

بررسی مقایسه ای محیطهای مختلف در حفظ حیات سلولهای لیگامان پریودنتال

دکتر عباسعلی خادمی* - دکتر سعید ساعی** - دکتر سیدعلی علوی*** - دکتر نوشین میرخشتی*** - فاطمه قسامی***

*- دانشیار گروه آموزشی اندودنتیکس دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان.

** - اندودنتیست.

*** - پزشک عمومی.

**** - دانشجوی پزشکی.

چکیده

زمینه و هدف: در جاگذاری سریع دندانهای بیرون افتاده درمان انتخابی برای بدست آوردن حداکثر التیام، پریودنتال می باشد. اگر دندان به فوریت ری پلانت نشود، حیات سلولهای لیگامان پریودنتال روی سطح ریشه باید به وسیله یک محیط واسط مناسب حفظ شود. هدف از این مطالعه مقایسه اثر محیطهای: آب، *Hanks Balanced Salt Solution (HBSS)*، شیر و سفیده تخم مرغ در حفظ حیات سلولهای لیگامان پریودنتال می باشد.

روش بررسی: طی یک مطالعه آزمایشگاهی، ۱۰۵ دندان پرمولر انسان بدون بیماری پریودنتال که علت خارج کردن آن درمان ارتودنسی بود بدون تروما خارج گردید. دندانها پس از خارج شدن با HBSS از خون عاری شد و داخل لوله آزمایش محتوی ده میلی لیتر محلول HBSS درون فلاسک حاوی یخ طی مدت نیم ساعت به آزمایشگاه منتقل شد. محیطهای مورد آزمایش شامل آب، شیر، سفیده تخم مرغ و HBSS بود. زمانهای ارزیابی: یک، دو، چهار، هشت و دوازده ساعت بود. پس از طی این زمان دندانها مجدداً با HBSS شسته شد. پس از جدا کردن سلولها از سطح ریشه دندان به وسیله تریپسین کردن و سپس استفاده از کلاژناز، حیات سلولهای لیگامان پریودنتال توسط رنگ آمیزی تریپان بلو بررسی شد. شمارش فیبروبلاستها و نسبت تعداد سلولهای زنده به کل سلولها محاسبه گردید برای مقایسه نتایج از آزمون آماری ANOVA/ استفاده گردید.

یافته ها: براساس نتایج این مطالعه بین محیط سفیده تخم مرغ و HBSS از نظر آماری اختلاف معنی داری وجود نداشت، همچنین بین آب و شیر نیز اختلاف معنی داری وجود نداشت و محیطهای سفیده تخم مرغ و HBSS از نظر حفظ حیات سلولهای لیگامان پریودنتال نسبت به محیطهای آب و شیر مناسبتر بودند.

نتیجه گیری: سفیده تخم مرغ می تواند بعنوان یک محیط مناسب برای حفظ حیات سلولهای لیگامان پریودنتال در دندانهای بیرون افتاده پیشنهاد شود. از خصوصیات مهم آن این است که به سهولت در دسترس می باشد.

کلید واژه ها: سلولهای لیگامان پریودنتال - کشت سلولی - دندانهای بیرون افتاده - محیط واسط (انتقالی)

وصول مقاله: ۸۳/۸/۳۰ اصلاح نهایی: ۸۳/۱۲/۲۴ پذیرش مقاله: ۸۴/۲/۲۵

نویسنده مسئول: گروه آموزشی اندودنتیکس دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان khademi@dnt.mui.ac.ir

مقدمه

اتفاقات شایع امروزی می باشد. بررسیهای کلینیکی نشان می دهد که این صدمات در اطفال به عنوان یک مشکل عمومی محسوب شده و شیوع آن در حال افزایش می باشد.

براساس تقسیم بندی WHO در مورد دندانهای ضربه خورده، بیرون افتادن دندان یا جابه جایی کامل دندان از ساکت خود و خروج و بیرون افتادن دندان می باشد (۱)، ضربه به دندانها از

طبق نظر Andreassen شیوع این صدمات ممکن است به مرور زمان از شیوع پوسیدگی دندان بیشتر شود (۲)، در دندانهای بیرون افتاده، جایگذاری فوری دندان به عنوان درمان انتخابی می باشد، وقتی آسیب و صدمه رخ می دهد، دندان بیرون افتاده باید فوراً جایگذاری شود تا از صدمات وارد به سلولهای لیگامان پریودنتال در آینده پیشگیری شود. به علت عوامل مرتبط با حادثه مانند حالت هیجانی والدین، عدم داشتن دانش کافی افراد حاضر در محل حادثه در رابطه با این مسئله و سایر موارد مشابه جایگذاری فوری دندانهای بیرون افتاده به طور استثنای انجام می شود. در این شرایط دندان باید در یک محیط مناسب نگهداری شود تا در اسرع وقت توسط دندانپزشک جایگذاری شود. (۳-۴)، دو عامل تأثیر بیشتری بر روی پیش آگهی دندانهای بیرون افتاده دارند. یکی زمان خشک شدن دندان بیرون از دهان و دیگری محیطی که دندان قبل از درمان در آن نگهداری می شود. (۵)، در یک زمان کوتاه پس از بیرون افتادن دندان سلولهای لیگامان پریودنتال چسبیده شروع به نکروز شدن می کند. Andreassen نشان داد که اگر دندان سریعاً جایگذاری شود دندان بدون تحلیل و با فانکشن طبیعی در قوس دندانی باقی می ماند. محیط واسط (انتقالی) ممکن است از زمان خارج بودن دندان نیز مهمتر باشد. محیط واسط نامناسب سبب افزایش نکروز سلولها و نتیجتاً انکیلوز و تحلیل ریشه دندان می شود. (۶)

برای حفظ Viability سلولهای لیگامان پریودنتال محیطهای مختلفی پیشنهاد شده است که از آن جمله می توان به محیطهای: شیر، سالین، بزاق، آب، محیطهای کشت Save - A - Tooth و HBSS اشاره کرد (۷)، بنا به پیشنهاد انجمن اندودنتیستهای آمریکا (AAE) برای درمان دندانهای بیرون افتاده، HBSS به عنوان محیط واسط انتخابی می باشد و علت آن قدرت این محیط در حفظ حیات سلولهای لیگامان

پریودنتال برای زمان طولانی است (۸)، علی رغم تمام ویژگیهای مثبت HBSS جهت حفظ دندانهای بیرون افتاده دسترسی به این محیط در محلهایی که معمولاً این حادثه رخ می دهد (مدرسه، منزل، زمینهای ورزشی) مشکل می باشد. هدف از انجام این مطالعه معرفی محیط واسط مناسب برای انتقال دندانهای بیرون افتاده شده می باشد که ضمن دارا بودن خواص مطلوب دیگر قابل دسترسی نیز باشد. به واسطه این موضوع محیطهای شیر و سفیده تخم مرغ را به عنوان محیطهای آزمایش، HBSS و آب را به ترتیب به عنوان شاهد مثبت و منفی انتخاب گردید. هدف از تکرار آزمون شیر، بررسی اثربخشی شیر تولید داخل برای این منظور می باشد. در مورد سفیده تخم مرغ نیز به دلیل در دسترس بودن آن برای غالب آسیب دیدگان و تطابق آن با شرایط فیزیولوژیک نگهداری و رشد سلولی، مورد بررسی قرار گرفت.

روش بررسی

در این مطالعه آزمایشگاهی، ۱۰۵ دندان پرمولر دائمی افراد جوان (۱۲-۳۰ ساله) مورد استفاده قرار گرفت. دندانها فاقد بیماری پریودنتال بود و دقت لازم برای حداقل آسیب به ریشه در هنگام خارج کردن دندانها لحاظ شد (علت خارج کردن دندان درمان ارتودنسی بود).

مواد مورد استفاده عبارت بودند از:

آب شهری، محلول HBSS (Sigma, H-4891)، تریپسین استخراج شده از پانکراس خوک (Sigma, T - 4799)، کلاژناز نوع چهار، محیط کشت RPMI 1640, Sigma، اسید هیدروکلریک (HCL, Merck, 159415)، R - 5382، تریپتان بلو (Trypan Blue, Sigma, T-6146)، شیر پگاه (پاستوریزه پگاه اصفهان) و سفیده تخم مرغ، آب شهری به عنوان شاهد منفی و محلول HBSS به عنوان شاهد مثبت

مورد استفاده قرار گرفت.

مدت آزمون بقای سلول‌های فیبروبلاست در محیط‌های مورد نظر عبارت بودند از یک ساعت، دو ساعت، چهار ساعت، هشت ساعت و دوازده ساعت، در مورد سفیده تخم مرغ یک مورد چهل ساعت آزمایش انجام پذیرفت. (پنج دندان به این منظور استفاده گردید)

روش مورد استفاده در این طرح روش Doyle DL و همکارانش در سال ۱۹۹۸ با اندکی تغییرات می‌باشد. (۹) بر این اساس تعداد دندان مورد استفاده برای هر محیط، بیست و پنج دندان بود که در زمانهای مورد نظر (یک، دو، چهار، هشت و دوازده ساعت) مورد ارزیابی قرار گرفت. تعداد دندان مورد استفاده در هر زمان پنج عدد بود.

تمام دندانها پس از خارج شدن با استفاده از پیست محتوی محلول HBSS بدون کلسیم منیزیم از خون عاری شدند و داخل لوله آزمایش محتوی ده میلی لیتر محلول HBSS، درون فلاسک حاوی یخ خورده شده، ظرف مدت نیم ساعت به محل آزمایشگاه انتقال داده شدند. سپس با استفاده از تیغ بیستوری در حالی که دندان از محل تاج با پنس نگه داشته می‌شد، زوائد مربوط به باقیمانده‌های لثه از روی دندانها جداسازی شد.

دندانها درون لوله‌های آزمایش حاوی محیط آزمایش در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد برای مدت مورد نظر قرار داده شدند (محیطها از قبل با دمای مورد نظر هم‌دم شده بودند).

پس از خاتمه زمان مورد آزمون، دندانها مجدداً با محلول HBSS فاقد کلسیم منیزیم شسته و سلول‌های فیبروبلاست ریشه دندانها به ترتیب زیر جدا گردید.

دندانها ابتدا به مدت ده دقیقه در ده میلی‌لیتر محلول تریپسین ۲/۵٪ در آنکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد بر روی میکسر هماتولوژی قرار داده شدند (روی میکسر مورد نظر برای جلوگیری از سقوط لوله، یک چهارچوب محافظ قرار داده شد).

بلافاصله محلول رویی تخلیه شد و ده میلی‌لیتر محلول ۰/۰۱٪ کلاژناز (با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد) اضافه و چهل دقیقه در آنکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد بر روی شیکر قرار داده شد. در نهایت مایع رویی جدا و بدان ۰/۵ ml محلول RPMI 1640 با FCS ۱۰٪ (برای غیرفعال کردن کلاژناز) اضافه گردید.

سوسپانسیون سلولی به مدت پنج دقیقه با هزار و دو سیست دور در دقیقه در چهار درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شد. مایع رویی تخلیه و رسوب ته لوله توسط شیکر لوله معلق شد. ده میلی‌لیتر محلول HBSS فاقد کلسیم منیزیم با دمای ۴-۶ درجه سانتی‌گراد اضافه و از فیلتر با قطر منافذ صد میکرومتر عبور داده شد و مشابه روش قبل سانتریفوژ تکرار گردید. مایع رویی تخلیه و چهارصد میکرولیتر HBSS فاقد کلسیم منیزیم اضافه و رسوب ته لوله معلق شد.

توسط سمپلر، ۱۵ µl از سوسپانسیون برداشته و درون ویال اپندورف به ۱۵ µl از رنگ حیاتی تریپان بلو (۰/۴٪) اضافه و پس از پنج دقیقه (و قبل از ۱۵ دقیقه) زیر لام هماسیتومتری وارد شد. در چهار خانه ۱۶ تایی، شمارش کل فیبروبلاست‌ها و شمارش تعداد فیبروبلاست‌های آبی شده (مرده) انجام و نسبت تعداد سلول مرده و زنده به کل محاسبه گردید.

جهت مقایسه درصد زنده ماندن سلول‌ها بین محیط‌های مختلف از آزمون آماری ANOVA استفاده گردید.

یافته‌ها

براساس نتایج این مطالعه بین محیط سفیده تخم‌مرغ و HBSS و نیز بین آب و شیر اختلاف معنی‌داری از نظر حفظ حیات سلول‌های پرئودنتال وجود نداشت، ولی بین شیر و آب با سفیده تخم‌مرغ و HBSS اختلاف معنی‌دار بود ($P < 0.001$) (جدول ۱). در یک مورد آزمون، درصد سلول‌های زنده در سفیده تخم‌مرغ پس از چهل ساعت ۶۷٪ بود.

غنای کمتری برخوردار است. ممکن است پاسخ سلول در این حالت نسبت به آنچه در عمل اتفاق می افتد تفاوت کند.

روش استفاده شده در مطالعه حاضر، به دلیل نیاز به تأمین تعداد زیاد دندان در عمل مشکلترا از روش فوق می باشد ولی تشابه بیشتری به آنچه در هنگام بروز حادثه اتفاق می افتد دارد. عملکرد فیبروبلاست ها تحت تأثیر سن، تروما و التهاب می باشد. (۱۱)، لذا در این مطالعه بیماران جوان با دندانهای سالم و بدون بیماری پریو انتخاب شدند و تلاش گردید خارج کردن دندانها با حداقل تروما انجام شود. نتایج بدست آمده از این مطالعه در مورد HBSS و آب تأیید کننده مطالعات پیشین ولی در مورد محیط شیر نتایج حاصل با نتایجی که در اکثر مطالعات قبلی بدست آمده مغایر می باشد.

محیط آب محیط مناسبی برای حفظ حیات سلولهای لیگامان پریودنتال در دندانهای بیرون افتاده نمی باشد و محیط HBSS در این مورد محیط مناسب می باشد.

نشان داده شده است که PH و اسمولالیتی نسبت به ترکیب شیمیایی محیط در حفظ حیات سلولهای لیگامان پریودنتال از اهمیت بیشتری برخوردار است. (۱۲)

اسمولالیتی آب ۳ mosm/L و PH آن ۷/۴-۷/۴۹ می باشد و آب به واسطه هیپوتونیستی آن باعث لیز سریع سلول می شود. (۱۳)

مشاهده شده است که رشد سلول در اسمولالیتی ۲۳۰-۴۰۰ رخ می دهد و رشد اپتیمال آن در اسمولالیتی ۲۹۰-۳۳۰ صورت می گیرد. رشد اپتیمال سلول ها در PH، ۷/۴-۷/۴ انجام می شود ولی در PH، ۶/۶-۷/۸ نیز رشد سلول رخ می دهد. (۱۲ و ۱۴)

اسمولالیتی HBSS، ۲۷۰-۲۹۰ و PH آن ۷/۲ می باشد. اسمولالیتی شیر ۲۵۰ و PH آن ۶/۵-۶/۸ می باشد. اسمولالیتی

جدول ۱: میانگین درصد سلول های زنده مانده به کل سلول ها در ساعات مختلف قرار گرفتن در هر یک از محیطها

زمان	یک	دو	چهار	هشت	دوازده
محیطهای مورد استفاده	ساعت	ساعت	ساعت	ساعت	ساعت
آب	۰	۰	۰	۰	۰
شیر	۱/۶	۰/۸	۰	۰	۰
HBSS	۹۵	۹۰/۶	۹۰/۲	۹۰/۴	۸۷
سفیده	۹۳/۴	۹۰/۸	۹۰/۲	۸۶/۸	۸۷

بحث

دو روش برای ارزیابی قابلیت محیطهای مختلف در زنده نگهداشتن سلول های فیبروبلاست دندان وجود دارد. در روش متداولتر ابتدا سلول های فیبروبلاست از ریشه دندانها جدا می شوند و پس از تکثیر، محیط مورد نظر بر روی آنها ریخته می شود و بقای سلول ها در زمانهای متفاوت ارزیابی می گردد. در این روش از Cell Line برای آزمون استفاده می شود. (۱۰) روش دوم، روش Doyle DL و همکاران در ۱۹۹۸ که در آن دندان مستقیماً وارد محیط مورد آزمون می شود و پس از زمان مورد نظر از محیط خارج و فیبروبلاست ها از ریشه جدا و بقای سلول ها ارزیابی می گردد. این روش در واقع همان Primary Cell Culture می باشد. هر یک از دو روش مزایا و معایبی دارند. مزیت اصلی روش اول، در اختیار بودن تعداد بسیار زیاد سلول فیبروبلاست برای آزمون، با استفاده از تعداد اندکی دندان در ابتدای کار می باشد. اما اشکال مهم آن تفاوت با وضعیتی است که واقعا و در عمل اتفاق می افتد چون در این روش، سلول ها از مرحله تکثیر (از محیط کشت) مستقیماً وارد محیط مورد آزمون می شوند که از لحاظ مواد غذایی از

سفیده تخم مرغ در حدود دویست و پنجاه و PH آن ۸/۹ می‌باشد. (۱۵)

طبق اکثر مطالعات پیشین شیر یک محیط مؤثر و مناسب برای حفظ حیات سلول‌های لیگامان پریدنتال می‌باشد. براساس این مطالعات محیط شیر در سه ساعت با جایگذاری فوری از لحاظ حفظ حیات سلول‌های لیگامان پریدنتال تفاوتی نداشت و پس از ۱۲ ساعت از نظر هیستولوژیک التیام کامل یا حداقل تحلیل التهابی یا جایگزینی مشاهده شد (۱۶-۱۸). ولی در مطالعه حاضر شیر مورد آزمایش (شیر پگاه) حتی در یک ساعت نیز محیط مناسبی برای حفظ حیات سلول‌های لیگامان پریدنتال نبود و از این لحاظ در مقایسه با آب تفاوتی معنی‌داری مشاهده نگردید.

در مطالعه Nathan Rozenfarb و همکاران که به صورت In-Vitro برای مقایسه محیط‌های سفیده تخم مرغ، شیر، بزاق و MEM (محیط کشت) در حفظ حیات فیبروبلاست‌های پوست انسان انجام شد، مشاهده گردید که بهترین محیط MEM بوده و بین سفیده تخم مرغ و شیر تفاوت معنی‌داری وجود نداشت و هر سه محیط از بزاق مناسبتر بودند. (۱۵)

تفاوت‌هایی که این مطالعه با مطالعه حاضر دارد این است که اولاً بررسی بر روی فیبروبلاست پوست انجام شده و ثانیاً زمانهایی که در آن مطالعه انتخاب شده فقط زمانهای ۱۵، ۴۵ و نود دقیقه بود.

طبق نتیجه‌ای که در مطالعه حاضر بدست آمد بین سفیده تخم مرغ و HBSS از نظر حفظ حیات سلول‌های لیگامان پریدنتال در زمانهای یک، دو، چهار، هشت و ۱۲ ساعت تفاوت معنی‌داری مشاهده نگردید و هر دو محیط نسبت به شیر مورد آزمایش (شیر پگاه) و آب مناسبتر بودند.

تحقیقات نشان می‌دهد که فیبروبلاست‌های بدست آمده از منابع دیگر مانند، لثه، لب، پوست گرچه از نظر مورفولوژی

فیبروبلاست‌های لیگامان پریدنتال شبیه هستند ولی در محیط کشت رفتار مشابهی نشان نمی‌دهند. (۱۶-۱۷)

بعضی از انواع شیر که در مطالعات پیشین مورد استفاده قرار گرفت مانند مطالعه حاضر نتایج مطلوبی از نظر حفظ حیات سلول‌ها لیگامان پریدنتال نشان ندادند (حتی در یک ساعت) به عنوان مثال Blomlof مشاهده کرد که یک شیر به نام Viability, Filmjolk سلول‌های لیگامان پریدنتال را فقط در سطح پایینی حفظ می‌کند (حدود یک ساعت) احتمالاً علت آن مربوط به PH پایین آن (۴/۲-۴/۵) می‌باشد. (۱۸)

نشان داده شده است که شیر کم چرب نسبت به شیر با چربی بیشتر در حفظ حیات سلول‌های لیگامان پریدنتال مؤثرتر است. (۱۹)

زمانهای انتخاب شده در این مطالعه (یک، دو، چهار، هشت و ۱۲ ساعت) زمانهایی است که در اکثر مطالعات قبل نیز مورد استفاده قرار گرفته و معمولاً فاصله زمانی بین بیرون افتادن دندان و جایگذاری آن در این محدوده می‌باشد، البته در مطالعه، یک مورد چهل ساعت نیز انجام شد که نتایج آن نسبتاً مطلوب بود.

نتیجه‌گیری

مطالعه حاضر نشان داد که سفیده تخم مرغ می‌تواند محیط واسط مناسبی برای انتقال دندانهای بیرون افتاده شده باشد و با محلول بالانس شده کمکی (HBSS) برابری می‌کند و از طرف دیگر نسبت به HBSS قابلیت دسترسی بهتری دارد و در محیط‌هایی که حادثه اتفاق می‌افتد و HBSS وجود ندارد، بهتر است به جای استفاده از شیر، آب، بزاق و سالی‌نرمال از سفیده تخم مرغ به عنوان محیط انتقال واسط (Storage media) استفاده گردد.

تقدیر و تشکر

شهرک علمی تحقیقاتی اصفهان که در انجام این مطالعه

بدین وسیله از شرکت تحقیقاتی حکیمان شروق وابسته به همکاری کردند تشکر و قدردانی می گردد.

REFERENCES

1. World Health Organization Application of international classification of disease and stomatology. Geneva: World Health Organization; 1992.
2. Andreasen JO, Andreasen FM. Dental text book and color atlas of traumatic injuries to the teeth. Copenhagen: Munksgaard ; 1994, 383–419.
3. Hamilton F, Hill FJ, Mackie IC. Investigation of lay knowledge of the management of avulsed permanent incisors. Endod Dent Traumatol 1997;13:19-23.
4. Marino TG. Determination of periodontal ligament cell viability in long shelf-life milk. J Endod 2000;26:699-702.
5. Andreasen JO, Borum MK, Andreasen FM. Replantation of 400 traumatically avulsed permanent incisors. Part 1. Diagnosis of healing complications. Endod Dent Traumatol 1995;11:51–58.
6. Andreasen JO. Effect of extra alveolar period and storage media upon periodontal and pulpal healing after replantation of mature permanent incisors in monkeys. Int J Oral Surg 1981;10:43- 53.
7. 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.
8. Treatment of the avulsed tooth. Recommended guidelines of The American Association of Endodontists. Dent Clin North Am 1995; 39(1):221-5.
9. Doyle DL, Dumsha TC, Sydiskis RJ. Effect of soaking in han 0..k,s balanced salt solution or milk on PDL cell viability of dry stored human teeth. Endod Dent Traumatol 1998;14:221-224.
10. Ragnarsson B, Carr G, Daniel JC. Isolation & growth of human periodontal ligament cells in – vitro. J Dent Res 1985;64(8):1026-30.
11. Partovi M, Sadeghein A, Azizi E, Qstad SN. Mitogenic effect of L-dopa on human periodontal ligament fibroblast cells. J Endod 2002;28:193- 196.
12. Lindskog S, Blomlof L. Influence of osmolality and composition of some storage media on human periodontal ligament cells. Acta Odontol Scand 1982;40:435–41.
13. Hammarstrom L, Pierce A, Blomlof L, Feiglin B, Lindskog S. Tooth avulsion and replantation – A review. Endod Dent Traumatol 1986;2:1-8.
14. Blomlof L, Otteskoge P, Hammarstrom L. Effect of storage in media with different ion strengths and osmolalities on human periodontal ligament cells. Scand J Dent Res 1981;89:180-187.
15. Rozenfarb N, Kupietzky A, Shey Z. Milk and egg albumen are superior to human saliva in preserving human skin fibroblasts. Pediatr Dent 1997;19:347-8.
16. Martin MP, Pileggi R. A quantitative analysis of propolis: A promising new storage media following avulsion. Dent Traumatol 2004;20:85-9.
17. Trope M, Friedman S. Periodontal healing of replanted dog teeth stored in viaspan, milk and Hank,'s balanced salt solution. Endod Dent Traumatol 1992;8:183-188.

18. 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;31:137-40.
19. Courts FJ, Mueller WA, Tabeling HJ. Milk as an interim storage medium for avulsed teeth. *Pediatr Dent* 1983;5:183-86.