



Scan online to view this article

Evaluation of cytotoxicity of calcium hydroxide, sodium fluoride and their mixture in order to introduce the best combination for use in root canal treatment

Mohammadreza Amanzadeh¹, Azar Heydari^{2*}, Mehdi Mahdavi³

1. Department of Cellular and Molecular Biology, Faculty of Advanced Science and Technology, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

2. Department of Endodontics, School of Dentistry, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

3. Advanced Therapy Medicinal Product (ATMP) Department, Breast Cancer Research Center, Motamed Cancer Institute, Academic Center for Education, Culture and Research (ACECR), Tehran, Iran.

Abstract

Aim and Background: In dentistry, antimicrobial materials are selected due to their antimicrobial effects and tissue-compatibility. In the present study, cell-toxicity of calcium hydroxide and sodium fluoride powders were evaluated in L929 fibroblast cell line. Also in this study, possible effect of calcium hydroxide was evaluated in decreasing cell-toxicity effect of sodium fluoride.

Materials and Methods: Experimental materials were evaluated in time points of 6, 12, 24, 48 and 72 hrs with concentrations of 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 5, 25, 100, 500 and 1000 ppm by MTT test on L929 fibroblast cells and as negative control untreated cells were evaluated.

Results: Calcium hydroxide alone, showed low cell-toxicity ($p < 0.05$). Sodium fluoride in concentrations of 500 and 1000 ppm showed a meaningful difference versus negative control sample ($p < 0.05$). Combination of calcium hydroxide and sodium fluoride reduced sodium fluoride cell-toxicity meaningfully in concentration of 500 ppm ($p < 0.05$).

Conclusion: Using of new compounds is so useful in dentistry for disinfection. One solution is reducing current compounds cell-toxicity. In the other hand, calcium hydroxide did not show noticeable cell-toxicity but it reduced sodium fluoride cell-toxicity in a combination form.

Keywords: Calcium hydroxide, Sodium fluoride, L929 fibroblast, Cell-toxicity, Iau Science

Corresponding author:

Department of Endodontics, School of Dentistry, Shahid Beheshti University of Medical Sciences

Email: Azarheydari1@gmail.com





برای مشاهده این مقاله به صورت
آنلاین اسکن کنید

ارزیابی سمیت سلولی هیدروکسیدکلسیم، سدیم فلوراید و مخلوط آن‌ها به منظور معرفی مؤثرترین ترکیب جهت استفاده در درمان ریشه دندان محمد رضا امن زاده^۱، دکتر آذر حیدری^{۲*}، دکتر مهدی مهدوی^۳

۱. گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم و فناوری نوین، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۲. گروه اندودنتیکس، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.

۳. دپارتمان توسعه فناوری درمان‌های پیشرفته در سرطان، مرکز تحقیقات سرطان پستان، پژوهشکده معتمد، جهاد دانشگاهی، تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: یکی از اهداف درمان کانال ریشه دندان، حذف باکتری‌های داخل کانال تا حد ممکن است. داروهایی که برای این منظور به کار گرفته می‌شوند می‌بایست اثرهای ضد میکروبی همراه با سازگاری بافتی داشته و برای سلول‌های بدن سمیت نداشته باشند. رایج‌ترین داروی به کار گرفته شده هیدروکسیدکلسیم است. اما در عین حال ترکیب دیگری به نام سدیم فلوراید با فعالیت ضد میکروبی وجود دارد که تاکنون در درمان ریشه از آن استفاده نشده است. هم‌چنین ممکن است فلوراید در ترکیب با هیدروکسیدکلسیم داروی مناسبی برای ضد عفونی فضای کانال دندان باشد. هدف از این مطالعه ارزیابی سمیت سلولی هیدروکسیدکلسیم، سدیم فلوراید و مخلوط آن‌ها است تا مؤثرترین ترکیب برای درمان ریشه معرفی شود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی - آزمایشگاهی، از داروهای هیدروکسیدکلسیم و سدیم فلوراید در غلظت‌های ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۲۵، ۰/۵، ۰/۷۵، ۱، ۵، ۲۵، ۱۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و زمان‌های ۶، ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تست MTT انجام شد. هم‌چنین اثر سمیت سلولی مخلوط ۲۵٪ پودر هیدروکسیدکلسیم و ۷۵٪ سدیم فلوراید، ۵۰٪ پودر هیدروکسیدکلسیم و ۵۰٪ سدیم فلوراید و ۷۵٪ پودر هیدروکسیدکلسیم و ۲۵٪ سدیم فلوراید در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تست MTT صورت گرفت. تمامی ارزیابی‌های انجام شده بر اساس تست آماری two way ANOVA، گروه‌های تست با گروه کنترل مورد مقایسه قرار گرفتند.

یافته‌ها: کلسیم هیدروکساید به‌تنهایی سمیت سلولی کمی نشان داد. سمیت سلولی فلوریدسدیم در غلظت‌های ۵۰۰ و ۱۰۰۰ ppm تفاوت معنی‌داری در مقابل نمونه کنترل منفی از خود نشان داده است ($P < 0/05$). استفاده ترکیبی از کلسیم هیدروکسید و فلوریدسدیم سمیت سلولی ناشی از فلوریدسدیم را به‌طور معنی‌داری در غلظت ۵۰۰ ppm کاهش داده است ($P < 0/05$).

نتیجه‌گیری: ضمن این بررسی مشخص شد که هیدروکسیدکلسیم سمیت قابل توجهی بر روی سلول‌های مذکور از خود نشان نداد اما توانست به‌خوبی سمیت ناشی از فلوریدسدیم را در حالت ترکیبی کاهش دهد. بنابراین در این طرح ترکیب جدید و هدفمند هیدروکسیدکلسیم-فلوریدسدیم که در آن فلوریدسدیم با اثر ضد میکروبی‌اش و هیدروکسیدکلسیم با سمیت بسیار کم‌اش بر روی سلول مورد مطالعه، کاندید ایده آل برای درمان ریشه به‌صورت چند جلسه‌ای معرفی می‌گردد. در نتیجه این طور به-نظر می‌رسد استفاده از این ترکیب بر روی سلول‌های دندانی درمان مؤثرتری را فراهم می‌نماید.

واژگان کلیدی: سمیت سلولی، هیدروکسیدکلسیم، فلوریدسدیم، فیبروبلاست L929، Iau Science

مقدمه

از گذشته‌های دور پاکسازی بافت‌های بدن از میکروب‌های پاتوژن از مباحث مهم در علوم پزشکی بوده است و ترکیب-های مختلفی در این راستا به‌کار گرفته شده‌اند. برای مثال در دندانپزشکی حذف باکتری‌های بیماری‌زا داخل ریشه

نویسنده مسئول:

گروه اندودنتیکس، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهیدبهشتی

پست الکترونیکی: Azarheydari1@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۱/۲۳

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۳/۱۶

دندان با استفاده از شوینده ها و داروهای ضد عفونی کننده مختلف میسر است (۱). در علم دندانپزشکی درمان دندان زمانی موفقیت آمیز است که ماده قرار گرفته در لثه با بافت های اطراف خود واکنش توکسیک ندهد و از طرفی شرایط محیط به گونه ای باشد که میکروب ها در آنجا رشد نکنند (۲). در حقیقت ضد عفونی نمودن منطقه جراحی شده در لثه و استریل نگه داشتن آن در روزهای آتی دغدغه اصلی در دندانپزشکی محسوب می شود (۳). از سوی دیگر از آنجا که امکان نشت داروهای داخل کانال دندان در طی فرآیند درمان به ناحیه انتهای ریشه وجود دارد، سمیت مواد به کار گرفته شده برای سلول های اطراف بافت های ریشه بعضی اوقات می تواند مشکل ساز باشد (۱). پس در یک جمع بندی ساده در کنار درمان و ضد عفونی نمودن دندان باید به سمیت سلولی مواد به کار برده شده اهمیت داد و حتی الامکان تلاش نمود تا سمیت سلولی ناشی از عوامل ضد عفونی کننده برای بدن به حداقل برسد (۴).

در مواقعی که درمان ریشه به صورت چند جلسه ای انجام می شود، از داروهای ضد میکروبی داخل کانال استفاده می شود (۵). رایج ترین ماده مورد استفاده جهت میکروب زدائی در دندان پزشکی، هیدروکسیدکلسیم است. این ماده اولین بار توسط Hermann در آلمان در سال ۱۹۲۰ معرفی شد و از آن زمان در درمان های مختلف دندانپزشکی از جمله به عنوان داروی ضد عفونی کننده کانال ریشه دندان کاربرد داشته است. این ماده از نظر شیمیایی به عنوان یک عامل بازی قوی طبقه بندی می شود، واکنش های اصلی آن ناشی از تفکیک یونی Ca^{+2} و OH^{-2} است و تأثیر آن ها بر بافت های حیاتی، ایجاد تحریک در تشکیل بافت های سخت از طریق نکروز انعقادی و در عین حال اثر ضد میکروبی نیز از خود نشان می دهد (۶). علی رغم اثرهای ضد باکتریایی و سازگاری بافتی مناسب هیدروکسیدکلسیم، به دلیل عدم تأثیر بر باکتری مشکل ساز داخل کانال یعنی انتروکوک فکالیز و کاندیدا آلبیکانس و همین طور شکننده شدن عاج در مصرف طولانی مدت آن، کاندید ایده آلی به نظر نمی رسد (۷، ۸). از این رو احساس می شود که این ماده نیاز به بهینه سازی و یا جایگزین دارد.

ترکیب های دیگری از جمله فرآورده های فلوراید علاوه بر افزایش مقاومت ساختار دندان، اثرهای ضد میکروبی نیز دارند. فلوراید، ترکیب طبیعی عنصر فلوئور است که در طبیعت به وفور یافت می شود. فلوئور (F) یکی از عناصر

غیرفلزی است که به طور معمول به صورت ترکیب با کلسیم (CaF_2) دیده می شود (۹). فلوراید به دو روش سیستمیک و موضعی مصرف شده و باعث اثرهای: افزایش تراکم مینا و عاج، پدیده دوباره معدنی شدن، خاصیت ضد میکروبی، کاهش حلالیت مینا در اسیدهای حاصل از فعالیت باکتری های پوسیدگی زا، کاهش انرژی سطحی مینا و کاهش شیارهای عمیق موجود در سطح جونده دندان ها می شود (۱۰). این ماده تاکنون در درمان ریشه استفاده نشده است لذا می بایست سمیت ترکیب های فلوراید جهت استفاده به عنوان داروی داخل کانال ریشه مورد بررسی قرار گیرد (۱۱). هم چنین ممکن است فلوراید در ترکیب با هیدروکسیدکلسیم داروی مناسبی برای ضد عفونی فضای کانال دندان باشد.

با توجه به ویژگی های گفته شده در مورد هیدروکسیدکلسیم و فلوراید، هدف از این مطالعه بررسی سازگاری بافتی و سمیت سلولی این دو ماده و مخلوطی از آنان است تا شاید بتوان در آینده ماده ای را برای ضد عفونی کانال عفونی دندان معرفی نمود، تا در عین داشتن قابلیت های ضد میکروبی بیش تر و تقویت ساختار دندان، سمیت سلولی کمتری داشته باشند. به همین دلیل در گام اول سمیت این مواد و فرم مخلوط آن ها بر رده سلولی فیبروبلاستی مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش ها

پودر هیدروکسیدکلسیم (DHARMA-American)، پودر سدیم فلوراید (Merck-Germany) تهیه شد. در مرحله بعدی غلظت مناسب از داروهای مورد آزمایش با مقادیر: ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۲۵، ۰/۵، ۰/۷۵، ۱، ۵، ۲۵، ۱۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر از دو ماده هیدروکسیدکلسیم و فلوراید سدیم تهیه شد. به علاوه مخلوطی از هیدروکسیدکلسیم - فلوراید سدیم با نسبت های ۲۵٪ پودر هیدروکسیدکلسیم و ۷۵٪ سدیم فلوراید، ۵۰٪ پودر هیدروکسیدکلسیم و ۵۰٪ سدیم فلوراید و ۷۵٪ پودر هیدروکسیدکلسیم و ۲۵٪ سدیم فلوراید در غلظت های نهایی ۲۵، ۱۰۰ و ۵۰۰ میلی گرم در میلی لیتر نیز تهیه گردید. سپس غلظت های تهیه شده تمام مواد به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد در اتوکلاو استریل گردیدند تا برای تست سمیت سلولی مورد استفاده قرار گیرند.

رده سلولی

رده سلولی فیبروبلاست موشی L929 از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه شده و سپس در محیط کشت RPMI-1640 (Gibco Germany) و سرم جنین گاو FBS (۱۰٪) با مشخصات (Germany Gibco) و آنتی-بیوتیک استرپتومایسین و پنی سلین (Sigma USA) قرار گرفته و درون انکوباتور حاوی ۵٪ CO₂، ۹۵٪ رطوبت و دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شد. وقتی که ۸۰ درصد فلاسک پر از سلول های رشد یافته شد، از آنزیم EDTA-Tripsin سلول ها از کف فلاسک جدا شده و به داخل لوله فالکون ریخته و سانتریفیوژ انجام گردید. سپس مایع فوقانی تخلیه شده و سلول ها در محیط کشت سولی سوسپانسیون شدند. با استفاده از لام نتوبار شمارش سلول-ها انجام گرفت. به طوری از سلول ها سوسپانسیونی با تراکم ۱۰۰۰۰۰ سلول در میلی لیتر تهیه شد.

تست سمیت سلولی و گروه کنترل

جهت سنجش سمیت سلولی بر روی رده فیبروبلاستی L929 از تست MTT استفاده شد. از سوسپانسیون سلولی به دست آمده مقدار ۱۰۰ میکرولیتر حاوی ۱۰۰۰۰ عدد سلول در پلیت های ۹۶ خانه ای اضافه گردیدند. سپس غلظت های ۰/۱، ۰/۲۵، ۰/۵، ۱، ۵، ۲۵، ۱۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر از دو ماده هیدروکسید کلسیم و فلوراید سدیم بر روی سلول های فیبروبلاستی اثر داده شد و پس از زمان های ۶، ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت سمیت سلولی بررسی شد. گروه کنترل، حاوی محیط کشت و سلول فیبروبلاستی L929 بود که برای مقایسه با گروه های مورد آزمایش و سلامت از انجام آزمایش، در نظر گرفته شد. برای هر غلظت از مواد استفاده شده در آزمایش گروه کنترل به کار برده شد. (در تصاویر به عنوان گروه Normal نام گذاری شده است.)

بدین منظور پس از زمان های مذکور ۲۰ میکرولیتر از محلول رنگ MTT به هر چاهک اضافه کرده و به مدت ۴ ساعت انکوباسیون ادامه یافت. در مرحله بعد مایع رویی حذف و ۱۰۰ میکرولیتر DMSO به هر چاهک اضافه شد. بعد از یک دقیقه تکان به نسبت شدید پلیت ها، جذب در طول موج ۵۷۰ نانومتر با استفاده از ELISA reader خوانده شد. همچنین جهت بررسی اثر سمیت مخلوط دو ماده مذکور بر اساس نتایج اولیه از غلظت های ۲۵، ۵۰ و

۱۰۰ میلی گرم در میلی لیتر در درصدهای ذکر شده در ساعت های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ در تست MTT بررسی شدند.

آنالیز آماری

تمامی آزمایش ها به صورت ۵ تکرار مستقل از هم به صورت دوتایی انجام شد. از نتایج اولیه به دست آمده میانگین گرفته شد و جهت آنالیز آماری از نرم افزار Graph pad prism v6 استفاده شد و با آزمون ANOVA آثار بیولوژیک تیمارهای این مطالعه مورد بررسی آماری قرار گرفت.

نتایج

نتایج سمیت سلولی ماده هیدروکسید کلسیم در رده

سلولی L929

نتایج سمیت سلولی پس از ساعت ۶

نتیجه سمیت سلولی پس از شش ساعت تیمار با هیدروکسید کلسیم نشان می دهد که در هیچ یک از غلظت های مذکور نسبت به سلول تیمار نشده سمیت سلولی مشاهده نشده است ($p > 0/2396$).

نتایج سمیت سلولی پس از ساعت ۱۲

نتیجه سمیت سلولی پس از ۱۲ ساعت بعد از تیمار با هیدروکسید کلسیم نشان می دهد که هیچ یک از رقت های مذکور نسبت به سلول تیمار نشده سمیت سلولی مشاهده نشده است ($p > 0/0828$).

نتایج سمیت سلولی پس از ساعت ۲۴

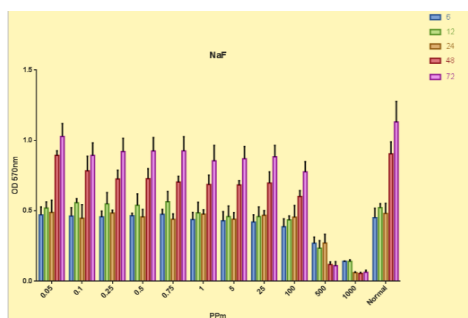
نتایج سمیت سلولی پس از ۲۴ ساعت نسبت به سلول تیمار نشده نشان می دهد که در هیچ یک از رقت ها اختلاف معنی داری نشان نداده است ($P > 0/0703$).

نتایج سمیت سلولی پس از ساعت ۴۸

نتایج سمیت سلولی پس از ۴۸ ساعت نسبت به سلول تیمار نشده نشان می دهد در غلظت های ۰/۱، ۰/۵، ۰/۷۵، ۱، ۵، ۲۵ و ۵۰۰ اختلاف معنی داری در سمیت سلولی از خود نشان داده است ($P < 0/0069$). همچنین پس از ۴۸ ساعت در غلظت های ۱۰۰ و ۱۰۰۰ سمیت سلولی نسبت به سلول تیمار نشده در حد بوردر لاین بوده است.

نتایج سمیت سلولی پس از ساعت ۷۲

پس از ۷۲ ساعت تیمار با هیدروکسید کلسیم به غیر از غلظت ۰/۰۵ تمامی غلظت های دیگر نسبت به سلول های



شکل ۲. نتایج سمیت سلولی سدیم فلوراید در رده سلولی L929

نتایج سمیت مخلوط ماده هیدروکسید کلسیم ۲۵٪ و ماده فلوراید سدیم ۷۵٪

نتایج سمیت سلولی پس از ۲۴ ساعت

نتایج در ساعت ۲۴ نشان می‌دهد که در غلظت ۲۵ ppm از هیدروکسید کلسیم و یا سدیم فلوراید نسبت به سلول تیمار نشده منجر به سمیت سلولی به صورت معنادار شده‌اند ($p < 0.0394$). اما مخلوط این دو نسبت به سلول تیمار نشده سمیت سلولی نشان نداده است ($P = 0.1689$). این موضوع نشان می‌دهد که مخلوط دو ماده سمیت کمتری نسبت به دو ماده به تنهایی داشته است.

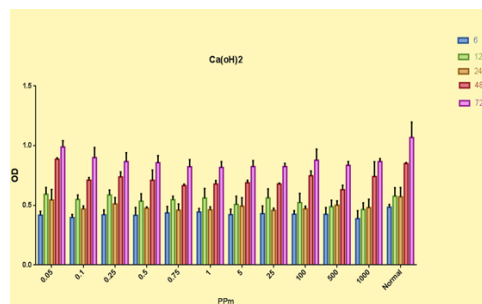
در غلظت ۱۰۰ ppm هر سه ماده نسبت به سلول تیمار نشده سمیت سلولی نشان داده‌اند ($p < 0.0455$). در غلظت ۵۰۰ ppm سدیم فلوراید و مخلوط نسبت به سلول تیمار نشده سمیت سلولی را نشان داده‌اند ($p < 0.0251$). اما هیدروکسید کلسیم نسبت به سلول تیمار نشده سمیت سلولی نشان نداده است ($P = 0.2530$). اما از طرفی اضافه نمودن هیدروکسید کلسیم به سدیم فلوراید سمیت سلولی سدیم فلوراید را کاهش داده است به گونه‌ای که در حالت ترکیب نسبت به سدیم فلوراید تنها افزایش معناداری در بقا سلول‌ها مشاهده شده است ($P = 0.0251$).

نتایج سمیت سلولی پس از ۴۸ ساعت

نتایج در ساعت ۴۸ در غلظت ۲۵ ppm نشان می‌دهد که هیدروکسید کلسیم و سدیم فلوراید نسبت به سلول تیمار نشده منجر به سمیت سلولی معنادار شده‌اند (0.0001). اما ترکیب این دو در سمیت سلولی منجر به کاهش سمیت سلولی شده است به گونه‌ای که نسبت به سلول تنها اختلاف معناداری مشاهده نشده است ($P = 0.5439$).

در غلظت ۱۰۰ ppm بعد از ۴۸ ساعت هر سه ماده نسبت به سلول نرمال سمیت نشان داده‌اند ($p < 0.01$).

تیمار نشده سمیت سلولی در حد معنی‌داری از خود نشان داده است ($P < 0.0003$).



شکل ۱. نتایج سمیت سلولی ماده هیدروکسید کلسیم در رده سلولی L929

نتایج سمیت سلولی سدیم فلوراید در رده سلولی L929

نتایج سمیت سلولی پس از ۶ ساعت

نتایج سمیت سلولی سدیم فلوراید در ساعت ۶ نشان می‌دهد که تنها غلظت‌های ۵۰۰ و ۱۰۰۰ نسبت به سلول تیمار نشده سمیت سلولی نشان دادند ($P < 0.0008$).

نتایج سمیت سلولی پس از ۱۲ ساعت

نتایج سمیت سلولی سدیم فلوراید در ساعت ۱۲ نشان می‌دهد که تنها غلظت‌های ۵۰۰ و ۱۰۰۰ نسبت به سلول تیمار نشده سمیت سلولی نشان دادند ($P = 0.0001$).

نتایج سمیت سلولی پس از ۲۴ ساعت

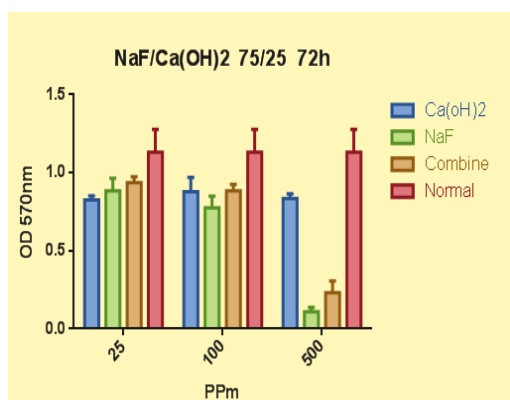
نتایج سمیت سلولی سدیم فلوراید در ساعت ۲۴ نشان می‌دهد که تنها غلظت‌های ۵۰۰ و ۱۰۰۰ نسبت به سلول تیمار نشده سمیت سلولی نشان دادند ($P = 0.0001$).

نتایج سمیت سلولی پس از ۴۸ ساعت

نتایج سمیت سلولی سدیم فلوراید در ساعت ۴۸ نشان می‌دهد که در غلظت‌های ۰/۱، ۰/۵، ۰/۷۵، ۱، ۵، ۲۵ و ۵۰۰ و ۱۰۰۰ نسبت به سلول تیمار نشده سمیت معنی‌داری از خود نشان داده است ($P < 0.0017$).

نتایج سمیت سلولی پس از ۷۲ ساعت

نتایج سمیت سلولی سدیم فلوراید در ساعت ۷۲ نشان می‌دهد از غلظت ۰/۱ تا ۱۰۰۰ تمامی غلظت‌ها در تیمار با سلول فیبروبلاستی نسبت به سلول تیمار نشده موجب سمیت معنی‌داری شده است ($P = 0.0001$).



شکل ۵. سمیت مخلوط ۲۵٪ هیدروکسید کلسیم و ۷۵٪ فلورید سدیم پس از ۷۲ ساعت

نتایج سمیت مخلوط ماده هیدروکسید کلسیم ۵۰٪ و ماده فلورید سدیم ۵۰٪

نتایج سمیت سلولی پس از ۲۴ ساعت

سمیت هیدروکسید کلسیم ۵۰٪ و سدیم فلوراید ۵۰٪ در ساعت ۲۴ در غلظت ۲۵ ppm نشان می‌دهد که هیدروکسید کلسیم و سدیم فلوراید نسبت به سلول تیمار نشده سمیت سلولی نشان می‌دهند ($p < 0.0001$). اما مخلوط این دو نسبت به سلول تیمار نشده هیچ اختلاف معنی‌داری نشان نداده است و به عبارت دیگر هیچ سمیتی نشان نداده است ($p < 0.9996$). در غلظت ۱۰۰ ppm کلسیم هیدروکساید و سدیم فلوراید به سلول تنها سمیت سلولی را نشان داده‌اند ($p < 0.0001$). اما مخلوط این دو نسبت به سلول تیمار نشده سمیت نشان نداده است ($P = 0.7348$). در غلظت ۵۰۰ ppm هیدروکسید کلسیم نسبت به سلول تنها سمیت نداشت ($P = 0.2362$). اما سدیم فلوراید و فرم مخلوط نسبت به سلول تنها سمیت داشت ($p < 0.0001$). اما اضافه نمودن هیدروکسید کلسیم به سدیم فلوراید نسبت به سدیم فلوراید موجب کاهش معنادار سمیت سلولی در حالت مخلوط شده است ($P = 0.0014$).

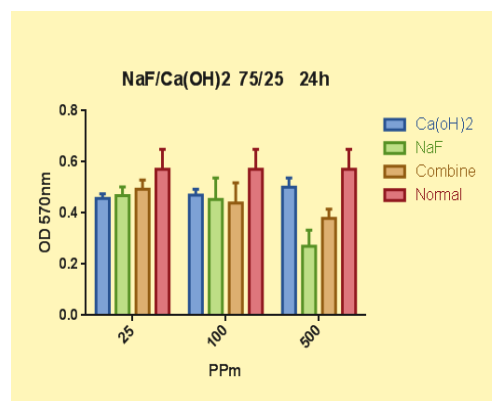
نتایج سمیت سلولی پس از ۴۸ ساعت

سمیت هیدروکسید کلسیم ۵۰٪ و سدیم فلوراید ۵۰٪ در ساعت ۴۸ در غلظت ۲۵ ppm نشان می‌دهد که هر سه ماده نسبت به سلول تنها سمیت معناداری داشته است ($p < 0.0001$). در غلظت ۱۰۰ ppm نیز همین حالت مشاهده شده است. در غلظت ۵۰۰ ppm نیز همین حالت مشاهده شده است اما اضافه نمودن هیدروکسید کلسیم به سدیم فلوراید سمیت سدیم فلوراید را در حالت مخلوط کاهش داده به گونه‌ای که در

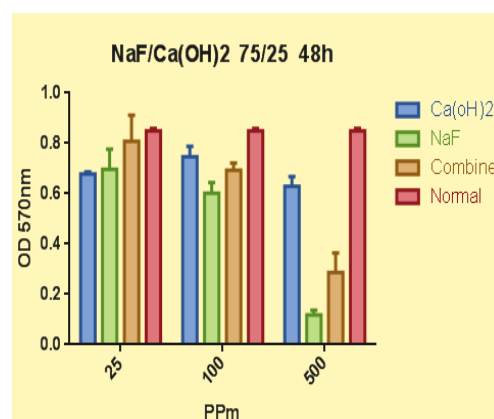
در غلظت ۵۰۰ ppm بعد از ۴۸ ساعت نیز هر سه ماده سمیت معناداری نسبت به سلول نرمال نشان داده‌اند ($p < 0.0001$). ولی اضافه نمودن هیدروکسید کلسیم به سدیم فلوراید منجر به کاهش سمیت سدیم فلوراید شده است به گونه‌ای که حالت ترکیب نسبت به سدیم فلوراید تنها به طور معناداری سمیت سلولی را کاهش داده است ($p < 0.0001$).

نتایج سمیت سلولی پس از ۷۲ ساعت

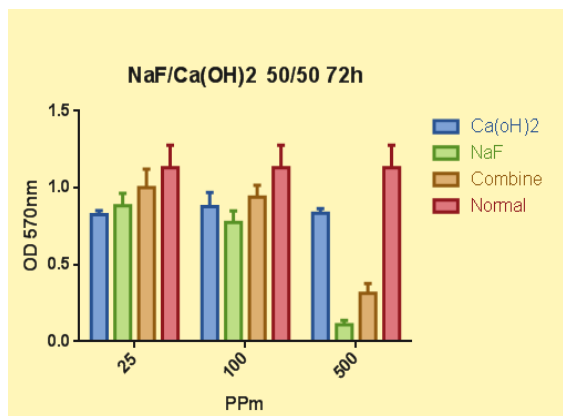
نتایج بعد از ۷۲ ساعت نشان می‌دهد که در غلظت ۲۵ ppm و ۱۰۰ و ۵۰۰ هر سه ماده نسبت به سلول تنها سمیت معناداری نشان داده‌اند ($p < 0.0064$). اما نکته جالب این که در هر سه غلظت اضافه نمودن هیدروکسید کلسیم به سدیم فلوراید نسبت به سدیم فلوراید تنها سمیت سلولی را کاهش می‌دهد اما این کاهش از نظر آماری معناداری نبوده است ($p > 0.1464$).



شکل ۳. سمیت مخلوط ۲۵٪ هیدروکسید کلسیم و ۷۵٪ فلورید سدیم پس از ۲۴ ساعت



شکل ۴. سمیت مخلوط ۲۵٪ هیدروکسید کلسیم و ۷۵٪ فلورید سدیم پس از ۴۸ ساعت



شکل ۸. سمیت مخلوط ۵۰٪ هیدروکسید کلسیم و ۵۰٪ فلوراید سدیم پس از ۷۲ ساعت

نتایج سمیت مخلوط ماده هیدروکسید کلسیم ۷۵٪ و ماده فلوراید سدیم ۲۵٪

نتایج سمیت سلولی پس از ۲۴ ساعت

سمیت هیدروکسید کلسیم ۷۵٪ و سدیم فلوراید ۲۵٪ در ۲۴ ساعت در غلظت ۲۵ ppm نشان می‌دهد که هیدروکسید کلسیم و سدیم فلوراید تنها نسبت به سلول تنها سمی بودند ($p < 0.0559$). اما مخلوط این دو نسبت به سلول تیمار نشده سمی نبود ($P = 0.7856$). اما در غلظت ۱۰۰ ppm تنها سدیم فلوراید نسبت به سلول تنها سمی بود ($P = 0.0247$). در غلظت ۵۰۰ ppm سدیم فلوراید و مخلوط نسبت به سلول تنها توکسیک بود ($p < 0.0116$). اما فرم مخلوط نسبت به سدیم فلوراید سمیت کمتری داشت ($P = 0.0004$).

نتایج سمیت سلولی پس از ۴۸ ساعت

سمیت هیدروکسید کلسیم ۷۵٪ و سدیم فلوراید ۲۵٪ در ۴۸ ساعت در غلظت ۲۵ ppm نشان می‌دهد که هیدروکسید کلسیم و سدیم فلوراید تنها نسبت به سلول تیمار نشده سمیت معناداری ایجاد کرده است ($p < 0.0002$). اما حالت مخلوط از خود سمیت سلولی نشان نداده است ($P = 0.9926$). در غلظت ۱۰۰ ppm هر دو ماده نسبت به سلول تنها سمی بود ($p < 0.0188$). اما حالت مخلوط نسبت به سلول تنها سمیت نداشت ($P = 0.7192$). هم‌چنین حالت مخلوط نسبت به سدیم فلوراید موجب کاهش معنادار سمیت سلولی شده است ($P = 0.0001$). در غلظت ۵۰۰ ppm سدیم فلوراید و هیدروکسید کلسیم تنها نسبت به سلول تیمار نشده سمیت معناداری نشان داده است ($P = 0.0001$). اما حالت مخلوط نه تنها نسبت به سدیم فلوراید کاهش

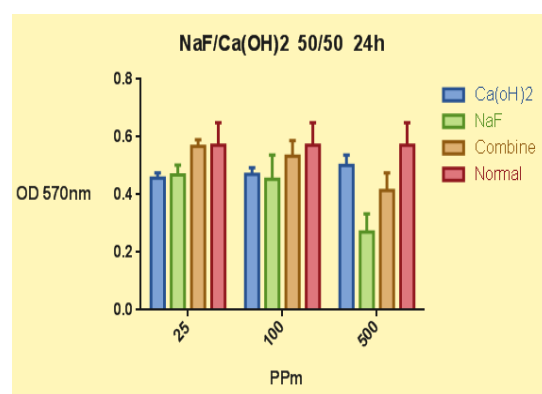
غلظت ۵۰۰ ppm حالت مخلوط نسبت به سدیم فلوراید تنها موجب کاهش معنادار سمیت سلولی شده است ($p < 0.0001$).

نتایج سمیت سلولی پس از ۷۲ ساعت

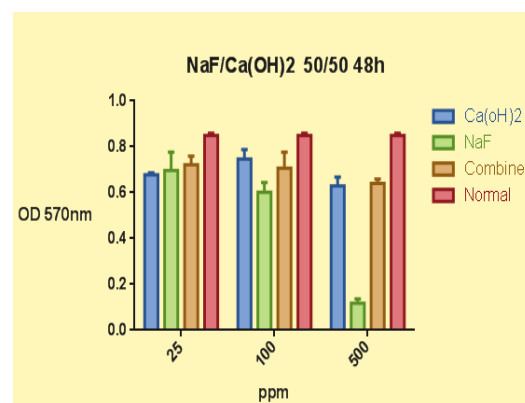
سمیت هیدروکسید کلسیم ۵۰٪ و سدیم فلوراید ۵۰٪ در ۷۲ ساعت در غلظت ۲۵ ppm نشان می‌دهد که هیدروکسید کلسیم و سدیم فلوراید نسبت به سلول تنها سمیت دارد. ($p < 0.0001$).

اما در مخلوط این دو نسبت به سلول تنها سمیت از خود نشان نداده است ($P = 0.1628$). در غلظت ۱۰۰ ppm سه ماده نسبت به سلول تنها سمیت معناداری داشته است ($p < 0.0148$).

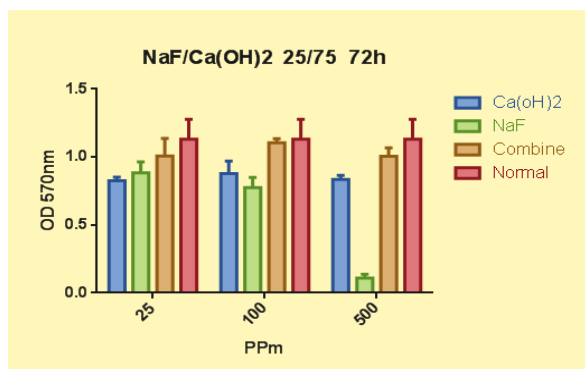
اما حالت مخلوط نسبت به سدیم فلوراید تنها موجب کاهش معنادار سمیت سلولی شده است ($P = 0.0497$). در غلظت ۵۰۰ ppm هر سه ماده نسبت به سلول تنها سمیت معناداری داشته است ($p = 0.0001$). اما حالت مخلوط نسبت به سدیم فلوراید تنها موجب کاهش معنادار سمیت سلولی شده است ($P = 0.0087$).



شکل ۶. سمیت مخلوط ۵۰٪ هیدروکسید کلسیم و ۵۰٪ فلوراید سدیم پس از ۲۴ ساعت



شکل ۷. سمیت مخلوط ۵۰٪ هیدروکسید کلسیم و ۵۰٪ فلوراید سدیم پس از ۴۸ ساعت



شکل ۱۱. سمیت مخلوط ۷۵٪ هیدروکسید کلسیم و ۲۵٪ فلورید سدیم پس از ۷۲ ساعت

بحث

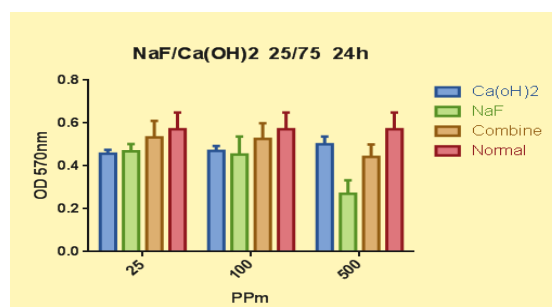
از آنجا که علت اصلی بیماری‌های دندان از میکروارگانیسم‌ها هستند، حذف هر چه بیش‌تر آن‌ها از ملزومات اصلی یک درمان موفق در دندانپزشکی محسوب می‌گردد. از این رو ترکیب‌های متعددی جهت حذف باکتری‌ها و کلیه عوامل عفونی مسبب عوارضی نظیر درد، آبسه و مشکلات عفونی استخوان به کار گرفته می‌شوند (۲،۳). از آنجا که طی درمان ریشه دندان امکان نشت داروهای داخل کانال به ناحیه انتهای ریشه وجود دارد لذا توکسیستی این مواد برای سلول‌های بافت اطراف ریشه می‌تواند مشکل‌ساز باشد (۱).

یکی از اهداف درمان کانال ریشه دندان، حذف باکتری‌های داخل کانال تا حد ممکن است. شستشو دهنده‌های باکتریوسید حین درمان ریشه تا حدی دست‌یابی به این هدف را میسر می‌سازند؛ اما در مواقعی که درمان ریشه به صورت چند مرحله‌ای انجام می‌شود، از داروهای ضد میکروبی داخل کانال نیز می‌توان بهره برد. این داروها علاوه بر اثرهای ضد میکروبی باید سازگاری بافتی نیز داشته باشند و برای سلول‌های بدن سمیت نداشته باشند. رایج‌ترین داروی داخل هیدروکسید کلسیم است که با وجود اثرهای ضد باکتریایی و سازگاری بافتی مناسب، به دلیل عدم تأثیر بر برخی میکروارگانیسم‌های عفونت‌زای داخل کانال مانند انتروکوک فکالپس و کاندیدا آلبیکانس و همین‌طور شکننده شدن عاج در مصرف طولانی مدت آن، انتظارات ما را از این ماده به عنوان یک داروی ایده آل فراهم نمی‌سازد (۲،۳). از این در این مورد نیاز به جایگزینی برای هیدروکسید کلسیم احساس می‌شود. ایده اصلی در این مطالعه بر این استوار است که با توجه به این‌که اثر میکروب‌کشی سدیم فلوراید بسیار قوی‌تر است. اما هم‌زمان سمیت بالایی بر روی سلول‌های

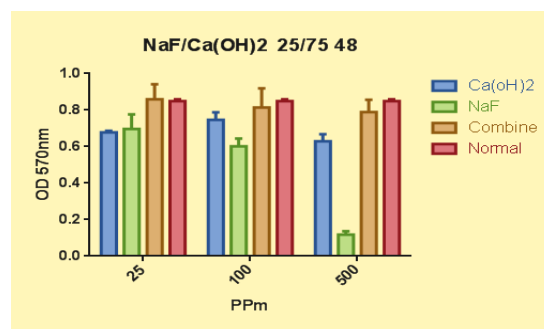
معنادار سمیت سلولی شده است ($P=0/0001$). بلکه نسبت به سلول تنها هیچ‌گونه سمیت سلولی از خود نشان نداده است ($P=0/2963$).

نتایج سمیت سلولی پس از ۷۲ ساعت

سمیت سلولی مخلوط هیدروکسید کلسیم ۷۵٪ و سدیم فلوراید ۲۵٪ در ۷۲ ساعت در غلظت ۲۵ ppm نشان می‌دهد که هیدروکسید کلسیم و سدیم فلوراید تنها نسبت به سلول تیمار نشده سمیت معناداری ایجاد کرده است ($p<0/0008$). اما حالت مخلوط سمیت سلولی نسبت به سلول تیمار نشده از خود نشان نداد ($P=0/1906$). در غلظت ۱۰۰ ppm دو ماده مذکور نسبت به سلول تیمار نشده سمیت معنادار سلولی داشت ($p<0/0006$). اما حالت مخلوط نه تنها نسبت به سدیم فلوراید موجب کاهش معنادار سمیت سلولی شده است ($P=0/0001$). بلکه نسبت به سلول تنها هیچ‌گونه سمیت سلولی از خود نشان نداد ($P=0/9714$). در غلظت ۵۰۰ ppm بعد از ۷۲ ساعت هیدروکسید کلسیم و سدیم فلوراید تنها نسبت به سلول تیمار معناداری از خود نشان داد ($P=0/0001$). اما حالت مخلوط نه تنها نسبت به سدیم فلوراید تنها موجب کاهش معنادار سمیت سلولی شده است ($P=0/0001$). بلکه نسبت به سلول تیمار نشده هیچ‌گونه سمیت از خود نشان نداده است ($P=0/1708$).



شکل ۹. سمیت مخلوط ۷۵٪ هیدروکسید کلسیم و ۲۵٪ فلورید سدیم پس از ۲۴ ساعت



شکل ۱۰. سمیت مخلوط ۷۵٪ هیدروکسید کلسیم و ۲۵٪ فلورید سدیم پس از ۴۸ ساعت

مطالعه حاضر مبنی بر سمیت پایین هیدروکسید کلسیم هم خوانی دارد.

هیدروکسید کلسیم در صنعت پزشکی به خصوص دندان-پزشکی بسیار کاربرد دارد. اما ضعف های دیگر این ماده از جمله تضعیف و شکننده کردن ساختار دندان و نیز عدم تأثیر بر باکتری انتروکوک فکاليس، انتظارات مصرف کنندگان از این ماده را به عنوان، یک داروی داخل کانال به طور کامل بر آورده نمی سازد (۷،۱۸). فلوراید، ترکیب طبیعی عنصر فلورئور است که در طبیعت به وفور یافت می شود و به طور معمول به صورت ترکیب با کلسیم (CaF_2) دیده می شود این ماده به شدت آنتی میکروبیال است اما همان گونه که در مطالعه حاضر نیز به اثبات رسید برای سلول ها فیبروبلاست نیز به شدت توکسیک است (۱۹،۲۰). فلوراید قادر است میکروارگانیسم هایی مانند اشرشیاکلی و کاندیدا آلبیکانس و انتروکوک فکاليس را در غلظت ۲۵۰ میلی مولار از بین ببرد (۲۱،۲۲). از سوی دیگر جذب بیش از حد فلوراید توسط بدن، به خصوص در مناطقی با فلوراید آب بالا، می تواند منجر به فلوروزیس دندانی (دندان های خال دار) شود (۲۳). این ماده با توجه به مطالعه های گذشته اثر سایتوتوکسیک بسیار زیادی دارد. بنابراین کاهش سمیت این ماده با یک عامل فرعی شاید آن را در جهت مصارف دندان پزشکی مفید سازد (۲۴). بدین منظور در مرحله بعد از مخلوط این ماده در مطالعه های سمیت سلولی استفاده شد و نتایج در نسبت های مختلف مخلوط شده و غلظت های متعدد نشان داده است که سمیت سدیم فلوراید در مخلوط با کلسیم هیدروکسید کاهش می یابد به گونه ای که حتی در غلظت ۵۰۰ سمیت سدیم فلورید وقتی که با کلسیم هیدروکسید مخلوط شد با سلول تیمار نشده اختلاف معنی داری از خود نشان نداده است و این بدان معنی است که این استراتژی سمیت سدیم فلوراید را حذف می نماید.

به نظر می رسد در این روشن غلظت مخلوط نیز مؤثر است زیرا زمانی که پودر هیدروکسید کلسیم به فلورید سدیم اضافه شد سمیت فلورید سدیم کاهش پیدا کرد و در غلظت ۵۰۰ این تأثیر به خوبی مشاهده شد. این کاهش سمیت در غلظت های بالای ۱۰۰ نیز مشاهده شد اما غلظت های پایین تر از ۲۵ این اثر کم تر بوده است که این نشان دهنده

فیبروبلاستی دارد آیا می توان استفاده از مخلوط هیدروکسید کلسیم و سدیم فلوراید به ماده ای رسیده که سمیت کمتری داشته باشد و بتوان جهت ضد عفونی نمودن دندان استفاده نمود. لذا در فاز اول تحقیق سمیت این مخلوط بر رده فیبروبلاستی L929 مورد بررسی قرار گرفت (۱۲).

بررسی نتایج سمیت هیدروکسید کلسیم پس از سه روز مجاورت با سلول حساس تنها در ساعت ۷۲ سمیت سلولی از خود نشان داده است. در حالی که نتایج سمیت فلورید سدیم در شرایط یکسان مطالعاتی در زمان های ۶، ۱۲ و ۲۴ در غلظت های ۵۰۰ و ۱۰۰۰ سمیت سلولی از خود نشان داده است. اما پس از ۴۸ و ۷۲ ساعت در غلظت های ۰/۱ تا به ۱۰۰۰ به طور کامل سمیت سلولی از خود نشان داده است. این نتایج در مرحله اول نشان می دهد که سدیم فلورید نسبت به هیدروکسید کلسیم بسیار توکسیک تر است و این سمیت وابسته به دوز و زمان است به گونه ای که در ساعت های ۴۸ و ۷۲ سمیت بیش تری از خود نشان داده و این یافته مورد تأیید مطالعه های گذشته است (۱۳،۱۴).

از سوی دیگر یافته های این مطالعه در خصوص سمیت بسیار پایین هیدروکسید کلسیم با مطالعه های قبلی نیز هم خوانی دارد. از جمله این مطالعه ها می توان به مطالعه Willershausen و همکارانش (۱۰) در سال ۲۰۱۳ اشاره نمود. آن ها سمیت بسیار پایینی برای هیدروکسید کلسیم روی سلول های فیبروبلاست لثه و سلول های اپیتلیال توموری گزارش کردند که با مطالعه حاضر هم خوانی داشت. هم چنین دکتر Arab و همکارانش در سال ۲۰۰۶ (۱۵) اثر سایتوتوکسیسیته پانسمان پرپودنتال که حاوی هیدروکسید کلسیم بود را همانند این مطالعه بر روی سلول های فیبروبلاستی L929 در محیط آزمایشگاهی بررسی کردند و به این نتیجه رسیدند که هیدروکسید کلسیم در غلظت های مختلف اثر کمی بر رشد سلول داشته است. در ادامه Ozdemir و همکاران در سال ۲۰۰۹ (۱۶) سمیت سلولی هیدروکسید کلسیم را با تری کلسیم فسفات مقایسه نمود که نتایج این مطالعه با یافته های حاصل از مطالعه حاضر نیز هم خوانی داشت. در انتها می توان به مطالعه Estrela و همکاران (۱۷) در سال ۲۰۱۸ اشاره نمود. نتایج آن ها با نتایج

این است که هیدروکسید کلسیم اثر سایتوتوکسیسیتی سدیم فلوراید را با توجه به نسبت غلظت کاهش می دهد.

اگر چه از سدیم فلوراید به علت سمیت بالای این ماده به تنهایی در دندانپزشکی استفاده نمی شود (۲۵) اما به نظر می رسد بتوان از مخلوط این مواد استفاده کرد. تحت شرایط این مطالعه میزان سمیت هیدروکسید کلسیم به تنهایی بسیار کم است. از طرف دیگر میزان سمیت فلورید سدیم به تنهایی بسیار بالا بود ولی در ترکیب این دو پودر با همدیگر، هیدروکسید کلسیم اثر سمیت فلورید سدیم را به حد خوبی کاهش داده است به گونه ای که در برخی غلظت ها و ساعت های سنجش استفاده از فرم مخلوط نسبت به سلول تیمار نشده هیچ گونه سمیتی از خود نشان نداده است در حالی که در برخی از این موارد فرم تنهای هر دو سمیت سلولی از خود نشان داده بود.

بنابراین با توجه نتایج به دست آمده و ویژگی حائز اهمیت ترکیب هیدروکسید کلسیم-فلورید سدیم که هر ترکیب مکمل نواقص ترکیب مقابل خود است و هر یک به تنهایی نمی توانند به عنوان یک داروی اثربخش جهت درمان استفاده شوند لذا این ترکیب جدید به عنوان داروی موثر در درمان ریشه چند جلسه ای می تواند موثر واقع شود.

ترکیب جدید و هدفمند هیدروکسید کلسیم-فلورید سدیم که در آن فلورید سدیم با اثر ضد میکروبی اش و هیدروکسید کلسیم با سمیت بسیار کم اش، کاندید ایده آل برای درمان ریشه به صورت چند جلسه ای معرفی می گردد. در نتیجه این طور به نظر می رسد استفاده از این ترکیب بر روی سلول های دندانی درمان مؤثرتری را فراهم می نماید.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله بدین وسیله مراتب تشکر و قدردانی خود را از مسئولین محترم دانشکده علوم و فناوری نوین واحد تهران پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی جهت فراهم آوردن امکانات پژوهشی برای انجام این تحقیق ابراز می دارند.

1. Cobb CM, Sottosanti JS. A re-evaluation of scaling and root planing. *Journal of Periodontology*. 2021 Oct;92(10):1370-8.
2. Makvandi P, Josic U, Delfi M, Pinelli F, Jahed V, Kaya E, Ashrafizadeh M, Zarepour A, Rossi F, Zarrabi A, Agarwal T. Drug delivery (nano) platforms for oral and dental applications: tissue regeneration, infection control, and cancer management. *Advanced Science*. 2021 Apr;8(8):2004014.
3. Sinha DK, Kumar C, Gupta A, Nayak L, Subhash S, Kumari R. Knowledge and practices about sterilization and disinfection. *Journal of family medicine and primary care*. 2020 Feb;9(2):793.
4. Lei X, Wang J, Chen J, Gao J, Zhang J, Zhao Q, Tang J, Fang W, Li J, Li Y, Zuo Y. The in vitro evaluation of antibacterial efficacy optimized with cellular apoptosis on multi-functional polyurethane sealers for the root canal treatment. *Journal of Materials Chemistry B*. 2021;9(5):1370-83.
5. Patel E, Pradeep P, Kumar P, Choonara YE, Pillay V. Oroactive dental biomaterials and their use in endodontic therapy. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. 2020 Jan;108(1):201-12.
6. Jimenez-Gonzalez HA, Nakagoshi-Cepeda MA, Nakagoshi-Cepeda SE, Urrutia-Baca VH, La Garza-Ramos D, Angélica M, Solis-Soto JM, Gomez-Flores R, Tamez-Guerra P. Antimicrobial Effect of Calcium Hydroxide Combined with Electrolyzed Superoxidized Solution at Neutral pH on *Enterococcus faecalis* Growth. *BioMed Research International*. 2021 Nov 9;2021.
7. Farhad, A., Barekatin, B., Allameh, M., Narimani, T., Evaluation of the antibacterial effect of calcium hydroxide in combination with three different vehicles: An in vitro study. *Dental research journal*, 2012. 9(2): p. 167-72.
8. Sahebi, S., Nabavizadeh, M., Dolatkah, V., Jamshidi, D., Short term effect of calcium hydroxide, mineral trioxide aggregate and calcium-enriched mixture cement on the strength of bovine root dentin. *Iranian endodontic journal*, 2012. 7(2): p. 68- 73.
9. Al-Saleh S, Tulbah HI, Al-Qahtani AS, Binhasan M, Shabib S, Farooq I, Vohra F, Abduljabbar T. The influence of calcium fluoride nanoparticles' addition on the bond integrity, degree of conversion, ion-release, and dentin interaction of an adhesive. *Applied Nanoscience*. 2022 Feb 7:1-2.
10. Willershausen I, Wolf T, Kasaj A, Weyer V, Willershausen B, Marroquin BB. Influence of a bioceramic root end material and mineral trioxide aggregates on fibroblasts and osteoblasts. *Archives of oral biology*. 2013 Sep 1;58(9):1232-7.
11. Bhawalkar A, Mulay S, Shetty R. Antimicrobial Effectiveness Of Various Drug Combinations Used As Intracanal Medicaments-A Systematic Review. *Pravara Medical Review*. 2020 Dec 1;12(4).
12. Eldeniz, A., Mustafa, K., Orstavik, D., Dahl, J. , Cytotoxicity of new resin-, calcium hydroxide-and silicone-based root canal sealers on fibroblasts derived from human gingiva and L929 cell lines. *International endodontic journal*,, 2007. 40(5): p. 329-37.
13. Salomão, P.M.A., et al., The cytotoxic effect of TiF4 and NaF on fibroblasts is influenced by the experimental model, fluoride concentration and exposure time. *PloS one*, 2017. 12(6): p. e0179471.
14. Salomão, P.M.A., et al., TiF4 and NaF varnishes induce low levels of apoptosis in murine and human fibroblasts through mitochondrial Bcl-2 family and death receptor signalling. *Archives of oral biology*, 2019. 97: p. 245-252.

15. Arab, H., Afshari, J., Taghavi, M., Sargolzaei, G., Brog, N., In-vitro evaluation of periodontal dressing plus calcium hydroxide on L929 fibroblast cells. *Journal of Dentistry Mashhad University of Medical Sciences*, 2006. 29(3): p. 279-88.
16. Özdemir, J., Comparison of the cytotoxicity of calcium hydroxide and tricalcium phosphate,. *Int Endod J*, 2009. 40(2): p. 112-118.
17. Estrela C, Decurcio DD, Rossi-Fedele G, Silva JA, Guedes OA, Borges ÁH. Root perforations: a review of diagnosis, prognosis and materials. *Brazilian oral research*. 2018 Oct 18;32.
18. Barczak K, Palczewska-Komsa M, Sikora M, Buczkowska-Radlińska J. Biodentine™—use in dentistry. Literature review. *Pomeranian Journal of Life Sciences*. 2020 Jun 17;66(2).
19. Ülker M, Çelik AC, Yavuz E, Kahvecioğlu F, Ülker HE. Real-Time Analysis of Antiproliferative Effects of Mouthwashes Containing Alcohol, Sodium Fluoride, Cetylpyridinium Chloride, and Chlorhexidine In Vitro. *BioMed Research International*. 2021 Oct 12;2021.
20. Erdem U, Dogan M, Metin AU, Baglar S, Turkoz MB, Turk M, Nezir S. Hydroxyapatite-based nanoparticles as a coating material for the dentine surface: An antibacterial and toxicological effect. *Ceramics International*. 2020 Jan 1;46(1):270-80.
21. Barnkggei, I., Halboub, ES., Alboni, RS., Pulpotomy of symptomatic permanent teeth with carious exposure using mineral trioxide aggregate. *Iranian endodontic journal*, 2013. 8(2): p. 65-8.
22. Breaker, R., New insight on the response of bacteria to fluoride. *Caries research*, 2012. 46(1): p. 78-81.
23. Revelo-Mejía IA, Hardisson A, Rubio C, Gutiérrez ÁJ, Paz S. Dental fluorosis: the risk of misdiagnosis—a Review. *Biological Trace Element Research*. 2021 May;199(5):1762-70.
24. Gutiérrez-Salinas, J., Morales-González, JA., Madrigal-Santillán, E., Esquivel-Soto, J., Esquivel-Chirino, C., Suástegui-Domínguez, S., Exposure to sodium fluoride produces signs of apoptosis in rat leukocytes. *International journal of molecular sciences*, 2010. 11(9): p. 3610-22.
25. Tadin, A., et al., In vivo evaluation of fluoride and sodium lauryl sulphate in toothpaste on buccal epithelial cells toxicity. *Acta Odontologica Scandinavica*, 2019. 77(5): p. 386-393.