

● مقاله تحقیقی کد مقاله: ۰۳



فعالیت حیاتی سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی انسان در مجاورت با ذرات نانوهیدروکسی آپاتیت

چکیده

زمینه: هیدروکسی آپاتیت $(Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2)(HA)$ یکی از مهم‌ترین بیوسرامیک‌ها برای کاربردهای پزشکی و دندانپزشکی است. ولی حلالیت پایین ذرات منجر به کاهش اثر آن در ساخت استخوان (osteoconductivity) شده و در نتیجه ذرات نانو هیدروکسی آپاتیت (Nano-HA) با داشتن سطح تماس بیشتر و حلالیت بالاتر نسبت به HA معمولی، مورد توجه بسیاری از محققان به عنوان یک گرفت مؤثر و جدید استخوانی واقع شده است. اما مطالعات متعددی نشان دادند که تناقض‌هایی در زمینه‌ی سازگاری زیستی این ذرات وجود دارد. هدف از مطالعه حاضر بررسی سایتوتوکسیسیته‌ی ذرات نانوهیدروکسی آپاتیت بر روی سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی انسان می‌باشد.

روش کار: این مطالعه به صورت تجربی انجام گرفت. پس از استریل نمودن ذرات Nano-HA آن را با غلظت‌های ۱۵.۷۵، ۳۲، ۶۵، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۲۰۰۰، ۴۰۰۰، ۸۰۰۰ ppm تهیه کرده و بر روی ۱۰۵ سلول تک هسته‌ای خون محیطی انسان اثر داده و در پایان ویتالیته سلول‌ها در زمان‌های ۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت با استفاده از تست MTT مورد ارزیابی قرار گرفت. سپس با استفاده از دستگاه ELISA READER میزان جذب نوری سنجیده شد و داده‌های به دست آمده با تست ANOVA آنالیز گشت.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که با افزایش غلظت و نیز زمان فعالیت حیاتی سلول‌ها کاهش یافت، ولی این کاهش از لحاظ آماری معنی‌دار نبود ($P > 0.05$) و کمترین میزان فعالیت حیاتی سلول‌ها در غلظت 8000 ppm بعد از گذشت ۷۲ ساعت می‌باشد (0.220 ± 0.005) اما در گروه کنترل در ۷۲ ساعت برابر با 0.259 ± 0.007 است.

نتیجه‌گیری: نتایج سازگاری ذرات Nano-HA را در مجاورت با سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی انسان نشان داد.

واژگان کلیدی: هیدروکسی آپاتیت، نانو هیدروکسی آپاتیت، سایتوتوکسیسیته، سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی انسان، میزان جذب نوری، سازگاری زیستی.

دکتر حسین شاهون ۱*

رویا حامدی ۲

زهرا یادگاری ۳

ناصر ولایی ۴

۱- استادیار گروه جراحی فک و صورت دانشکده دندانپزشکی دانشگاه شاهد

۲- دانشجوی دانشکده دندانپزشکی دانشگاه شاهد

۳- کارشناس ارشد ایمونولوژی دانشکده دندانپزشکی دانشگاه شهید بهشتی

۴- مشاور آمار حیاتی دانشگاه آزاد اسلامی

* نشانی نویسنده مسؤؤل:

تهران- بلوار کشاورز- خیابان وصال شیرازی- خیابان ایتالیا غربی- دانشکده دندانپزشکی دانشگاه شاهد

تلفکس: ۰۲۱-۸۸۹۶۷۶۱۸

نشانی الکترونیکی:

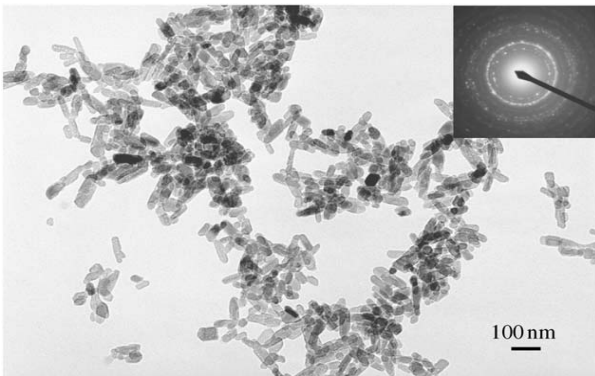
hhamedi@shahed.ac.ir

مواد و روش ها

مطالعه به روش تجربی (Experimental) و در دانشگاه شهید بهشتی و شاهد در سال ۸۸ و ۸۹ به منظور تعیین سایتوتوکسیسیته‌ی ذرات نانوهیدروکسی آپاتیت بر روی سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی انسان انجام گرفت.

۱- تهیه و استریل کردن ذرات Nano-HA

در این مطالعه از پارتیکل‌های Nano-HA با ابعاد زیر 100 nm و ومیله‌ای شکل (تصویر ۱) با خلوص ۹۹٪ ساخت شرکت آلمانی Batch No#20090621 (NANOSHEL) استفاده شد. با استفاده از نور ماورای بنفش به مدت ۲۴ ساعت، پارتیکل‌های Nano-HA استریل گشت.



تصویر ۱- TEM

از (Transmission electron micrograph)

پارتیکل‌های Nano-HA با مقیاس ۱۰۰ نانومتر

۲- جداسازی و کشت سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی انسان (HPBMCs)

برای انجام آزمایش از 10 cc خون هیپارینه فرد داوطلب سالم غیر سیگاری استفاده شد. نمونه با بافر Hanks به نسبت ۱-۱ رقیق گردید و سپس 5 cc خون به آرامی روی 3 cc فایکول ۱۰۷۷ (sigma) ریخته شد. سپس لوله را داخل سانتریفوژ قرار داده و با نیروی 500 g به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. در این مرحله سلول‌های مونونوکلئر در لایه‌ی وسط قرار گرفته، به آرامی آنها را جدا کرده و در لوله‌ی آزمایش استریل ریخته شد. 5 cc محیط کشت GIBCO (RPMI-1640) به آن اضافه گشت و پس از سانتریفیوژ به مدت ۲۰ دقیقه، سوپانسیون سلولی تهیه کرده و با

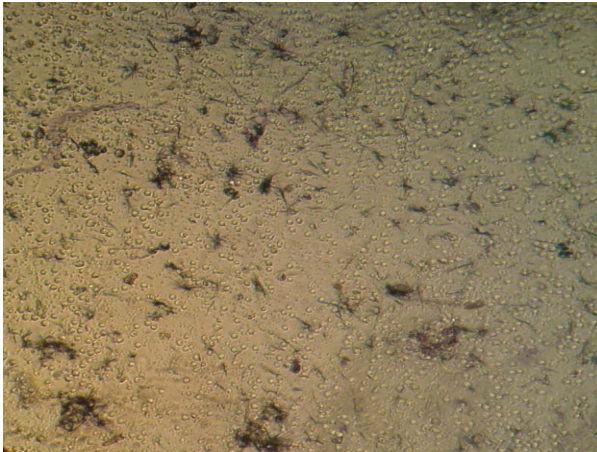
مقدمه

هیدروکسی آپاتیت $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ *HA یک ماده‌ی زیستی مهم و جزء اصلی بخش معدنی استخوان و دندان می‌باشد [۳-۱] که به دلیل داشتن قرابت شیمیایی و بیولوژیکی با ساختمان استخوان و دندان به عنوان یکی از مهم‌ترین بیوسرامیک‌ها برای کاربردهای پزشکی و دندانپزشکی خصوصاً در زمینه‌ی جایگزینی بافت استخوانی مطرح است [۴-۸] اما پروسه‌ی ساخت آن به دما و فشار بالایی نیاز دارد که منجر به کاهش تخلخل و افزایش دانسیته‌ی آن شده و در نتیجه منجر به کاهش حلالیت این ماده در محیط و کاهش اثر ذرات در تحریک ساخت استخوان (osteocoductivity) می‌شود [۹] و در حقیقت بیشتر به عنوان یک فیلر جهت پر کردن نقایص استخوانی به کار می‌رود [۱۰-۱۳]. از طرفی ذرات نانو هیدروکسی آپاتیت (Nano-HA) به دلیل داشتن سطح تماس بیشتر و حلالیت بالاتر، قدرت و کارایی بالاتری نسبت به HA دارند [۱۴] و تحقیقات فراوانی در زمینه‌ی استفاده از ذرات Nano-HA در درمان ضایعات استخوانی پیرونتال [۵]، افزایش osteointegration در ایمپلنت‌ها [۷]، ترمیم پرفوراسیون دندانی [۸]، افزایش رژنراسیون دیفکت‌های استخوانی در ارتوپدی [۹] و همچنین سیستم‌های انتقال دارو و واکسن صورت گرفته است [۱۵]. اما از آنجایی که برای معرفی یک ماده و کاربرد آن در کلینیک، در درجه اول به ارزیابی سمیت این مواد در محیط *in vitro* نیاز است [۱۶-۱۸]، مطالعات متعددی بر روی سازگاری زیستی این ماده صورت گرفته است ولی نتایج حاصل از این مطالعات تناقض‌هایی را در زمینه‌ی سازگاری زیستی این ذرات (Biocompatibility) نشان می‌دهد [۱۱-۱۵]. بنابراین در این مطالعه اثر سایتوتوکسیک پارتیکل‌های Nano-HA (با ابعاد زیر 100 nm و میله‌ای شکل) بر روی سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی انسان HPBMCs** به عنوان سلول‌های دفاعی بدن مورد بررسی قرار گرفت تا در صورت توکسیک نبودن، این بیومتریال به عنوان یکی از جایگزین‌های مؤثر بافت استخوانی مورد استفاده قرار گیرد.

*- Hydroxy Apatite

** - Human peripheral blood mononuclear cells

جذب نوری چاهک‌های Nano-HA مورد قضاوت آماری قرار گرفت.



تصویر ۲- پیکان بلورهای فومارازون تشکیل شده در مجاورت HPBMCs را نشان می‌دهد.

یافته‌ها

تحقیق روی ۱۰ گروه تجربی و ۱ گروه شاهد مجموعاً ۱۱ گروه صورت گرفت و در آن غلظت‌های ۱۵.۵، ۳۱.۲۵، ۶۲.۵، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۲۰۰۰، ۴۰۰۰، ۸۰۰۰ ppm از Nano-HA به مدت ۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت با HPBMCs مجاورت داده شد. میانگین فعالیت حیاتی سلول‌ها بر حسب زمان‌های پیگیری به تفکیک مقادیر مختلف Nano-HA در جدول ۱ آمده است. آزمون ANOVA نشان داد که میزان فعالیت حیاتی سلول‌ها در گروه‌های ۱۰ گانه و زمان‌های پیگیری اختلاف معنی‌دار آماری نداشته است ($P > 0.05$). نتایج نشان داد که با گذشت زمان در تمام گروه‌ها میانگین فعالیت حیاتی سلول‌ها کاهش می‌یابد و کمترین میانگین فعالیت حیاتی سلول‌ها مربوط به غلظت 8000 ppm بعد از گذشت ۷۲ ساعت می‌باشد (۰.۰۰۵+۰.۲۲۰).

رنگ حیاتی تریپان بلو مخلوط گشت و با میکروسکوپ نوری و لام هموسیتر، سلول‌ها شمارش گردید و در چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه توزیع شد.

۳- قرارگیری ذرات Nano-HA در مجاورت HPBMCs

در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه‌ای کشت سلولی تعداد ۱۰۵ سلول قرار داده شد و پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون (فشار ۵ درصد CO₂، رطوبت ۹۸ درصد، دمای ۳۷ درجه) محیط کشت روئی تخلیه گردید. سپس ذرات Nano-HA با غلظت‌های ۱۵.۷۵، ۳۲، ۶۵، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۲۰۰۰، ۴۰۰۰، ۸۰۰۰ ppm در چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه روی سلول‌ها اثر داده شد و در سه چاهک کنترل محیط کشت کامل به عنوان یک ماده صفر درصد غیر توکسیک ریخته شد.

۴- ارزیابی وایتالیته HPBMCs

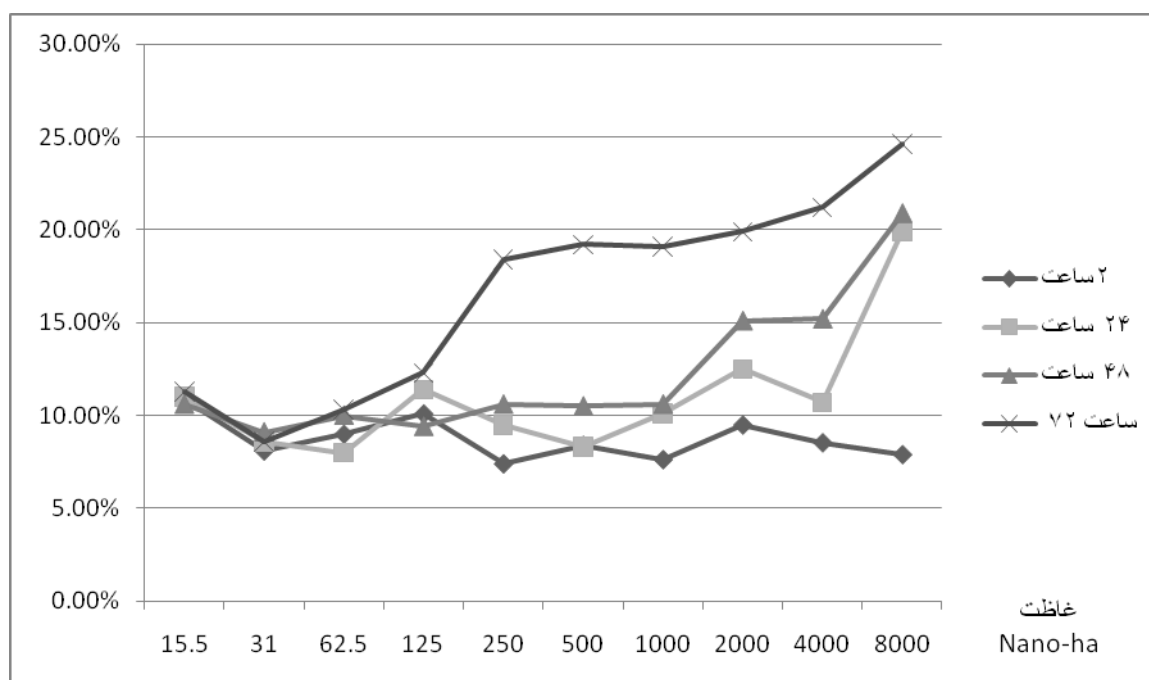
وایتالیته سلول‌ها در زمان‌های ۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از مجاورت با ذرات با استفاده از تست MTT مورد سنجش قرار گرفت. به این ترتیب که بعد از گذشت زمان‌های مورد نظر، محیط‌های کشت سلولی را از انکوباتور (فشار ۵% CO₂، رطوبت ۹۸٪، دمای ۳۷ درجه) خارج کرده و یک‌دهم حجم روئی سلول‌ها به هر چاهک محلول Dimethylthiazol-2yl 2-5 (MTT) diphenyl tetrazolium bromide اضافه گشت و پلیت به مدت ۴ ساعت به انکوباتور برگردانده شد. پس از سپری شدن ۴ ساعت، پلیت را بیرون آورده و با کشیدن محیط روئی به چاهک‌ها ایزوپروپانل اسیدی اضافه گشته تا کریستال‌های بنفش رنگ فومارازون ایجاد شده در سلول‌هایی که زنده مانده‌اند (شکل ۲)، حل شده و مایع رنگی یکنواختی ایجاد شود. این مایع رنگی را به چاهک‌های یک پلیت الایزا منتقل و جذب آن با استفاده از دستگاه ELISA READER در طول موج 570 nm با فیلتر فرانس ۶۲۰ نانومتر خوانده شد. سپس با استفاده از آزمون ANOVA

جدول ۱- میزان و انحراف معیار فعالیت حیاتی سلول ها بر حسب زمان های پیگیری به تفکیک مقادیر مختلف Nano-HA					
زمان	غلظت Nano-HA	۲ ساعت	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت
۱۵.۵		۰.۳۲۷ ± ۰.۰۰۳	۰.۲۹۹ ± ۰.۰۰۵	۰.۲۹۵ ± ۰.۰۰۹	۰.۲۵۹ ± ۰.۰۰۷
۳۱		۰.۳۳۷ ± ۰.۰۰۳	۰.۳۰۶ ± ۰.۰۱۲	۰.۳۰۰ ± ۰.۰۰۵	۰.۲۶۷ ± ۰.۰۰۶
۶۲.۵		۰.۳۳۴ ± ۰.۰۰۵	۰.۳۰۹ ± ۰.۰۰۲	۰.۲۹۷ ± ۰.۰۰۳	۰.۲۶۲ ± ۰.۰۰۲
۱۲۵		۰.۳۳۰ ± ۰.۰۰۶	۰.۲۹۸ ± ۰.۰۰۹	۰.۲۹۹ ± ۰.۰۰۹	۰.۲۵۶ ± ۰.۰۰۲
۲۵۰		۰.۳۴۰ ± ۰.۰۰۲	۰.۳۰۴ ± ۰.۰۰۴	۰.۲۹۵ ± ۰.۰۰۷	۰.۲۳۸ ± ۰.۰۰۲
۵۰۰		۰.۳۳۶ ± ۰.۰۰۲	۰.۳۰۸ ± ۰.۰۰۹	۰.۲۹۵ ± ۰.۰۰۵	۰.۲۳۶ ± ۰.۰۰۴
۱۰۰۰		۰.۳۳۹ ± ۰.۰۰۱	۰.۳۰۲ ± ۰.۰۰۷	۰.۲۹۳ ± ۰.۰۰۲	۰.۲۳۶ ± ۰.۰۰۶
۲۰۰۰		۰.۳۳۲ ± ۰.۰۰۳	۰.۲۹۴ ± ۰.۰۰۶	۰.۲۸۱ ± ۰.۰۰۲	۰.۲۳۴ ± ۰.۰۰۴
۴۰۰۰		۰.۳۳۶ ± ۰.۰۰۲	۰.۳۰۰ ± ۰.۰۰۵	۰.۲۸۰ ± ۰.۰۰۸	۰.۲۳۰ ± ۰.۰۰۲
۸۰۰۰		۰.۳۳۸ ± ۰.۰۰۳	۰.۲۶۹ ± ۰.۰۰۹	۰.۲۶۱ ± ۰.۰۰۳	۰.۲۲۰ ± ۰.۰۰۴

می دهد، حداکثر درصد توکسیسیته ی نسبت به گروه شاهد بعد از گذشت ۷۲ ساعت و در غلظت 8000 ppm برابر ۲۴.۶٪ است.

جدول شماره ی ۲ و نمودار ۱ درصد تغییرات سایتوتوکسیسیته نسبت به گروه کنترل به تفکیک مقادیر مختلف Nano-HA را نشان

جدول ۲- درصد سایتوتوکسیسیته نسبت به گروه کنترل به تفکیک مقادیر مختلف Nano-HA					
زمان	غلظت Nano-HA	۲ ساعت	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت
۱۵.۵		٪۱۰.۹	٪۱۱	٪۱۰.۶	٪۱۱.۳
۳۱		٪۸.۱	٪۸.۶	٪۹.۱	٪۸.۶
۶۲.۵		٪۹	٪۸	٪۱۰	٪۱۰.۳
۱۲۵		٪۱۰.۱	٪۱۱.۴	٪۹.۴	٪۱۲.۳
۲۵۰		٪۷.۴	٪۹.۵	٪۱۰.۶	٪۱۸.۴
۵۰۰		٪۸.۴	٪۸.۳	٪۱۰.۵	٪۱۹.۲
۱۰۰۰		٪۷.۶	٪۱۰.۱	٪۱۰.۶	٪۱۹.۱
۲۰۰۰		٪۹.۵	٪۱۲.۵	٪۱۵.۱	٪۱۹.۹
۴۰۰۰		٪۸.۵	٪۱۰.۷	٪۱۵.۲	٪۲۱.۲
۸۰۰۰		٪۷.۹	٪۱۹.۹	٪۲۰.۹	٪۲۴.۶



نمودار ۱- مقایسه‌ی درصد‌های سایتوتوکسیک بر حسب زمان‌های پیگیری به تفکیک غلظت‌های مختلف Nano-HA

Nano-HA را در غلظت‌های ۱ تا ۱۰۰ ppm بر روی استئوبلاست‌ها از طریق تست MTT بعد از گذشت ۷۲ h مورد بررسی قرار دادند و نتیجه‌گیری کردند که هر دو شکل ذرات در هیچ غلظتی توکسیک نبود [۱۹]. نتایج اخیر نیز در تأیید نتیجه‌ی فوق نشان داد که این ماده دارای سازگاری زیستی قابل قبولی می‌باشد. البته در مطالعه‌ی Yantae بازه‌ی زمانی محدود بوده و تنها تا غلظت 100 ppm تحقیق انجام شده است. از طرفی مطالعه‌ی Hsieh-MF و همکاران در سال ۲۰۰۹ نیز نشان داد که پارتیکل‌های Nano-HA تا غلظت 5000 ppm کمترین سمیت را برای استئوبلاست دارا هستند [۲۰] و نتایج مطالعه‌ی ما هم به طور مشابه بیانگر سازگاری زیستی ذرات Nano-HA است. اما در مطالعه‌ی که توسط Motskin و همکاران در سال ۲۰۰۹ صورت گرفت و در آن سایتوتوکسیسیته‌ی پارتیکل‌های Nano-HA به شکل کلوتید و ژل را در غلظت‌های 31-62-125-250-500 ppm بر روی ماکروفاژهای مشتق از مونسیت از طریق تست MTT بعد از ۲۴ h مورد ارزیابی قرار دادند، نشان دادند که پارتیکل‌های Nano-HA در فرم ژل در تمامی غلظت‌ها توکسیک بوده و فرم کلوتید آن فقط در غلظت‌های بالاتر از 125 ppm توکسیک بود [۲۱]. اما در این مطالعه پارتیکل‌های Nano-HA را به شکل سوسپانسیون به کار رفت و سمیت آن روی سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی بررسی گردید. همچنین در سال ۲۰۰۴ J.Huang و همکاران اثر

با افزایش غلظت ذرات Nano-HA و نیز گذشت زمان، درصد سایتوتوکسیسیته افزایش می‌یابد ولی از نظر آماری تفاوت معنی‌داری بین گروه‌ها وجود ندارد.

بحث

نتیجه پژوهش نشان داد که با افزایش غلظت Nano-HA از ۱۵.۵ تا ۸۰۰۰ ppm و نیز گذشت زمان از ۲ تا ۷۲ ساعت میزان توکسیسیته افزایش یافته، ولی این کاهش در فعالیت حیاتی سلول‌ها از نظر آماری معنی‌دار نیست ($P > 0.05$). بنابراین، ذرات Nano-HA در مجاورت با HPBMCs سازگاری قابل قبولی دارد.

(the half maximal inhibitory concentration) IC50 غلظتی از یک ماده است که منجر به مهار رشد سلولی یا مرگ سلولی به میزان ۵۰٪ سلول‌های اولیه می‌گردد و این مطالعه نشان داد که حداکثر میزان توکسیسیته در غلظت 8000 ppm برابر با ۲۴.۶٪ است و لذا برای بدست آوردن غلظتی از Nano-HA که ۵۰٪ از سلول‌های اولیه را از بین می‌برد، نیاز به انجام مطالعه‌ی دیگر با در نظر گرفتن شرایط مطالعه‌ی اخیر می‌باشد.

در مطالعه‌ی که توسط Yantae و همکاران در سال ۲۰۰۹ صورت گرفت و در آن سازگاری زیستی اشکال میله‌ای و کروی

مؤثر است [۶-۸]، بر روی سایتوتوکسیک بودن پارتیکل ها نیز مؤثر باشد.

بنابراین با توجه به اهمیت موضوع پیشنهاد می شود تا مطالعات بیشتری نظیر بررسی واکنش های ایمنولوژیکی و مولکولی و هم چنین بررسی سایتوتوکسیسته این ماده در مدل های *in vivo* توسط محققین دیگر انجام و پیگیری شود.

نتیجه گیری

همان طور که در نتایج به دست آمده ملاحظه می شود، جذب نوری هر ۱۰ غلظت سه بار اندازه گیری شد و میانگین آن ثبت شد. علاوه بر میانگین، انحراف معیار و ANOVA هم به عمل آمد. هیچ کدام از دوزهای مورد استفاده توکسیک نبود. بنابراین در مجموع می توان این گونه نتیجه گرفت که Nano-HA ماده ای سازگار با سلول های سفید تک هسته ای خون محیطی انسان است.

تقدیر و تشکر

از حمایت مالی مرکز تحقیقات دندانپزشکی و معاونت محترم پژوهشی دانشگاه شاهد و آزمایشگاه بیولوژی مولکولی دانشکده دندانپزشکی دانشگاه شهید بهشتی در اجرای این تحقیق صمیمانه سپاسگزاری می شود.

سازگاری زیستی Nano-HA میله ای شکل را در غلظت های ۱-۱۰ ppm را بر روی ماکروفاژهای مشتق از مونوسیت از طریق تست LDH بعد از ۲۴ h مورد بررسی قرار دادند و نشان دادند که در غلظت 100 ppm Nano-HA، توانائی آسیب زدن به غشا سلولی و آزاد کردن LDH را دارد [۲۲]، از طرفی آقای Scheel و همکاران در سال ۲۰۰۹ در مطالعه ای ماکروفاژهای رده ی Murine RAT 264,7 را در معرض Nano-HA در غلظت های ۵۰-۱۰۰-۵۰۰-۱۰۰۰-۵۰۰۰ ppm قرار دادند و سایتوتوکسیسته ی ذرات را از طریق X-TT بررسی کردند و نتیجه گیری کردند که غلظت های بالاتر از 500 ppm توکسیک بود [۲۳]. نتایج این سه مطالعه با نتیجه حاصل از مطالعه ی فعلی تفاوت دارد و این تناقض ها در نتایج ممکن است به دلیل ویژگی های خاص ذرات مورد استفاده و نوع سلول مورد بررسی و نیز تفاوت در روش های به کار رفته باشد [۱۸]. به طوری که ممکن است علت توکسیک بودن ذرات برای ماکروفاژها در غلظت های بالاتر از ۱۲۵ ppm به دلیل فاگوسیت کردن ذرات و افزایش غلظت کلسیم در سیتوپلاسم سلول ها باشد، اما در مورد استئوبلاست ها و سلول های تک هسته ای خون محیطی به مقدار کمتری وارد سلول می شود. بنابراین می توان این گونه نتیجه گیری کرد که اگر پارتیکل Nano-HA وارد سلول شود، می تواند در غلظت های بالاتر توکسیک باشد ولی به شکل خارج سلولی حتی تا غلظت ۸۰۰۰ ppm برای لنفوسیت ها و ۵۰۰۰ ppm برای استئوبلاست ها توکسیک نمی باشد. از طرفی شاید به کار بردن اشکال مختلف ذرات که بر روی سطح تماس ذرات و لذا مقدار حلالیت و قدرت ذرات

مراجع

- 1- Thein-Han WW, Shah Ji, Misra RD. Superior in vitro biological response and mechanical properties of an implantable nanostructured biomaterial: Nanohydroxyapatite- silicone rubber composite. *J materials in medicine* 2011; 57: 567-600.
- 2- Xie XH, Yu XW, Zeng SX, Du RL, Hu YH, Yuan Z, Lu EY, Dai KR, Tang TT. Enhanced osteointegration of orthopaedic implant gradient coating composed of bioactive glass and nanohydroxyapatite. *J Mater Sci Mater Med* 2010; 21(7): 2165-73.
- 3- Nam YH, Kim JI, Um SJ, Lee SK, Son CH. Absence of hyper-responsiveness to methacholine after specific bronchial provocation tests in a worker with hydroxyapatite-induced occupational asthma. *J Allergy Asthma Immunol Res* 2011; 32: 135-157.
- 4- Lorado T, Polte J. Effect of hydrogen peroxide on osteoinduction by demineralized bone. *Am J Orthop* 2006 Dec; 35(12): 562.
- 5- Wojciech Suchanek, Masahiro Y. Processing and properties of hydroxyapatite-based biomaterials for use as hard tissue replacement implants. *The Materials Gateway* 2004; 21(7): 165-736.
- 6- Alis Yovana Pataquiva Mateus, Cristina C. Barrias, Cristina Ribeiro, Maria P. Ferraz, Fernando J. Monteiro. Comparative study of nanohydroxyapatite microspheres for medical applications. in *Wiley InterScience DOI* 2007; 23(2): 262-7.
- 7- Shahoon H, Ghazanfari T, valaie N, Safaee M. Evaluation of Human Endochondral Bone Matrix Gelatin cytotoxicity on the human peripheral WBC mononuclear cells. *J Shahed University March* 2010; 56: 86-99.
- 8- Shahoon H, Mashhadi Abbas F, Shahravi N. Histological evaluation of human bone matrix gelatin (BMG) with Autogenous Bone Graft in the reconstruction of parietal bone defect in rats. *J Shahid Beheshti University of Medical sciences* 2009; 27(2): 67-85.
- 9- Puvvada N, Panigrahi PK, Pathak A. Nanoscale. Room temperature synthesis of highly hemocompatible hydroxyapatite, study of their physical properties and spectroscopic correlation of particle size. *J ADA* 2010; 12: 261-289.
- 10- Beud H, Adrian K. Clinical effects of nanocrystallin hydroxyapatite paste in the treatment of trabony periodontal defects. *J clin oral invest* 2009; 52: 28-68.
- 11- Xingyil Li, Guoquan LIU, Shidan YUAN. Study on the Hemolysis Rates and cytotoxicity Test of Porous Ultramicron HA Containing Mg. *Material Science Forum* 2009; 61(7): 1215-1218.
- 12- Gerlach KL, Niehues D. Treatment of jaw cysts with a newkind of nanoparticular hydroxylapatite. *J Mund Kiefer Gesichtschir* 2007; 14: 59-79.9.
- 13- Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi. Development of nanohydroxyapatite composites as bone grafting materials. *NANO J* 2008; 25(5): 1231-4.
- 14- Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao. Proliferation and differentiation of MC 3T3-E1 cells cultured on nanohydroxyapatite/chitosan composite scaffolds. *Article in Chinese* 2007 Mar; 23(2): 262-7.
- 15- Zhou G, Li Y, Xiao W, Zhang L, Zuo Y, Xue J, Jansen JA. Synthesis, characterization, and antibacterial activities of a novel nanohydroxyapatite/zinc oxide complex. *J Biomed Mater Res A* 2007; 81(4): 994-100.
- 16- Ferraz MP, Mateus AY, Sousa JC, Monteiro FJ. Nanohydroxyapatite microspheres as delivery system for antibiotics: release kinetics, antimicrobial activity, and interaction with osteoblasts. *J Biomed Mater* 2008; 81(4): 994-100.

- 17- Wojciech S, Masahiro Y. Processing and properties of hydroxyapatite-based biomaterials for use as hard tissue replacement implants. *J The Materials Gateway* 2004; 21: 665-736.
- 18- Yovana P, Cristina C, Cristina R, Maria P. Comparative study of nanohydroxyapatite microspheres for medical applications. *J InterScience* DOI 2007; 23: 262-307.
- 19- Yantao Z, Yumei Z, Dagang G. Synthesis and cellular Biocompatibility of Two Kinds of HAP with Different Nanocrystal Morphology. *J Wiley interscience* 2009; 24: 548-689.
- 20- Hsieh MF, Li JK, lin CA, Caang WH. Tracking of cellular uptake of hydrophilic CdSe/ZnS quantum dots/hydroxyapatite composites nanoparticles in - MC3T3-E1 osteoblast cells. *J Nanosci Nanotechnol* 2009; 9(4): 2758-62.
- 21- Motskin M, Wright D.M, Muller K. Kyle N, Gard T.G, Porter A. Hydroxyapatite nano and microparticles: Correlation of particle properties with cytotoxicity and biostability. *J Biomaterials* 2009; 30: 337-397.
- 22- J. HUANG, S. M. BEST, W. BONFIELD. In vitro assessment of the biological response nano-sized hydroxyapatite. *materials science* 2004; 15(204): 441-445.
- 23- Scheel J, Weimans S, Thiemann A. Exposure of the murine RAW 264. 7 macrophage cell line to hydroxyapatite dispersions of various composition and morphology: assessment of cytotoxicity and activation. *J Toxic in vitro* 2009; 23: 531-548.