

Investigation of the capability of the new storage media in keeping the periodontal ligament cells Viability

Nozari Ali¹, Esmailpour Tahere², Fijan Soleiman³ *

Abstract

Background: Tooth avulsion is defined as the complete displacement of the tooth from its normal position which causes damage to the periodontal ligament structure, cementum, alveolar bone, gingiva, and dental pulp. Since, the milk is storage medium for the short-term storage of avulsed teeth, the purpose of this study was to determine the ability of the new storage media (symphytum+ Mihan long-life milks) in keeping the Periodontal Ligament (PDL) cells viability.

Methods: Following atraumatic extraction of healthy human premolars, the PDL cells were cultured. A certain number of the cells was seeded in each well of a 96-well plate and treated with Mihan long-life milks, Hank's Balanced Salt Solution (HBSS), composition media (symphytum+ Mihan long-life milks), and Apada fresh milk for 1, 3, 6, and 24 hours. Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) and dry medium were considered as positive control and negative control media, respectively. Cell viability was determined by using the MTT assay. Moreover One Way-ANOVA and post Hoc (LSD) test were used for comparing the study groups.

Results: After 24 hours, the cells' viability in composition media was significantly better than Apada fresh milk medium ($P=0.03$). Moreover, the results of One-way ANOVA showed that the PDL cells' viability in composition media was higher than the HBSS medium after 24 hours. At this time point, the mean of viable cells in composition media, Mihan long-life milk medium, and HBSS was 135%, 64%, and 35%, respectively.

Conclusion: According to the study results, composition media (symphytum+ Mihan long-life milks) are considered as desirable storage media which are comparable to HBSS. This media are not only able to keep more cells viability after 24 hours time period compared to the expensive commercial solutions, but they can also be easily accessed and used.

Keyword: Tooth Avulsion; Periodontal Ligament, symphytum

Sadra Med Sci J 2013; 1(2): 103-112

Received: Feb. 28th, 2013

Accepted: March. 20th, 2013

¹ Department of pediatric dentistry, School of Dentistry, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

² Laboratory of Stem Cell Research, Department of Anatomy, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

^{3*} Postgraduate student, Department of Pediatric Dentistry, School of Dentistry, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran, Corresponding author, Email: fsoleiman@yahoo.com, Tel:09173192902

مجله علمی علوم پزشکی صدرا

دوره ۱، شماره ۲، بهار ۱۳۹۲، صفحات ۱۰۳ تا ۱۱۲

تاریخ پذیرش: ۹۱/۱۲/۳۰ تاریخ دریافت: ۹۱/۱۲/۱۰

بررسی توانایی یک محیط حد واسط جدید در حفظ حیات سلولهای لیگامان پریدونتال

دکتر علی نوذری^۱، دکتر طاهره اسماعیل پور^۲، دکتر سلیمان فیجان^{۳*}

^۱ گروه دندانپزشکی کودکان، دانشکده ی دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، ایران

^۲ آزمایشگاه تحقیقات سلولهای بنیادی، گروه آناتومی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، ایران

^{۳*} دستیار سال آخر، گروه دندانپزشکی کودکان، دانشکده ی دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، ایران (نویسنده مسئول)، Email:

۰۹۱۷۳۱۹۲۹۰۲@soleiman@yahoo.com

چکیده

مقدمه: (بیرون افتادن) دندان به معنای جابجایی کامل دندان از حفره دندانی است که باعث آسیب به ساختارهای لیگامان پریدونتال، سمان، استخوان آلوئول، لثه و پالپ دندان می شود. با توجه به این که شیر یک محیط ایده آل برای زنده نگه داشتن سلولها در مدت زمان کوتاه می باشد، هدف از مطالعه حاضر بررسی میزان زنده ماندن سلولهای لیگامان پریدونتال در محیط ترکیبی شیر و داروی گیاهی سیمفیتوم در مدت زمان طولانی (۲۴ ساعت) و مقایسه ی آن با محیطهای استاندارد بود.

مواد و روش: سلولهای لیگامان پریدونتال در محیط کشت (Dulbecco's Modified Eagle MEM (DMEM Medium) در پلیت 96-well کشت داده شد و تا زمان اتصال سلولها به پلیت، در ۳۷° انکوبه شد. بعد از آن محیط کشت DMEM را برداشته و به هر well، به میزان ۱۰۰ میکرو لیتر از محیطهای شیر مدت دار میهن، شیر معمولی آپادا، Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) و محیط ترکیبی (سیمفیتوم + شیر مدت دار میهن) اضافه شد. (DMEM) به عنوان محیط کنترل مثبت و محیط خشک به عنوان محیط کنترل منفی در نظر گرفته شد. سپس پلیتها به مدت ۱ و ۳ و ۶ و ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷° قرار داده شد. زنده ماندن سلولها با استفاده از روش (MTT(Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide) ارزیابی شد. نتایج مطالعه با استفاده از نرم افزار SPSS و آزمون آماری (One-Way ANOVA, post Hoc (LSD) بررسی شد.

یافته ها: بعد از گذشت ۲۴ ساعت میزان بقای سلولها در محیط ترکیبی به صورت معنی داری نسبت به محیط شیر معمولی آپادا بیشتر بود (p = ۰/۰۳). علاوه بر این، نتایج آنالیز واریانس یک طرفه نشان داد که بعد از گذشت ۲۴ ساعت میانگین زنده ماندن سلولهای PDL در محیط ترکیبی بیشتر از HBSS بود. بعد از گذشت ۲۴ ساعت میزان سلولهای زنده در محیط ترکیبی ۱۳۵٪ بود، در حالی که در محیط شیر بلند مدت میهن ۳۵٪ و در محیط HBSS ۶۴٪ سلولها زنده ماندند.

بحث و نتیجه گیری: بر طبق نتایج مطالعه ی حاضر محیط ترکیبی (سیمفیتوم + شیر مدت دار میهن) را می توان به عنوان یک محیط حد واسط قابل مقایسه با محیط HBSS در نظر گرفت. این محیط نه تنها توانایی نگهداری میزان سلولهای بیشتری بعد از گذشت ۲۴ ساعت نسبت به محیط HBSS دارد، بلکه نسبت به این محلول تجاری پرهزینه به راحتی در دسترس و قابل استفاده می باشد.

واژگان کلیدی: لیگامان پریدونتال، سیمفیتوم، DMEM

مقدمه

تجاری مثل HBSS و Viaspan (۸) اشاره نمود. از بین این مواد Viaspan ایده‌آل‌ترین ماده است و مطالعات تجربی نشان دادند که حتی تا ۹۶ ساعت توانایی زنده نگهداشتن سلولها را دارد (۹). هر چند مواد تجاری فوق بسیار موثر هستند، اما گران بوده و غالباً در محل حادثه دردسترس نمی‌باشند.

شیر ماده‌ای است با اسمولالیتی mosmol/kg ۲۷۵ که تعداد باکتری آن ناچیز است و حاوی مواد مغذی ضروری می‌باشد (۱۰). لذا از شیر به عنوان یک ماده حدواسط مطلوب و کاملاً دردسترس برای دندان‌های Avulsed شده، یاد می‌شود. شیر به عنوان کاربردی‌ترین محیط حد واسط جهت نگهداری کوتاه مدت دندان Avulsed شده مطرح می‌باشد. شیر حاوی آمینو اسیدها و ویتامین‌هایی می‌باشد که سبب غیر فعال کردن آنزیم‌هایی که برای سلولهای PDL مضر هستند، می‌شوند (۱۱).

در سطح سلولی، شیر دارای رتبه‌ای برابر با HBSS به عنوان محیط حد واسط می‌باشد، هرچند که تاثیر آن بعد از ۲ ساعت کاهش می‌یابد. شیر نسبت به بزاق با توجه به میزان زنده نگهداشتن و توانایی بهبود سلولها و ترمیم زخم‌ها برتری دارد (۱۲). شیرهای پاستوریزه‌ی معمولی طول عمر کمی داشته و برای نگهداری احتیاج به یخچال دارند. شیرهای بلند مدت می‌توانند بدون این محدودیت‌ها در محیط‌هایی که صدمات دندان‌ی شایع‌تر می‌باشد به راحتی دردسترس باشند.

یکی از معایب شیر به عنوان محیط حد واسط عدم توانایی نگهداری سلولها برای مدت زمان طولانی می‌باشد. با توجه به سهولت دسترسی و هزینه‌ی ارزان شیر، نیاز است که این مشکل مرتفع گردد. گیاه سیمفیتوم (symphytum) دارای سه گونه‌ی مختلف به نام‌های officinale، asperunz و officinale ktsrelicun می‌باشد. ه سیمفیتوم

بیرون افتادن دندان (Avulsion) به معنای جابجایی کامل دندان از حفره دندان‌ی است که باعث آسیب به ساختارهای لیگامان پریودونتال، سمان، استخوان آلوئول، لثه و پالپ دندان می‌شود (۱). در بیشتر ضربه‌هایی که منجر به خروج کامل دندان از حفره دندان‌ی می‌شوند، فقط یک دندان درگیر می‌شود و شایع‌ترین دندان درگیر غالباً ثنایای میانی فک بالا است (۲). این صدمات تروماتیک معمولاً در سنین ۷-۹ سال بروز می‌کند و پسرها ۳ برابر دخترها گرفتار می‌شوند. پیش آگهی درمان دندان Avulsed شده عمدتاً تحت تاثیر زنده ماندن سلولهای لیگامان پریودونتال و توانایی آنها برای پرولیفرة شدن در سطح ریشه می‌باشد (۳). برای افزایش موفقیت درمان، می‌بایست هرچه سریع‌تر دندان در حفره دندان‌ی جاگذاری مجدد شود (درمان انتخابی) و یا آنکه تا زمان جاگذاری مجدد در یک ماده حد واسط مناسب نگهداری شود (۱ و ۲).

دو عامل تاثیر بیشتری بر پیش آگهی دندان‌های Avulsed شده دارند. یکی طول مدت زمانی که از خروج آن از حفره آلوئول می‌گذرد و دیگری محیط حد واسطی که دندان در آن نگهداری می‌شود. مطالعات تجربی نشان دادند که نوع ماده حد واسط بیشتر از مدت زمان خارج آلوئول بودن در پیش آگهی نهایی درمان نقش دارد. نا مناسب بودن محیط حد واسط، سبب افزایش نکروز سلولها و در نتیجه انکیلوز و یا تحلیل ریشه دندان پس از جاگذاری مجدد می‌شود (۴).

تاکنون مواد حد واسط متعددی جهت زنده نگهداشتن سلولهای لیگامان پریودونتال مورد بررسی قرار گرفته اند. از آن جمله می‌توان به شیر، سرم فیزیولوژی، بزاق، آب شرب شهری (۵)، شیر نارگیل (۶)، سفیده تخم مرغ (۷) و... و همچنین مواد

مواد و روش

مطالعه حاضر یک پژوهش کارآزمایی بالینی بود که با هدف بررسی میزان زنده ماندن سلول‌های PDL در شش محیط کشت مختلف در سال ۱۳۹۱ انجام شد.

برای تهیه سلول‌های لیگمان پریدونتال از دندان‌های پرمولر و مولر سوم سالم که به دلیل اهداف درمانی مختلف کشیده شده‌اند استفاده می‌شود. بافت پریو دنتالی در این افراد باید سالم بوده و فاقد هرگونه التهاب باشد. سپس دندان ۳ بار توسط نرمال‌سالین شسته شده و داخل لوله آزمایش حاوی ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت DMEM (Biosera, South Africa) حداکثر طی ۳۰ دقیقه به آزمایشگاه منتقل شد. سپس سلول‌های ناحیه ۱/۳ میانی سطح ریشه با استفاده از تیغ جراحی استریل از سطح دندان جدا شد. پس از شستشوی بافت جدا شده، آن را به قطعات کوچک تقسیم کرده و با استفاده از کلاژناز (۴ mg/ml) و دیسپاز (۳ mg/ml) به صورت سوسپانسیون سلولی در آورده و از Strainer رد کردیم و سپس در محیط کشت DMEM همراه با (Biosera) 10% FBS، 10% AB-Serum، پنی سیلین 100 U/ml، استرپتومایسین (100 U/ml) PAA) و ۱٪ Antimycotic در درجه حرارت ۳۷°، ۹۵٪ هوا و ۵٪ CO₂ کشت داده شد. پس از ۴-۶ روز که سلول‌ها به ۷۰-۸۰٪ confluence رسیدند، trypsinized شده و برای ادامه روند تکثیر به پلیت جدید منتقل شد. جهت انجام آزمایش از سلول‌های پاساژ ۷-۵ استفاده شد. سلول‌ها تا مرحله آزمایش فریز شد. بعد از ذوب سلول‌ها، آن‌ها را با هموسایتومتر شمرده و سپس به میزان یکسان (۸×۱۰^۳ سلول در هر خانه) در محیط کشت DMEM در پلیت well-۹۶ کشت داده شد و سپس تا زمان اتصال سلول‌ها به پلیت، در ۳۷° انکوبه

یا comfrey گیاهی است که جهت درمان زخم‌های پوستی به کار می‌رود (۱۳).

گیاه سیمفیتوم منبعی برای موکو پلی‌ساکاریدها (گلوکز و فروکتوز) محسوب می‌شود. در هر ۱۰۰ میلی گرم از این گیاه ۰/۵ میلی گرم تیمین، ۱ میلی گرم ریبوفلاوین، ۵ میلی گرم اسید نیکوتینیک، ۰/۰۷ میلی گرم ویتامین B12، ۲۸۰۰۰ واحد بین المللی ویتامین A، ۱۰۰ میلی گرم ویتامین C، ۳۰ میلی گرم ویتامین E و ۰/۱۸ میلی گرم آلانتوئین وجود دارد. این گیاه دارای میزان قابل توجهی تانن است که دلیل خاصیت آنتی‌اکسیدانی این دارو می‌باشد. گیاه سیمفیتوم سریع‌ترین منبع سازنده پروتئین جهان در بین گیاهان است و یکی از معدود گیاهانی است که تولید کننده ویتامین B12 می‌باشد (۱۴). این گیاه یکی از اجزای مهم بسیاری از داروهای گیاهی، داروها و فرآورده‌های دارویی می‌باشد. تجزیه‌ی این گیاه (۸۴/۹ درصد آب) بر پایه‌ی وزن خشک ۲۲/۷۳ درصد پروتئین خام و مقادیر قابل توجهی کلسیم، فسفر و پروتئین می‌باشد. این گیاه حاوی آلانتوئین می‌باشد که تمایز دهنده‌ی سلول‌ها، به هم آورنده‌ی زخم‌ها و بهبود دهنده‌ی جراحات‌ها است. این گیاه دارویی به جهت خصوصیات ضد التهابی، تحریک رشد سلولی و ضد دردی مورد استفاده قرار می‌گرفته است. این گیاه باعث بازسازی سلول‌ها و بافتهای همبندی می‌گردد (۱۵). تا کنون در حیطة ی صدمات دندانپزشکی از گیاه سیمفیتوم استفاده نشده است. با توجه به این که شیر یک محیط ایده آل برای زنده نگه داشتن سلول‌ها در مدت زمان کوتاه می‌باشد؛ هدف از تحقیق حاضر بررسی میزان زنده ماندن سلول‌های PDL در محیط ترکیبی شیر و سیمفیتوم در مدت زمان طولانی (۲۴ ساعت) و مقایسه‌ی آن با محیط‌های استاندارد بود.

مطالعه توسط کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی شیراز مورد تایید قرار گرفت.

اطلاعات با استفاده از نرم افزار SPSS و آزمون آماری (LSD) post Hoc و One-Way ANOVA تجزیه و تحلیل شد.

یافته‌ها

در مطالعه‌ی حاضر شش محیط کشت مختلف مورد بررسی قرار گرفت. دو محیط مربوط به شیرهای بلندمدت میهن و شیر معمولی آپادا، ترکیب شیر بلندمدت میهن و سیمفیتوم، DMEM به عنوان کنترل مثبت و محیط خشک به عنوان محیط کنترل منفی در نظر گرفته شد. HBSS نیز به عنوان یک محیط استاندارد در نظر گرفته شد.

نتایج مطالعه نشان داد که میزان بقای سلول‌های PDL در تمام محیط‌ها و در تمام زمان‌ها به صورت معنی‌داری نسبت به محیط کنترل منفی بهتر بود. میانگین سلول‌های PDL زنده در محیط شیر معمولی تا یک ساعت با سایر محیط‌ها تفاوت نداشت، اما بعد از گذشت ۳ ساعت ۷۵٪ و بعد از گذشت ۶ ساعت حدود ۵۰٪ از سلول‌های PDL در محیط شیر معمولی زنده ماندند. در حالی که در این زمان میزان سلول‌های سالم در محیط شیرهای مدت‌دار میهن، محیط ترکیبی و HBSS به مراتب بیشتر بود. نتایج مطالعه گویای این بود که بعد از گذشت ۲۴ ساعت میزان بقای سلول‌ها در محیط ترکیبی به صورت معنی‌داری نسبت به محیط شیر معمولی آپادا بیشتر بود ($p=0/03$). علاوه بر این نتایج آنالیز واریانس یک طرفه نشان داد که بعد از گذشت ۲۴ ساعت میانگین زنده ماندن سلول‌های PDL در محیط ترکیبی بیشتر از HBSS بود. بدین صورت که میزان سلول‌های زنده در محیط ترکیبی ۱۳۵٪ بود؛ در حالی که در محیط شیر بلندمدت میهن ۳۵٪ و در محیط HBSS ۶۴٪ بود (جدول ۱).

شد. بعد از آن محیط کشت DMEM را برداشته و به هر well، به میزان ۱۰۰ میکرولیتر از محیط‌های مورد آزمایش به ترتیب زیر اضافه گردید:

(۱) شیر مدت‌دار میهن (Mihan food)

industries Group با چربی ۱/۵ درصد

(۲) ترکیب شیر مدت‌دار میهن و سیمفیتوم*

(۳) شیر معمولی آپادا با چربی ۲/۵ درصد (شرکت زرین غزال)

(۴) محیط کشت DMEM (کنترل مثبت)

(۵) محیط کشت خشک (کنترل منفی)

(۶) محیط کشت -XB (BioSera-XC-S2065) HBSS

* محیط ترکیبی شامل ۷۰٪ شیر مدت‌دار میهن به همراه ۳۰٪ از داروی گیاهی سیمفیتوم (Organic Comfrey Herb Tincture - Fushi co) می‌باشد.

سپس پلیت‌ها به مدت ۱ و ۳ و ۶ و ۹ ساعت در انکوباتور ۳۷° قرار گرفتند. پس از طی مدت زمان مورد نظر، مواد مورد آزمایش از روی سلول‌ها برداشته شده و مدیای حاوی DMEM و FBS ۱۰٪ به سلول‌ها اضافه شد و پس از گذشت ۴۸ ساعت میزان سایتوتوکسیسیتی مواد مورد آزمایش با انجام تست (MTT) اندازه‌گیری شد. اساس این تست احیاء نمک تترازولیوم و تولید یک رنگ (رنگ آبی) است که می‌توان تعداد سلول‌های زنده را اندازه‌گیری نمود. بدین صورت که ابتدا محیط آزمایش با محلول MTT جایگزین شده و پلیت‌ها به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷° انکوبه شدند. سپس محلول MTT برداشته شده و محلول DMSO (Dimethyl sulfoxide) به wellها افزوده شدند. زنده ماندن سلول‌ها با اندازه‌گیری (Optical Density (OD) در ۴۹۰ nm بر روی اسپکتروفوتومتر برای هر گروه جداگانه محاسبه گردید.

جدول ۱: میانگین زنده ماندن سلولهای لیگامان پرپودنتال در محیطها و زمانهای مختلف

زنده ماندن سلولهای لیگامان پرپودنتال				محیط حد واسط
۲۴ ساعت	۶ ساعت	۳ ساعت	۱ ساعت	
میانگین(انحراف معیار)	میانگین(انحراف معیار)	میانگین(انحراف معیار)	میانگین(انحراف معیار)	
(۳/۰۵)۱۰۰	(۲/۵۲)۱۰۰	(۲/۲۳)۱۰۰	(۳/۰۷)۱۰۰	DMEM(کنترل مثبت)
(۲/۰۹)۱۲	(۳/۰۵)۵۷	(۳/۲۲) ۷۵	(۲/۹)۹۴	شیر آپادا
(۴/۱۳) ۳۵	(۳/۰۷)۸۳	(۱/۱۹)۹۴	(۲/۱۴)۹۶	شیر مدت دار میهن
(۲/۸۲)۱۳۵	(۲/۹۱)۱۲۶	(۲/۳۳)۹۰	(۴/۵)۹۲	محیط ترکیبی(شیر+سیمفیتوم)
(۲/۷۸)۶۴	(۱/۰۷)۸۷	(۰/۴۸)۹۵	(۱/۹۷)۹۴	HBSS
(۱/۲۸)۱۰	(۲/۲۳)۳۰	(۳/۰۵)۳۵	(۴/۰۲)۳۸	محیط خشک (کنترل منفی)

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), Hank's Balanced Salt Solution (HBSS), *Negative Control: Media free conditio*

بحث

ترکیبی ۱۳۵٪ بود که درصد زنده بودن سلولها در این محیط بیشتر از سایر موارد بود. شیر به عنوان کاربردی ترین محیط حد واسط جهت نگهداری کوتاه مدت دندانهای Avulsed شده، است که به راحتی و به آسانی در هر مکانی در دسترس می باشد. شیر، که دارای ویتامینها و آمینواسیدهای مختلف است، توانایی غیر فعال کردن آنزیمهایی که برای سلولهای PDL مضر هستند، را دارد (۱۱). مطالعات متعددی نشان داده اند که توانایی شیر در حفظ حیات PDL پس از گذشت ۲-۳ ساعت کاهش می یابد. بلوملوف (Blomelof) و همکاران شیر را به عنوان یک محیط حد واسط مناسب برای مدت زمان کوتاه معرفی کردند (۱۶). در مطالعه ای دیگر بلوملوف نشان داد پس از ۱۲ ساعت تنها ۵۰٪ سلولهای PDL زنده ماندند (۱۷). در مطالعه ای حاضر سیمفیتوم به عنوان یک داروی گیاهی محرک رشد و پرولیفراسیون سلولی با شیر مدت دار میهن ترکیب شد تا میزان بقای سلولهای PDL در مدت زمان طولانی ارزیابی و با محیط های استاندارد نظیر HBSS و DMEM مقاسه گردید. شیر بلند مدت میهن دارای حداقل ۸٪ ماده ی خشک شیر بدون چربی، ۳/۳ گرم پروتئین، ۴/۷ گرم کربوهیدرات، ۰/۱

روند درمان دندانهای Avulsed شده بایستی شامل کنترل سلولهای پالپ و PDL به منظور بهبود پیش آگهی طولانی مدت و بقای این دندانها باشد. استفاده از محیطها یا مواد حد واسط نامناسب به طور بالقوه سبب افزایش ریسک نکروز سلولهای PDL، که می تواند باعث بروز Ankylosis و تحلیل جایگزینی ریشه گردد، شود (۴). زمان بیرون بودن دندان از محیط دهان و محیطی که دندان در آن قرار دارد به عنوان مهم ترین فاکتورها در زنده ماندن سلولهای PDL می باشد (۲). محیطهای حد واسط مختلفی تاکنون مورد بررسی قرار گرفته است. اندریاسن نشان داد که ۴۵ دقیقه ماندن دندان در محیط نامناسب شانس زنده ماندن سلولهای PDL را تا ۲۰٪ کاهش می دهد (۴). سلولهای فیروبلاست که در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفت از دندانهای پرمولر و مولر سوم سالم که به دلیل اهداف درمانی مختلف کشیده شده بودند، تهیه شد. نتایج مطالعه ای حاضر یک محیط حد واسط جدید که از ترکیب شیر و سیمفیتوم تشکیل شده است مورد بررسی قرار داد و نشان داد که بعد از گذشت ۲۴ ساعت میزان سلولهای زنده در این محیط

گرم کلسیم و ۱۲/۰ گرم فسفر است در حالی که شیر های معمولی فاقد ماده‌ی خشک بوده و مقدار پروتئین، کلسیم و فسفر کمتری دارد. گیاه سیمفیتوم سریع‌ترین منبع سازنده‌ی پروتئین جهان در بین گیاهان است و یکی از معدود گیاهانی است که تولید کننده‌ی ویتامین B12 است (۱۴). این گیاه یکی از اجزای مهم بسیاری از داروهای گیاهی، داروها و فرآورده‌های دارویی است. تجزیه‌ی این گیاه (۸۴/۹ درصد آب) بر پایه‌ی وزن خشک ۲۲/۷۳ درصد پروتئین خام و مقادیر قابل توجهی کلسیم، فسفر و پروتئین است. این گیاه حاوی آلانتوئین می‌باشد که تمایز دهنده‌ی سلولها، به هم آورنده‌ی زخم‌ها و بهبود دهنده‌ی جراحات‌ها است. این گیاه دارویی به جهت خصوصیات ضد التهابی، تحریک رشد سلولی و ضد دردی مورد استفاده قرار می‌گرفته است. این گیاه باعث بازسازی سلول‌ها و بافتهای همبندی می‌گردد (۱۵). HBSS یک محلول استاندارد است که به طور گسترده در مطالعات Biomedical به منظور رشد بسیاری از انواع سلولها به کار می‌رود. این محلول غیر سمی، دارای PH بالانس و حاوی بسیاری مواد غذایی ضروری می‌باشد (۱۸). نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان می‌دهد که در محیط شیر معمولی آپادا بعد از گذشت ۳ ساعت به میزان ۷۵٪ و در محیط های شیر مدت دار میهن، محیط ترکیبی و HBSS بیش از ۹۰٪ سلولها زنده ماندند. بعد از گذشت ۶ ساعت تنها ۵۰٪ سلولهای PDL در محیط شیر زنده ماندند. در مطالعه‌ی لکیک و مک‌کلوج (Lekic & McCulloch) و همکاران شیر ارزشی برابر با HBSS نشان داد هر چند که بعد از گذشت ۲ ساعت تاثیر آن کاهش پیدا کرد (۱۶). در زمان ۶ ساعت بهترین نتایج مربوط به محیط ترکیبی بود که میزان شمارش سلولی ۱۲۶٪ بود. در این زمان در محیط شیر مدت‌دار میهن ۸۳٪ و در

محیط HBSS ۸۷٪ سلولها زنده ماندند. در مطالعه ای که توسط توماس (Tomas) و همکاران صورت گرفت میزان بقای سلولهای PDL در محیط شیرهای بلندمدت بعد از گذشت ۹ ساعت بهتر از HBSS بود (۱۷). HBSS یک محیط حد واسط ایده‌آل است که توانایی حفظ سلول‌ها تا مدت زمان ۲۴ ساعت را دارد (۱۸). در مطالعه‌ی حاضر نیز بعد از گذشت ۲۴ ساعت بیش از ۶۰٪ سلولها در محیط HBSS زنده ماندند. در محیط شیر مدت‌دار میهن بعد از گذشت ۲۴ ساعت ۳۵٪ سلولها زنده ماندند. میزان بقای سلول‌ها در این زمان در دو محیط خشک و شیر معمولی آپادا تقریباً یکسان بود. این در حالی است که در محیط ترکیبی سیمفیتوم و شیر میهن میزان بقای سلولها بعد از ۲۴ ساعت حدود ۱۳۵٪ سلولهای زنده شمارش شد. تاکنون در چندین مطالعه اثر بخشی سیمفیتوم در رشد و تحریک سلولی بررسی شده است (۱۳ و ۱۴). در مطالعه‌ی حاضر نیز با اضافه کردن این ماده به شیر مدت‌دار میهن اثر این ترکیب بر بقای سلول‌های PDL افزایش یافت. در مطالعه‌ی ای که در سال ۲۰۱۲ به صورت *in vivo* بر روی موش‌ها (rat) به منظور ارزیابی اثر سیمفیتوم بر ترمیم زخم صورت گرفت میزان رسوب کلاژن در بافت صدمه دیده از روز سوم تا بیست و هشتم از ۴۰٪ به ۲۴۰٪ افزایش یافت. همچنین حدود ۴۳٪ کاهش اینفیلتراسیون سلولهای التهابی در این مدت مشاهده شد (۱۹). مطالعه‌ی حاضر به طور واضح نشان دهنده‌ی خاصیت تحریک پرولیفراسیون سلولی و بهبود زخم این دارو می‌باشد. با توجه به خاصیت پرولیفراسیون سلولی سیمفیتوم بعد از گذشت ۲۴ ساعت، محیط ترکیبی نسبت به تمام محیط‌ها از جمله محیط کنترل، HBSS و شیر مدت‌دار میهن میزان بیشتری سلولهای زنده شمارش گردید.

References

- 1- Andreason JO, Andreason F.M. Avulsion" In": J. Text book and color atlas of traumatic injuries to the teeth (4th edition). Chapter 17; p: 444
2. Gomes M, Westphalen V, Westphalen F, Neto U, Fariniuk F and Everdan C. Study of storage media for avulsed tooth. Brazilian Journal of Dental Traumatology 2009; 1(2): 69-76
3. McDONALD R E, Avery's R D, Dean J A Management of trauma to the teeth and supporting tissues "In": Mosby Dentistry for the child and adolescent. Ninth edition, 2011; p: 428.
4. Andreasen JO, Reinholdt J, Dybdahl R, Soder PO, Otteskog P. Periodontal and pulpal healing of monkey incisors preserved in tissue culture before replantation. Int J Oral Surg 1978; 7(2):104-12.
5. Trope M, Chivian N, Sigurdsson A, Vann, Jr WF. Traumatic Injuries In: Pathways of the pulp, Cohen S, Burns RC Editors, 8th ed. St. Louis: Mosby; 2002:636-637.
6. Moreira-Neto J J S, Gondim J O, Raddi M S G, Pansani C A. Viability of human fibroblasts in coconut water as a storage medium. International Endodontic Journal 2009; 42:827-830.
7. Khademi AA, Saei S, Mohajeri MR, Mirkheshti N, Ghassami F, Torabi nia N. A new storage medium for an avulsed tooth. J Contemp Dent Pract 2008; 9(6):25-32.
8. Hiltz J, Trope M. Vitality of human lip fibroblasts in milk, Hanks balanced salt solution and Viaspan storage media. Endod Dent Traumatol 1991; 7:69-72.
9. Hupp JG, Mesaros SV, Aukhil I, Trope M. Periodontal ligament vitality and histologic healing of teeth stored for

با توجه به این که مطالعه ی حاضر نخستین کاربرد داروی گیاهی سیمفیتوم در دندانپزشکی می باشد پیشنهاد می گردد که با مطالعات بیشتر در این زمینه، دسترسی به یک محیط حد واسط کم هزینه و قابل دسترس جهت نگهداری سلول های PDL مهیا گردد.

نتیجه گیری

یکی از اهداف این مطالعه دسترسی به محیطی که توانایی شیر را جهت حفظ طولانی مدت سلول های لیگامان پریدونتال افزایش دهد بود. مطالعه ی حاضر با بررسی ترکیب شیر مدت دار میهن با داروی گیاهی سیمفیتوم نشان داد که این محیط در مقایسه با سایر محیط ها، از میزان بقای سلولی بیشتری برخوردار است. بر طبق نتایج این مطالعه می توان این ترکیب را به عنوان یک محیط حد واسط جدید در نظر گرفت.

تقدیر و تشکر

مقاله ی حاضر مستخرج از پایان نامه ی دانشجویی دکتر سلیمان فیجان با شماره طرح ۴۵۶۱ در دانشگاه علوم پزشکی شیراز می باشد. بدین وسیله از جناب آقای دکتر وثوق در مرکز توسعه ی پژوهش دانشکده ی دندانپزشکی به جهت راهنمایی های آماری تقدیر و تشکر می گردد.

The authors thank The Vice-chancellery of Shiraz University of Medical sciences for supporting the research (Grant#4561).

- Symphytum. Bulletin of the Georgian National Academy of Sciences 2009; 3(1):159-164.
- 15- Rose J. Herbal guide to inner health. Grosett & Dunalp, New Yourk, 1979; P: 239
- 16- Lekic P, McCulloch CA. Periodontal ligament cell population: the central role of fibroblasts in creating a unique tissue. Anat Rec. 1996; 245(2):327-341.
- 17- Marino TG, West LA, Liewehr FR, Mailhot JM, Buxton TB, Runner RR, et al. Determination of periodontal ligament cell viability in long shelf-life milk. J Endod 2000; 26(12):699-702.
- 18- Krasner PR. Avulsed teeth: improving the diagnosis. Dent Prod Rep 2007; 2: 52–64.
- 19- Araújo LU, Reis PG, Barbosa LC, Saúde-Guimarães DA, Grabe-Guimarães A, Mosqueira VC, et al. In vivo wound healing effects of Symphytum officinale L. leaves extract in different topical formulations. Pharmazie 2012; 67(4):355-360.
- extended periods before transplantation. Endod Dent Traumatol 1998; 14: 79–83.
10. Fagade OO. Extra-alveolar storage media for tooth autotransplants and replants. Internet J Dent Sci 2005; 2: 1–10.
11. Thomsson M, Blomlöf L, Otteskog P, Hammarström L. A clinical and radiographic evaluation of cultivated and autotransplanted human teeth. Int J Oral Surg 1984; 13: 211–220.
12. Lindskog S, Blomlöf L, Hammarström L. Mitoses and microorganisms in the periodontal membrane after storage in milk or saliva. Scand J Dent Res 1983; 91(6):465-472.
- 13- Sosa S, Balick MJ, Arvigo R, Esposito RG, Pizza C, Altinier G, et al. Screening of the topical anti-inflammatory activity of some Central American plants. J Ethnopharmacol 2002; 81(2):211-215.
- 14- Barbakadze V, Mulkijanyan K, Gogilashvili L, Amiranashvili L, Merlani M, Novikova Z, Sulakvelidze M. Allantoin- and Pyrrolizidine Alkaloids-Free Wound Healing Compositions from

کمیته تحقیقات دانشگاه علوم پزشکی شیراز

www.sadramj.com