The Journal of Qazvin Univ. of Med. Sci.
مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی قزوین
Vol. 11, No. 1, Spring 2007
سال یازدهم، شماره ۱ (پی‌درپی ٤٢)، بهار ١٣٨٦

اثرات سیتوتوکسیک کلرهگزیدین بر روی فیبروبلاست های رده L929 موش

دکتر سورنا وهبی* دکتر راشین علیالی**

Cytotoxic effects of chlorhexidine on rat L929 fibroblast cell line

S Vahabi❖ R Aliali

دریافت : ۸۴/۱۲/۱۵ پذیرش : ۸۵/۱۱/۲۹

✸Abstract

Background: Recent studies has shown that toxic effects of chlorhexidine (CHL) is not limited to bacteria but also noxious for a variety of cells including sperms, polymorphonuclears, macrophages, epithelial cells, erythrocytes and gingival fibroblasts.

Objective: To evaluate cytotoxic effects of chlorhexidine on rat L929 fibroblast cell line and also determining the safest and most effective dose of this agent.

Methods: L929 fibroblast cell cultures supplemented with FBS were treated with 0.2, 0.12 and 0.009% of chlorhexidine concentrations for 30 seconds, 1 minute and 5 minutes. Then, Media was removed and cells were washed with RPMI three times and were incubated in new culture media with MTT for 4 hours. Since chlorhexidine cytotoxicity affects mitochondrial dehydrogenase in viable cells, no MTT reduction and further formazan crystal formation occurs. The optical density of the color changes was detected using ELISA reader.

Findings: CHL was cytotoxic at all concentrations and time intervals used in our study. ANOVA showed a lack of any significant difference in toxic effects of chlorhexidine at different concentrations and durations.

Conclusion: Regarding the cytotoxicity of CHL at concentrations and durations much less than those in clinical application, conservative use of chlorhexidine is recommended. Also, additional studies on CHL to determine a safe and effective dose and duration are suggested.

Keywords: Chlorhexidine, Fibroblast, Cytotoxicity, Gingiva

✸ چکیده

زمینه : مطالعه‌های اخیر نشان داده که آثار سمی کلرهگزیدین به باکتری محدود نبوده و برای انواع سلول‌ها از جمله اسپرم، نوتروفیل، ماکروفاژ، سلول اپی‌تلیال، اریتروسیت و فیبروبلاست لثه نیز سایتوتوکسیک است.

هدف : این مطالعه به‌منظور تعیین اثر سیتوتوکسیک کلرهگزیدین بر روی فیبروبلاست‌های رده L929 موش انجام شد.

مواد و روش‌ها : در این مطالعه تجربی، فیبروبلاست‌های L929 موش در محیط کشت حاوی FBS با غلظت‌های۰/۲، ۰/۱۲ و ۰/۰۰۹ درصد کلرهگزیدین به‌مدت ۳۰ ثانیه، ۱ دقیقه و ۵ دقیقه مجاورت داده شدند. سپس محیط کشت خارج و سلول‌ها سه مرتبه با RPMI (محیط کشت) شستشو داده شده و در محیط کشت جدیدی همراه رنگ MTT به‌مدت ۴ ساعت انکوبه شدند. سیتوتوکسیسیته کلرهگزیدین، آنزیم دهیدروژناز میتوکندریال سلول زنده را تحت تأثیر قرار می‌دهد؛ بنابراین این آنزیم قادر به احیای MTT و تبدیل آن به کریستال فرمازان در صورت وجود سایتوتوکسیسیته نیست. در نهایت دانسیته اپتیک تغییرات رنگ توسط ELISA-reader اندازه گیری شد.

یافته‌ها : کلرهگزیدین در غلظت‌های ۰/۲، ۰/۱۲ و ۰/۰۰۹ و زمان‌های ۳۰ ثانیه، یک و ۵ دقیقه سیتوتوکسیک بود. آزمون ANOVA تفاوت معنی‌داری در توکسیسیته در غلظت‌ها و زمان‌های مختلف نشان نداد.

نتیجه‌گیری : با توجه به توکسیسیته کلرهگزیدین در غلظت‌ها و زمان‌هایی کمتر از موارد کاربرد بالینی، کاربرد محتاطانه کلرهگزیدین و انجام مطالعات مشابه برای تعیین غلظت مؤثر و ایمن پیشنهاد می‌شود.

کلید واژه‌ها : کلرهگزیدین، فیبروبلاست، سیتوتوکسیک، لثه

* استادیار پریودونتیکس دانشکده دندان‌پزشکی دانشگاه علوم پزشکی قزوین

** دانش آموخته دندان‌پزشکی دانشگاه علوم پزشکی قزوین

آدرس مکاتبه: قزوین، دانشگاه علوم پزشکی، دانشکده دندان‌پزشکی، بخش پریودونتیکس، تلفن: ۳۳۵۳۰۶۴ -۰۲۸۱

❖Emahl: Dr_s_Vahabi@yahoo.com

*** مقدمه :**

با توجه به ماهیت عفونی بیماری لثه به‌عنوان یکی از بیماری‌های شایع مسؤول از دست رفتن دندان در بزرگسالان و عدم کفایت روش‌های مکانیکی در حصول نتایج ایده آل، پیشگیری و استفاده از روش‌های شیمیایی کنترل پلاک مورد توجه خاصی قرار گرفته و از دهان‌شویه‌ها به خصوص کلرهگزیدین در برنامه بهداشت دهان و دندان استفاده می‌شود.[۱و۲و۳]

به‌نظر نمی‌رسد ویژگی‌های توکسیک کلرهگزیدین تنها مختص به باکتری باشد.[۲] مطالعه‌های مختلف نشان داده است که کلرهگزیدین برای انواعی از سلول‌ها از جمله اسپرم، لکوسیت پلی مورفونوکلئر، ماکروفاژ، سلول اپی‌تلیال پوست، اریتروسیت و فیبرو بلاست لثه کشنده است.[۳و۴و۵] فیبروبلاست ها سلول غالب لیگامان پریودنتال هستند و با توجه به نقش کلیدی آنها در حفظ سلامت لثه و بافت‌های اطراف دندان، اثرات سیتوتوکسیک عوامل شیمیایی از جمله کلرهگزیدین روی فیبروبلاست‌ها دارای اهمیت است.[۱و۲]

با توجه به اینکه دهان‌شویه‌ها به‌خصوص انواع ایرانی از نظر عوارض بیولوژیک کمتر مورد مطالعه قرار گرفته‌اند، این تحقیق به‌منظور تعیین اثر سیتوتوکسیک کلرهگزیدین روی فیبروبلاست های کشت داده شده از رده L929 موش انجام شد تا در صورت سمی بودن این ماده از کاربرد بی رویه آن خودداری شده یا از غلظتی با حداقل عوارض زیست شناختی و در زمان محدود استفاده شود.

*** مواد و روش‌ها :**

این مطالعه تجربی در سال ۱۳۸۴ در دانشگاه علوم پزشکی قزوین انجام شد. بعد از آماده سازی فیبروبلاست‌های رده L929NCBI 161 موش تهیه شده از انستیتو پاستور ایران، تعداد ۴۰۰۰۰ سلول درون هر یک از چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای (edt SARST) قرار داده شد. حجم سلول‌ها با محیط کشت کامل حاوی RPMI (Gibco) FBS (Gibco)، ۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر پنی‌سیلین (Sigma) و ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر استرپتومایسین (Sigma) به ۱۰۰ لاندا رسانیده شد و پلیت‌ها به‌مدت ۲۰ ساعت انکوبه شدند. با توجه به این که کلرهگزیدین ایرانی در غلظت ۰/۲ درصد موجود است، غلظت‌های۰/۱۲ و ۰/۰۰۹ درصد با محاسبه حجم مورد نیاز از کلرهگزیدین بر حسب میلی‌لیتر درون حلال تهیه شد. به‌منظور رقیق کردن کلرهگزیدین از محیط کشت RPMI استفاده شد؛ زیرا در صورت استفاده از الکل یا آب به‌عنوان حلال، احتمال وجود اثرات سیتوتوکسیک خود این مواد و تأثیر بر نتیجه آزمایش وجود داشت. سپس غلظت‌های مختلف کلرهگزیدین در زمان‌های ۳۰ ثانیه، ۱ دقیقه و ۵ دقیقه با فیبروبلاست‌ها مجاورت داده شدند. قبل از مجاورت، محیط کشت خارج شد تا محیط هنگام اضافه کردن کلرهگزیدین فاقد سرم باشد؛ زیرا محیط دارای سرم باعث رسوب کلرهگزیدین می‌شود.[۳] کلرهگزیدین با غلظت مورد نظر وارد چاهک‌ها شد و پس از سپری شدن زمان مجاورت، از چاهک‌ها خارج و بعد از سه بار شستشو توسط RPMI دوباره محیط کشت به چاهک‌ها اضافه گردید. رنگ آمیزی توسط MTT انجام شد.[۶] رنگ MTT به میزان ۰/۱ محیط کشت یعنی ۱۰ لاندا و به‌صورت محلول ۰/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر MTT در سرم بافری فسفات به چاهک‌ها اضافه شد و سلول ۴ ساعت تحت انکوباسیون قرار گرفت. سپس با اضافه کردن ایزوپروپانول اسیدی به محیط، بلورهای نامحلول فرمازان به بلورهای محلول تبدیل شدند. تغییر رنگ نشانگر حیات سلول‌هاست؛ به گونه‌ای که هرچه دستگاه ELISA-reader تغییر رنگ بیشتری را به شکل عدد بالاتر قرائت نماید نشان‌دهنده وجود تعداد سلول‌های بیشتری در حالت زنده (vital)

است که قدرت تبدیل بلورهای نـامحلول فرمـازان را بـه حالت محلول داشته اند.

این عمل برای هر یـک از غلظـت‌هـا و زمـان‌هـا ۱۵ مرتبـه (یعنـی در ۱۵ چاهـک) انجـام شـد. نمونـه‌هـای کنترل مثبـت و کنتـرل منفـی در هـر یـک از پلیـت‌هـا وجـود داشـت. کنتـرل مثبـت نمونـه‌هـایی بـود کـه سیتوتوکسیسـیته در آنهـا مثبـت بـود و اکثـر قریـب بـه اتفـاق سـلول‌هـا در آن مـرده بودنـد. بـرای تهیـه ایـن نمونـه‌هـا در چاهـک‌هـای حـاوی فیبروبلاسـت، آب مقطـر سـرد تحـت فشـار وارد شـد تـا غشـای سـلولی پـاره شـود و سـلول از بـین بـرود. کنتـرل منفـی نمونه‌هـایی بـود کـه سیتوتوکسیسـیته در آنهـا منفـی و شامل چاهک‌هایی بـود کـه فیبروبلاسـت‌هـا در محـیط کشت بدون مجاورت با کلرهگزیدین قرار داشتند.

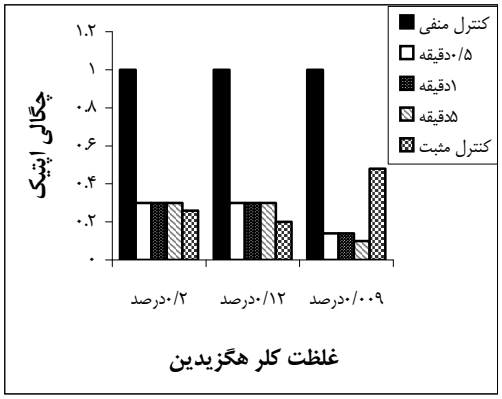
قبل از انجـام آزمـایش اصـلی، یـک مطالعـه پـایلوت بـا غلظـت‌هـای مـورد نظـر و زمـان‌هـای ۱، ۵ و۱۵ دقیقـه انجـام شـد. بـه‌علـت سیتوتوکسیسـیته بـالای کلرهگزیـدین زمـان مجـاورت در آزمـایش اصـلی کـاهش یافـت و از زمـان‌هـای ۰/۵، ۱ و ۵ دقیقـه اسـتفاده شـد. نتـایج حاصـل بـر اسـاس چگـالی نـوری (optic density) رنـگ ایجـاد شـده ارزیـابی شـد؛ به‌گونه‌ای کـه عـدد بزرگتـر نشـان‌دهنـده حیـات تعـداد بیشتری از سلول‌ها بود.

جهت بررسـی تفـاوت بـین زمـان‌هـا و غلظـت‌هـای مختلـف کلرهگزیـدین بـر روی فیبروبلاسـت از آزمـون آمـاری ANOVA(scheffe) بـا خطـای نـوع اول کمتر از ۰/۰۱ استفاده شد.

* یافته ها :

تمام غلظت‌های مورد مطالعه کلرهگزیدین (۰/۰،۲/۱۲ و۰/۰۰۹ درصد) در سه زمان ۳۰ ثانیه، ۱ دقیقه و ۵ دقیقه بر روی فیبروبلاست‌ها اثـر سیتوتوکسـیک داشـت، ولـی تفاوت بین غلظت‌های مختلف از نظـر آمـاری معنـی‌دار نبود (نمودار شماره۱).

نمودار ۱- چگالی اپتیک (حیات سلولی) فیبروبلاست‌ها بر اساس غلظت و زمان مجاورت کلرهگزیدین



در غلظت ۰/۰۰۹ درصد، علاوه بر تفاوت معنی‌دار بین گروه مورد با کنترل منفی، اختلاف بین گروه مورد با کنترل مثبت نیز معنادار بود و این بدان معنی است که سمیت کلرهگزیدین در غلظت ۰/۰۰۹ درصد در زمان ۳۰ ثانیه به اندازه کنترل مثبت (آب مقطر) نیست.

در مـورد هریـک از غلظـت‌هـای کلرهگزیـدین نیـز اخـتلاف معنـی‌داری بـین زمـان‌هـای مختلـف وجـود نداشت.

* بحث و نتیجه گیری :

این مطالعه نشان داد که کلرهگزیدین بـا غلظـت ۰/۲ درصـد در هـر سـه زمـان ۰/۵، ۱ و ۵ دقیقـه بـرای فیبروبلاست‌های رده L929 موش سیتوتوکسیک اسـت که با مطالعه‌های مشـابه مطابقـت دارد.[۷و۸و۹] تعـدادی از مطالعه‌های انجام شده بر روی مدل‌هـای حیـوانی، عـدم وجود اثر سوء کلرهگزیدین ۰/۲ درصد را نشان داده‌اند و در آنها تنها به جنبه‌هایی مثـل رشـد و تولیـد مثـل رت، تکثیر سلول‌های اپی‌تلیال رت یا آثار سوء ناشی از تزریق اینتراکرانیال کلرهگزیدین پرداخته شده است.[۵]

کلرهگزیدین با غلظت ۰/۱۲ درصـد نیـز در هـر سـه زمان مورد مطالعـه بـرای فیبروبلاسـت‌هـای رده L929 موش سیتوتوکسیک بود که موافق با یافته‌های مطالعات قبلی با این غلظت از کلرهگزیدین است.[۳و۴و۱۰]

در مطالعه فلوترا و مباکن هم که به‌صورت in vivo انجام شده، تأثیر سوء کلرهگزیدین ۰/۱۲ درصد به ترتیب روی ترمیم زخم و مخاط دهان مشخص شده است.[۹و۱۱]

کلرهگزیدین با غلظت ۰/۰۰۹ درصد نیز در هر سه زمان مورد مطالعه برای فیبروبلاست‌های رده L929 موش سیتوتوکسیک بود. استفاده از این غلظت در مطالعه رامف و ماریوتی نیز نتیجه مشابهی داشته است.[۳] در مطالعه دنیل و پوچر از غلظت‌های ۰/۰۰۵ و ۰/۰۰۲درصد استفاده شده که طبق نتایج این مطالعه، کلرهگزیدین ۰/۰۰۵ درصد روی تعداد سلول‌ها اثر سمی داشت و این اثر برگشت پذیر نبود؛ ولی اثر کلرهگزیدین ۰/۰۰۲ درصد بعد از قطع مجاورت، طی مدت زمان ۷ روز قابل برگشت بود.[۱۰]

در مطالعه حاضر توکسیسیته کلرهگزیدین از لحاظ توانایی آن در از بین بردن حیات میتوکندریایی فیبروبلاست‌ها ارزیابی شده است. برای سنجش این جنبه سلولی از رنگ آمیزی MTT که وابسته به احیای رنگ توسط آنزیم‌های میتوکندریایی است، استفاده شد. در سایر مطالعات از روش‌هایی مثل رنگ آمیزی تریپان بلو، رادیو ایزوتوپ‌ها و یا شمارش سلولی استفاده شده است.[۳و۴و۷]

حذف عوامل مداخله‌گر و اطمینان از عدم وجود هر گونه عامل توکسیک غیر از ماده مورد مطالعه یعنی کلرهگزیدین از اهمیت بسزایی برخوردار بود، لذا این مطالعه در شرایط کاملاً استریل انجام شد و به‌منظور رقیق کردن کلرهگزیدین از محیط کشت سلولی استفاده شد تا هرگونه مرگ سلول تنها به علت اثر کلرهگزیدین باشد. البته مواردی مثل پاساژ سلولی به‌منظور تکثیر و به دست آوردن حجم مناسب سلول‌ها که خود می‌تواند بر روی قدرت سلول‌ها اثر بگذارد، غیر قابل اجتناب بود. به دلیل رقیق شدن کلرهگزیدین توسط مایعات دهانی مثل بزاق و مایع شیار لثه‌ای و یا مایعات بین سلولی، در این مطالعه و سایر مطالعات از غلظت‌هایی کمتر از موارد استفاده بالینی استفاده شد. همچنین به‌دلیل این‌که دهان‌شویه کلرهگزیدین چند دفعه در روز استفاده می‌شود و حتی گاهی به‌علت تجویز بی‌مورد، مورد استفاده روزمره قرار گرفته و در مجموع زمان طولانی‌تری در تماس با بافت‌های دهانی قرار می‌گیرد، از زمان‌های طولانی‌تری نسبت به کاربرد معمول بالینی استفاده شد.

کاربرد کلرهگزیدین در مواردی‌که عملکرد سد اپی‌تلیال دچار آسیب شده، مثلاً در حین و یا بلافاصله بعد از جراحی و با جرم‌گیری زیر لثه می‌تواند با تماس مستقیم با فیبروبلاست‌ها عواقب مهمی در پی داشته باشد. در مجموع این مطالعه با توجه به سیتوتوکسیسیته کلرهگزیدین در غلظت‌هایی پایین‌تر از کاربرد بالینی، استفاده محتاطانه از آن‌را توصیه و مطالعات دیگری را بر روی فیبروبلاست‌ها و سایر سلول‌های انسان در شرایطی نزدیک به کاربرد بالینی پیشنهاد می‌نماید.

*** سپاسگزاری :**

از شورای پژوهشی دانشگاه علوم‌پزشکی قزوین در تأمین هزینه‌های این پایان‌نامه دندان‌پزشکی قدردانی می‌شود.

*** مراجع :**

1. Newman MG, Takei HH, Carranza FA. Carranza's clinical periodontology. 9th ed. W.B. Saunders Co; 2002. chap 1,2,26, 38,49,666

2. Poggi P, Rodriguez Y, Baena R, Rizzo S, Rota MT. Mouth rinses with alcohol: Cytotoxic effects on human gingival fibroblasts in vitro. J Periodontol 2003; 74(5): 623-9

3. Mariotti AJ, Rumpf DA. Chlorhexidine - induced changes to human gingival fibroblasts collagen and non collagen protein

production. J Periodontol 1999; 70(12): 1443-8
4. Alleyn CD, O'neal RB, Strong SL, Scheidt MJ, Vandyke TE, Mephersen JC. The effect of chlorhexidine treatment of root surfaces on the attachment of human gingival fibroblasts in vitro. J Periodontol 1991; 62: 434-8
5. Bonacorsi C, Raddi MSG, Carlos IZ. Cytotoxicity of chlorhexidine digluconate to murine macrophages and its effect on hydrogen peroxide and nitric oxide induction. Braz J Med Biol Res 2004; 37(2): 207-12
6. Fernandez R, Vetvicka V, Raten B. Methods in cellular immunology. 2 nd ed. New York, Washington DC: 55-6
7. Wilken R, Botha SJ, Griber A, Germishuys PJ. In vitro cytotoxicity of chlorhexidine gluconate, benzydamine-hcl and povidine iodine mouth rinses in human gingival fibroblasts. SAD J 2001; 56(10): 455-60
8. Goldschmidt P, Cogen R, Taubman S. Cytopathologic effects of chlorhexidine on human cells. J Periodon Res 1997; 48(4): 212-6
9. Kenny E, Saxe R, Bowles R. Effects of chlorhexidine on human polymorphonuclear leukocytes. Arch Oral Biol 1972; 17: 633
10. Pucher JJ, Daniel JC. The effect of chlorhexidine digluconate on human fibroblasts in vitro. J Periodontol 1993; 62: 526-32
11. Flotra L, Gjermo P, Rolla G, Waerlaug J. Side effects of chlorhexidine mouthwashes. Scand J Dent Res 1971; 79: 119-25