بررسی تأثیر محیط‌های نگهدارنده بر قابلیت تکثیر سلول‌های پالپ دندان آپکس باز خرگوش

دکتر سید ابراهیم جباری فر*، دکتر سید محمد رضوی[۱]، دکتر متین عابد حقیقی[۲]، دکتر عباسعلی خادمی[۳]، دکتر فرناز مشرف جوادی[۴]

چکیده

مقدمه: قابلیت تکثیر سلول‌های پالپ متعاقب جاگذاری مجدد در حفره آلوئول امکان بازسازی پالپ و ریشه نابالغ را فراهم می‌آورد. هدف از این پژوهش، مقایسه پتانسیل تکثیر سلول‌های پالپ دندان با آپکس باز خرگوش نگهداری شده در شیر و سفیده تخم‌مرغ و محلول نمکی متعادل شده هانک (Hanks Balanced Salt Solution) بود.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش تجربی آینده‌نگر، ۶۰ دندان ثنایای آپکس باز خرگوش پس از خارج نمودن به روش جراحی باز، به مدت یک، سه و شش ساعت به طور جداگانه در شیر، سفیده تخم‌مرغ و محلول هانک نگهداری شد. سپس دندان‌های خارج شده از محلول‌های نگهداری، فیکس و دکلسیفیه گردید. از هر دندان سه برش هیستوپاتولوژیک از پالپ قسمت‌های کرونال، میانی و اپیکال تهیه شد. برش‌های هیستولوژیک به روش رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمیایی برای ظهور آنتی‌ژن Ki-67 آماده شد. میانگین شاخص نشان‌دار شدن سلول‌های پالپ نمونه‌ها تعیین و توسط آزمون واریانس سه طرفه آنالیز آماری انجام شد ($\alpha = ۰/۰۵$).

یافته‌ها: میانگین و انحراف معیار شاخص نشان‌دار شدن سلول‌های پالپ در یک، سه و شش ساعت نگهداری در شیر به ترتیب ۴/۳۷ ± ۱۳/۷، ۴/۱۱ ± ۱۴/۵۶ و ۶۵۶ ± ۱۵/۵۲، در سفیده تخم‌مرغ به ترتیب ۲/۸۷ ± ۱۴/۹۰، ۵۹ ± ۱۷/۶۶ و ۳/۸۷ ± ۱۲/۲۳ و در محلول هانک به ترتیب ۱/۵۷ ± ۱۴/۶۰، ۵/۰۲ ± ۱۴/۱۴ و ۶/۵۴ ± ۱۸/۸۵ بود.

نتیجه‌گیری: قابلیت تکثیر سلول‌های پالپ نگهداری شده در شیر و سفیده تخم‌مرغ و محلول نمکی متعادل شده هانک به مدت یک، سه و شش ساعت یکسان بود. در محیط‌ها و زمان‌های ذکر شده، قابلیت تکثیر سلول‌های پالپ ناحیه اپیکال بیش از قسمت میانی و ناحیه میانی بیش از قسمت کرونالی حفظ شد.

کلید واژه‌ها: خروج دندان ازحفره آلوئول، پالپ دندان، بازسازی، جاگذاری مجدد دندان، محیط نگهدارنده.

* دانشیار، گروه دندان‌پزشکی کودکان، دانشکده دندان‌پزشکی و عضو مرکز تحقیقات دندان‌پزشکی ترابی‌نژاد، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران. (مؤلف مسؤول)
jabarifar@dnt.mui.ac.ir

۱: دانشیار، گروه آسیب شناسی دهان، فک و صورت، دانشکده دندان‌پزشکی و عضو مرکز تحقیقات دندان پزشکی ترابی‌نژاد، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

۲: متخصص دندان‌پزشکی کودکان، اصفهان، ایران.

۳: استاد، گروه اندودنتیکس، دانشکده دندان‌پزشکی و عضو مرکز تحقیقات دندان‌پزشکی ترابی‌نژاد، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

۴: متخصص دندان‌پزشکی ترمیمی، دانشکده دندان‌پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

این مقاله حاصل پایان‌نامه تخصصی دندان‌پزشکی کودکان با شماره ۳۸۸۴۲۳ مصوب دانشگاه علوم پزشکی اصفهان می‌باشد.

این مقاله در تاریخ ۸۹/۱۰/۱ به دفتر مجله رسیده، در تاریخ ۹۰/۱/۲۰ اصلاح شده و در تاریخ ۹۰/۱/۲۹ تأیید گردیده است.

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

امروزه پیش‌گیری از پیامدهای نامطلوب اجتماعی، روحی، اقتصادی و بیولوژیک صدمات دندانی یکی از خواسته‌های والدین، دندان‌پزشکان و متولیان سلامت دهان و دندان است[۱]. یکی از آسیب‌های دندانی خروج کامل آن از حفره آلوئول پس از زمین خوردن، دوچرخه سواری و ورزش‌های فردی و گروهی در کودکان می‌باشد. در بیشتر موارد خروج کامل دندان از حفره آلوئول در سن ۷ تا ۹ سالگی قبل از اتمام تکامل ریشه رخ می‌دهد. خروج کامل دندان از حفره آلوئول آسیب‌های شدیدی به بافت‌های پالپ، پریودنشیوم و استخوان آلوئول، به خصوص در ناحیه پری‌اپکس، وارد می‌نماید. شایع‌ترین پیامد آسیب‌ها پس از جاگذاری مجدد، تحلیل ریشه، نکروز پالپ و توقف تکامل مجموعه عاج و پالپ و تخریب پریودنشیوم می‌باشد. به دنبال عدم موفقیت در روند رژنراسیون، دیواره کانال ریشه ضعیف و شکننده شده، نسبت استاندارد طول تاج به ریشه به هم خورده، حفره پالپ ریشه وسیع شده، خطر شکستگی ریشه افزایش می‌یابد و نیز امکان درمان موفق ریشه وجود ندارد[۲].

بقای دندان خارج شده از حفره آلوئول پس از جاگذاری مجدد بستگی به توانایی خون رسانی مجدد و ترمیم دیگر اجزای سلولی پالپ و پریودنشیوم دارد. نکروز، عفونت و آبسه متعاقب خروج کامل دندان از حفره آلوئول، باعث تحلیل التهابی پیش رونده مرتبط با عفونت ریشه دندان می‌گردد؛ به طوری که ۳۷ درصد از دندان‌های نابالغ جاگذاری شده مبتلا به تحلیل خارجی و داخلی ریشه می‌شوند[۳]. پس از جاگذاری مجدد دندان نابالغ، احتمال بازسازی کمپلکس پالپ- عاج و پریودنشیوم وجود دارد. ریشه کوتاه دندان آپکس باز اجازه رشد عروق ناحیه آپکس به داخل فضای پالپ را می‌دهد. سرعت بازسازی عروق و رگ سازی به شرط عدم ورود باکتری‌ها و عفونت به ناحیه افزایش می‌یابد[۴]. در درمان‌های بازسازی دندان‌های زنده و آپکس باز، باید شرایط بیولوژیک به گونه‌ای فراهم شود که بعضی از سلول‌های قطعه اپیکالی پالپ زنده باقی مانده، تکثیر شوند تا بتوانند جایگزین پالپ نکروزه کرونالی تر گردند؛ در این حالت، علاوه بر تغذیه و اکسیژن رسانی به بافت، داربستی فراهم می‌گردد که امکان رژنراسیون و رشد و تکامل پالپ را فراهم می‌سازد[۵]. منشأ سلول‌های بازسازی کننده به طور دقیق تعیین نشده است، ولی سلول‌های بنیادی موجود در ناحیه اپیکال و دیگر قسمت‌های زنده پالپ یا بافت‌های نفوذی پریودنشیوم مورد توجه قرار گرفته‌اند. محققین گزارش کرده‌اند که سلول‌های غلاف هرتویک اپی‌تلیالی ریشه می‌توانند بافت مزانشیمی اپکس پالپ را به اجزای تخصصی تشکیل دهنده مجموعه پالپ و عاج متمایز نمایند[۹-۶].

عرض و طول کانال ریشه، مدت زمان بیرون ماندن دندان، ویژگی‌های بیوشیمیایی، بیوفیزیکی و سازگاری‌های بیولوژیک مواد نگهدارنده و کاربرد مواد با توان تکثیر و ضد عفونی از مهمترین عوامل تأثیرگذار بر بازسازی و ترمیم پالپ و پریودنشیوم پس از جاگذاری است. قابلیت دفاع و بازسازی پالپ وتکامل دندان نیازمند تکثیر و تمایز سلولی می‌باشد که نظیر آن در پالپوتومی و پوشش مستقیم و غیر مستقیم پالپ مشاهده می‌گردد. بررسی قابلیت حیات سلول‌های پالپ به تنهایی با موفقیت بالینی همراه نیست و توانایی عملکردی سلول‌ها و بافت‌ها و تکثیر و توانایی تشکیل کلونی و تمایز در آن مهم هستند. با این خصوصیات، امکان افتراق کارایی محیط‌های نگهدارنده دندان در اوالژن فراهم می‌گردد. در پژوهش‌های گذشته از شیوه‌های رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمیایی جهت بررسی توانایی تکثیر سلول‌ها استفاده شده است. Tekin و همکاران[۵]، از این روش‌ها برای ردیابی آنتی‌ژن تکثیر هسته سلول در سلول‌های پالپ دندان نابالغ استفاده کرده، گزارش کردند که محیط کشت اختصاصی سلولی (SCCM) بهتر از محلول نمکی متعادل شده هانک (Hank's Balanced Salt Solution یا HBSS) قادر به حفظ قابلیت تکثیر سلول‌های پالپ دندان می‌باشد. آنتی‌ژن Ki67 نشانگر میتوز است که در هسته سلول‌های در حال تکثیر در مراحل S، G_1 و G_2 از رشد سلولی یافت می‌شود و در مرحله G_0 (استراحت) وجود ندارد. ارتباط نزدیکی بین ایمونورادیواکتیویته Ki-67 و میزان رنگ پذیری و اندازه هسته سلول‌های در حال تکثیر وجود دارد [۱۴-۱۰].

هدف از این پژوهش، مقایسه تأثیر قابلیت تکثیر سلول‌های پالپ دندان آپکس باز خارج شده خرگوش، نگهداری شده در سفیده تخم‌مرغ، شیر و محلول HBSS بر اساس شاخص نشان‌دار (Labiality Index) بود.

Archive of SID
www.SID.ir

مواد و روش‌ها

در این پژوهش تجربی آینده‌نگر با توجه به هدف مطالعه، به دلیل لزوم باز بودن آپکس، دندان‌های خرگوش‌هایی با حدود سنی یکسان انتخاب شدند. تعداد ۱۶ دندان ثنایای خرگوش به‌طور تصادفی برای هر محیط نگهدارنده (شیر، محلول HBSS و سفیده تخم‌مرغ) انتخاب گردید. پس از واکسیناسیون و قرنطینه حیوانات، ابتدا هر خرگوش به‌وسیله تزریق عضلانی داروهای کتامین ۸۰ mg/kg، آسپرومازین ۰/۰۲ mg/kg و آتروپین ۲ mg/kg (Daroopaksh Co, Tehran, Iran) بی‌هوش شدند؛ سپس به وسیله تزریق انفیلتراسیون در سمت لینگوال، بی‌حسی برای ناحیه دندان‌های ثنایای فک بالا و پایین حیوان به دست آمد. به دلیل انحنای ریشه دندان‌های خرگوش، از هر فک حیوان، رادیوگرافی گرفته شد تا از آناتومی ریشه و استخوان اطراف اطلاع حاصل شود. روش باز، برای دادن فلپ و برداشتن استخوان اطراف ریشه و خارج کردن دندان‌ها در اتاق عمل (لانه حیوانات) مرکز تحقیقات پروفسور ترابی نژاد اصفهان انجام شد و برای پروسه تهیه لام‌های هیستوپاتولوژیک به آزمایشگاه آسیب شناسی دهان، فک و صورت دانشکده دندان‌پزشکی اصفهان ارسال گردید. سپس حیوانات با عمیق‌تر کردن و ادامه بیهوشی قربانی شدند. بعد از خارج کردن، دندان‌ها مستقیم و به طور تصادفی در لوله‌های حاوی مواد نگهدارنده شیر استریلیزه کم چرب با ماندگاری طولانی (Damdaran Co, Iran)، سفیده تخم‌مرغ (Simorgh Co, Iran) و محلول HBSS (Save-A-Tooth, Merck Co, Germany) برای مدت زمان یک، سه و شش ساعت قرار گرفتند. پس از گذشت زمان‌های لازم، دندان‌ها از محیط نگهدارنده خارج و به منظور تثبیت سلول‌ها در شیشه‌های حاوی فرمالین ده درصد خنثی، به مدت ۲۴ ساعت شناور شدند و پس از ۱۲ هفته دکلسیفیکاسیون نمونه‌ها توسط EDTA برای رنگ آمیزی و تهیه لام آماده گردید. به منظور تشخیص وجود آنتی Ki67 در هسته سلول‌های پالپ دندان‌های مورد آزمایش، از تکنیک ایمونوهیستوشیمیایی استفاده شد. از هر دندان سه برش طولی با استفاده از بلوک‌های پارافین به ضخامت ۳ تا ۴ میلی‌متر تهیه گردید؛ سپس مقاطع بر روی لام آغشته به پلی ال لایزین (Poly L. Lysine) برای جلوگیری از کنده شدن بافت قرار داده شد. در مرحله بعد، عمل دهیدراتاسیون و جداسازی پارافین از بلوک‌ها در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ دقیقه به کمک گزیلول، الکل و آب مقطر صورت گرفت؛ سپس نمونه‌ها در محلول بافری سیترات با pH = ۶، برای تثبیت آنتی‌ژن Ki-67 به مدت ۱۵ تا ۲۰ دقیقه در مایکروویو با فرکانس ۷۵۰ هرتز قرار گرفتند تا ساختمان مولکولی آنتی‌ژن فیکس شود. بار دیگر نمونه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در دمای سرد اتاق قرار گرفته و سپس به وسیله آب مقطر شستشو داده شد. به منظور تقویت آنتی‌ژن، نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه در محلول PBS (Phosphate bufferal saline) قرار گرفت و سپس در پراکساید هیدروژن برای انکوبه کردن گذاشته و با آب مقطر شستشو داده شد. از محلول Protein Block (RE7102) برای جلوگیری از رنگ آمیزی کاذب استفاده گردید. لام‌ها بار دیگر به مدت ۵ دقیقه در محلول PBS قرار داده شد و جهت بررسی ظهور آنتی‌ژن Ki-67 به مدت یک ساعت در آنتی‌بادی اولیه، علیه ژن هسته‌ای Ki-67 فعال، با غلظت یک درصد در دمای ۲۵ درجه قرار گرفتند تا آنتی‌بادی به آنتی‌ژن اتصال پیدا کند. پس از طی این مراحل، لام‌ها دوباره توسط محلول PBS به مدت ۵ دقیقه شستشو داده شدند و ۳۰ دقیقه در محلول

Post primary Block (RE 7111) قرار گرفتند. در این مرحله، آنتی‌بادی و محلول PPB، کمپلکسی را ایجاد می‌کنند. از آنتی‌بادی ثانویه برای افزایش حساسیت تکنیک استفاده گردید. سپس نمونه‌ها با محلول PBS شستشو داده شد و در محلول Novolink Polymer (RE 7112) به مدت نیم ساعت انکوبه گردید. محلول Novolink Polymer در مقایسه با روش بیوتین استرپتاویدین، جایگاه‌های بیشتری برای واکنش دارد و باعث افزایش دقت و حساسیت می‌گردد. بار دیگر بعد از شستشو با محلول PBS، نمونه‌ها در کروموژن دی‌آمینوبنزیدین، به مدت پنج دقیقه انکوبه شده، با آب مقطر و سپس PBS شستشو داده شد. در این مرحله در صورتی که آنتی‌ژن مورد نظر در بافت وجود داشته باشد، به رنگ قهوه‌ای نشان‌دار می‌گردد. تمام نمونه‌ها در هماتوکسیلین، جهت رنگ آمیزی زمینه قرار گرفت و سپس اسلایدها با آب شستشو داده شد. در مرحله نهایی، نمونه‌ها در الکل و گزیلول به منظور شفاف‌سازی قرار گرفت و مانت شد. پس از رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمیایی، تمام لام‌ها برای تعیین تعداد سلول‌های Ki-67 مثبت در هر هزار سلول در سه منطقه تاجی، یک سوم میانی و اپیکالی، زیر میکروسکوپ نوری با درشت نمایی ۱۰۰ و ۴۰۰ قرار گرفت. شاخص نشان‌دار شدن سلول‌های پالپ با شمارش تعداد سلول‌های رنگ گرفته محاسبه

Archive of SID
www.SID.ir

شد. میانگین شاخص نشان‌دار شدن بر اساس برش هر دندان و هر ناحیه از پالپ در محیط‌های شیر، سفیده تخم‌مرغ و محلول هانک (HBSS) بر اساس معادله زیر به دست آمد:

$$\text{شاخص نشان‌دار سلول (Liability Index)} = \frac{\text{تعداد سلول‌های رنگ گرفته}}{\text{هزار عدد سلول پالپ}}$$

سپس داده‌ها وارد نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۱/۵ شد و تحلیل واریانس سه طرفه برای داده‌های مکرر در زمان‌های یک، سه و شش ساعت در سه ناحیه تاجی، میانی و اپیکالی پالپ ریشه انجام گردید.

یافته‌ها

با استفاده از آنالیز واریانس سه طرفه برای داده‌های مکرر، میانگین شاخص نشان‌دار شدن سلول‌ها در محیط‌های نگهدارنده سفیده تخم‌مرغ، شیر و محلول هانک (HBSS)، در سه ناحیه پالپ کرونالی، میانی و اپیکالی در زمان‌های مختلف به دست آمد.

میانگین و انحراف معیار شاخص نشان‌دار سلول‌های پالپ ناحیه اپیکال یک، سه و شش ساعت نگهداری در شیر به ترتیب ۷/۰۸ ± ۲۳/۸۳، ۷۶/ ۵ ± ۲۱/۷۱ و ۱۲/۲۳ ± ۳۲/۱۴ بود.

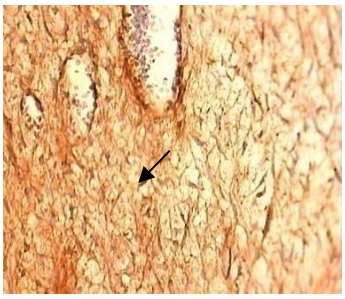
میانگین و انحراف معیار شاخص نشان‌دار سلول‌های پالپ قسمت میانی یک، سه و شش ساعت نگهداری در سفیده تخم‌مرغ به ترتیب ۴/۸۰ ± ۱۲/۵۰، ۴/۱۵ ± ۱۴/۷ و ۵/۷۵ ± ۱۷/۱۴ به دست آمد.

میانگین و انحراف معیار شاخص نشان‌دار سلول‌های پالپ در قسمت‌های کرونالی، میانی و اپیکالی یک، سه و شش ساعت بعد از نگهداری در محلول هانک (HBSS) و سفیده تخم‌مرغ در جدول ۱ آمده است (اشکال ۱ تا ۶).

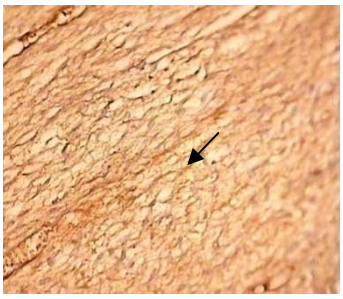
به منظور بررسی اثر متقابل نوع محیط نگهداری و شاخص نشان‌دار شدن سلول‌ها در نواحی کرونالی، میانی و اپیکالی پالپ، از آزمون آنالیز واریانس سه طرفه استفاده گردید و اندازه احتمال معنی‌دار شدن آن (p value) ۰/۴۹۱ به دست آمد. قابلیت تکثیر سلول‌های پالپ در محیط‌های نگهداری هانک (HBSS)، شیر و سفیده تخم‌مرغ در نواحی کرونالی، میانی و اپیکالی پالپ تفاوت معنی‌داری نداشت.

همچنین با استفاده از تحلیل واریانس سه طرفه، اندازه احتمالی معنی‌دار شدن برابر با ۰/۴۴۷ به دست آمد که نشان می‌دهد، قابلیت تکثیر سلول‌های پالپ بعد از نگهداری در مواد مذکور تفاوتی نداشته است. با افزایش مدت زمان نگهداری دندان در محیط‌های نگهدارنده، اندازه شاخص نشان‌دار افزایش یافت، که معنی‌دار نبود. میانگین و انحراف معیار شاخص نشان‌دار شدن سلول‌های پالپ در صورت نگهداری آن‌ها در شیر، سفیده تخم‌مرغ و محلول هانک (HBSS) نزدیک به هم بود. بیشترین اندازه شاخص نشان‌دار شدن در گروه نگهداری شده، در سفیده تخم‌مرغ و کمترین آن در محلول هانک (HBSS) بود.

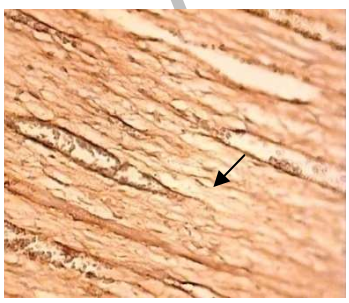
پس از بررسی آماری میانگین هندسی (لگاریتم میانگین حسابی) با استفاده از تحلیل واریانس سه طرفه برای داده‌های مکرر، اندازه شاخص نشان‌دار معنی‌دار نبود (p value = ۰/۸۳۵) که نشان می‌دهد قابلیت تکثیر سلول‌های پالپ در سه محیط شیر، سفیده تخم‌مرغ و محلول هانک (HBSS) یکسان بوده است (جدول ۱).



الف) شیر



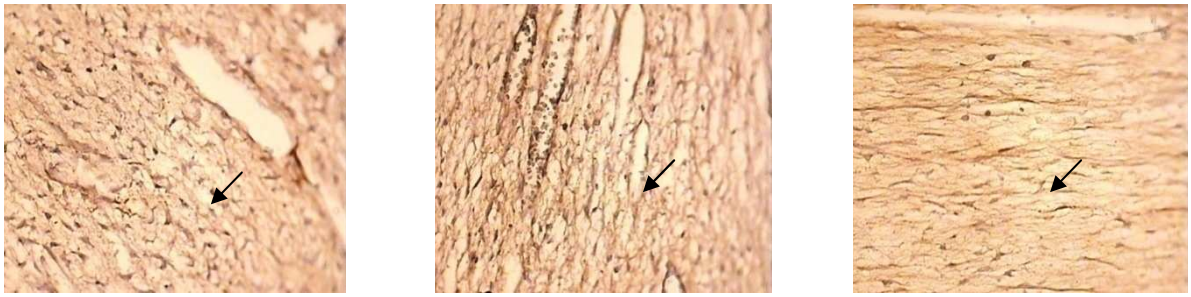
ب) سفیده تخم‌مرغ



ج) HBSS

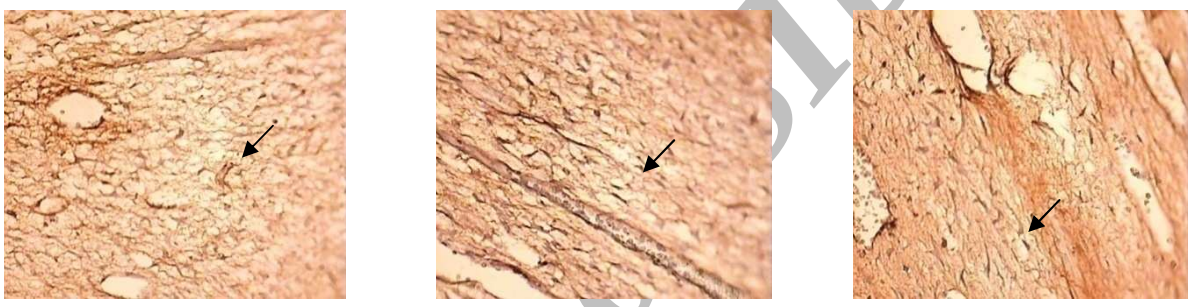
Archive of SID
www.SID.ir

شکل ۱. نمای میکروسکوپ نوری (۴۰۰ ×) ناحیه اپیکالی پالپ، پس از ۱ ساعت نگهداری دندان در محیط‌های واسط



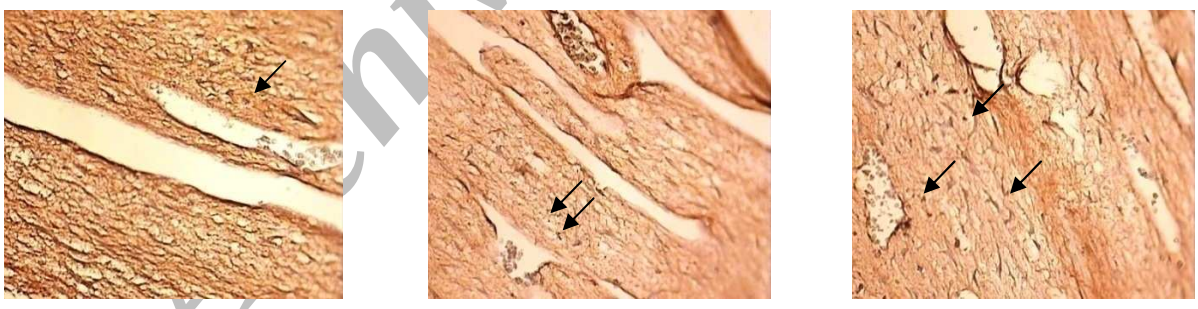
الف) شیر　　ب) سفیده تخم‌مرغ　　ج) HBSS

شکل ۲. نمای میکروسکوپ نوری (۴۰۰ ×) ناحیه اپیکالی پالپ، پس از ۳ ساعت نگهداری دندان در محیط‌های واسط



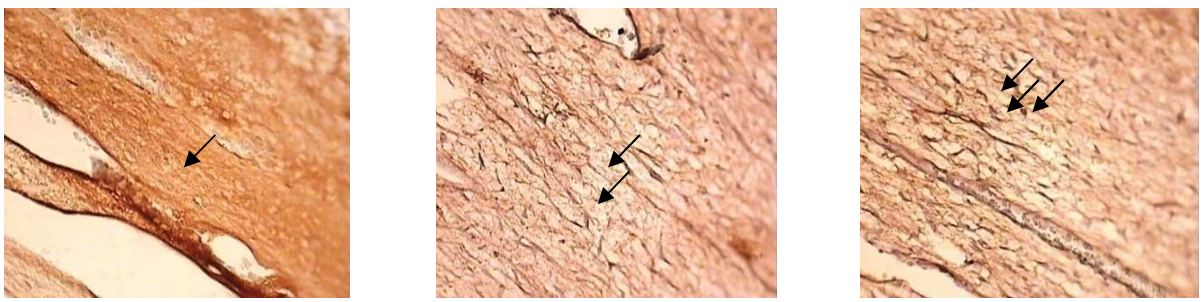
الف) شیر　　ب) سفیده تخم‌مرغ　　ج) HBSS

شکل ۳. نمای میکروسکوپ نوری (۴۰۰ ×) ناحیه اپیکالی پالپ، پس از ۶ ساعت نگهداری دندان در محیط‌های واسط (پیکان‌ها نشان دهنده هسته سلول‌های Ki-67 مثبت یا سلول‌های در حال تکثیر می‌باشد)

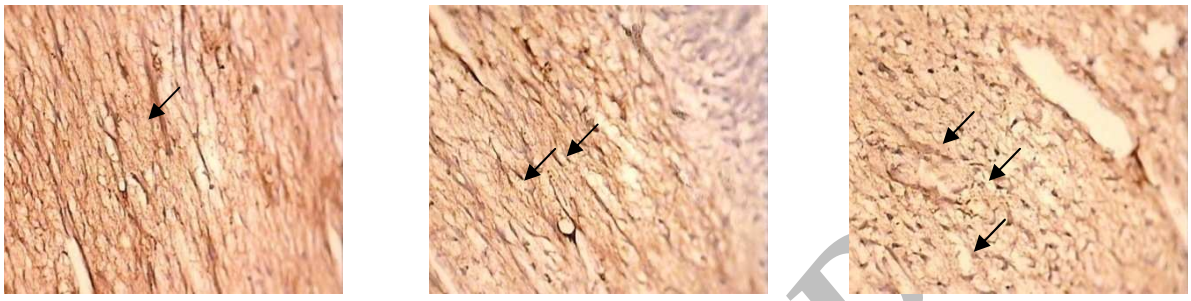


الف) یک سوم اپیکالی　　ب) یک سوم میانی　　ج) یک سوم کرونالی

شکل ۴. نمای میکروسکوپ نوری (۴۰۰ ×) نواحی مختلف پالپ دندان نگهداری شده در شیر (۶ ساعت)



Archive of SID
www.SID.ir



الف) یک سوم اپیکالی ب) یک سوم میانی ج) یک سوم کرونالی

شکل ۵. نمای میکروسکوپ نوری (۴۰۰ ×) نواحی مختلف پالپ دندان نگهداری شده در سفیده تخم‌مرغ (۶ ساعت)

الف) یک سوم اپیکالی ب) یک سوم میانی ج) یک سوم کرونالی

شکل ۶. نمای میکروسکوپ نوری (۴۰۰ ×) نواحی مختلف پالپ دندان نگهداری شده در HBSS (۶ ساعت)
(پیکان‌ها نشان دهنده هسته سلول‌های Ki-67 مثبت یا سلول‌های در حال تکثیر می‌باشد)

جدول ۱. میانگین هندسی و انحراف معیار شاخص نشان‌دار (Liability Index) سلول‌های پالپ به تفکیک مواد نگهدارنده دندان

محیط نگهدارنده	زمان نگهداری (ساعت)	اپیکال	میانی	کرونال
شیر	۱	۲۲/۵۰ ± ۷/۰۸	۱۱/۷ ± ۴/۸۰	۵/۶۲ ± ۱/۳۲
	۳	۲۰/۸۹ ± ۵/۷۶	۱۳/۸۰ ± ۴/۱۵	۶/۷۶ ± ۲/۴۲
	۶	۲۹/۵۱ ± ۱۲/۲۳	۱۶/۲۱ ± ۵/۷۵	۷/۰۷ ± ۱/۷۰
سفیده تخم‌مرغ	۱	۲۱/۳۷ ± ۴/۰۵	۱۴/۴۰ ± ۲/۹۴	۷/۴۱ ± ۰/۶۱
	۳	۲۶/۳ ± ۴/۷۰	۱۶/۵۹ ± ۴/۵۷	۷/۱۱ ± ۱/۵۱
	۶	۲۲/۹۰ ± ۹/۶۱	۱۳/۸۰ ± ۶/۸۷	۲/۷۵ ± ۲/۹۹
محلول هانک (HBSS)	۱	۲۱/۸۷ ± ۱/۷۵	۱۴/۴۵ ± ۱/۶۳	۶/۶۰ ± ۱/۳۲
	۳	۲۰/۸۹ ± ۷/۴۱	۱۳/۱۸ ± ۴/۸۳	۵/۷۵ ± ۳/۱۰
	۶	۲۵/۷۰ ± ۰/۲۳	۱۴/۷۹ ± ۵/۷۰	۶/۹۱ ± ۱/۷۰

بحث

این پژوهش به دلیل شناخت اندک و مطالعات بسیار کم، به منظور تأثیر ترکیبات نگهدارنده مختلف بر پالپ دندان انجام گردید. عوامل مختلفی بر قابلیت تکثیر سلول‌های پالپ دندان، پس از نگهداری در محیط‌های واسط تأثیر می‌گذارد که اسیدیتی، اسمولایتی، محتوای معدنی و مغذی و دمای ماده نگهدارنده از آن جمله است. اسیدیتی شیر و محلول هانک (HBSS) در محدوده قابل قبول برای رشد سلولی، یعنی بین ۶/۶ تا ۷/۸ بود. همچنین اسمولایتی آن‌ها در محدوده قابل قبول mos/kg ۲۳۰ تا ۴۰۰ برای رشد و حفظ قابلیت تکثیر سلولی بوده است[۱۵]. به نظر می‌رسد حفظ قابلیت تکثیر کسب شده در این پژوهش، پیامد اسمولالیتی و اسیدیتی مناسب سه ماده نگهدارنده انتخابی باشد.

سفیده تخم‌مرغ حاوی آلبومین، انواع ویتامین‌ها و مایعات می‌باشد؛ عدم آلودگی میکروبی سفیده تخم‌مرغ، شیر و محلول هانک (HBSS) از موارد قابل توجه در حفظ و قابلیت تکثیر سلولی بوده است[۸]. شیر حاوی اسیدهای آمینه، کربوهیدرات، ویتامین و آنزیم‌های غیر فعال مناسب برای رشد و قابلیت میتوز سلولی خارج از استخوان آلوئول می‌باشد[۷].

Archive of SID
www.SID.ir

محلول هانک (HBSS) حاوی کلسیم، منیزیوم و گلوکز است که برای زنده ماندن سلول‌ها مناسب هستند. محلول نمکی هانک (HBSS) در حفظ تعادل اسموتیک و اسیدیتی محیط نگهدارنده و تأمین مایعات و یون‌های ضروری، برای بقا و پتانسیل‌های سلولی نقش دارد[۱۶].

تمام نمونه‌ها در دمای چهار درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند و یکسان سازی دما کمک کرد تا تغییرات دمای محیط نگهدارنده، کمتر شود و شرایط برای ادامه توانایی‌های سلولی، مانند تکثیر، فراهم گردد. به دلیل مشابهت عوامل مؤثر در کارایی شیر، سفیده تخم‌مرغ و محلول هانک (HBSS)، فقدان تفاوت معنی‌دار در شاخص نشان‌دار شدن سلول‌های پالپ قابل توجیه است.

Tekin و همکاران[۵] محیط ویژه کشت سلولی (SCCM) را برای قابلیت تکثیر سلول‌های پالپ آپکس باز دندان انسان مناسب‌تر از محلول هانک (HBSS) گزارش کرده‌اند که متفاوت از پژوهش حاضر می‌باشد.

خادمی و همکاران[۸] گزارش کردند که HBSS و سفیده تخم‌مرغ در یک، دو، چهار، هشت و دوازده ساعت، تفاوتی در حفظ قابلیت تکثیر سلول‌های پریودنتال ندارند که مشابه پژوهش حاضر است.

همچنین خادمی و همکاران[۱۰] بیان کردند که سفیده تخم‌مرغ بیش از شیر، حیات سلول‌های پریودنتال سگ را حفظ می‌کند و در ترمیم بافت پریودنتال دندان‌های بالغ سگ نیز موفق‌تر از آلبومین تخم‌مرغ عمل می‌نماید که با پژوهش حاضر تفاوت دارد.

Rozanford و همکاران[۱۷] مشاهده کردند که در نود دقیقه نگهداری سلول‌های فیبروبلاست پوست در شیر و آلبومین تخم‌مرغ، درصد سلول‌های زنده تفاوتی نداشته‌اند که با یافته‌های این پژوهش هم‌خوانی دارد.

در پژوهش Ashkenazi و همکاران[۷] توانایی تکثیر الیاف پریودنتال، ۲۴ ساعت در دمای ۵ درجه در محیط‌های واسط شیر و هانک (HBSS) یکسان بود که با نتایج پژوهش حاضر، با توجه به تفاوت‌های متدولوژیک و نوع بافت مطالعه شده، مشابهت دارد.

Marino و همکاران[۱۸] قابلیت تکثیر سلول‌های پریودنتال را در مدت ۸ ساعت نگهداری در شیر و هانک (HBSS) یکسان گزارش کردند که این نتیجه نیز با یافته‌های مطالعه حاضر هم جهت می‌باشد.

همچنین خادمی و همکاران[۱۴] بیان کردند که پس از گذشت یک تا سه ساعت، توانایی سلول‌های پریودنتال در شیر و محلول هانک (HBSS) یکسان است که با یافته‌های پژوهش حاضر، با وجود بافت متفاوت هم‌سو می‌باشد.

تفاوت نتایج پژوهش حاضر با پژوهش‌هایی از این نوع می‌تواند ناشی از تفاوت در انتخاب نمونه پژوهش، وضعیت پالپ و آپکس دندان‌های انتخاب شده و بافت مورد مطالعه، مدت زمان نگهداری بافت، تکنیک‌ها و پیامدهای مورد ارزیابی، وضعیت بافت مورد آزمایش وترکیب شیمیایی مواد نگهدارنده دندان باشد. قابلیت دسترسی به شیر و سفیده تخم‌مرغ در محل وقوع صدمات دندانی در کودکان مدارس و منزل و هزینه کم و کارایی یکسان آن‌ها با محلول هانک (HBSS) در پژوهش حاضر از مزایایی هستند که نمی‌توان آن را نادیده گرفت.

محدودیت‌های پژوهش که باعث می‌شوند نتایج با احتیاط تفسیر و تعمیم داده شوند عبارت از مقطعی بودن مطالعه، حجم و نوع نمونه است. بنابراین مطالعات وسیع‌تر در دندان‌های آپکس باز انسان و شرایط بالینی و ارزیابی نشان‌گرهای مؤثر و عینی‌تر مانند تکامل ریشه، تکمیل عاج‌سازی، ترمیم پریودنشیوم و پالپ و حفظ دندان بعد از جاگذاری پیشنهاد می‌شود.

نتیجه‌گیری

در شرایط این پژوهش، قابلیت تکثیر سلول‌های پالپ دندان آپکس باز خرگوش نگهداری شده در شیر استریلیزه کم چرب، سفیده تخم‌مرغ و محلول هانک (HBSS) در یک، سه و شش ساعت، تفاوتی نداشت. قابلیت تکثیر سلول‌های یک‌سوم اپیکال پالپ دندان آپکس باز خرگوش بیش از یک سوم میانی، و یک سوم میانی بیش از قسمت کرونالی توسط محیط‌های نگهدارنده شیر، سفیده تخم‌مرغ و محلول هانک (HBSS) در زمان‌های یک، سه و شش ساعت حفظ می‌شود..

Archive of SID

www.SID.ir

References

1. Friedlander LT, Cullinan MP, Love RM. Dental stem cells and their potential role in apexogenesis and apexification. Int Endod J 2009; 42(11): 955-62.
2. Cotti E, Mereu M, Lusso D. Regenerative treatment of an immature, traumatized tooth with apical periodontitis: report of a case. J Endod 2008; 34(5): 611-6.
3. Kranser PR. A Comparative Analysis of Storage Media for Avulsed Teeth. [online]. [cited 2010 Mar 3]; Available from: URL: http://mytoothcaretips.com/wp-content/uploads/2010/06/storage_medium_chart.pdf.
4. Hargreaves KM, Kohen S, Berman LH. Regenerative endodontic. In: Hargreaves KM, Cohen S, Editor. Cohen's pathways of the pulp. St. Louis: Mosby Elsevier; 2010. p. 602-18.
5. Tekin U, Filippi A, Pohl Y, Kirschner H. Expression of proliferating cell nuclear antigen in pulp cells of extracted immature teeth preserved in two different storage media. Dent Traumatol 2008; 24(1): 38-42.
6. Trope M. Treatment of the immature tooth with a non-vital pulp and apical periodontitis. Dent Clin North Am 2010; 54(2): 313-24.
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. Khademi AA, Atbaee A, Razavi SM, Shabanian M. Periodontal healing of replanted dog teeth stored in milk and egg albumen. Dent Traumatol 2008; 24(5): 510-4.
9. Barati M, Jahanshahi GR, Jalalzadeh SM, Aslani A. Effect of topical application of doxycycline on pulp revascularization in replanted immature dog teeth. Journal of Mashhad Dental School 2008; 32(2): 103-10.
10. Khademi AA, Saei S, Mohajeri MR, Mirkheshti N, Ghassami F, Torabi N, et al. A new storage medium for an avulsed tooth. J Contemp Dent Pract 2008; 9(6): 25-32.
11. Wiggs RB, Lobprise H. Dentistry in rabbits and rodents. In: Crossley DA, Penman S, Editors. Manual of small animal dentistry. New York: British Small Animal Veterinary Association; 1995. p. 68-91.
12. Debra Bourne MA, Molly Varga B. Extraction of the Incisors in Rabbits (Disease Investigation & Management - Treatment and Care). [online]. [cited 2010 Mar 11]. Available from: URL: http://www.wildpro.twycrosszoo.org/S/00Man/VeterinaryTechniques/Indiv_TechniquesRabbit/IncisorExtractionRabbit.htm.
13. Andreasen JO, Andreasen FM. Avulsions. In: Andreasen JO, Andreasen FM, Andersson L, Editors. Textbook and color atlas of traumatic injuries to the teeth .Philadelphia: Wiley-Blackwell; 2007. p. 444-88.
14. Khademi AA, Saeei S, Alavi A, Mirkheshti N, Ghesami F. An investigation on different storage media in the preserva-tion of periodontal ligament cells vitality. JIDA 2005; 17(5): 89-95.
15. Gomes MCB, Gomes VPD, Westphalen FH, Neto UX, Fariniuk LF, Carneiro E. Study of storage media for avulsed teeth. Brazilian Journal of Dental Traumatology 2009; 1(2): 69-76.
16. HANK'S balance salts solution (HBSS). [online]. [cited 2010 Feb 2]. Available from: URL: http//:vgn.uvm.edu/outreach/documents/Hanksbufferedsalinesolution.pdf.
17. Rozenfarb N, Kupietzky A, Shey Z. Milk and egg albumen are superior to human saliva in preserving human skin fibroblasts. Pediatr Dent 1997; 19(5): 347-8.
18. 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.

Archive of SID

www.SID.ir

Effect of storage media on pulp cell proliferation capacity of open apex teeth in rabbits

Ebrahim Jabbarifar*, Mohammad Razavi, Matin Abedhaghighi, Abbas Ali Khademi, Farnaz Moshref Javadi

Abstract

Introduction: *The proliferative capacity of dental pulp cells after replantation in the alveolus facilitates pulp regeneration and subsequent root maturation. The aim of this study was to compare milk, egg white and HBSS (Hanks Balanced Salt Solution) to maintain pulp cells' proliferative capacity in open apex teeth in rabbits.*

Materials and Methods: *Sixty open apex incisors of rabbits were randomly stored for one, three and six hours in tubes containing milk, egg white and HBSS at 4°C, immediately after open surgical extraction. Following fixation and decalcification of the teeth, three histologic sections were prepared from the coronal, middle and apical thirds of the pulp and the presence of Ki-67 antigens was evaluated in the sections by immunohistochemical methods. The mean values of liability index were analyzed using repeated measures ANOVA ($\alpha = 0.05$).*

Results: *Liability index of dental pulp cells stored in milk at one-hour, three-hour, and six-hour intervals were 13.7 ± 4.37, 14.56 ± 4.11, and 15.52 ± 6.56; these indexes in egg white were 14.90 ± 2.87, 17.66 ± 5.9, and 12.23 ± 3.87 and for HBSS th ey were 14.60 ± 1.57, 14.14 ± 5.02 and 18.85 ± 6.54, respectively, during the same intervals.*

Conclusion: *Pulp cells stored in milk, egg white and HBSS exhibited the same proliferative capacity at one-hour, three-hour, and six-hour intervals, with higher proliferative capacity in the apical third compared to the middle and in the middle third compared to the coronal third.*

Key words: *Alveolus, Dental pulp, Storage media, Regeneration, Tooth avulsion, Tooth replantation.*

Received: 21 Dec, 2010 **Accepted:** 18 Apr, 2011

Address: Associate Professor, Department of Pediatric Dentistry, School of Dentistry and Torabinejad Dental Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.
Email: jabarifar@dnt.mui.ac.ir

Journal of Isfahan Dental School 2011; 7(2): 138.

Archive of SID

www.SID.ir