The effect of different concentrations for grapefruit seed extract on proliferation of periodontal ligament cells

Sadighe Mozafar[1], Mandana Sattari[2], Somayeh Kameli[1], Zohre Sadat Hosseinipour[3,*], Mohammad Reza Sedighian Rad[4]

1- Assistant Professor, Department of Pediatric Dentistry, School of Dentistry, Shahed University of Medical Sciences, Tehran, Iran
2- Professor, Department of Immunology, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
3- Assistant Professor, Department of Pediatric Dentistry, Faculty of Dentistry, AJA University of Medical Sciences, Tehran, Iran
4- Dentist, School of Dentistry, Shahed University, Tehran, Iran

Article Info

Article type:
Original Article

Article History:
Received: 29 Oct 2020
Accepted: 6 Sep 2021
Published: 23 Sep 2021

Corresponding Author:
Zohre Sadat Hosseinipour

Department of Pediatric Dentistry, Faculty of Dentistry, AJA University of Medical Sciences, Tehran, Iran

(Email:zohreshosseinipour@gmail.com)

Abstract

Background and Aims: Survival of periodontal ligament (PDL) cells after avulsion is an important factor in treatment prognosis. Grapefruit Seed Extract (GSE) can be a proper environment for preserving periodontal ligament cells. The objective of this study was to analyze the effect of different concentrations of GSE on the proliferation of fibroblast PDL cells.

Materials and Methods: In this study, the undifferentiated PDL fibroblasts were obtained from two human premolars teeth and cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM). The cultured cells were exposed to different concentrations of GSE. The positive and negative control groups were cultured in fetal bovine serum (FBS) 10% and in a medium without FBS 10%, respectively. The plates were incubated for 1, 6, 12, 24, and 48 hrs. The PDL cell viability was assessed by MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay. Statistical analysis of data was accomplished using repeated measure ANOVA with Post HOC Tukey, $P<0.05$ was considered statistically significant.

Results: We found out that among different concentrations of GSE, 1:128 had the most impact on undifferentiated PDL fibroblasts. Although, the cell vitality was higher in the twelfth hour, 1:128 GSE and in the forty-eighth hour, 1:1024 GSE than the positive control group but they were not statistically significant ($P>0.05$). Furthermore, all the samples were similar to the positive control group in three of the five timeperiods ($P>0.05$).

Conclusion: GSE was more effective in fewer concentration and longer periods and it had no toxic effect on PDL cells. Therefore, GSE can be considered as a promoting medium in PDL regeneration of avulsed permanent teeth in the future.

Keywords: Tooth avulsion, Cell culture techniques, Grapefruit seed extract, Periodontal ligament (PDL), Tetrazolium salt

Journal of Dental Medicine-Tehran University of Medical Sciences 2021;34:18

Cite this article as: Mozafar S, Sattari M, Kameli S, Hosseinipour ZS, Sedighian Rad MR. The effect of different concentrations for grapefruit seed extract on proliferation of periodontal ligament cells. J Dent Med-TUMS. 2021;34:18.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-12-18]

Copyright © 2021 Tehran University of Medical Sciences. Published by Tehran University of Medical Sciences.
This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International license (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/). Non-commercial uses of the work are permitted, provided the original work is properly cited.

بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره دانه گریپ فروت بر تکثیر سلول‌های فیبروبلاست لیگامان پریودنتال

صدیقه مظفر[۱]، ماندانا ستاری[۲]، سمیه کاملی[۱]، زهره سادات حسینی پور[۳*]، محمدرضا صدیقیان راد[۴]

۱- استادیار گروه آموزشی دندانپزشکی کودکان، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شاهد، تهران، ایران
۲- استاد گروه آموزشی ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
۳- استادیار گروه آموزشی دندانپزشکی کودکان، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی آجا، تهران، ایران
۴- دندانپزشک، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شاهد، تهران، ایران

چکیده

زمینه و هدف: حفظ حیات سلول‌های لیگامان پریودنتال پس از خارج شدن کامل دندان از ساکت دندانی، از مهم‌ترین عوامل در پیش آگهی درمان می‌باشد. عصاره پالپ و هسته گریپ فروت (Grape fruit Seed Extract (GSE)) می‌تواند به عنوان محیط نگه دارنده مناسب برای حفظ حیات سلول‌های لیگامان پریودنتال باشد. هدف از این مطالعه بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره دانه گریپ فروت برتکثیر سلول‌های فیبروبلاست لیگامان پریودنتال بود.

روش بررسی: دراین مطالعه فیبروبلاست تمایز نیافته PDL از دو دندان پره مولر سالم دو انسان به دست آمد و در DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) کشت داده شد. سلول‌های کشت داده شده در مجاورت غلظت‌های مختلف GSE قرار گرفتند. محیط کشت حاوی FBS (Fetal Bovin Serum) ۱۰٪ و محیط کشت فاقد FBS ۱۰٪ به ترتیب به عنوان کنترل مثبت و کنترل منفی قرار گرفتند. پلیت‌ها در داخل انکوباتور به مدت ۱، ۶، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت قرار داده شدند. حیات فیبروبلاست‌های تمایز نیافته با روش MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) سنجیده شد. داده‌ها توسط آنالیز آماری ANOVA repeated measure به همراه آزمون تکمیلی Post HOC Tukey مورد بررسی قرارگرفتند و مقادیر P<۰/۰۵ معنی‌دار محسوب شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که از میان غلظت‌های GSE مورد مطالعه، غلظت ۱:۱۲۸ بیشترین تأثیر را بر تکثیر فیبروبلاست تمایز نیافته PDL دارد. همچنین در ساعت دوازدهم غلظت GSE ۱:۱۲۸ و در ساعت چهل و هشتم غلظت GSE ۱:۱۰۲۴ از نظر رشد فیبروبلاست تمایز نیافته بالاتر از گروه کنترل مثبت بودند، اما تفاوت معنی‌داری نشان ندادند (P>۰/۰۵). بنابر این، در تمامی غلظت‌های GSE در سه زمان از پنج زمان مورد مطالعه، مشابه کنترل مثبت عمل نمود (P>۰/۰۵).

نتیجه‌گیری: GSE در غلظت کمتر و زمان طولانی‌تر، مؤثرتر بوده و هیچ اثر سمی بر روی سلول‌های PDL ندارد. بنابراین می توان GSE به عنوان ماده محرک رشد سلول‌های PDL برای درمان دندان‌های دچار avulsion پیشنهاد کرد.

کلید واژه‌ها: افتادن دندان، روش کشت سلولی، عصاره دانه گریپ فروت، لیگامان پریودنتال، نمک تترازولیوم

اطلاعات مقاله

نوع مقاله:
مقاله پژوهشی

وصول: ۹۹/۰۸/۰۸
اصلاح نهایی: ۴۰۰/۰۶/۱۵
تأیید چاپ: ۴۰۰/۰۷/۰۱

نویسنده مسوول:
زهره سادات حسینی پور

گروه آموزشی دندانپزشکی کودکان، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی آجا، تهران، ایران

(Email:zohreshosseinipour@gmail.com)

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-12-18]

مقدمه

GSE Grapefruit seed extract که شامل عصاره پالپ و دانه گریپ فروت می‌باشد، به صورت محصول تجاری در بسیاری از کشورها برای دیگر مصارف غیر از دندانپزشکی در دسترس است و تحقیقاتی در مورد تأثیر آن بر روی سلول‌های فیبروبلاست انجام شده است (۱،۲). گریپ فروت درختی نیمه طویل از خانواده مرکبات است که به میوه آن "میوه ممنوعه باربادوس" گفته می‌شود (۳) عصاره دانه گریپ فروت توسط Jacob Harich ایمونولوژیست و پزشک آلمانی در سال ۱۹۸۰ کشف شد (۴).

تجزیه و تحلیل نشان می‌دهد اجزای عصاره دانه و پالپ گریپ فروت از فلاونوئید (۵،۶) اسید اسکوربیک، توکوفرول، اسید سیتریک (۷) لیموئیدها (۸،۹) استرول و مواد معدنی (۱۰) تشکیل شده است. این عصاره توسط برخی از پزشکان جایگزین برای داشتن خواص ضد باکتری (۱۱،۱۲)، ضد ویروسی (۱۳) و ضد قارچی (۳،۱۱،۱۴) همچنین آنتی اکسیدانی تجویز می‌شود (۶،۱۵). دانشمندان بر این باورند که یک ماده ایده آل ضد میکروبی باید دارای دو ویژگی مهم باشد: باکتریسید و غیر سمی (۱۶). GSE هردو ویژگی یک عامل ضد میکروبی ایده آل، ایمنی و اثر بخشی را نشان می‌دهد (۱۷). تنها دو مطالعه تأثیر غلظت‌های مختلف GSE بر روی تکثیر سلول‌های فیبروبلاست (غیر از PDL) را مورد بررسی قرار دادند (۱،۲). نتایج مطالعه نشان داد که GSE با غلظت ۱:۵۱۲٪ اثر باکتری سیدال داشته و هیچگونه اثر سمی از خود نشان نمی‌دهد (۲).

در مطالعه‌ای دیگر که توسط Guedes و همکاران (۱) (۲۰۱۳) انجام شد پس از ۵ روز در غلظت‌های بالای ۰/۱٪ GSE سلول زنده وجود نداشت. با توجه به مطالعات اندک انجام شده مطالعه حاضر بدین منظورانجام شده تا علاوه بر مشاهده تاثیر غلظت‌های متفاوت GSE (۱:۶۴٪، ۱:۱۲۸٪، ۱:۲۵۶٪، ۱:۵۱۲٪، ۱:۱۰۲۴٪) بر تکثیر سلول‌های PDL، تأثیر این عصاره در زمان‌های مختلف (در ساعات اول، ششم، دوازدهم، بیست و چهارم و چهل و هشتم) نیز مورد ارزیابی قرار گیرد. به این علت که تأثیر این عصاره و مصرف آن به عنوان ماده‌ای مطلوب و مؤثر بر روی فیبروبلاست‌ها در مقالات دیگر ثابت شده است و هنوز ماده‌ای ایده آل برای حفظ سلامت سلول‌های PDL در شرایط اورژانسی وجود ندارد، بر آن شدیم تا تأثیر آن را بر روی حیات سلول‌های PDL دندان انسان که تا به حال انجام نشده، بررسی کنیم. این مطالعه در سال ۱۳۹۷ در دانشکده دندانپزشکی دانشگاه شاهد انجام شد.

روش بررسی

تهیه و کشت اولیه فیبروبلاست‌های تمایز نیافته

ابتدا افرادی ۱۰ و ۲۲ ساله که متقاضی کشیدن دندان‌های پره مولر سالم جهت درمان ارتودنسی در بخش ارتودنسی دانشکده دندانپزشکی دانشگاه شاهد بودند، انتخاب شدند. این تحقیق به شماره ۸۳۱ و با شناسه کمیته اخلاق در پژوهش دانشگاه شاهد IR.SHAHED.REC.1397.063 انجام شد. هدف از مطالعه و روش کار برای والدین و خود شخص توضیح داده شد. بعد از اخذ رضایتنامه کتبی از بیمار و شستشوی دهان بیمار با کلرهگزیدین ۰/۲٪ به منظور کاهش آسیب وارده به سلول‌های لیگامان پریودنتال تلاش شد تا دندان‌ها به صروت آتروماتیک از ساکت خارج شوند.

دندان‌ها بعد از شستشو با نرمال سالین به لوله‌های فالکون حاوی محیط نگه داری و انتقال بافت دندان شامل Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)، ۱۰٪ FBS، ۵٪ Penicillin/streptomycin و ۵٪ Gentamicin شامل ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر و ۵ میکرو گرم بر میلی لیتر Amphotericin در هر فالکون منتقل شده و در عرض کمتر از یک ساعت به آزمایشگاه کشت سلول انتقال داده شدند و مجدداً ۲ بار توسط PBS شسته شده و سپس با اسکالپل شماره ۱۵ استریل، بقایای بافت‌های لیگامان پریودنتال چسبیده به دندان از قسمت یک سوم میانی ریشه جدا و به درون لوله فالکون ۱۵ منتقل شد. لوله به مدت ۵ دقیقه در دور rpm ۱۵۰۰ سانتریفیوژ شد. بعد از اتمام سانتریفیوژ، مایع رویی خارج شد و مجددا به آن محیط کشت DMEM، FBS ۱۰٪، پنی سیلین و استرپتومایسین ۵۰ میکرو گرم در میلی لیتر اضافه نموده و عمل سانتریفیوژ تکرارشد.

بعد از سانتریفیوژ دوم، مایع رویی در زیر هود خارج و ml ۵ محیط کشت کامل به لوله فالکون اضافه و لوله را به خوبی تکان داده شد. سپس محتوی لوله به درون فلاسک کشت سلولی منتقل شد و درون انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و غلظت ۵٪ CO_2 نگه داری شد. بعد از

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-12-18]

اینکه فلاسک مملو از سلول‌های PDL شد، در زیر هود لامینار با استفاده از PBS و آنزیم تریپسین-EDTA سلول‌ها از کف فلاسک جدا شد.

کندن سلول‌ها

ابتدا ml ۵ از بافر PBS به فلاسک اضافه و درب فلاسک بسته شد و بعد از مجاورت کافی، بافر PBS خارج شد. علت استفاده از PBS وجود FBS درون محیط کشت کامل است که می‌تواند اثر آنزیم را خنثی کند.

سپس به آن ۱ میلی گرم از محلول آنزیم اضافه و درب فلاسک بسته شد و به صورت بی حرکت یک دقیقه در زیر هود قرار گرفت. در کمتر از یک دقیقه سلول‌ها آغاز به جدا شدن از کف فلاسک کردند. به محض مشاهده جدا شدن سلول‌ها از کف فلاسک، بلافاصله به آن ۲ تا ۳ میلی گرم محیط کشت اضافه شد، فلاسک به شدت تکان داده شد تا بقیه سلول‌ها که اتصالشان به کف فلاسک سست شده بود، با تکان دادن کنده شوند. محتوی فلاسک به درون لوله فالکون ۱۵ میلی گرم منتقل و لوله به مدت ۱۰ دقیقه با دور rpm ۱۵۰۰ سانتریفیوژ شد. سپس زیر هود مایع رویی خارج شد. جهت شمارش سلولی مقداری محیط کشت به لوله اضافه شد تا حجم مایع به ۱ میلی گرم برسد. در این بررسی تعداد سلول‌های مورد مطالعه در هر چاهک پلیت ۲۴ خانه‌ای، ۵۰۰۰۰ سلول در نظر گرفته شد. به هر چاهک ۵ × ۱۰۴ سلول منتقل و سپس به آن‌ها محیط کشت شد. جهت اطمینان از اتصال سلول‌ها به کف، بعد از گذشت ۴ ساعت، پلیت در زیر میکروسکوپ معکوس مورد بررسی گرفت. زیر هود مایع رویی هر چاهک پلیت با سمپلر یا پیپت پاستور استریل خارج شد تا سلول‌هایی که هنوز نچسبیده‌اند از محیط عمل خارج شوند، سپس به چاهک‌ها محیط کشت کامل اضافه شد به صورتی که ۱۰ درصد محیط کشت، عصاره پالپ و هسته گریپ فروت به صورت مساوی در رقت‌های مختلف بود.

آماده سازی GSE

گریپ فروت پس از جدا سازی دانه‌ها و پالپ، درون دستگاه پرکولاتور ریخته شده و سه بار با ۲۵۰ سی سی اتانول ۷۰ درصد عصاره گیری شد و در انتها به وسیله ی دستگاه تقطیر کن دوار تلغیظ شد و GSE به دست امده، با غلظت‌های ۱:۶۴، ۱:۱۲۸، ۱:۲۵۶، ۱:۵۱۲، ۱:۱۰۲۴ تهیه شد.

محتوای هر پلیت

یک ردیف ۳ خانه محتوای ۵ × ۱۰۴ فیبروبلاست +GSE ۱:۶۴ + ۴۵۰ µL محیط کشت حاوی ۱۰٪ FBS

یک ردیف ۳ خانه محتوای ۵ × ۱۰۴ فیبروبلاست +GSE ۱:۱۲۸ + ۴۵۰ µL محیط کشت حاوی ۱۰٪ FBS

یک ردیف ۳ خانه محتوای ۵ × ۱۰۴ فیبروبلاست +GSE۱:۲۵۶ + ۴۵۰ µL محیط کشت حاوی ۱۰٪ FBS

یک ردیف ۳ خانه محتوای ۵ × ۱۰۴ فیبروبلاست + GSE ۱:۵۱۲ + ۴۵۰ µL محیط کشت حاوی ۱۰٪ FBS

یک ردیف ۳ خانه محتوای ۵ × ۱۰۴ فیبروبلاست + GSE ۱:۱۰۲۴ + ۴۵۰ µL محیط کشت حاوی ۱۰٪ FBS

یک ردیف ۳ خانه محتوای ۵ × ۱۰۴ فیبروبلاست + ۵۰۰ µL محیط کشت حاوی ۱۰٪ FBS

یک ردیف ۳ خانه محتوای ۵ × ۱۰۴ سلول فیبروبلاست + الکل + ۵۰۰ µL محیط کشت بدون ۱۰٪ FBS

برای هر غلظت، ۳ خانه از پلیت درنظر گرفته شد که به منزله ۳ بار تکرار آزمایش بود.

بررسی میزان حیات فیبروبلاست‌های تمایز نیافته

میزان حیات سلول‌ها در ساعات ۱، ۶، ۱۲، ۲۴، ۴۸ پس از انکوباسیون توسط روش MTT بررسی شدند. ابتدا میزان ۱۰ µL محلول MTT به هر خانه پلیت اضافه نموده و به مدت ۴ ساعت در انکوباتور با شرایط استاندارد قرار گرفت. سپس محلول MTT از خانه‌ها تخلیه و در زیر میکروسکوپ inverted وجود کریستال‌های آبی رنگ فورمازان داخل سلولی بررسی شد.

مایع رویی هر چاهک پلیت با استفاده از سمپلر یا پی پت پاستور استریل خارج شده و به هر چاهک ۲۰۰ میکرو لیتر محلول اسید الکل ۴٪ اضافه شد (اسید الکل ۴٪ حاوی ۹۶ میلی لیتر ایزوپروپیل الکل و ۴ میلی لیتر اسید کلریدریک نرمال است). بعد از گذشت یک دقیقه یا بیشتر، ۱۰۰ µL محلول موجود در هر خانه را به یک خانه پلیت ۹۶ خانه‌ای منتقل کرده و در دستگاه ELISA reader با طول موج ۵۷۰ nm، OD (Optical density) ارزیابی شد. میزان رنگ تولید شده با تعداد سلول‌هایی که از نظر متابولیک فعال هستند رابطه مستقیم دارد.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-12-18]

یافته‌ها

به منظور مقایسه نتایج بدست آمده و تعیین تفاوت‌های مشاهده شده در آزمایشات مختلف از نرم افزار SPSS25 استفاده شد. از آنالیز repeated measure ANOVA برای مقایسه گروه‌های آزمایش در فواصل زمانی مشخص کمک گرفته شد. به دلیل وجود برهمکنش معنادار، گروه‌ها به صورت جداگانه در مقاطع زمانی مختلف ابتدا توسط 2-way analysis of variance (ANOVA) و سپس جهت بررسی دو به دوی گروه‌ها با یکدیگر توسط آزمون تکمیلی Tukey's HSD Test آنالیزشدند. عدد P-value کمتر از ۰/۰۵ (P<۰/۰۵) معنی‌دار در نظر گرفته شد.

غلظت GSE

در تعریف، GSE به معنای عصاره پالپ و هسته گریپ فروت می‌باشد.

میزان رشد و تکثیر سلول‌های فیبروبلاست تمایز نیافته توسط ۷ محیط (Media) مختلف از جمله GSE با غلظت ۱:۶۴، ۱:۱۲۸، ۱:۲۵۶، ۱:۵۱۲، ۱:۱۰۲۴ و گروه کنترل مثبت حاوی FBS ۱۰٪ و گروه کنترل منفی بدون FBS در ساعات اول، ششم، دوازدهم، بیست و چهارم و چهل و هشتم سنجیده شد. از روش سنجش احیای MTTبرای بررسی میزان فعالیت حیاتی یا همان فعالیت تنفسی سلول استفاده گردید. نتایج بر اساس میزان رنگ تولید شده در هر خانه و OD مشخص برای هر کدام توسط دستگاه ELISA خوانده شد (جدول ۱).

در محاسبه درصد viability سلول‌های PDL، میانگین OD تولید شده در محیط کشت کنترل مثبت حاوی FBS ۱۰٪ در زمان صفر که برابر ۰/۸۹ بود، ۱۰۰ درصد در نظر گرفته شد و سایر اعداد به دست آمده بر اساس آن محاسبه گردید.

جدول ۱- میانگین OD، انحراف معیار و درصد زنده بودن سلول‌های فیبروبلاست در محیط‌های کشت و زمان‌های مورد مطالعه

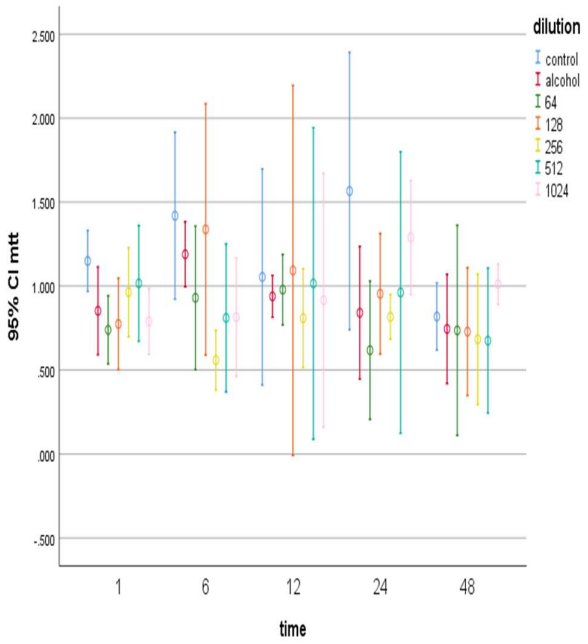
	غلظت عصاره	۱:۶۴	۱:۱۲۸	۱:۲۵۶	۱:۵۱۲	۱:۱۰۲۴	کنترل مثبت	کنترل منفی
پس از ۱ ساعت	میانگین (انحراف معیار)	۰/۷۴ (۰/۰۸)	۰/۷۷ (۰/۱۱)	۰/۹۶ (۰/۱۱)	۱/۰۲ (۰/۱۴)	۰/۷۹ (۰/۰۸)	۱/۱۵ (۰/۱۱)	۰/۸۵ (۰/۱)
	درصد حیات	۸۳	۸۶	۱۰۸	۱۱۵	۸۹	۱۲۹	۹۵
پس از ۶ ساعت	میانگین (انحراف معیار)	۰/۹۳ (۰/۱۷)	۱/۳۴ (۰/۳)	۰/۵۶ (۰/۰۷)	۰/۸۱ (۰/۱۸)	۰/۸۱ (۰/۱۴)	۱/۴۲ (۰/۲)	۱/۱۹ (۰/۰۸)
	درصد حیات	۱۰۴	۱۵۱	۶۳	۹۱	۹۱	۱۶۰	۱۳۴
پس از ۱۲ ساعت	میانگین (انحراف معیار)	۰/۹۸ (۰/۰۸)	۱/۰۹ (۰/۴۴)	۰/۸۱ (۰/۱۲)	۱/۰۱ (۰/۳۷)	۰/۹۱ (۰/۳)	۱/۰۵ (۰/۲۶)	۰/۹۴ (۰/۰۵)
	درصد حیات	۱۱۰	۱۲۲	۹۱	۱۱۳	۱۰۲	۱۱۸	۱۰۶
پس از ۲۴ ساعت	میانگین (انحراف معیار)	۰/۶۲ (۰/۱۷)	۰/۹۵ (۰/۱۴)	۰/۸۲ (۰/۰۵)	۰/۹۶ (۰/۳۴)	۱/۲۹ (۰/۱۴)	۱/۵۷ (۰/۳۳)	۰/۸۴ (۰/۱۶)
	درصد حیات	۷۰	۱۰۷	۹۲	۱۰۸	۱۴۵	۱۷۶	۹۴
پس از ۴۸ ساعت	میانگین (انحراف معیار)	۰/۷۴ (۰/۲۵)	۰/۷۳ (۰/۱۵)	۰/۶۸ (۰/۱۶)	۰/۶۸ (۰/۱۷)	۱/۰۱ (۰/۰۵)	۰/۸۲ (۰/۱۳)	۰/۷۴ (۰/۱۳)
	حیات سلولی	۸۳	۸۲	۷۶	۷۶	۱۱۳	۹۲	۸۳

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-12-18]

نتایج تفاوت معنی‌داری از نظر آماری در بین محیط کشت‌های متفاوت و زمان‌های مورد بررسی نشان دادند (P<۰/۰۵) و هم چنین تقابل معنی‌داری بین محیط کشت و زمان‌های مطالعه وجود داشت (P<۰/۰۵). نتایج two-way ANOVA در ساعات ۱، ۶ و ۲۴ معنی‌دار (P<۰/۰۵) و در ساعات ۱۲ و ۴۸ معنی‌دار نبود (P>۰/۰۵). بنابراین در هر زمان به دنبال مقایسه گروه‌ها با یکدیگر، آزمون Tukey's Post HOC جهت مقایسه دو به دوی گروه‌ها انجام شد. نتایج نشان داد که محیط‌های کشت در ساعت ۱۲ بیشترین اثر تحریکی بر فعالیت حیاتی سلول‌ها را داشتند و سپس در ساعات ۲۴ و ۴۸ تعداد سلول‌ها کاهش می‌یافت.

GSE با غلظت‌های ۱:۶۴ و ۱:۱۲۸ در ساعات ۶، ۱۲و ۴۸، مشابه با کنترل مثبت عمل نمود، اما از نظر آماری تفاوتی نداشت (P>۰/۰۵) ولی در ساعات ۱ و ۲۴ اثر محیط کنترل مثبت در افزایش فعالیت حیاتی سلول‌ها بالاتر بوده وتفاوت آماری نیز معنی‌دار بود (P<۰/۰۵). GSE با غلظت‌های ۱:۲۵۶ و ۱:۵۱۲ در ساعات ۱، ۱۲ و ۴۸ با کنترل مثبت از لحاظ آماری تفاوتی نداشت (P>۰/۰۵) و مشابه آن عمل نمود ولی در ساعات ۶ و ۲۴ تفاوت آماری معنی‌دار بوده (P<۰/۰۵) به طوری که اثر محیط کنترل مثبت در افزایش حیات سلول‌ها بالاتر بود. GSE با غلظت ۱:۱۰۲۴ در ساعات ۱۲، ۲۴ و ۴۸ با کنترل مثبت از لحاظ آماری تفاوتی نداشت (P>۰/۰۵) و مشابه آن عمل نمود ولی در ساعات ۱ و ۶ تفاوت آماری معنی‌دار بوده (P<۰/۰۵) به طوری که اثر محیط کنترل مثبت در افزایش حیات سلول‌ها بالاتر بود. بنابراین GSE در غلظت‌های پایین‌تر و در ساعات بیشتر، بهتر توانست در حفظ حیات سلول‌های PDL عمل کند (نمودار ۱).

در مقایسه گروه‌های GSE، آزمون‌های ANOVA و Tukey نشان دادند که غلظت‌های مختلف GSE با زمان در طی ساعات مختلف به صورت خطی عمل نمی‌کنند و جز در غلظت ۱:۱۲۸ در ساعت ۱۲ و غلظت ۱:۱۰۲۴ در ساعت ۴۸ بالاتر از کنترل مثبت نبودند (P>۰/۰۵). همچنین در تمامی غلظت‌ها در ساعاتی حتی کمتر از کنترل منفی بر افزایش حیات سلول‌ها نقش داشتند که این اختلاف آماری معنی‌دار نبود (P>۰/۰۵) ولی در غلظت ۱:۲۵۶ در ساعت ۶ این تفاوت از لحاظ آماری معنی‌دار بود (P<۰/۰۵) (جدول ۲).



نمودار ۱- نمودار errorbar میانگین و حدود اطمینان ۹۵٪ میانگین OD در غلظت‌های فیبروبلاست‌های تمایز نیافته لیگامان پریودنتال در محیط‌های کشت و زمان‌های مورد مطالعه

بحث و نتیجه گیری

بیرون افتادن دندان از ساکت (Avulsion) از بدترین آسیب‌های تروماتیک دندانی است که منجر به جدا شدن لیگامان پریودنتال از ساکت آلوئول می‌شود. درمان انتخابی جایگذاری سریع دندان در ساکت است، هرچند به علت استرس و عدم اطلاعات کافی ری پلنت نمودن فوری دندان به ندرت صورت می‌گیرد (۱۸،۱۹). در این شرایط، زمان خارج دهانی و محیط ذخیره سازی عوامل مهمی برای پیش آگهی دندان اوالزشده هستند (۲۰،۲۱). قرارگرفتن طولانی مدت دندان در محیط خشک، پیش آگهی را ضعیف می‌کند. بنابراین، بسیاری از مطالعات با هدف حفظ دندان اوالز شده در محیط مناسب انجام شدند (۲۰،۲۲،۲۳). محیط ذخیره سازی باید قادر به حفظ حیات سلول و ظرفیت انطباق باشد و همچنین در لحظه اوالژن به راحتی قابل دسترسی باشد (۲۳،۲۴). آب شیر به دلیل‌هایپوتونیک بودن و لیز سلولی یک محیط نگه دارنده مناسب محسوب نمی‌شود.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-12-18]

جدول ۲- مقایسه محیط‌های کشت در زمان‌های مورد آزمایش

زمان (ساعت)	کنترل مثبت	GSE 1:1024	GSE 1:512	GSE 1:256	GSE 1:128	GSE 1:64	گروه‌ها (بر اساس غلظت)
1						P=1	GSE 1:128
					P=0.372	P=0.208	GSE 1:256
				P=0.996	P=0.150	P=0.075	GSE 1:512
			P=0.198	P=0.461	P=1	P=0.997	GSE 1:1024
		P=0.007	P=0.668	P=0.318	P=0.005	P=0.002	کنترل مثبت
	P=0.032	P=0.989	P=0.528	P=0.857	P=0.969	P=0.847	کنترل منفی
6						P=0.145	GSE 1:128
					P=0.002	P=0.216	GSE 1:256
				P=0.612	P=0.035	P=0.979	GSE 1:512
			P=1	P=0.595	P=0.037	P=0.982	GSE 1:1024
		P=0.013	P=0.013	P=0.001	P=0.997	P=0.056	کنترل مثبت
	P=0.699	P=0.208	P=0.198	P=0.010	P=0.942	P=0.580	کنترل منفی
12						P=0.998	GSE 1:128
					P=0.852	P=0.985	GSE 1:256
				P=0.962	P=1	P=1	GSE 1:512
			P=0.999	P=0.999	P=0.981	P=1	GSE 1:1024
		P=0.995	P=1	P=0.917	P=1	P=1	کنترل مثبت
	P=0.998	P=1	P=1	P=0.996	P-0.991	P=1	کنترل منفی
24						P=496	GSE 1:128
					P=0.983	P=0.905	GSE 1:256
				P=0.977	P=1	P=0.472	GSE 1:512
			P=0.523	P=0.166	P=0.498	P=0.023	GSE 1:1024
		P=0.693	P=0.046	P=0.010	P=0.042	P=0.001	کنترل مثبت
	P=0.013	P=0.207	P=0.991	P=1	P=0.994	P=0.851	کنترل منفی
48						P=1	GSE 1:128
					P=1	P=0.999	GSE 1:256
				P=1	P=0.999	P=0.999	GSE 1:512
			P=0.188	P=0.207	p=0.348	p=0.377	GSE 1:1024
		P=0.680	P=0.887	P=0.910	P=0.987	P=0.992	control+
	P=0.995	P=0.412	P=0.998	P=0.999	P=1	P=1	control-

معنی‌دار (P<۰/۰۵) غیر معنی‌دار

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-12-18]

محیط نگه دارنده بزاق مناسب‌تر از آب شیر بوده ولی پتانسیل آلودگی باکتریال آن زیاد است (۲۵) و همچنین بزاق نیز مانند آب‌های پوتونیک است و تنها برای نگهداری دندان در کوتاه مدت مناسب است (۲۶).

در مطالعه‌ای شیر به عنوان یک محیط نگه دارنده‌ای موقت در کوتاه مدت نتیجه قابل قبولی داشته است (۱۸،۲۷)، اگرچه سایر مطالعات بیان می‌دارند که شیر ماده مناسب برای بقای بالای ۴۸ ساعت است (۲۸،۲۹). که شاید علت این تفاوت، اختلاف در انواع شیرهای مصرفی باشد. HBSS به عنوان محیط نگه دارنده ی مناسب برای دندان‌های اوالز شده توسط انجمن بین المللی دندانپزشکی تروماتولوژی پیشنهاد شده است (۳۰). گرچه HBSS توانایی حفاظت طولانی مدت سلول‌های PDL را دارد، اما عیب آن عدم دسترسی آسان در زمان حادثه و همچنین استفاده در شرایط خاص می‌باشد. بنابراین به یک محیط نگه دارنده قابل قبول و در دسترس برای نگه داری و حفظ سلول‌های PDL نیاز است (۱۸).

با بررسی مطالعات گذشته و عدم یافتن مطالعه‌ای که اثر GSE را بر روی سلول‌های PDL مورد بررسی قرار داده باشد، برآن شدیم تا مطالعه حاضر را انجام دهیم. GSE به صورت محصول تجاری در بسیاری از کشورها برای دیگر مصارف غیر از دندانپزشکی در دسترس است و تحقیقاتی در مورد تاثیر آن بر روی سلول‌های فیبروبلاست انجام شده است (۱،۲). همچنین اثر آنتی باکتریالی و غیرسمی بودن GSE مورد بررسی قرار گرفته است (۱). GSE اثر باکتری سیدال قوی داشته و غلظت‌های ۱:۱ تا ۱:۲۵۶ به شدت برای فیبروبلاست‌های لثه و پوست، حتی باکتری‌های سمی است در حالی در غلظت‌های ۱:۲۵۶ تا ۱:۵۱۲، GSE با حفظ اثر آنتی باکتریال خود، باعث زنده ماندن سلول‌های فیبروبلاست شد (۲) و همچنین در مطالعه‌ای دیگر غلظت‌های ۱:۱ تا ۱:۱۲۸ سمی نشان داده شدند (۱) که ممکن است بخاطر استفاده از GSE تجاری و استفاده مواد دیگر داخل آن در این محصول باشد (۱۲،۳۱،۳۲). به همین علت در مطالعه حاضر ما برای مطالعه تأثیر خالص عصاره گریپ فروت، عصاره GSE را تهیه کرده و از فرم تجاری آن استفاده نکردیم و همچنین ۵ غلظت ۱:۶۴، ۱:۱۲۸، ۱:۲۵۶، ۱:۵۱۲و ۱:۱۰۲۴GSE مورد بررسی قرار دادیم.

نتایج سمیت کلرهگزیدین نشان می دهد که نسبت به GSE برای سلول تهاجمی‌تر است. تعدادی از نویسندگان اظهار داشتند که کلرهگزیدین ممکن است منجر به بهبودی زخم‌های دهانی شود و به انواع مختلف دیگر سلول‌ها بسیار سمی باشد و سبب آسیب به فیبروبلاست‌های لثه، سلول‌های اندوتلیال و استئوبلاست‌های آلوئولار شود (۳۳،۳۴).

برخی از محصولات مورد استفاده در دندانپزشکی، مانند هیدروکسید کلسیم، توکسیک در مدل‌های کشت بوده، اما اثرات ضد التهابی و درمانی بسیار عالی بر روی بافت‌ها دارد (۳۵،۳۶). بر طبق Saw و همکاران (۳۷) برای اطمینان از سمیت یک محصول، لازم به آزمایش مدل‌های مختلف سلول‌های کشت و انجام مطالعات in vivo است که شرایط تقریبی بالینی بهتری را در بر می‌گیرد. بنابراین سمیت GSE در مطالعات پیشین در غلظت‌های بالا مانع انجام این مطالعه نمی‌باشد.

گزارش شده است که رشد سلول‌ها عمدتا در pH ۶/۶ تا ۷/۸ اتفاق می‌افتد (۲۰). هرچند در مطالعه‌ای GTE که دارای PH ۵/۹۱ بود، دارای اثر بهتری نسبت به HBSS و شیر کم چرب بود. PH مخلوط ۵۰ درصدی پالپ و هسته GSE برابر با ۳/۳۵ می‌باشد. در غلظت ۱:۶۴ PH برابر ۴/۷۵، در غلظت‌های ۱:۱۲۸ برابر ۴/۸۶، در غلظت ۱:۲۵۶ برابر ۴/۹۴، در غلظت ۱:۵۱۲ برابر ۵/۰۵ و در غلظت ۱:۱۰۲۴ برابر با ۵/۱۹ بود که نشان دهنده افزایش PH با کاهش رقت بود. PH اتانول ۷۰ درصدی که محلول رقیق کننده GSE و کنترل منفی بود، برابر با ۵/۶۱ و PH محلول FBS به عنوان کنترل مثبت برابر با ۷/۲ بود. در این مطالعه نیز مانند مطالعه‌ای که GTE را مورد بررسی قرار داده بود، PH پایین‌تر از حدی بود که برای رشد سلول‌ها، نرمال در نظر گرفته شده بود، اما شاهد رشد سلولی در غلظت‌های مختلف GSE بودیم که احتمالاً به علت مداخله عوامل دیگری غیر از PH می‌باشد.

اثر GSE بر روی تکثیر سلول‌های PDL در ساعات ۱، ۶، ۱۲، ۲۴، ۴۸ با روش احیای MTT که نمایانگر فعالیت تنفسی سلول است به صورت کمی اندازه‌گیری شد. علت انتخاب سنجش احیای MTT در این مطالعه، توانایی بررسی غلظت‌های مختلف در زمان واحد و درون یک پلیت ۹۶ خانه‌ای و با سرعت بالا می‌باشد (۳۰)، همچنین به طور مثال استفاده از روش تریپان بلو اطلاعاتی در مورد اینتگریتی فیزیکی غشاء سلولی ارائه می دهد، اما فعالیت سلولی متابولیک واقعی را ارزیابی نمی‌کند اما در روش MTT فعالیت میتوکندری که متناسب با میزان فورمازان است اندازه گیری می‌شود (۳۰) و همچنین نسبت به بسیاری از روش‌ها حساسیت بالاتری دارد و مشکل مربوط به کار با مواد رادیواکتیو

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-12-18]

وجود ندارد (۳۸).

با انجام این تحقیق مشخص شد که بالاترین اثر تحریکی GSE در غلظت ۱:۱۲۸ بوده که در ساعت ششم بیشترین تأثیر را داشته و در ساعت دوازدهم از کنترل مثبت نیز بیشتر بوده است. در حالی که GSE در غلظت ۱:۲۵۶ کمترین اثر تحریکی را داشته و در تمام ساعات جز ساعت اول حتی کمتر از کنترل منفی بود و همچنین GSE در غلظت ۱:۱۰۲۴ و ساعات ۱۲، ۲۴، ۴۸ تاثیری در حد کنترل مثبت داشته که نشان دهنده این است که GSE در غلظت‌های کمتر و زمان‌های طولانی‌تر، در حفظ حیات سلول‌های PDL مؤثرتر است.

اثر تحریکی GSE بر روی سلول‌های PDL تا کنون بررسی نشده بود اما Heggres و همکاران (۲) در سال ۲۰۰۲ اعلام کردند که GSE در غلظت‌های ۱:۱ تا ۱:۱۲۸ خاصیت ضدباکتریایی دارد اما سمی نیز می‌باشد اما در غلظت ۱:۵۱۲با اینکه همچنان ضدباکتری است، بر روی سلول‌های فیبروبلاست اثر سمی ندارد. همچنین Regour و همکاران (۱۱) در سال ۲۰۰۲ به این نتیجه رسیدندکه GSE بر روی ۶۷ بیوتایپ مختلف باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی تاثیر آنتی باکتریال داشته، هرچند بر روی باکتری‌های گرم مثبت نسبت به باکتری‌های گرم منفی مؤثرتر می‌باشد.

Bernatonieno و همکاران (۳۹) در سال ۲۰۱۳ بیان کردند که آب کران بری و GSE باعث کاهش رشد باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی شدند، اما اثر GSE به طور چشمگیری بیشتر بود و کاندیدا آلبیکنز فقط به GSE حساس بود. به همین علت، به منظور تأثیر همه میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه، می‌توان از ترکیبی از ۰/۷٪ GSE و ۱۰٪ آب کرانبری یا ۵٪ GSE استفاده کرد (۳۹). Guedes و همکاران (۱) در سال ۲۰۱۳ اظهار نمودند که GSE و کلرهگزیدین سایتوتوکسیک بوده و غلظت‌های بالاتر منجر به سمیت بیشتر فیبروبلاست‌ها می شود و در بافت همبند، GSE باعث ایجاد التهاب شدید در روز اول در تمام غلظت‌ها می‌شود (۱). اما در این مطالعه در هیچ غلظتی سمیتی در غلظت‌های مختلف GSE دیده نشد که ممکن است به دلیل استفاده از GSE تجاری در این مطالعات و همچنین استفاده از غلظت‌های بالاتر باشد.

GSE با داشتن خواصی از جمله فلاونوئید اسید اسکوربیک، توکوفرول، اسید سیتریک لیموئیدها استرول و مواد معدنی توانسته بود ماده مؤثر در رشد سلول‌های فیبروبلاست تماس نیافته PDL باشد. غلظت‌های مختلف GSE با زمان در طی ساعات مختلف به صورت خطی عمل نمی‌کنند و در غلظت‌های ۱:۱۲۸ و ۱:۱۰۲۴ و همچنین در ساعات ۱۲ و ۲۴ بهترین نتیجه را داشتند. تمامی غلظت‌ها در سه زمان از پنج زمان مورد مطالعه در حد کنترل مثبت عمل نمودند و هیچ اثر سمی در تمامی غلظت‌ها بر روی سلول‌های PDL مشاهده نشد.

با توجه به محدودیت‌های مختلف HBSS، GSE می‌تواند به عنوان ماده اولیه و ارزان در غلظت‌های کمتر و زمان‌های طولانی استفاده شود. بدین ترتیب شاید بتوان از GSE در درمان دندان اوالز شده به دلیل تروما اشاره کرد که با حفظ حیات و تحریک سلول‌های لیگامان پریودنتال به صورت ماده اولیه و ارزان، می‌تواند شانس موفقیت درمان را افزایش دهد. البته جهت حصول اطمینان از این فرضیات نیاز به انجام تحقیقات بیشتری است.

تشکر و قدردانی

این مقاله از پایان نامه دکترای حرفه‌ای دندانپزشکی عمومی مصوب و دفاع شده در دی ماه سال ۱۳۹۷ در دانشکده دندانپزشکی شاهد به شماره ۸۳۱ و با شناسه کمیته اخلاق در پژوهش دانشگاه شاهد IR.SHAHED.REC.1397.063 استخراج شده است.

نویسندگان بر خود لازم می‌دانند مراتب تشکر صمیمانه خود را از معاونت و مسئولان پژوهشی دانشکده دندانپزشکی شاهد و هیئت داوران پایان نامه که ما را در انجام و بهبود کیفی این پژوهش یاری دادند، اعلام نمایند.

References

1- Guedes C, Silverio-Amancio O, Kalil-Bussadori S, Marcilio-Santos E, Santos-Pavesi V, Martins M. In vitro and in vivo toxicity of grapefruit seed extract. Med Sci Tech. 2013;54:65-9.

2- Heggers JP, Cottingham J, Gusman J, Reagor L, McCoy L, Carino E, et al. The effectiveness of processed grapefruit-seed extract as an antibacterial agent: II. Mechanism of action and in vitro toxicity. J Altern Complement Med. 2002;8(3):333-40.

3- Morton JF, Dowling CF. Fruits of warm climates, 1st ed, Miami: Florida Flair Books, 1987.

4- Sims J. Gale Encyclopedia alternative medicine, 2nd ed, New Hampshire: Thomson Gale, 2001.

5- Drewnowski A, Gomez-Carneros C. Bitter taste, phytonutrients, and the consumer: a review. Am J ClinNutr. 2000;72(6):1424-35.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-12-18]

6- Tirillini B. Grapefruit: the last decade acquisitions. Fitoterapia. 2000 ;71:S29-37.

7- Armando C, Maythe S, Beatriz NP. Antioxidant activity of grapefruit seed extract on vegetable oils. J Sci Food Agric. 1998;77(4):463-7.

8- Patel BH, Suhagia BN, Patel MM, Patel JR. High-performance liquid chromatography and thin-layer chromatography for the simultaneous quantitation of rabeprazole and mosapride in pharmaceutical products. J Chromatogr Sci. 2008 ;46(1):10-4.

9- Braddock RJ, Bryan CR. Extraction parameters and capillary electrophoresis analysis of limonin glucoside and phlorin in citrus byproducts. J Agric. Food Chem. 2001;49(12):5982-8.

10- Jonsson C, Ellegård L. Grapefruit juice and serum lipids in healthy adults. Scand J Food Nutr. 2006;50(3):118-23.

11- Reagor L, Gusman J, McCoy L, Carino E, Heggers JP. The effectiveness of processed grapefruit-seed extract as an antibacterial agent: I. An in vitro agar assay. J Altern Complement Med. 2002;8(3):325-32.

12- Ganzera M, Aberham A, Stuppner H. Development and validation of an HPLC/UV/MS method for simultaneous determination of 18 preservatives in grapefruit seed extract. J Agric Food Chem. 2006;54(11):3768-72.

13- Sugimoto N, Tada A, Kuroyanagi M, Yoneda Y, Yun YS, Kunugi A, et al. Survey of synthetic disinfectants in grapefruit seed extract and its compounded products. Shokuhin Eiseigaku Zasshi. 2008;49(1):56-62.

14- Krajewska-Kułak E, Lukaszuk C, Niczyporuk W. Effects of 33% grapefruit extract on the growth of the yeast-like fungi, dermatopytes and moulds. Wiadomosci parazytologiczne. 2001;47(4):845-9.

15- Giamperi L, Fraternale D, Bucchini A, Ricci D. Antioxidant activity of Citrus paradisi seeds glyceric extract. Fitoterapia. 2004;75(2):221-4.

16- Turkoski ON. Fighting infection: an ongoing challenge, part 1. Orthop Nurs. 2005;24:40-6.

17- Ionescu G. Oral citrus seed extract. J Orthomolec Med. 1990;5:230-8.

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.

19- Andersson L, Andreasen JO, Day P, Heithersay G, Trope M, DiAngelis AJ, et al. International Association of Dental Traumatology guidelines for the management of traumatic dental injuries: 2. Avulsion of permanent teeth. Dent Traumatol. 2012;28(2):88-96.

20- Khademi A, Saei S, Mohajeri M, Mirkheshti N, Ghassami F. Torabi nia N, Alavi SA. A new storage medium for an avulsed tooth. J Contemp Dent Pract. 2008;9(6):25-32.

21- Martins WD, Westphalen VP, Westphalen FH. Tooth replantation after traumatic avulsion: a 27-year follow up. Dent Traumatol. 2004;20(2):101-5.

22- Martin MP, Pileggi R. A quantitative analysis of Propolis: a promising new storage media following avulsion. Dent traumatol. 2004;20(2):85-9.

23- Chamorro MM, Regan JD, Opperman LA, Kramer PR. Effect of storage media on human periodontal ligament cell apoptosis. Dent Traumatol. 2008;24(1):11-6.

24- Dos Santos CLV, Sonoda CK, Poi WR, Panzarini SR, Sundefeld MLMM, Negri MR. Delayed replantation of rat teeth after use of reconstituted powdered milk as a storage medium. Dent Traumatol. 2009;25(1):51-7.

25- Khinda VI, Kaur G, Brar GS, Kallar S, Khurana H. Clinical and practical implications of storage media used for tooth avulsion. Int J Pediatr Dent. 2017;10(2):158-65.

26- Osmanovic A, Halilovic S, Kurtovic-Kozaric A, Hadziabdic N. Evaluation of periodontal ligament cell viability in different storage media based on human PDL cell culture experiments-A systematic review. Dent Traumatol. 2018;34(6):384-93.

Pearson RM, Liewehr FR, West LA, Patton WR, McPherson III

27- Pearson RM, Liewehr FR, West LA, Patton WR, McPherson JC 3rd, Runner RR. Human periodontal ligament cell viability in milk and milk substitutes. J Endod. 2003;29(3):184-6.

28- Olson BD, Mailhot JM, Anderson RW, Schuster GS, Weller RN. Comparison of various transport media on human periodontal ligament cell viability. J Endod. 1997;23(11):676-9.

29- 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):130-6.

30- Edmondson JM, Armstrong LS, Martinez AO. A rapid and simple MTT-based spectrophotometric assay for determining drug sensitivity in monolayer cultures. Meth Cell Sci. 1988;11(1):15-7.

31- Schlüter B, Pflegel P, Lindequist U, Jülich W. Aspects of the antimicrobial efficacy of grapefruit seed extract and its relation to preservative substances contained. Die Pharmazie. 1999;54(6):452-6.

32- Takeoka GR, Dao LT, Wong RY, Harden LA. Identification of benzalkonium chloride in commercial grapefruit seed extracts. J Agric Food Chem. 2005;53(19):7630-6.

33- Flemingson, Emmadi P, Ambalavanan N, Ramakrishnan T, Vijayalakshmi R. Effect of three commercial mouth rinses on cultured human gingival fibroblast: an in vitro study. Indian J Dent Res. 2008;19(1):29-35.

34- Giannelli M, Chellini F, Margheri M, Tonelli P, Tani A. Effect of chlorhexidine digluconate on different cell types: a molecular and ultrastructural investigation. Toxicol in vitro. 2008;22(2):308-17.

35- Duarte P, Giro E, Hebling J. Cytotoxic effects and pulpal response caused by a mineral trioxide aggregate formulation and calcium hydroxide. Am J Dent. 2008;21(4):255-61.

36- de Mendonca AAM, Souza PPC, Hebling J, de Souza Costa CA. Cytotoxic effects of hard-setting cements applied on the odontoblast cell line MDPC-23. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol. 2007;104(4):e102-e8.

37- Saw TY, Cao T, Yap AUJ, Ng MML. Tooth slice organ culture and established cell line culture models for cytotoxicity assessment of dental materials. Toxicol in vitro. 2005;19(1): 145-54.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-12-18]

38- Yuan T, Zhang CQ, Wang JH. Augmenting tendon and ligament repair with platelet-rich plasma (PRP). Muscles, ligaments, tendons J. 2013;3(3):139.

39- Bernatoniene J, Keraitė R, Masteiková R, Pavilonis A, Savickas A. A combination of grapefruit seed extract and concentrated cranberry juice as a potential antimicrobial preservative for the improvement of microbiological stability of hypromellose gel. Ceska a Slovenska farmacie: casopis Ceske farmaceuticke spolecnosti a Slovenske farmaceuticke spolecnosti. 2013;62(5):212-9.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-12-18]