

## اثرات سیتوتوکسیک کلرگزیدین 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 کلرگزیدین به باکتری محدود نبوده و برای انواع سلول‌ها از جمله اسپرم، نوتروفیل، ماکروفاژ، سلول اپی‌تلیال، اریتروسیت و فیبروبلاست لته نیز سیتوتوکسیک است.

**هدف:** این مطالعه به منظور تعیین اثر سیتوتوکسیک کلرگزیدین بر روی فیبروبلاست‌های رده L929 موش انجام شد.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه تجربی، فیبروبلاست‌های L929 موش در محیط کشت حاوی FBS با غلظت‌های ۰/۲، ۰/۱۲ و ۰/۰۰۹ درصد کلرگزیدین به مدت 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 به مدت ۴ ساعت انکوبه شدند. سیتوتوکسیسیته کلرگزیدین، 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 سیتوتوکسیسیته نیست. در نهایت دانسیته اپتیک تغییرات رنگ توسط ELISA-reader اندازه گیری شد.

**یافته‌ها:** کلرگزیدین 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 کلرگزیدین در غلظت‌ها و زمان‌هایی کمتر از موارد کاربرد بالینی، کاربرد محتاطانه کلرگزیدین و انجام مطالعات مشابه برای تعیین غلظت مؤثر و ایمن پیشنهاد می‌شود.

**کلید واژه‌ها:** کلرگزیدین، فیبروبلاست، سیتوتوکسیک، لته

\* استادیار پرودونتیکیس دانشکده دندان پزشکی دانشگاه علوم پزشکی قزوین

\*\* دانش آموخته دندان پزشکی دانشگاه علوم پزشکی قزوین

آدرس مکاتبه: قزوین، دانشگاه علوم پزشکی، دانشکده دندان پزشکی، بخش پرودونتیکیس، تلفن: ۰۲۸۱-۳۳۵۳۰۶۴

✉Email: [Dr\\_s\\_Vahabi@yahoo.com](mailto:Dr_s_Vahabi@yahoo.com)

**\* مقدمه :**

با توجه به ماهیت عفونی بیماری لثه به‌عنوان یکی از بیماری‌های شایع مسوول 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 کلرگزیدین در برنامه بهداشت دهان و دندان استفاده می‌شود.<sup>(۱و۳)</sup>

به‌نظر نمی‌رسد ویژگی‌های توکسیک کلرگزیدین تنها مختص به باکتری باشد.<sup>(۲)</sup> مطالعه‌های مختلف نشان داده است که کلرگزیدین برای انواعی از سلول‌ها از جمله اسپرم، لکوسیت پلی مورفونوکلتر، ماکروفاژ، سلول اپی‌تلیال پوست، اریتروسیت و فیبروبلاست لثه کشنده است.<sup>(۳و۴و۵)</sup> فیبروبلاست‌ها سلول غالب لیگامان پریدنتال هستند و با توجه به نقش کلیدی آنها در حفظ سلامت لثه و بافت‌های اطراف دندان، اثرات سیتوتوکسیک عوامل شیمیایی از جمله کلرگزیدین روی فیبروبلاست‌ها دارای اهمیت است.<sup>(۶)</sup>

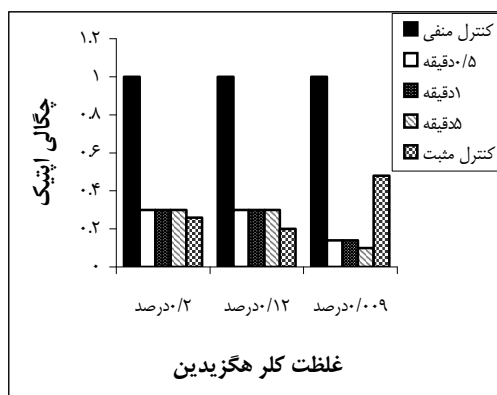
با توجه به اینکه دهان‌شویه‌ها به‌خصوص انواع ایرانی از نظر عوارض بیولوژیک کمتر مورد مطالعه قرار گرفته‌اند، این تحقیق به‌منظور تعیین اثر سیتوتوکسیک کلرگزیدین روی فیبروبلاست‌های کشت داده شده از رده L929 موش انجام شد تا در صورت سمی بودن این ماده از کاربرد بی‌رویه آن خودداری شده یا از غلظتی با حداقل عوارض زیست‌شناختی 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 لاندرا رسانیده شد و پلیت‌ها به‌مدت ۲۰ ساعت انکوبه شدند. با توجه به این که کلرگزیدین ایرانی در غلظت ۰/۲ درصد موجود است، غلظت‌های ۰/۱۲ و ۰/۰۹ درصد با محاسبه حجم مورد نیاز از کلرگزیدین بر حسب میلی‌لیتر درون حلال تهیه شد. به‌منظور رقیق کردن کلرگزیدین 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 کلرگزیدین 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 کلرگزیدین فاقد سرم باشد؛ زیرا محیط دارای سرم باعث رسوب کلرگزیدین می‌شود.<sup>(۳)</sup> کلرگزیدین 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.<sup>(۶)</sup> رنگ MTT به میزان ۰/۱ محیط کشت یعنی ۱۰ لاندرا 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)

### نمودار ۱ - چگالی اپتیک (حیات سلولی) فیروبلاستها بر اساس غلظت و زمان مجاورت کلر هگزیدین



در غلظت ۰/۰۹ 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 کلر هگزیدین در غلظت ۰/۰۹ درصد در زمان ۳۰ ثانیه به اندازه کنترل مثبت (آب مقطر) نیست. در مورد هر یک از غلظت‌های کلر هگزیدین نیز اختلاف معنی‌داری بین زمان‌های مختلف وجود نداشت.

#### \* بحث و نتیجه گیری :

این مطالعه نشان داد که کلر هگزیدین با غلظت ۰/۲ درصد در هر سه زمان ۰/۵، ۱ و ۵ دقیقه برای فیروبلاست‌های رده L929 موش سیتوتوکسیک است که با مطالعه‌های مشابه مطابقت دارد.<sup>(۹و۸)</sup> تعدادی از مطالعه‌های انجام شده بر روی مدل‌های حیوانی، عدم وجود اثر سوء کلر هگزیدین ۰/۲ درصد را نشان داده‌اند و در آنها تنها به جنبه‌هایی مثل رشد و تولید مثل رت، تکثیر سلول‌های اپی‌تلیال رت یا آثار سوء ناشی از تزریق اینتراکرنیال کلر هگزیدین پرداخته شده است.<sup>(۵)</sup> کلر هگزیدین با غلظت ۰/۱۲ درصد نیز در هر سه زمان مورد مطالعه برای فیروبلاست‌های رده L929 موش سیتوتوکسیک بود که موافق با یافته‌های مطالعات قبلی با این غلظت از کلر هگزیدین است.<sup>(۳و۴و۱۰)</sup>

است که قدرت تبدیل بلورهای نامحلول فرمازان را به حالت محلول داشته‌اند.

این عمل برای هر یک از غلظت‌ها و زمان‌ها ۱۵ مرتبه (یعنی در ۱۵ چاهک) انجام شد. نمونه‌های کنترل مثبت و کنترل منفی در هر یک از پلیت‌ها وجود داشت. کنترل مثبت نمونه‌هایی بود که سیتوتوکسیسیته در آنها مثبت بود و اکثر قریب به اتفاق سلول‌ها در آن مرده بودند. برای تهیه این نمونه‌ها در چاهک‌های حاوی فیروبلاست، آب مقطر سرد تحت فشار وارد شد تا غشای سلولی پاره شود و سلول از بین برود. کنترل منفی نمونه‌هایی بود که سیتوتوکسیسیته در آنها منفی و شامل چاهک‌هایی بود که فیروبلاست‌ها در محیط کشت بدون مجاورت با کلر هگزیدین قرار داشتند.

قبل از انجام آزمایش اصلی، یک مطالعه پایلوت با غلظت‌های مورد نظر و زمان‌های ۱، ۵ و ۱۵ دقیقه انجام شد. به علت سیتوتوکسیسیته بالای کلر هگزیدین زمان مجاورت در آزمایش اصلی کاهش یافت و از زمان‌های ۰/۵، ۱ و ۵ دقیقه استفاده شد. نتایج حاصل بر اساس چگالی نوری (optical density) رنگ ایجاد شده ارزیابی شد؛ به‌گونه‌ای که عدد بزرگتر نشان‌دهنده حیات تعداد بیشتری از سلول‌ها بود.

جهت بررسی تفاوت بین زمان‌ها و غلظت‌های مختلف کلر هگزیدین بر روی فیروبلاست از آزمون آماری ANOVA (scheffe) با خطای نوع اول کمتر از ۰/۰۱ استفاده شد.

#### \* یافته‌ها :

تمام غلظت‌های مورد مطالعه کلر هگزیدین (۰/۰۲، ۰/۱۲ و ۰/۰۹ درصد) در سه زمان ۳۰ ثانیه، ۱ دقیقه و ۵ دقیقه بر روی فیروبلاست‌ها اثر سیتوتوکسیک داشت، ولی تفاوت بین غلظت‌های مختلف از نظر آماری معنی‌دار نبود (نمودار شماره ۱).

استفاده بالینی استفاده شد. همچنین به دلیل این که دهان شویه کلرهگزیدین چند دفعه در روز استفاده می شود و حتی گاهی به علت تجویز بی مورد، مورد استفاده روزمره قرار گرفته و در مجموع زمان طولانی تری در تماس با بافت های دهانی قرار می گیرد، از زمان های طولانی تری نسبت به کاربرد معمول بالینی استفاده شد.

کاربرد کلرهگزیدین در مواردی که عملکرد سد اپی تلیال دچار آسیب شده، مثلاً در حین و یا بلافاصله بعد از جراحی و با جرم گیری زیر لثه می تواند با تماس مستقیم با فیبروبلاست ها عواقب مهمی در پی داشته باشد. در مجموع این مطالعه با توجه به سیتوتوکسیسیته کلرهگزیدین در غلظت هایی پایین تر از کاربرد بالینی، استفاده محتاطانه از آن را توصیه و مطالعات دیگری را بر روی فیبروبلاست ها و سایر سلول های انسان در شرایطی نزدیک به کاربرد بالینی پیشنهاد می نماید.

#### \* سپاسگزاری :

از شورای پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی قزوین در تأمین هزینه های این پایان نامه دندان پزشکی قدرانی می شود.

#### \* 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

در مطالعه فلوترا و مبانکن هم که به صورت in vivo انجام شده، تأثیر سوء کلرهگزیدین ۰/۱۲ درصد به ترتیب روی ترمیم زخم و مخاط دهان مشخص شده است. (۱۱۹)

کلرهگزیدین با غلظت ۰/۰۰۹ درصد نیز در هر سه زمان مورد مطالعه برای فیبروبلاست های 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 غلظت های ۰/۰۰۵ و ۰/۰۰۲ درصد استفاده شده که طبق نتایج این مطالعه، کلرهگزیدین ۰/۰۰۵ درصد روی تعداد سلول ها 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 فیبروبلاست ها ارزیابی شده است. برای سنجش این جنبه سلولی از رنگ آمیزی MTT که وابسته به احیای رنگ توسط آنزیم های میتوکندریایی است، استفاده شد. در سایر مطالعات از روش هایی مثل رنگ آمیزی تریپان بلو، رادیو ایزوتوپ ها و یا شمارش سلولی استفاده شده است. (۳ و ۴)

حذف عوامل مداخله گر 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 به منظور رقیق کردن کلرهگزیدین از محیط کشت سلولی استفاده شد تا هرگونه مرگ سلول تنها به علت اثر کلرهگزیدین باشد. البته مواردی مثل پاساژ سلولی به منظور تکثیر و به دست آوردن حجم مناسب سلول ها که خود می تواند بر روی قدرت سلول ها اثر بگذارد، غیر قابل اجتناب بود. به دلیل رقیق شدن کلرهگزیدین توسط مایعات دهانی مثل بزاق و مایع شیار لثه ای و یا مایعات بین سلولی، در این مطالعه و سایر مطالعات از غلظت هایی کمتر از موارد

- 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
- production. *J Periodontol* 1999; 70(12): 1443-8
4. Alleyn CD, O'neal RB, Strong SL, Scheidt MJ, Vandyke TE, Mepfersen 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,