

بررسی حفظ حیات سلول های لیگامان پرئودنتال دندان های گوسفند بر حسب زمان ها و محیط های نگهدارنده متفاوت

علیرضا نواب اعظم^۱، سینا قانعان^۲، محمدحسین امیرزاده ایرانی^۳، حسین قاسم پور^{۴*}

مقاله پژوهشی

مقدمه: بیرون افتادن دندان (Avulsion) یک صدمه جدی به دندان هاست. دندان خارج شده فوراً باید در ساکت دندان ریپلنت شود، وگرنه باید زمان خارج دهانی با قرار دادن دندان در یک محیط نگهدارنده مناسب کم شود. محیط نگهدارنده و زمان خارج دهانی ۲ فاکتور مهم در موفقیت آن می باشد. هدف از این مطالعه مقایسه توانایی چند محیط نگهدارنده شامل α MEM، DMEM، HBSS و نونا در جهت حفظ حیات سلول های لیگامان پرئودنتال می باشد که بر روی دندان های گوسفند انجام می گیرد تا بتوانیم یک محیط مناسب را ارائه دهیم.

روش بررسی: این مطالعه از نوع مطالعه آزمایشگاهی می باشد که سلول های DPL از ۱۲۴ دندان گوسفند جمع آوری شدند و در ۴ محیط α MEM، DMEM، HBSS و عرق نونا (بر اساس خواص دارویی و استفاده از عرق نونا در طب سنتی) برای ۶ بازه زمانی ۹۶، ۷۲، ۴۸، ۲۴، ۶، ۲ ساعت طراحی شده بودند قرار گرفتند. یک زمان صفر به عنوان گروه کنترل مثبت و یک محیط خشک برای هر بازه زمانی به عنوان گروه کنترل منفی در نظر گرفته شد. پس از گذشت زمان های مربوطه لوله ها به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۲۰۰۰ G سانتریفیوژ شده و سلول های ته نشین شده درون محلول کلاژناز نوع یک + دیسپاز قرار گرفتند، سپس یک ساعت در انکوباتور با دمای $37^{\circ}C$ و رطوبت ۵٪ گذاشته شدند، پس از آن سوسپانسیون سلولی را درون بافر PBS حل کرده و حیات سلول ها را با رنگ آمیزی تریپان بلو روی لام نئوبار و در زیر میکروسکوپ با بزرگنمایی $\times 200$ بررسی کردیم، نتایج به وسیله آنالیز آماری با روش - 2 way ANOVA با نرم افزار آماری SPSS v 15 ورژن بررسی شد.

نتایج: آزمون های آماری حاکی از اختلاف معنی دار بین گروه های بین مطالعه بودند. α MEM ($P < 0/05$) با متوسط میانگین ۹۰٪ بهترین و عرق نونا قبل از گروه های کنترل منفی با متوسط میانگین ۵۲/۲۲٪ بدترین محیط آزمایش بودند. **نتیجه گیری:** محیط نگهدارنده α MEM یک محیط ایده ال جهت حفظ حیات سلول های لیگامان پرئودنتال تا زمان ۹۶ ساعت بود و پس از آن به ترتیب HBSS، DMEM، HBSS و عرق نونا قرار گرفتند. زمان تأثیر منفی بر روی حیات سلول های PDL گذاشت.

واژه های کلیدی: لیگامان پرئودنتال، حیات سلولی، محیط نگهدارنده

ارجاع: نواب اعظم علیرضا، قانعان سینا، امیرزاده ایرانی محمدحسین، قاسم پور حسین. بررسی حفظ حیات سلول های لیگامان پرئودنتال دندان های گوسفند بر حسب زمان ها و محیط های نگهدارنده متفاوت. مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد ۱۳۹۷؛ ۲۶ (۱۲): ۹۴-۱۰۸۷.

۱- جراحی دهان و فک و صورت- استادیار دانشگاه علوم پزشکی خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی یزد، ایران

۲- دندانپزشک - دانشگاه علوم پزشکی خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی یزد، ایران

۳- دندانپزشک

۴- جراحی دهان و فک و صورت- استادیار دانشگاه علوم پزشکی خدمات بهداشتی درمانی اصفهان، ایران

* (نویسنده مسئول): تلفن: ۰۹۱۲۹۴۷۱۹۱۴ ، پست الکترونیکی: dr_hghasempoor@yahoo.com: کد پستی: ۸۱۸۵۷۷۴۷۳۵

مقدمه

بیرون افتادن دندان که صدمه جدی به دندان‌هاست و نسبت به پوسیدگی دندان‌ها شایع‌تر است. از یک طرف جدا شدن دندان می‌تواند بر پالپ و بافت (PDL (periodontal ligament به مانند بافت‌های سخت دندان، استخوان آلوئول و لثه اثر بگذارد. از طرف دیگر تحلیل جایگزینی ریشه پیش رونده ارتباطی پیچیده با ریپلنت شدن دندان‌های بیرون افتاده دارد. وضعیت لیگامان پریودنتال و پالپ برای ترمیم دندان‌های ریپلنت شده بحرانی است. فاکتورهای گوناگون که شامل طول زمان خارج آلوئولی، محیط نگهدارنده مناسب و نوع و مدت زمان اسپلنت می‌باشند در میزان موفقیت ریپلنت شدن مهم‌اند. محیط خشک برای دندان‌های بیرون افتاده موجب مرگ سلول‌های PDL متصل به ریشه می‌شود. برای کاهش این پروسه، قرار دادن دندان‌ها در یک محیط نگهدارنده ضروری می‌باشد (۱).

برای جلوگیری از صدمات بیشتر سلول‌های لیگامان پریودنتال (PDL) اگر دندان به هر دلیلی ریپلنت نشد باید زمان خشک ماندن خارج دهان با قرار دادن دندان در یک محیط نگهدارنده مناسب کم شود. محیط نگهدارنده مناسب باید برای نگهداری حیات، میتوژنیسیته و توانایی کلونوژنیک PDL صدمه دیده و نمونه‌های آنها استفاده شود (۲). توانایی یک محیط نگهداری انتقال دهنده برای حمایت حیات سلول می‌تواند از زمان خارج ماندن دندان برای وقوع انکیلوز و تحلیل جانشینی مهم تر باشد (۳).

فاکتورهایی در ترمیم PDL پس از صدمات Avulsion نقش دارند شامل تعداد صدمات فیزیکی اولیه به سطح ریشه، نوع محیط نگهدارنده و زمان سپری شده می‌باشد. هدف از درمان بیمار با دندان بیرون افتاده ریپلنت کردن فوری دندان است، ولی همیشه امکان ندارد و این‌جاست که نقش محیط‌های نگهدارنده در حفظ حیات سلول‌های PDL روشن تر می‌گردد (۴). PDL که یک هدف اولیه در آسیب بافت التهابی در بیماری پریودنتال است به‌طور نرمال شامل استئوبلاست‌ها، استئوکلاست‌ها، فیبروبلاست‌ها، بقایای اپی‌تلیالی مالاسز، ماکروفاژها، سلول‌های

مزانشیال تمایز نیافته، عناصر عصبی سلول‌های اندوتلیال و سمنتوبلاست‌هاست. فیبروبلاست‌ها سلول‌های عمده در PDL هستند (۵). عامل موفقیت ریپلنت شدن دندان بیرون افتاده بستگی به حیات فیبروبلاست‌های لیگامان پریودنتال (PDLF) دارد، که توانایی پرولیفراسیون کردن قسمت برهنه ریشه را دارد. این ضروری است که سطح برهنه ریشه سریعاً با PDLF جایگزینی و پر شود و از چسبیدن استئوکلاست‌ها به سمنتوم جلوگیری کرد (۶). نقش سلول‌های PDL در رژنره شدن بافت به خوبی مشخص است. فقط سلول‌های PDL می‌توانند در چسبیدن جدید شامل سمنتوم جدید با وارد کردن فیبرهای کلاژن اثرگذار و فرم دهنده باشند (۷). هدف از این مطالعه یافتن و معرفی یک محیط نگهدارنده مناسب جهت حفظ سلول‌های لیگامان پریودنتال پس از اولژن است.

روش بررسی

در این مطالعه که به روش مطالعه آزمایشگاهی انجام شد و روش جمع‌آوری نمونه‌ها به صورت تصادفی انجام شد، ۱۲۴ دندان از دندان‌های مولر و انسیزال سالم (فاقد پوسیدگی) گوسفند که بیش از ۱ ساعت از مرگ آن نمی‌گذرد انتخاب و Extract می‌گردد. ۲۴ دندان در ۶ گروه به‌عنوان گروه کنترل منفی قرار گرفته و ۴ دندان به‌عنوان گروه کنترل مثبت (زمان صفر) و ۹۶ دندان در گروه‌های آزمایشی جای داده می‌شوند. گروه آزمایشی حاوی ۳ محیط نگهدارنده (HBSS) Hank's balanced salt solution (MEM- α), (agpha- minimum essential medium) و یک محیط DMEM (Dulbecco's modified eagle media) پیشنهادی عرق نعنا است که هر کدام جداگانه در ۶ بازه زمانی ۲، ۶، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت بررسی می‌گردند. در هر لوله آزمایش قبل از جداسازی سلول‌ها ۱ ml از محیط مربوطه ریخته شد. دندان‌ها پس از خارج شدن از socket با سرنگ حاوی محلول نرمال سالین استریل و کلرهرگزیدین ۰/۲٪ شستشو داده شد و سپس سلول‌های PDL از سطح ریشه scrub و به صورت رندوم بین لوله‌های آزمایش تقسیم شدند. بعد از گذشت مدت زمان تعیین شده در دمای اتاق (25°C) لوله‌ها را سانتریفیوژ کرده (دور ۲۰۰۰ G به مدت ۱۰ دقیقه) و محیط رویی را دور

نسبت سلول‌های زنده به کل سلول‌ها (مجموع سلول‌های مرده و زنده) به صورت درصد حیات سلول‌های PDL بیان می‌شود. برای هر محیط در هر بازه زمانی حیات سلول‌های PDL مرتبط با ۴ لوله آزمایش ثبت می‌گردد.

تجزیه و تحلیل آماری

نتایج به وسیله آنالیز آماری با روش 2 Way ANOVA و نرم‌افزار آماری SPSS ورژن ۱۵ بررسی شد.

ملاحظات اخلاقی

پروپوزال این تحقیق توسط کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد تایید شد و با توجه به این‌که مطالعه در سال ۸۹ انجام گرفته اخذ کداخلاق وجود نداشته است.

نتایج

آنالیز آماری تفاوت آشکاری بین گروه‌ها مختلف نشان می‌دهد. (جدول ۱) آزمون مقایسه‌های دو به دو Bonferroni بین چهار محیط نگهدارنده و گروه کنترل منفی نشان داد که سلول‌های PDL نگهداری شده در محیط α MEM تعداد سلول‌های زنده بالاتری را به صورت معنادار، دارا می‌باشند (میانگین کلی ۹۰/۰۱ درصد) و بدترین محیط نگهدارنده عصاره نعنا بود. (میانگین کلی ۵۲/۲۲ درصد) تمام گروه‌ها آزمایشی به طور معنادار از گروه کنترل مثبت پایین تر و از گروه کنترل منفی بالاتر بودند (جدول ۲). یک ارتباط معکوس بین درصد حیات سلول‌های PDL و زمان نگهداری وجود داشت. (جدول ۳ و ۴) پس از محیط نگهدارنده α MEM به ترتیب محیط‌های DMEM و HBSS نتایج بهتری را نشان دادند

می‌ریزیم (البته این کار برای گروه کنترل منفی یا محیط خشک صورت نمی‌گیرد ولی مراحل بعدی برای تمامی محیط‌ها یکسان است) سلول‌های ته نشین شده داخل محلول (۳mgr/mlit Collagenase TypeI + Dispase ۴ mgr/mlit) ریخته شده به مدت یک ساعت داخل انکوباتور با دمای $37^{\circ}C$ و رطوبت ۵٪ قرار داده تا آنزیم روی نمونه‌ها اثر کرده و نمونه‌ها را به صورت سوسپانسیون تک سلولی در آورد.

در بین این یک ساعت یک دفعه نمونه‌ها را با استفاده از دستگاه shaker تکان داده تا تاثیر فیزیکی آنزیم در اثر تماس بیشتر افزایش یابد. پس از گذشت یک ساعت نمونه‌ها را از انکوباتور خارج کرده و به آن ۱ ml سرم به ازای هر ۳ ml آنزیم جهت غیر فعال شدن آنزیم اضافه نموده و دوباره به مدت ۱۰ دقیقه تحت سانتیفریوژ (دور ۲۰۰۰ G) قرار می‌دهیم تا رسوب کند بعد از سانتیفریوژ رسوب حاصل مخلوطی از سوسپانسیون سلولی و مقداری از نمونه هضم نشده بود. محیط رویی (هضم نشده) را دور می‌ریزیم و سوسپانسیون سلولی را درون بافر PBS (Phosphate Buffer Solution) حل کرده و مقدار ۱۰ میکرولیتر از این سوسپانسیون را با ۱۰ میکرولیتر رنگ زیستی تریپان بولو مخلوط کرده و روی لامل مخصوص شمارش یا لامل نئوبار (هموسیتومتر) Load می‌کنیم با استفاده از میکروسکوپ نوری با بزرگ‌نمایی $\times 200$ مشاهده می‌کنیم و سلول‌های زنده و مرده را جداگانه می‌شماریم. سلول‌های مرده به علت از بین رفتن غشاء و از دست دادن خاصیت نفوذپذیری انتخابی آن رنگ آبی تریپان بولو را گرفته و از سلول‌های زنده که شفاف اند قابل تمایزاند.

جدول ۱: نتایج حاصل از آزمون آماری 2way_ANOVA

P-value	فراوانی	میانگین	تعداد	مجموع میانگین	
۰/۰۰۰	۳۵۵۹/۶۱۵	۴۴۱/۲	۴	۹/۷۷۶	گروه آزمایشی
۰/۰۰۰	۸۹۶/۷۲۶	۰/۶۱۵	۵	۳/۰۷۵	گروه زمان
			۱۲۰	۶۷/۹۵۴	مجموع

جدول ۲: میانگین و انحراف معیار داده‌های حاصل از هر محیط درباره‌های زمانی مورد مطالعه

تعداد نمونه	انحراف معیار	میانگین درصد سلول های زنده	زمان	Group
۴	۳/۹۹۱	۹۶/۵۵	۲ ساعت	HBSS
۴	۱/۹۷۶	۸۹/۹۲	۶ ساعت	
۴	۲/۵۵۸	۸۵/۵۴	۲۴ ساعت	
۴	۳/۲۰۵	۸۱/۷۳	۴۸ ساعت	
۴	۵/۴۸۳	۷۹/۵۱	۷۲ ساعت	
۴	۲/۷۴۷	۷۲/۸۰	۹۶ ساعت	
۲۴	۸/۳۴۶	۸۴/۳۴	Overall	
۴	۳/۳۹۶	۹۷/۰۶	۲ ساعت	DMEM
۴	۰/۰۹۹	۹۵/۶۰	۶ ساعت	
۴	۲/۹۹۱	۸۹/۴۳	۲۴ ساعت	
۴	۰/۰۹۹	۸۵/۷۱	۴۸ ساعت	
۴	۳/۴۸۹	۸۱/۵۹	۷۲ ساعت	
۴	۲/۳۰۹	۷۷/۰۵	۹۶ ساعت	
۲۴	۷/۶۴۳	۸۷/۷۴	Overall	
۴	۲/۲۲۱	۹۸/۰۸	۲ ساعت	αMEM
۴	۲/۰۸۳	۹۶/۸۸	۶ ساعت	
۴	۲/۹۵۷	۹۲/۰۳	۲۴ ساعت	
۴	۰/۴۸۱	۸۷/۰۷	۴۸ ساعت	
۴	۳/۱۲۷	۸۳/۹۶	۷۲ ساعت	
۴	۱/۵۶۲	۸۲/۰۳	۹۶ ساعت	
۲۴	۶/۵۶۷	۹۰/۰۱	Overall	
۴	۲/۱۱۰	۹۴/۴۷	۲ ساعت	عصاره نعنا
۴	۲/۷۴۱	۹۰/۰۳	۶ ساعت	
۴	۳/۴۷۲	۸۲/۰۵	۲۴ ساعت	
۴	۴/۰۲۷	۴۶/۷۸	۴۸ ساعت	
۴	۰	۰	۷۲ ساعت	
۴	۰	۰	۹۶ ساعت	
۲۴	۴۰/۸۹۹	۵۲/۲۲	Overall	
۴	۲/۳۸۱	۶۷/۸۶	۲ ساعت	گروه کنترل منفی
۴	۴/۲۰۳	۲۸/۵۳	۶ ساعت	
۴	۰	۰	۲۴ ساعت	
۴	۰	۰	۴۸ ساعت	
۴	۰	۰	۷۲ ساعت	
۴	۰	۰	۹۶ ساعت	
۲۴	۲۶/۰۰۲	۱/۰۶	Overall	

جدول ۳: میانگین و انحراف معیار گروه‌های زمان (۲ و ۴ و ۶ و ۸ و ۱۲ و ۲۴ و ۳۰ و ۴۸ و ۷۲ و ۹۶ ساعت)

تعداد نمونه	انحراف معیار	میانگین سلول‌های زنده	زمان	Time-groups
۲۰	۱۲/۱۱۲	۹۰/۸۰	۲ ساعت	
۲۰	۲۶/۶۷۱	۸۰/۱۹	۶ ساعت	
۲۰	۳۶/۰۵۹	۶۹/۸۱	۲۴ ساعت	
۲۰	۳۴/۵۲۴	۶۰/۲۶	۴۸ ساعت	
۲۰	۴۱/۱۸۴	۴۹/۰۱	۷۲ ساعت	
۲۰	۳۸/۹۹۶	۴۶/۳۸	۹۶ ساعت	
۱۲۰	۳۶/۱۶۲	۶۶/۰۸	Overall	

جدول ۴: آزمون آماری *Pearson correlation* بین زمان مطالعه و تعداد سلول‌های زنده

Correlations	
میانگین تعداد سلول زنده	زمان
-۰/۹۶۳**	۱
۰/۰۰۲	معنی دار
۶	تعداد

(ارتباط در سطح ۰/۰۱ معنی دار می‌باشد).

همکاران (۸) Lekic و همکاران در سال ۱۹۹۸ در مطالعه‌ای تاثیر محیط‌های نگهدارنده را بر روی ظرفیت کلونوژنیکی سلول‌های PDL بررسی کردند. آن‌ها این مطالعه را بر روی محیط‌های α MEM، HBSS، بزاق و شیر در دو بازه زمانی ۳۰ و ۶۰ دقیقه انجام دادند. ظرفیت کلونوژنیکی سلول‌های لیگامان پرپیوندتال نگهداری شده در α MEM کمترین کاهش را در بازه‌های زمانی مورد آزمایش نشان داد و α MEM در بین سایر محیط‌ها که یکی از آن‌ها HBSS باشد بهترین بقای سلولی را نشان داد که نتیجه این مطالعه و مطالعه مشابه دیگری که در سال ۲۰۰۱ توسط Ashkenazi و همکاران انجام شد، با مطالعه حاضر هم خوانی دارد (۹،۶). Ashkenazi و همکاران در سال ۱۹۹۹ در مطالعه‌ای حیات، میتوزنیستی و ظرفیت کلونوژنیکی سلول‌های لیگامان پرپیوندتال را پس از نگهداری در ۵ محیط مختلف که شامل α MEM، شیر، HBSS، ViaSpan و CM (Conditional medium) است، بررسی کردند. آن‌ها گزارش نمودند که HBSS و شیر موثرترین محیط‌های نگهداری جهت

بحث

نتایج این مطالعه نشان داد که در کل بازه‌های زمانی، ۹۶ ساعت، α MEM بهترین محیط نگهدارنده جهت حفظ حیات سلول‌های PDL بوده و DMEM و HBSS به ترتیب در جایگاه‌های دوم و سوم قرار دارند. عصاره نعنا بعنوان محیط پیشنهادی اثر کمتری بر حفظ حیات سلول‌های PDL دارد. با این حال، در فواصل زمانی ۲، ۶ و ۲۴ ساعت نتایج مطلوبی نشان داد. بنابراین، اگرچه برای بازه‌های زمانی طولانی مناسب نیست، ولی در بازه‌های کوتاه‌تر محیط نسبتاً مناسبی می‌باشد. در تمام محیط‌ها زمان نگهداری دو ساعت بهترین و بازه زمانی ۹۶ ساعت بدترین نتایج را در پی داشت. در مطالعه حاضر برای حفظ حداکثر حیات سلول‌های سطح ریشه (لیگامان پرپیوندتال) تحت تاثیر کلاژناز نوع I و دیسپاز قرار گرفته و از رنگ‌آمیزی تریپان بلو جهت اندازه‌گیری حیات سلول‌ها و تمایز سلول‌های مرده از سلول‌های زنده استفاده شد (روش Pileggi و

در مورد محیط‌های نگهدارنده دندان پس از اوالژن، محیط‌های نگهدارنده α MEM و HBSS نتایج خوبی را نشان داده بودند که از این جهت مطالعه حاضر با آن هم‌خوانی دارد. بنابراین، به‌عنوان یک استراتژی پروفیلاکتیک ثانویه، انتخاب و تامین محیط نگهدارنده مناسب در مکان‌هایی که بروز آسیب‌های دندانی بیشتر است، از قبیل مدارس و زمین‌های ورزشی، منطقی به نظر می‌رسد. (۱۲)(۱۳)

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج به‌دست آمده از مطالعه حاضر، α MEM جهت حفظ حیات سلول‌های PDL محیط مناسب‌تری نسبت به سه محیط نگهدارنده دیگر شامل DMEM، HBSS و عصاره نعنا می‌باشد. باین حال عصاره نعنا در مواردی که بازه زمانی محیط خارج دهانی کوتاه‌تر (۲۴ ساعت) است، نگهدارنده نسبتاً مناسبی می‌باشد.

سپاسگزاری

این مقاله منتج از پایان‌نامه بوده و لازم به سپاسگزاری از مرکز تحقیقات ناباروری یزد می‌باشد. ضمناً هزینه‌های این پایان‌نامه به عهده محققین بوده است. تعارض در منافع: وجود ندارد

حفظ حیات سلول‌های PDL تا ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد بودند. (۷) علت این اختلاف می‌تواند تفاوت در روش کار باشد. علت دیگر، تفاوت در دمای آزمایش می‌باشد که مطالعه ما در دمای اتاق (۲۵ °C) و این مطالعه در دمای ۴°C انجام شده است. همین محقق در مطالعه ای دیگر دما را به‌عنوان یک فاکتور موثر و اصلی معرفی می‌کند. (۶). هم‌چنین داده‌های تحقیق حاضر نشان داد که نسبتی معکوس مابین تعداد سلول‌های زنده PDL و زمان نگهداری وجود دارد که این الگو به صورت مکرر در مطالعات دیگر هم قابل مشاهده است. هم‌چنین تحقیقات تاکید کرده اند که حیات دندان ریپلنت شده به‌طور مستقیم با تعداد سلول‌های زنده PDL در ارتباط است. (۱۰) و (۱۵). ریپلنت کردن دندان‌ها بعد از گذشت ۳۰ دقیقه از ترومای ایجاد شده نتایج موفقیت آمیز بیشتری نسبت به فواصل زمانی طولانی‌تر هم‌چون ۲ ساعت باقی ماندن در محیط خشک دارد که هیچ‌گونه سلول زنده ای یافت نمی‌شود. (۵) و (۱۴). در مطالعه حاضر، در گروه کنترل منفی (محیط خشک) تا بازه زمانی ۶ ساعت تعدادی سلول زنده یافت شد.

برخی مطالعات آزمایشگاهی، بیان دارند که محیط نگهدارنده مناسب، عامل پیشگویی کننده قوی‌تری در مقایسه با بازه زمانی که دندان در محیط خارج دهانی قرار دارد می‌باشد. (۱۱۴) طبق مطالعه مروری انجام شده توسط Poi و همکاران

References

- 1-Khademi AA, Atbaee A, Razavi SM, Shabani M. *Periodontal healing of replanted dog teeth stored in milk and egg albumen*. Dent Traumatol 2008; 24(5): 510-4. [Persian]
- 2-Kim HS, Park JW, Yeo SI, Choi BJ, Suh JY. *Effects of high glucose on cellular activity of periodontal ligament cells in vitro*. Diabetes Res ClinPract 2006; 74(1): 41-7.
- 3-Ozan F, Tepe B, Polat ZA, Er K. *Evaluation of in vitro effect of Morusrubra (red mulberry) on survival of periodontal ligament cells*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral RadiolEndod 2008; 105(2): e66-9.
- 4-Gopikrishna V, Thomas T, Kandaswamy D. *A quantitative analysis of coconut water: a new storage media for avulsed teeth*. Oral Surg Oral

- Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2008; 105(2): e61-5.
- 5-Martin MP, Pileggi R. *A quantitative analysis of Propolis: a promising new storage media following avulsion*. Dent Traumatol 2004; 20(2): 85-9.
- 6-Ashkenazi M, Marouni M, Sarnat H. *In vitro viability, mitogenicity and clonogenic capacity of periodontal ligament cells after storage in four media at room temperature*. Endod Dent Traumatol 2000; 16(2): 63-70.
- 7-Ashkenazi M, Sarnat H, Keila S. *In vitro viability, mitogenicity and clonogenic capacity of periodontal ligament cells after storage in six different media*. Endod Dent Traumatol 1999; 15(4): 149-56.
- 8-Pileggi R, Dumsha TC, Nor JE. *Assessment of post-traumatic PDL cells viability by a novel collagenase assay*. Dent Traumatol 2002; 18(4): 186-9.
- 9-Lekic PC, Kenny DJ, Barrett EJ. *The influence of storage conditions on the clonogenic capacity of periodontal ligament cells: implications for tooth replantation*. Int Endod J 1998; 31(2): 137-40.
- 10- Poornima P, Kotari S, Sasalawad SS, Roshan N. *Save cells before tooth replantation: A review*. International J Contemporary Dental Med Rev 2015; 2015.
- 11- Poi WR, Sonoda CK, Martins CM, Melo ME, Pellizzer EP, de Mendonça MR, et al. *Storage media for avulsed teeth: a literature review*. Braz Dent J 2013; 24(5): 437-45.
- 12- Flores MT, Andersson L, Andreasen JO, Bakland LK, Malmgren B, Barnett F, et al. *Guidelines for the management of traumatic dental injuries. II. Avulsion of permanent teeth*. Dent Traumatol 2007; 23(3): 130-36.
- 13- Petersson EE, Andersson L, Sörensen S. *Traumatic oral vs non-oral injuries*. Swed Dent J 1997; 21(1-2): 55-68.
- 14- Glendor U, Halling A, Andersson L, Eilert-Petersson E. *Incidence of traumatic tooth injuries in children and adolescents in the county of Vastmanland, Sweden*. Swed Dent J 1996; 20(1-2): 15-28.
- 15- Cardoso Lde C, Poi WR, Panzarini SR, Sonoda CK, Rodrigues Tda S, Manfrin TM. *Knowledge of firefighters with special paramedic training of the emergency management of avulsed teeth*. Dent Traumatol 2009; 25(1): 58-63.

Evaluation of preserving the viability of sheep's teeth PDL cells according to the different times and storage medias

Alireza Navabazam¹, Sina Ghanean², Mohammad Hosein Amirzade Iranaq³, Hosein Ghasempoor^{†4}

Original Article

Introduction: Vitality of periodontal ligament (PDL) cells is very critical for replantation of complete avulsion teeth due to traumatic injuries. This is important for transferring an avulsed tooth to clinic for replantation that which Medias used for storage. This study aimed to compare the vitality of PDL cells of sheep teeth cultured in different storage medias including α -Minimum Essential Medium (α MEM), Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), Hank's Balanced Salt Solution (HBSS), and mint extract

Methods: In this lab trial study, PDL cells were obtained from 124 healthy anterior and posterior sheep teeth and cultured in α MEM, DMEM, HBSS, and mint extract for periods of 2, 6, 24, 48, 72, or 96 hours (24 groups). For each solution, positive control group were PDL cells without incubation in any storage media. For each group, there was a negative control considered cells growing in dry plate with no medium. After exposure of PDL cells to scheduled solution for scheduled incubation time, centrifuge was performed for 10 minutes at rate of 2000G. Then cell precipitates were added into the solution of collagenase (3mgr/ml) and Dispase (4mgr/ml to cell precipitates, which were incubated at 37° C for 60 minutes. After washing cellular suspension in PBS, vitality of the cells was assessed by Trypan blue exclusion, on a neobar slide by magnification of 200X. The data were analyzed statistically using 2-way ANOVA test by SPSS version 15.

Results: Statistically significant differences in efficacy of different medias were obtained at least between two media ($P=0.0001$). PDL cells cultured in α MEM and mint extract showed 90% and 52.22% vitality representing, respectively, the best and the weakest storage media.

Conclusion: α MEM can be a suitable transport medium up to 96 hours to preserve the vitality of the PDL cells of avulsed teeth. There is a reverse correlation between the viability of PDL cells and incubation time, increasing the time decreases the viability.

Keywords: PDL, Cell viability, Storage media

Citation: Navabazam A, Ghanean S, Amirzade Iranaq MH, Ghasempoor H. Evaluation of preserving the viability of sheep's teeth PDL cells according to the different times and storage medias. J Shahid Sadoughi Uni Med Sci 2017; 26(12): 1087-94.

¹Department of Oral and Maxillofacial Surgery- Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Iran

² DDS Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Iran

³DDS

⁴Department of Oral and Maxillofacial Surgery- Isfahan University of Medical Sciences, Iran

*Corresponding author: Tel:09129471914, email: hsghasempoor@gmail.com