روی آن قرار گرفت (شکل ۱) و کل مجموعه داخل گوده های پلیت ۹۶ خانه قرار داده شد (شکل ۲). برای هر گروه در هر زمان پیگیری یک پلیت ۹۶ خانه در نظر گرفته شد. در پلیت اول دو دقیقه پس از قرار دادن ریشه مصنوعی حاوی مواد داخل گوده، مجموعه از گوده ها خارج شد (زمان بین مخلوط کردن مواد با مایع تا خارج کردن آن ها از محیط حداکثر ۵ دقیقه بود). این عصاره ها به عنوان عصاره های لحظه مخلوط کردن در نظر گرفته شدند.



شکل ۱- مجموعه مواد داخل ریشه مصنوعی

در پلیت های دیگر در مقاطع زمانی ۴، ۲۴، ساعت و ۷ روز، مدل های ساختگی ریشه حاوی مواد از گوده ها خارج گردید و از عصاره هر مرحله جهت ادامه کار استفاده گردید.



شکل ۲- قرار دادن مجموعه مواد و ریشه مصنوعی داخل محیط کشت

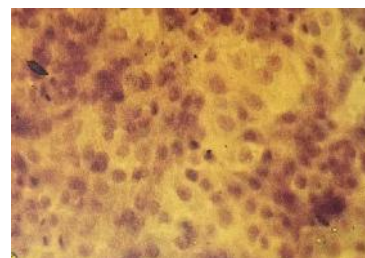
بحث:

انسداد کامل سیستم کانال ریشه و مهر و موم نمودن ارتباط بین سیستم کانال و بافت های اطراف ریشه از مهمترین ارکان درمان ریشه می باشد. جهت رسیدن به این هدف مواد مختلفی ارائه شده است که یکی از موفق ترین این مواد در چند سال اخیر MTA می باشد. نتایج حاکی از آن است که سیمان پرتلند از نظر شیمیایی، فیزیکی و بیولوژیک مشابه MTA می باشد.^(۱۲)

ترکیبات شیمیایی سیمان پرتلند و MTA شامل کلسیم فسفات، کلسیم اکساید و سیلیکا است و تنها تفاوت این دو ماده عدم وجود پتاسیم در ترکیب MTA و وجود بیسموت اکساید در ترکیب آن است که به عنوان ماده رادیوپاک به ترکیب اضافه می شود.^(۱۲،۱۳)

تا کنون مطالعات متعددی جهت بررسی Cell Viability، سمیت سلولی، سازگاری نسجی و سایر خواص بیولوژیک سیمان پرتلند و MTA انجام شده است.

بنابر یافته های این مطالعه در گروه سیمان پرتلند، در نمونه های ۲۴ ساعت و ۷ روز بعد از مخلوط کردن، علائمی از سمیت سلولی (سلولهای گرد جدا شده از کف ظرف با خاصیت انکسار نور) دیده شد. هر چند که میزان سمیت سلولی در حد گروه کنترل مثبت نبود و بین این دو گروه اختلاف آماری معنی داری وجود داشت.



شکل ۳- سلولهای L929 مجاور شده با Crystal violet

یافته ها:

تحقیق روی ۹۶ نمونه در هر گروه و در مجموع بر روی ۳۸۴ نمونه و در ۴ گروه Pro Root MTA و سیمان پرتلند و گروه کنترل مثبت و گروه کنترل منفی انجام شد. میزان دانسیته نوری بر حسب زمان پیگیری در جدول ۱ آمده است و نشان میدهد که:

بلافاصله پس از مخلوط کردن و ۴ ساعت پس از مخلوط کردن مواد: بین Pro Root MTA، سیمان پرتلند و کنترل منفی اختلاف آماری معنی داری مشاهده نشد ($P \geq 0.05$) و گروه های فوق فقط با گروه کنترل مثبت اختلاف معنی دار داشتند. ($P \leq 0.001$).

۲۴ ساعت و ۷ روز پس از مخلوط کردن مواد: سیمان پرتلند با Pro Root MTA، گروه کنترل منفی و گروه کنترل مثبت اختلاف آماری معنی دار داشت. ($P \leq 0.05$) Pro Root MTA با گروه کنترل منفی اختلاف آماری معنی دار نداشت. ($P \geq 0.05$) اما با سیمان پرتلند و گروه کنترل مثبت اختلاف آماری معنی دار وجود داشت. ($P \leq 0.05$).

جدول ۱- میزان دانسیته نوری بر حسب زمان های پیگیری به تفکیک گروه های مطالعه

زمان پیگیری	بلافاصله بعد از مخلوط کردن	۴ ساعت بعد از مخلوط کردن	۲۴ ساعت بعد از مخلوط کردن	۷ روز بعد از مخلوط کردن	مواد
Pro Root MTA	0.02 ± 0.019	0.01 ± 0.019	0.02 ± 0.017	0.03 ± 0.018	
سیمان پرتلند	0.04 ± 0.018	0.02 ± 0.017	0.03 ± 0.013	0.04 ± 0.011	
کنترل منفی	0.04 ± 0.021	0.03 ± 0.02	0.04 ± 0.021	0.05 ± 0.023	
کنترل مثبت	0.02 ± 0.008	0.03 ± 0.008	0.02 ± 0.007	0.01 ± 0.007	

شریفیان و همکاران در تحقیقی مشابه به بررسی سمیت سلولی Pro Root MTA، Root MTA و سیمان پرتلند بر روی فیبروبلاست های L929 موش به روش Neutral Red پرداختند که نتایج نشان داد که سمیت سلولی بین گروه های مورد مطالعه یکسان است.^(۱۴) اختلاف نتیجه دو مطالعه می تواند به دلیل اختلاف در روش رنگ آمیزی سلولها باشد. بنابراین روش رنگ آمیزی نیز می تواند در نتیجه آزمایش دارای اهمیت باشد.

Mestieri و همکاران در مطالعه ای با استفاده از روش MTT به بررسی سمیت سلولی سیمان پرتلند همراه با نیوبیوم اکساید به عنوان ماده رادیو اپک کننده پرداختند. بر اساس نتایج این مطالعه میزان بقای سلول های استئوبلاستیک Saos 2 در نمونه های سیمان پرتلند به تنهایی و سیمان پرتلند همراه با نیوبیوم اکساید بیشتر از نمونه های MTA بود.^(۱۰) در این مطالعه که به روش غیر مستقیم انجام شد عصاره ۴ ساعته مواد برای زمان های ۱، ۳ و ۷ روز در مجاورت سلول های استئوبلاستیک قرار گرفت. تفاوت در شیوه بررسی سمیت سلولی می تواند عامل تفاوت نتیجه این مطالعه با مطالعه ما باشد.

Zeferino و همکاران در مطالعه ای با استفاده از رنگ آمیزی Trypan blue و به کمک میکروسکوپ نوری به بررسی سمیت سلولی سیمان پرتلند سفید همراه با ۱۵٪ بیسموت اکساید با MTA سفید پرداختند. بر اساس نتایج این مطالعه هیچ یک از این دو ماده سمیت سلولی نداشتند.^(۸) در این مطالعه مواد مورد آزمایش به صورت مستقیم به مدت ۳ ساعت در مجاورت سلول های فیبروبلاست موش قرار گرفتند. تفاوت در روش مجاور کردن مواد و تفاوت در روش اندازه گیری بقا سلول ها در مجاورت مواد مورد آزمایش که در این مطالعه که به صورت شمارش سلول های رنگ گرفته در زیر میکروسکوپ نوری به شیوهی بررسی مستقیم بود، می تواند عوامل تفاوت نتیجه این مطالعه با مطالعه ما باشد.

Gomez و همکاران نیز در مطالعه ای به بررسی سمیت سلولی سیمان پرتلند همراه با مواد رادیو اپک کننده مختلف

بر روی سلول های لیگامان پرپوندتال و سلول های استئوسارکوما موش پرداختند. بررسی با استفاده از روش رنگ آمیزی با crystal violet نشان داد که سیمان پرتلند به تنهایی و یا همراه با مواد رادیو اپک کننده باعث تغییر شکل سلول ها نمی شود و بررسی MTT نشان داد که که سیمان پرتلند در غلظت های بالای مواد رادیو اپک کننده سمی است ولی به تنهایی سمیت سلولی ندارد.^(۹) در این مطالعه از شیوه ی غیر مستقیم استفاده شد و عصاره ۲ ساعته مواد در مجاورت سلول ها قرار گرفت. در این مطالعه نیز همچون مطالعه ما سیمان پرتلند در زمان کوتاه پس از آماده سازی سمیت سلولی نداشت.

در مطالعه ما بررسی مواد بر روی سلول به روش غیر مستقیم عصاره گیری از مواد انجام شد. عصاره های مورد مطالعه در ۴ زمان (لحظه مخلوط کردن، ۱ روز پس از مخلوط کردن و ۷ روز پس از مخلوط کردن) تهیه شد.

هدف از انتخاب عصاره های لحظه مخلوط کردن، تهیه مواد توکسیک احتمالی از مخلوط تازه بود. هدف از انتخاب عصاره های ۴ ساعت بعد، این بود که در این مدت سفت شدن مواد انجام می گیرد و بیشترین فعل و انفعالات در این مدت رخ می دهد. هدف از انتخاب عصاره های ۱ روز و ۷ روز بعد نیز بررسی مدت دار سمیت این مواد بود.

در این مطالعه یک مدل جهت عصاره گیری از مواد ابداع شد. این مدل در واقع یک ریشه با فورامن اپیکال باز (Open Apex) را تقلید می کرد که تمام مراحل کلینیکی قرار دادن مواد مورد مطالعه در ریشه را مشابه سازی می نمود. مدل مورد نظر را می توان مستقیماً روی سلول های گوده های ۹۶ خانه قرار داد و اثر مستقیم ماده بر روی سلول ها را بررسی کرد. اما قرار دادن مدل های ساختگی حاوی مواد بر روی سلول ها به مدت ۱ هفته، امکان پذیر نبود. زیرا پس از گذشت ۳ تا ۴ روز، در اثر رشد سلولی و آزاد شدن متابولیت های اسیدی و مصرف شدن مواد غذایی محیط، سلول ها قادر به ادامه زندگی نبودند. این موضوع می توانست نتایج حاصل از مطالعه را تحت تأثیر قرار دهد. بنابر این در

سلولها قبل از رنگ آمیزی می باشد، که باعث میشود سلول های کف ظرف را هنگام شستشو از دست ندهیم. در نهایت جهت پاسخ به این سوال که آیا سیمان پرتلند میتواند جایگزینی برای MTA باشد، باید مطالعات وسیع تر In vivo انجام شود. زیرا مطالعات In vitro قابل مقایسه با شرایط طبیعی بدن نیستند و هدف از این مطالعات خارج کردن مواد بسیار سمی از محدوده مطالعات بعدی می باشد.

نتیجه گیری:

با توجه به نتایج متفاوت در مطالعات مختلف به نظر می رسد داشتن یک روش استاندارد و قابل اعتماد (Reliable) در مطالعات سمیت سلولی مورد نیاز می باشد.

این مطالعه از روش مستقیم استفاده نشد و به جای آن به صورت غیر مستقیم، عصاره های حاصل از مواد، مورد بررسی قرار گرفت.

در این مطالعه جهت بررسی سمیت سلولی MTA و سیمان پرتلند از سلول های L929 موش استفاده شد. استفاده از این سلول ها در مطالعاتی که به بررسی سمیت سلولی مواد دندانپزشکی می پردازند بسیار شایع می باشد.^(۱۵)

روش رنگ آمیزی Crystal violet که در مطالعات بررسی سمیت سلولی مواد مورد کاربرد در دندانپزشکی، کاربرد وسیعی دارد،^(۱۶،۱۷) روشی حساس به تکنیک می باشد و در آن عوامل مداخله گری وجود دارد که در هر مرحله از رنگ آمیزی می توانند موثر باشند. مزیت این روش نسبت به روش های دیگر (Neutral Red, MTT assay)، فیکس کردن

References:

1. Parirokh M, Torabinejad M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review--Part III: Clinical applications, drawbacks, and mechanism of action. J Endod 2010;36(3):400-13.
2. Kohout GD, He J, Primus CM, Opperman LA, Woodmansey KF. Comparison of Quick-Set and mineral trioxide aggregate root-end fillings for the regeneration of apical tissues in dogs. J Endod 2015;41(2):248-52.
3. Wälivaara DÅ, Abrahamsson P, Isaksson S, Salata LA, Sennerby L, Dahlin C. Periapical tissue response after use of intermediate restorative material, gutta-percha, reinforced zinc oxide cement, and mineral trioxide aggregate as retrograde root-end filling materials: a histologic study in dogs. J Oral Maxillofac Surg 2012;70(9):2041-7.
4. Shahi S, Rahimi S, Yavari HR, Mokhtari H, Roshangar L, Abasi MM, et al. Effect of mineral trioxide aggregates and Portland cements on inflammatory cells. J Endod 2010;36(5):899-903.
5. Dreger LA, Felipe WT, Reyes-Carmona JF, Felipe GS, Bortoluzzi EA, Felipe MC. Mineral trioxide aggregate and Portland cement promote biomineralization in vivo. J Endod 2012;38(3):324-9.
6. Hungaro Duarte MA, Minotti PG, Rodrigues CT, Zapata RO, Bramante CM, Tanomaru Filho M, et al. Effect of different radiopacifying agents on the physicochemical properties of white Portland cement and white mineral trioxide aggregate. J Endod 2012;38(3):394-7.
7. ISO 7405: Dentistry: Preclinical Evaluation Biocompatibility of Medical Devices Used in Dentistry. Test Method for Dental Materials. http://www.iso.org/iso/home/store/catalogue_ics/catalogue_detail_ics.htm?csnumber=38059. Accessed 24 Feb 2014.
8. Zeferino EG, Bueno CE, Oyama LM, Ribeiro DA. Ex vivo assessment of genotoxicity and cytotoxicity in murine fibroblasts exposed to white MTA or white Portland cement with 15% bismuth oxide. Int Endod J 2010;43(10):843-8.
9. Gomes Cornélio AL, Salles LP, Campos da Paz M, Cirelli JA, Guerreiro-Tanomaru JM, Tanomaru Filho M. Cytotoxicity of Portland cement with different radiopacifying agents: a cell death study. J Endod 2011;37(2):203-10.
10. Mestieri LB, Tanomaru-Filho M, Gomes-Cornélio AL, Salles LP, Bernardi MI, Guerreiro-Tanomaru JM. Radiopacity and cytotoxicity of Portland cement associated with niobium oxide micro and nanoparticles. J Appl Oral Sci 2014;22(6):554-9.
11. Pasteur institute of iran. Cell bank of iran. Cell culture guideline 2012. [Persian]
12. Parirokh M, Torabinejad M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review--Part I: chemical, physical, and antibacterial properties. J Endod 2010;36(1):16-27.
13. Camilleri J. The biocompatibility of modified experimental Portland cements with potential for use in dentistry. Int Endod J 2008;41(12):1107-14.

14. Sharifian MR, Zarrabian M, Razmi H, Ghobadi M, Kharazifard MJ, Hemmatzade F, et al. Cytotoxicity evaluation of Pro Root MTA, Root MTA and Portland cement (PC) on L929 mouse fibroblasts. *Journal of Dental Medicine* 2007;20(2):131-7.[Persian]
15. Shahoon H, hamed R, golgonia P, Yadegari Z. Evaluation of Nano silver particles' cytotoxicity on L929 fibroblast cells by MTT assay: an in vitro Study. *J Res Dent Sci* 2011; 8 (2) :53-59.[Persian]
16. Chen YZ, Lü XY, Liu GD. A novel root-end filling material based on hydroxyapatite, tetracalcium phosphate and polyacrylic acid. *Int Endod J* 2013;46(6):556-64.
17. Scelza MZ, Linhares AB, da Silva LE, Granjeiro JM, Alves GG. A multiparametric assay to compare the cytotoxicity of endodontic sealers with primary human osteoblasts. *Int Endod J* 2012;45(1):12-8.