T. C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

AVÜLSE DİŞ SAKLAMA SOLÜSYONLARININ PERİODONTAL LİGAMENT FİBROBLASTLARI FARKLANMA MEKANİZMASI ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

İREM BAĞ

DOKTORA TEZİ

PEDODONTİ ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Sibel YILDIRIM

KONYA-2015

T. C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

AVÜLSE DİŞ SAKLAMA SOLÜSYONLARININ PERİODONTAL LİGAMENT FİBROBLASTLARI FARKLANMA MEKANİZMASI ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

İREM BAĞ

DOKTORA TEZİ

PEDODONTİ ANABİLİM DALI

Danışman
Prof. Dr. Sibel YILDIRIM
İkinci Danışman
Doç. Dr. Meltem Demirel KARS

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından proje 13202039 numarası ile desteklenmiştir.

KONYA-2015

ÖNSÖZ

Doktora eğitimim boyunca her konudaki desteğiyle, zamanını esirgemeden hem tezimde hem de klinik eğitimimde katkıları olan, aynı zamanda sevincimi veya derdimi rahatlıkla paylaşabildiğim, hayata dair deneyimleri ve gözlemleri ile bana yol gösterici olan, doktora eğitimim sonrasında bile hem hocam hem ablam olacağını bildiğim değerli danışmanım Prof. Dr. Sibel Yıldırım'a,

Tezime yaptığı katkılar ve AR- GE hücre kültürü laboratuvarının kapılarını bana açmış olmalarından dolayı ikinci tez danışmanım Doç. Dr. Meltem Demirel Kars ve laboratuvar sorumlularına,

Tıbbi Biyoloji ve Genetik Bölümü hücre kültürü laboratuvarının kapılarını bana tereddütsüz olarak açan Prof. Dr. Hasan Acar'a ve samimi bir çalışma ortamı sağlayan güler yüzlü ve yardımsever asistanlarına,

Doktora eğitimim süresince mesleki anlamda bilgilerini ve tecrübelerini paylaşan Anabilim Dalımızda görev yapmakta olan değerli tüm öğretim üyelerine, başta eş kıdemlilerim olmak üzere birlikte çalıştığımız asistan arkadaşlarıma ve bölümümüzün bütün personeline,

Bu zor süreçte desteğini esirgemeyen, hayata pozitif bakışı ve enerjisiyle motivasyon kaynağım olan, sevgisiyle bana neşe ve huzur veren sevgili Yiğit Tezanlar'a

Hayatım boyunca desteklerini ve güvenini esirgemeyen, her an yanımda olamasalar da istediğim an koşup geleceklerini, hep yanımda olduklarını bildiğim anneciğim ve babacığıma, Konya'daki yoldaşım sevgili kardeşime

sonsuz teşekkürlerimi sunarım…

İÇİNDEKİLER

Sayfa

SİMGELER VE KISALTMALAR vi

1. GİRİŞ 1

1.1. Avülsiyon 2
1.1.1. Avülse Dişin Diş Kliniğinde Tedavisi 3
1.1.2. Avülse Dişin Replantasyonundan Sonra Destek Tedavileri 6
1.2. Avülse Dişin Replantasyonunu Takiben Oluşabilecek Komplikasyonlar 7
1.2.1. Normal PDL ile İyileşme 7
1.2.2. Yüzey Rezorpsiyonu ile İyileşme 8
1.2.3. Replasman Rezorpsiyonu (Ankiloz) 8
1.2.4. İnflamatuar Kök Rezorpsiyonu 9
1.3. Avülsiyon patogenezi 9
1.4. Periodontal Ligament (PDL) ve Periodontal Ligament Fibroblastları (PDLF) 10
1.5. Kollajen Tip XII 11
1.6. Runt-Related Transcription Factor 2 (Runx2) 13
1.7. Nüklear Faktör-Kappa B Ligand Reseptör Aktivatörü (RANKL) 14
1.8. PDL Kök Hücreleri (PDL- KH) 16
1.9. Avülse Diş Saklama Solüsyonları 17
1.9.1. Çeşme Suyu 18
1.9.2. Tükürük 18
1.9.3. Salin 19
1.9.4. Süt 19
1.9.5. Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) 22
1.9.6. Viaspan 24
1.9.7. Eagle'ın vasatı 24
1.9.8. Oral Rehidratasyon Tuz Solüsyonu 26
1.9.9. Yeşil çay 27
1.9.10. Propolis 27
1.9.11. Diğer Avülse Diş Saklama Solüsyonları 28

1.10. Avülse Dişlerin Taşıma Solüsyonlarının Etkinliğinin Değerlendirilmesinde Kullanılan In Vitro Metotlar 30
1.10.1. PDL Hücre Kültürü 30
1.10.2. PDL Kültürlerinde Hücre Canlılığını Tespit Eden Yöntemler 30
1.10.3. Plastik Yüzeye Yapışma Kapasitesinin Değerlendirilmesi 31
1.10.4. Klonojenik Kapasitenin Ölçümü 31

2. GEREÇ VE YÖNTEM 33

2.1. Çalışmada Kullanılan Materyaller 33
2.1.1. Diş 33
2.1.2. Avülse Diş Saklama Solüsyonları 33
2.1.3. İmmunofloresan Antikorlar 35
2.2. Yöntem 36
2.2.1. Çekilen Dişlerin Avülse Diş Saklama Solüsyonuna Alınması 37
2.2.2. PDL Hücre İzolasyonu 37
2.2.3. Pasajlama 38
2.2.4. Hücrelerin Çoğalma Dinamiklerinin Saptanması 38
2.2.5. Plastik Yüzeye Yapışma ve Klonojenik Kapasitenin Değerlendirilmesi 39
2.2.6. İmmunfloresan İnceleme İçin Hücrelerin Hazırlanması 39
2.2.7. İmmun-floresan Boyama 39
2.2.8. Lazer Taramalı Konfokal Mikroskop Görüntüleri 40

3. BULGULAR 41

3.1. Hücre İzolasyonu 41
3.2. Hücre Morfolojileri 42
3.3. Klonojenik Büyüme Profili 43
3.4. Hücre Çoğalma Dinamikleri İle İlgili Sonuçlar 44
3.4.1. Proliferasyon Grafikleri 44
3.4.2. PDT (Population Doubling Time) 45

3.5. IF Boyama- Konfokal Mikroskop Sonuçları 47

4. TARTIŞMA 54

5. SONUÇ VE ÖNERİLER 68

6. KAYNAKLAR 70

7. EKLER 78

EK-A. Etik Kurul Kararı 78

8. ÖZGEÇMİŞ 80

SİMGELER VE KISALTMALAR

%: Yüzde

°C: Santigrat derece

αMEM: Minimal Essantial Medium Alfa Modifikasyonu

Bglap: Osteokalsin

cm^2: Santimetrekare

CO_2: Karbondioksit

COL 12: Kollajen tip 12

dk: Dakika

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DMEM- F12: Dulbecco's Modified Eagle's Medium- Ham's besleyici karışımı

DNA: Deoksiribonükleik asit

EDTA: Etilendiamin tetraasetik asit

EGCG: (-) - Epigallocatechin-3-gallate

FACIT: kesikli üçlü heliks yapıda fibrille ilişkili kollajenler

FBS: Fötal sığır serumu

FITC: Fluorescein isothiocyanate

HBSS: Hank's Balanced Salt Solution

Ig G: İmmunglobulin G

IF: İmmünfloresan

MEM: Minimal Essantial Medium

mg: Miligram

MKH: Mezenkimal kök hücre

mL: Mililitre

µM: Mikromolar

mRNA: Mesajcı ribonükleik asit

MTT: 3-[4, 5-dimetiltiazol-2-yl]-2, 5-difenil tetrazolyum bromid

OPG: Osteoprotegerin

ORTS: Oral rehidratasyon tuz solüsyonu

P: Pasaj

pH: Power of Hydrojen

PBS: Fosfat tamponlu salin

PDL: Periodontal ligament

PDLF: Periodontal ligament fibroblastları

PDL- KH: Periodontal ligament kök hücreleri

PDT: Population doubling time

RANK: Nüklear faktör- Kappa B aktivatör reseptörü

RANKL: Nüklear Faktör-Kappa B Aktivatör Reseptör Ligandı

Rpm: round per minute

Runx2: Runt-Related Transcription Factor 2

Spp1: Osteopontin

7AAD: 7-Aminoactinomycin D

ÖZET

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Avülse Diş Saklama Solüsyonlarının Periodontal Ligament Fibroblastları Farklanma Mekanizması Üzerine Etkilerinin Araştırılması

İrem Bağ
Pedodonti Anabilim Dalı

DOKTORA TEZİ / KONYA-2015

Avülsiyon dişin alveoler soketten tamamen ayrılması olarak tanımlanır. Avülsiyon olgularında, avülse olan dişin soketine derhal yerleştirilemediği durumlarda PDL hücrelerinin canlılığını sürdürmelerine yardımcı olacak bir solüsyon içerisinde saklanması gerekmektedir. Literatürde HBSS ve sütün PDL hücreleri canlılığı üzerine etkileri değerlendirilmiş ve ideale yakın özellikler sergiledikleri görülmüştür. Bu tez kapsamında süt ve HBSS'nin PDL hücrelerinin farklanmasına yol açıp açmadığının incelenmesi hedeflenmiştir.

Avülse dişi taklit eden çekilmiş dişler HBSS, süt ve DMEM- F12 (pozitif kontrol) solüsyonlarında 4°C'de 30- 60 dk ve 12 saat sürelerinde bekletilmiştir. Sonra bu dişlerin PDL dokusundan elde edilen PDLF'larının çoğalma dinamikleri hücre proliferasyon grafikleri ve PDT değerleri ile PDLF'nin osteoblast veya osteoklasta farklanma eğilimi gösterip göstermedikleri ya da fibroblast kimliğini koruyup korumadıkları immünfloresan (IF) işaretleyiciler kullanılarak konfokal mikroskop ile değerlendirilmiştir. PDLF'lerin osteoblasta farklanmaları Runx2, osteoklasta farklanmaları RANKL ve fibroblast kimliklerini korumaları COL 12 işaretleyicilerinin ifadeleri incelenerek değerlendirilmiştir.

PDLF'lerin çoğalma dinamikleri değerlendirildiğinde gruplar arasında ortalama hücre sayıları ve PDT değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p > 0,05$). HBSS grupları IF sonuçları incelendiğinde Runx2 ifadesinde artış gözlenirken, RANKL ifadesinde değişiklik olmadığı ve COL 12 ifadesinin azaldığı görülmüştür. Süt grubunda ise Runx2 ifadesinde azalma, RANKL ve COL 12 ifadesinde değişiklik olmadığı görülürken DMEM- F12 grubunda Runx2 ifadesinde azalma, RANKL ifadesinde artma ve COL 12 ifadesinde değişiklik olmadığı sonucuna ulaşılmaktadır. HBSS grubunda Runx2 ifadesinde artış gözlenmesi PDLF'lerin osteojenik farklanma eğiliminde olduğunu, DMEM- F12 grubunda ise RANKL ifadesinde artış gözlenmesi osteoklastojenik farklanma eğiliminde olduğunu göstermiştir. Süt grubunda PDLF'lerin Runx2 ifadesinde azalma ile birlikte RANKL ve COL 12 ifadelerinde değişiklik olmaması PDLF'lerin fibroblast kimliklerini koruduklarını göstermiştir. Sonuç olarak süt PDLF'lerin hem canlılığını hem de fibroblast kimliklerini koruyabilme özelliği ile avülse diş saklama solüsyonu olarak tavsiye edilebilir.

Anahtar Sözcükler: avülse diş saklama solüsyonu, Hank's balanced salt solution, hücre farklanması, periodontal ligament fibroblastları, süt.

SUMMARY

REPUBLIC of TURKEY
SELÇUK UNIVERSITY
HEALTH SCIENCES INSTITUTE

INVESTIGATION OF THE AVULSION STORAGE MEDIA'S EFFECTS ON PERIODONTAL LIGAMENT FIBROBLASTS DIFFERENTIATION MECHANISM

İrem Bağ
Department of Pedodontics

PhD THESIS / KONYA-2015

Avulsion is defined as a complete displacement of a tooth from its socket. In an avulsion case, the avulsed tooth must be store in a solution which maintain the PDL cells viability when it couldn't replanted its socket immediately. In literature effects of HBSS and milk on PDL cell viability have been evaluated and they display feature similar to ideal solution. In the content of the thesis, the aim is investigating whether HBSS and milk leads to PDL cells differentiation or not.

The extracted teeth which mimiced the avulsed teeth immersed in HBSS, milk and DMEM-F12 (positive control) at 4°C for 30- 60 min or 12 h. Then it was evaluated the growth dynamics of PDLF which were obtained from avulsed teeth's PDL tissue with cell proliferation graphics and PDT values, whether PDLF lean to osteoblast or osteoclast differentiation, protect their fibroblast identity or not, using IF markers with confocal microscope. PDLF's osteoblast differentiation by Runx2, osteoclast differentiation by RANKL and protecting fibroblast identity by COL12 expression was evaluated.

When PDLF's growth dynamics were evaluated by percentage of cell number and PDT values, there weren't statistically significant difference between groups. In HBSS groups, Runx2 expression increased while RANKL expression was stable and COL 12 expression decreased. In milk groups, Runx2 expression decreased but RANKL and COL 12 expression were stable. Runx2 expression decreased while RANKL expression increased and COL 12 expression was stable in DMEM- F12 groups. Increased expression of Runx2 in HBSS groups showed that PDLF lean to osteogenic differentiation while increased level of RANKL in DMEM- F12 groups showed that PDLF lean to osteoclastogenic differentiation. On the other hand, in milk groups, decreasing Runx2 but stable RANKL and COL 12 expression showed that PLDF protected their fibroblast identity. Consequently, milk is advisable for avulsion storage media because of protecting PLDF's viability and their fibroblast identity.

Key words: cell differentiation, Hank's balanced salt solution, milk, periodontal ligament fibroblasts, storage media for avulsed teeth

1. GİRİŞ

İnsanlarda tedavi ihtiyacı gerektiren tüm yaralanmaların %5'ini yüz bölgesini kapsayan yaralanmalar oluşturmaktadır. Yüz bölgesi travmaları genellikle diş kırıkları, dişlerde yer değiştirme veya diş kayıpları ile sonuçlanabilir. Fonksiyonel, estetik ve hatta psikolojik olarak da kalıcı hasarlar bırakabilecek dişsel yaralanmaların doğru bir teşhis ile tedavilerinin planlanması ve düzenli olarak takip edilmeleri büyük önem taşımaktadır (Cortes ve ark 2002, Lee ve Divaris 2009).

Dişin alveolar soketten tamamen ayrılması olarak tanımlanan avülsiyon olguları tüm diş yaralanmalarının %0,5-3'ünü oluşturur. Avülsiyon yaralanmanın olduğu yerde hemen müdahalenin gerektiği acil durumlardan biridir (Andersson ve ark 2012). Diş avülse olduğunda dişin derhal soketine geri yerleştirilmesi durumunda periodontal ligament (PDL) hücrelerinde rejenerasyon gerçekleşebilecek ve iyileşme sağlanabilecektir. Fakat şiddetli yaralanmalarda ilk önce hayati fonksiyonların korunması için tedavilere başlandığı için zarar gören dişlere hemen müdahale edilemez (Brullmann ve ark 2010). Avülse olan diş soketine derhal yerleştirilemediği durumlarda dişin olay yerinden, diş hekimine ulaşıncaya kadar geçen sürede taşınacağı, kolayca elde edilecek ve çevresindeki PDL hücrelerinin canlılığını sürdürmelerine ve fizyolojik fonksiyonlarını devam ettirmelerine yardımcı olacak bir solüsyon içerisinde saklanması gerekir. Aksi takdirde avülse dişin PDL hücreleri replantasyona kadar canlılığını sürdüremez, nekroz olurlar. Bu durumda diş yine de replante edilirse sonrasında inflamatuar reaksiyonlar, replasman rezorpsiyonu ve ankiloz komplikasyonları gelişir ve dişin kaybına neden olabilir (Boyd ve ark 2000).

Günümüzde her ne kadar, avülse dişin replantasyonuna kadar içinde taşınacağı ideal solüsyon arayışları halen devam etmekteyse de, mevcut literatür incelendiğinde Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) ve sütün ideale yakın özellikler sergilediği görülmektedir. Bununla birlikte bugüne kadar yapılan araştırmaların büyük çoğunluğu in vitro şartlarda gerçekleştirilmiştir. Deneysel yöntemler, biyolojik mekanizmaları anlamada klinik çalışmalara göre daha kontrollüdür. Çünkü in vitro modellerde analiz edilen homojen hücre popülasyonu titizlikle kontrol edilebilen koşullar altındadır ve in vivo faktörlerden bağımsızdır. In vitro şartlarda hücrelerin canlılığını koruduğu kanıtlanmış fakat HBSS ve sütün, PDL hücrelerinin farklanma mekanizması üzerine olan etkisinin araştırıldığı çok az

sayıda çalışmaya rastlanmıştır. In vivo ortamın tüm özelliklerinin in vitro deneylerde yansıtılamadığı bilindiğinden, bu tez kapsamında PDL hücrelerinin canlılığını uzun süre koruduğu bilinen süt ve HBSS'nin PDL hücrelerinin farklanmasına yol açıp açmadığının incelenmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla PDL hücresinin, fibroblastik özelliğini koruyup korumadığının belirlenmesi için fibroblast işaretleyicisi olarak kollajen tip XII (COL 12), osteoblastik doğrultuda farklanıp farklanmadığının test edilmesi için Runt-Related Transcription Factor 2 (Runx2) ve osteoklastik doğrultuda farklanıp farklanmadığının test edilmesi için ise osteoklast işaretleyicisi olarak Nüklear Faktör-Kappa B Reseptör Aktivatör Ligandı (RANKL) moleküler belirleyicileri kullanılmıştır. Bu sayede süt ve HBSS'nin PDL hücrelerinin canlılığını devam ettirmekle birlikte, taşıma sonrasında sokete geri yerleştirilen diş üzerindeki hücrelerin PDL özelliklerini halen koruyup korumadıklarının anlaşılması ile taşıma solüsyonlarının seçimine bir diğer kriter eklenmesi amaçlanmıştır. Literatürde daha önce bu tarz bir araştırmanın olmaması tez çalışmamızın üstünlüğünü sağlamakla birlikte, mevcut solüsyonlar arasındaki tercihin bilimsel verilerle daha açık olarak değerlendirilebilmesine katkı sağlamak amaçlanmıştır.

1.1. Avülsiyon

Dişin alveoler soketten tamamen ayrılması olarak tanımlanan avülsiyon, pulpal ve periodontal dokunun şiddetli hasarıyla karakterizedir. Avülsiyon olguları tüm diş yaralanmalarının %0,5- 3'ünü oluşturur (Andersson ve ark 2012). Avülsiyon, yaralanmanın olduğu yerde hemen müdahalenin gerektiği acil durumlardan biridir. Ancak hastanın uyumsuz olması, hastanın yanındaki kişilerin bilinçsiz veya dişi yerine yerleştirmekte cesur davranamaması veya şiddetli yaralanmalarda ilk önce hayati fonksiyonların korunması için gerekli olan tedavilere başlanması nedeniyle diş hemen replante edilemez (Andersson ve ark 2012). Ayrıca zamanında müdahale edilememiş avülse diş çekim soketine yerleştirilemediğinde diş eksikliği oluşur. Oluşan diş eksikliğinin fonksiyon, konuşma, estetik ve hastanın psikolojisi üzerine olumsuz etkileri olacağı gibi yer kaybı olmaması ve ark bütünlüğünün korunması için de ileri restoratif tedavilere (köprü veya implant uygulamaları) ihtiyaç duyulacak ve hastaya hem manevi hem de maddi büyük yük getirecektir. Bu sebeple, avülsiyon olgularının sıklıkla gerçekleştiği okullarda, sportif faaliyet alanlarında öğretmenlerin, sağlık görevlilerinin ve velilerin bilgilendirilmesi gerekmektedir.

Avülse dişin replantasyonu acil müdahaleyi gerektirir ki bu da dişin, yaralanmanın olduğu yerde replantasyonu anlamına gelir. Konu hakkında bilgi sahibi olan bir yetişkin tarafından avülse dişin olay yerinde soketine geri yerleştirilmesi sağlanabileceği gibi, konu hakkında bilgi ve tecrübe sahibi olunmadığı durumlarda avülse diş olay yerinden diş hekimine ulaşıncaya kadar, kolayca elde edilecek ve avülse dişin çevresindeki PDL hücrelerinin canlılığını sürdürmelerine ve fizyolojik fonksiyonlarını devam ettirmelerine yardımcı olacak ideal bir taşıma solüsyonu içinde taşınmalıdır. Bahsedilen birinci alternatifte, diş sadece kronundan tutularak soğuk su altında hafifçe ve kısa süreli yıkandıktan sonra soketine geri yerleştirilir ve hastaya bir mendil ısırtılarak en kısa sürede diş hekimine ulaşılması sağlanmalıdır. İkinci senaryoda, diş yerine yerleştirilemiyorsa kesinlikle kuru kalmamalıdır. Okullarda, evlerde veya eczanelerde uygun bir taşıma solüsyonuna ulaşılamadığı durumlarda avülse diş, süt, serum fizyolojik içinde, bunlara dahi ulaşılamıyorsa hastanın yanağının içerisinde saklanarak hekime ulaşması sağlanmalıdır (Trope 2011).

1.1.1. Avülse Dişin Diş Kliniğinde Tedavisi

Avülse diş hekime ulaştığında kazanın nerde, ne zaman olduğu, dişin hangi koşullarda getirildiği öğrenilmelidir. Dişin kök gelişim seviyesi (kök ucu açık veya kapalı), dişin saklandığı solüsyon ve ağız dışında geçen süreye bağlı olarak tedavi planı yapılır (Andersson ve ark 2012). Özellikle kuru olarak geçirilen zaman, hücrelerin canlı kalabilmesi için kritik öneme sahiptir. Kuru olarak geçirilen 60 dakika ve üzeri süreden sonra hiçbir PDL hücresi canlı kalamaz. Bu nedenle yerine yerleştirilmeden veya saklamaya alınmadan önce dişin kuru geçirdiği zamanın hastadan öğrenilmesi önemlidir (Andersson ve ark 2012). Kök ucu kapalı ve kök ucu açık avülse dişlerde uygulanacak tedavi planlaması Çizelge 1.1 ve Çizelge 1.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 1.1. Kök ucu kapalı avülse dişlerde uygulanacak tedavi planlaması (Andersson ve ark 2012).

KÖK UCU KAPALI DİŞLER

Kliniğe gelmeden önce replante edilmişse	**Ağız dışında kuru kalma süresi 60 dakikadan az ve kuru olarak ya da solüsyon içerisinde gelmişse**	**Ağız dışında kuru kalma süresi 60 dakikadan fazla ise**
- Dişin pozisyonunun klinik ve radyografik değerlendirilmesi -Yara bölgesi su, serum fizyolojik veya klorheksidin ile temizlenmesi - 2 hafta esnek splint - Sistemik antibiyotik - Tetanoz aşısı - 2 hafta yumuşak gıda - Oral hijyen - Replantasyondan 7 gün sonra ve splint sökülmesinden önce kök kanal tedavisi - 4 hafta, 3 ay, 6 ay, 1 yıl sonra ve daha sonra her yıl klinik ve radyografik takip	- Dişin serum fizyolojik ile temizlenmesi - Lokal anestezi - Alveol soket muayenesi - Dişin hafif parmak basıncıyla yerine yerleştirilmesi - Replante edilmiş dişin pozisyonunun klinik ve radyografik kontrolü - 2 hafta esnek splint - Sistemik antibiyotik - Tetanoz aşısı - 2 hafta yumuşak gıda - Oral hijyen - 7 gün sonra ve splint sökülmesinden önce kök kanal tedavisi - 4 hafta, 3 ay, 6 ay, 1 yıl sonra ve daha sonra her yıl klinik ve radyografik takip	- Kök üzerindeki ölü ve yapışık haldeki dokuların spanç ile uzaklaştırılması - Kök kanal tedavisinin replantasyon öncesinde elde veya 7-10 gün sonrasında yapılması - Lokal anestezi - Soketin serum fizyolojik ile yıkanması - Alveol soket muayenesi - Dişin 20 dakika % 2'lik sodyum florid içerisinde bekletilmesi -Dişin hafif parmak basıncıyla yerine yerleştirilmesi - Replante edilmiş dişin pozisyonunun klinik ve radyografik kontrolü - 4 hafta esnek splint - Sistemik antibiyotik - Tetanoz aşısı -2 hafta yumuşak gıda - Oral hijyen - 7 gün sonra ve splint sökülmesinden önce kök kanal tedavisi - 4 hafta, 3 ay, 6 ay, 1 yıl sonra ve daha sonra her yıl klinik ve radyografik takip

Çizelge 1.2. Kök ucu açık avülse dişlerde uygulanacak tedavi planlaması (Andersson ve ark 2012).

KÖK UCU AÇIK DİŞLER		
Kliniğe gelmeden önce replante edilmişse	**Ağız dışında kuru kalma süresi 60 dakikadan az ve kuru olarak ya da solüsyon içerisinde gelmişse**	**Ağız dışında kuru kalma süresi 60 dakikadan fazla ise**
- Dişin pozisyonunun klinik ve radyografik değerlendirilmesi -Yara bölgesi su, serum fizyolojik veya klorheksidin ile temizlenmesi - 2 hafta esnek splint - Sistemik antibiyotik - Tetanoz aşısı - 2 hafta yumuşak gıda - Oral hijyen -Pulpanın revaskülarizasyon şansı olduğu için nekroz belirtileri gösterene kadar kanal tedavisi yapılmamalı. - 4 hafta, 3 ay, 6 ay, 1 yıl sonra ve daha sonra her yıl klinik ve radyografik takip	- Dişin serum fizyolojik ile temizlenmesi - Lokal anestezi - Alveol soket muayenesi - Minosiklin veya doksisiklin 1 mg/20 ml oranında serum fizyolojik ile karıştırılarak 5 dakika kök yüzeyine uygulanması - Dişin hafif parmak basıncıyla yerine yerleştirilmesi - Replante edilmiş dişin pozisyonunun klinik ve radyografik kontrolü - 2 hafta esnek splint - Sistemik antibiyotik - Tetanoz aşısı - 2 hafta yumuşak gıda - Oral hijyen - Pulpanın revaskülarize olma şansı olduğu için kanal tedavisi uygulanmadan dişin takip edilmesi - 4 hafta, 3 ay, 6 ay, 1 yıl sonra ve daha sonra her yıl klinik ve radyografik takip	- Kök üzerindeki ölü ve yapışık haldeki dokuların spanç ile uzaklaştırılması - Kök kanal tedavisinin replantasyon öncesinde elde veya 7-10 gün sonrasında yapılması - Lokal anestezi - Alveol soket muayenesi - Dişin 20 dakika % 2'lik sodyum florid içerisinde bekletilmesi -Dişin hafif parmak basıncıyla yerine yerleştirilmesi - Replante edilmiş dişin pozisyonunun klinik ve radyografik kontrolü - 4 hafta esnek splint - Sistemik antibiyotik - Tetanoz aşısı -2 hafta yumuşak gıda - Oral hijyen - 7 gün sonra ve splint sökülmesinden önce kök kanal tedavisi - 4 hafta, 3 ay, 6 ay, 1 yıl sonra ve daha sonra her yıl klinik ve radyografik takip

1.1.2. Avülse Dişin Replantasyonundan Sonra Destek Tedavileri

Sistemik antibiyotik kullanımı

Avülse dişin replantasyonu ve uygulanacak endodontik tedavi öncesinde nekrotik pulpanın bakteriyel invazyonunu ve inflamatuar rezorpsiyonu önlemek amacıyla sistemik antibiyotik kullanılması tavsiye edilmektedir. Bu amaçla önerilen tetrasiklin antibiyotiklerin, osteoklast ve kollajenaz etkinliğini azaltarak kök rezorpsiyonunun yavaşlatılmasında etkili olduğu bildirilmiştir (Trope 2011). Genç hastalarda tetrasiklinlerin sistemik kullanımı öncesinde kalıcı dişlerde renklenme riski göz önüne alınmalıdır. Pek çok ülkede tetrasiklinlerin 12 yaş altı hastalarda kullanımı önerilmemektedir. Bu nedenle 12 yaş altındaki hastalarda fenoksimetilpenisilin (Penisilin V) veya amoksisilin hastanın yaşı ve kilosuna uygun dozda, replantasyon sonrası 1 hafta süreyle verilebilir (Trope 2011).

Tetanoz aşısı

Tetanoz gram-pozitif, anaerobik bir basil olan Clostridium tetani bakterisinden ileri gelen ve çizgili kaslarda uzun süreli sertleşme ve kasılmayla belirginleşen toksik ve ölümcül bir enfeksiyon hastalığıdır. Toprakta yaşayan Clostridium tetaninin derideki yara veya çizik aracılığıyla organizmaya girmesiyle hastalık oluşmaktadır. Avülse bir diş toprak ile temas etmişse dişin replantasyonu sırasında Clostridium tetani basilinin vücuda girmesine neden olacaktır. Dolayısıyla avülse dişin replantasyonu sonrasında hastanın tetanoz aşısı koruması şüpheli ise 48 saat içerisinde bir sağlık kuruluşuna yönlendirilerek aşı olması sağlanmalıdır (Trope 2011).

Replante edilmiş dişlerin splintlenmesi

Replante edilmiş bir dişi doğru pozisyonda yerinde tutmak, hastanın rahatını sağlamak ve fonksiyonu iyileştirmek amacıyla dişin fizyolojik hareketine izin verecek şekilde splint yapılmalıdır. Replante edilmiş dişlerin splintlemesi için kısa süreli ve esnek splint uygulamaları tavsiye edilmektedir. Avülse dişin ağız dışında kuru kalma süresi 60 dk'yı geçmişse 4 hafta, geçmemişse 2 hafta süreyle esnek splint uygulanması yeterli iken avülsiyona alveolar kırığın eşlik ettiği olgularda splint süresi 4-8 haftaya kadar uzatılabilmektedir (Andersson 2012). Çalışmalar replante

edilen bir dişe hafif hareket şansı verildiğinde ve splintleme zamanı çok uzun olmadığında periodontal ve pulpal iyileşmenin arttığını göstermiştir (Hinckfuss ve Messer 2009).

İdeal bir splintin özellikleri şunlardır:

- Dişin fizyolojik hareketine izin vermeli
- Uygulaması ve çıkarılması kolay olmalı
- Konuşma, beslenme ve oral hijyeni sağlamak kolay olmalı
- Yumuşak dokuları irrite etmemeli
- Pasif olmalı, dişe kuvvet uygulamamalı
- Oklüzyonu engellememeli
- Pulpa testinin ve endodontik tedavinin uygulanmasına izin verebilmeli (Burcak Cengiz ve ark 2006).

1.2. Avülse Dişin Replantasyonunu Takiben Oluşabilecek Komplikasyonlar

Avülse dişin replantasyonundan sonra PDL'de bağ dokusu hücrelerinin proliferasyonu başlar ve 3-4 gün sonra yeni bağ dokusu PDL aralığını kapatır. Replantasyondan 1 hafta sonra, epitelin mine-sement birleşimine ataşmanı gerçekleşir. Dişeti kollajen fibrilleri birbirine kaynaşır. Kök yüzeyi boyunca ilk yüzeyel osteoklast atağı başlar. PDL'deki ayrılma çizgisi 2 hafta sonra iyileşir ve kollajen fibriller sement ile alveol kemik arasında uzanır (Andreasen 1980b, c).

Replante edilen insan ve hayvan dişlerinin histolojik olarak incelenmesi sonucunda PDL'de 4 farklı iyileşme şekli tanımlanmıştır (Andreasen 1971).

1.2.1. Normal PDL ile İyileşme

Histolojik olarak PDL'nin tam rejenerasyonu ile karakterize bir iyileşme şeklidir ve sinir oluşumunun tamamlanmasıyla 4 hafta sürmektedir. Radyografik olarak kök rezorpsiyonunun gözlenmemesi, lamina duranın normal olarak izlenmesi gerekmektedir. Klinik olarak avülse dişin asemptomatik olduğu, normal bir mobilite ve normal perküsyon sesine sahip olduğu görülmektedir (Andreasen ve Hjorting-Hansen 1966, Yamada ve ark 1999).

1.2.2. Yüzey Rezorpsiyonu ile İyileşme

Histolojik olarak kök yüzeyinde sement dokusu ile sınırlı lokal alanlarda yeni sement ile tamir edilebilen yüzeyel rezorpsiyon lakünleri görülmektedir (Andreasen 1980c, 1981). Yüzey rezorpsiyonu yeni sement oluşumu ile tamir edilebildiği için lezyonun ilerlemediği kendi kendini sınırladığı görülmektedir. Radyografik olarak lezyon boyutları çok küçük olduğu için çoğu zaman gözlenememektedir.

1.2.3. Replasman Rezorpsiyonu (Ankiloz)

Avülse diş replantasyon öncesinde uzun süre kuru kalmış ve PDL hücreleri zarar görmüşse kök yüzeyinde makrofaj aktivasyonu yani inflamatuar yanıt oluşur. Geniş rezorpsiyon bölgesi sekonder sement ile tamir edilemez. Osteoblast hücreleri kemikte fizyolojik yeniden şekillenme (remodeling) oluştururken kök yüzeyindeki rezorbe alan kemikle dolmuş olur. Geri dönüşümü olmayan rezorpsiyon süreci replasman rezorpsiyonu olarak isimlendirilir (Trope 1998, 2011). Genç hastalarda kemiğin yeniden şekillenmesinin daha hızlı olması nedeniyle replasman rezorpsiyonu daha hızlı ilerler (Boyd ve ark 2000). Andersson ve ark (1989) avülsiyon sonrasında kök rezorpsiyonu görülme oranının 8-16 yaş grubunda 17-39 yaş grubuna göre daha fazla olduğunu bildirmişlerdir (Andersson ve ark 1989, Petrovic ve ark 2010). Replasman rezorpsiyonu radyografide PDL aralığı ve lamina duranın kaybıyla karakterizedir. Rezorpsiyon radyografide replantasyondan 2 ay sonra görülür. Pek çok olguda bu süre 6 ay ya da 1 yıla kadar uzayabilir (Andreasen ve ark 1995b).

Ankiloz terimi bazı yazarlar tarafından kemik ve sementin kaynaşmasını ifade etmek için kullanılır. Ankilozun replasman rezorpsiyonundan farklı bir ifade olduğu ve replasman rezorpsiyonunun erken dönemini ifade etmek için kullanılabileceği bildirilmiştir (Andersson ve ark 1984). Andreasen ankiloz terimini replasman rezorpsiyonu yerine kullanmaktadır (Andreasen 1980a). Tiz bir perküsyon sesinin olması ve dişte hiç mobilite gözlenmemesi ankiloz belirtisidir. Histolojik olarak ankiloz kök yüzeyi ile alveol kemiğinin birleşmesini ifade eder. Replantasyondan 2 hafta sonra görülür. Büyüme gelişim dönemindeki bir hastada ankiloz gelişir ve diş infrapozisyonda kalırsa avülse diş bölgesinde alveol ve yüz gelişiminde bozukluğa neden olur (Boyd ve ark 2000, Andersson 2012).

1.2.4. İnflamatuar Kök Rezorpsiyonu

Avülsiyon yaralanmaları sonucu genellikle pulpa nekrozu meydana gelir. Kök gelişimi devam eden dişlerde revaskülarizasyon şansı olabilir. Revaskülarizasyonun oluşmadığı olgularda ve nekroz sonrasında kanal tedavisi uygulanmayan dişlerde pulpa enfekte olarak kalacaktır. Nekrotik pulpadan toksinlerin dentin tübülleri vasıtasıyla kök yüzeyine ulaşmasıyla inflamatuar kök rezorpsiyonu meydana gelir (Trope 2011). Genç hastalarda dentin tübüllerinin geniş olması nedeniyle inflamatuar ürünler pulpadan kök yüzeyine çok kolay geçiş yapar (Hammarstrom ve ark 1986b, Boyd ve ark 2000). Klinik olarak inflamatuar rezorpsiyonlu dişler semptomsuz olabileceği gibi ağrı, mobilite ve enfeksiyonla ilişkili şişliğin varlığı da görülebilir. Birkaç ay içerisinde tüm kökü rezorbe edebilecek kadar hızlı ilerleyen bir rezorpsiyon şeklidir. Radyografik olarak kök yüzeyi boyunca çukur şeklinde kavitasyonlar ve bu alanlara komşu kemikte rezorpsiyon bölgeleri görülür. İnflamatuar rezorpsiyonun ilk radyografik belirtileri replantasyondan 2 hafta sonra gözlemlenir. Histolojik olarak sement ve dentinde çukur şeklinde rezorpsiyon kaviteleri görülür. Kök yüzeyinde Howship lakünleri ve osteoklastların etkinliğinde şiddetli bir reaksiyon gözlenir.

1.3. Avülsiyon patogenezi

Avülsiyonda dişin çevresini saran nörovasküler yapıda tam bir kopma, ayrılma meydana gelir. Diş soketinden ayrıldığında kısa bir süre içinde pulpa dokusu canlılığını yitirmeye ve PDL hücreleri nekroz olmaya başlarlar. PDL'nin baskın hücre tipi olan fibroblastlar ve kök yüzeyine tutunan diğer hücrelerde dejenerasyon meydana gelir (Andreasen 1981). Diğer taraftan avülse diş 5 dk içerisinde soketine replante edilirse PDL hücrelerinin fonksiyonlarını kaybetmeden sürdürdüğü bildirilmiştir (Flores ve ark 2007). Bununla birlikte kuru ortamda 15 dakikadan fazla kalan avülse dişte, projenitör veya kök hücrelerin fibroblastlara farklanma yeteneklerini kaybettikleri tespit edilmiştir (Lekic ve ark 1996a, Lekic ve ark 1998). Soder ve ark (1977) avülse olan dişin ekstraoral olarak kuru kaldığı zaman arttıkça nekroz PDL hücre sayısının arttığını ve 2 saat sonra yaşayan hücre tespit etmenin mümkün olmadığını göstermişlerdir (Soder ve ark 1977). Nitekim, Lin ve ark (2000) kuru ortamda 30 dk kaldıktan sonra PDL hücrelerinin nekrotik hale geldiğini bildirmişlerdir (Lin ve ark 2000).

Diğer taraftan, avülse dişin ağız dışında geçirdiği süreyle ilgili olarak, replante edildiğinde, nekroze olmuş veya olmakta olan PDL hücrelerinin mevcut olduğu durumlarda, replantasyondan sonra inflamatuar reaksiyonlar, yerdeğiştirme (replasman) kök rezorpsiyonu ve ankiloz gibi komplikasyonların oluşmaması için tek çare avülse dişin uygun hatta ideal bir taşıma solüsyonu içerisinde ve en kısa zamanda diş hekimine ulaştırılmasıdır (Blomlof ve ark 1983a).

1.4. Periodontal Ligament (PDL) ve Periodontal Ligament Fibroblastları (PDLF)

PDL alveolar kemik ile sement arasında uzanan, lokalize fibröz bağ doku bandıdır (Choe ve ark 2012). Büyük bir kollajen demeti PDL'nin tamamını oluşturur ve hem semente hem de alveolar kemiğe gömülü durumdadır. PDL dişin sürmesi sırasında olgunlaşır ve oklüzal kuvvetlere karşı dişi destekler (Yamamoto ve ark 2014).

PDL, fibroblastlar, makrofajlar, farklanmamış ektomezenkimal hücreler, sementoblastlar, osteoblastlar, Malassez epitel artığı olan hücreler içermekle birlikte, yapısında vasküler ve sinirsel elemanları da bulundurmaktadır (Beertsen ve ark 1997, Benatti ve ark 2007). PDL'yi oluşturan fibröz bağ doku bandı içerisinde üç tip kollajen bulunmaktadır. Fibril oluşturan kollajenlerden tip I, III, V, fibril oluşturmayan kollajen tip VI ve kesikli üçlü heliks yapıda fibrille ilişkili kollajenler (FACIT- fibril-associated collagens with interrupted triple helix) olan tip IX, XII, XIV ve XVI PDL fibröz bağ doku bandı içerisinde yer almaktadır (Kook ve ark 2009a).

PDL'nin en önemli hücre grubu PDLF'dir. PDLF'nin temel fonksiyonu ekstraselüler matriksin sentezi ve devamlılığını sağlamaktır. Ayrıca PDL rejenerasyonunda görev alır. PDLF mikrotübül ve aktin mikroflamanlarından oluşan gelişmiş bir hücre iskeletine sahiptir (Griffin ve Spain 1972, Rodríguez-Lozano ve ark 2012).

Heterojen yapı içerisinde, PDLF'ye özgü hücre dizilerinin tanımlanması için çeşitli işaretleyiciler önerilmiştir. Bunlar arasında epidermal büyüme faktörü reseptörü (epidermal growth factor receptor – EGFR) (Cho ve ark 1991), tip XII kollajen (Oh ve ark 1993, Karimbux ve Nishimura 1995), osteopontin (Lekic ve ark

1996b), alkalen fosfataz (Groeneveld ve ark 1993) işaretleyicilerinin PDLF'na özgü olabilecekleri bildirilmiştir. PDLF periostin, sklerotin, sementum ataşman proteini, osteonektin, osteokalsin, N-Kaderin ve NCAM-1 gibi özel işaretleyicileri sentezler (Konstantonis ve ark 2013) (Çizelge 1.3).

1.5. Kollajen Tip 12

Tip XII kollajen PDL'de ilk olarak Yamauchi ve ark (1986) tarafından tespit edilmiştir. Tip XII kollajen, kollajen süper ailesinin FACIT alt grubunda yer alır (Gordon ve ark 1990, Shaw ve Olsen 1991, MacNeil ve ark 1998). FACIT yapısı üçlü heliks içermektedir. Üçlü heliks yapısı fibriler kollajene bağlanma afinitesine sahipken, üçlü heliks içermeyen bölgeler ekstraselüler matriksin diğer elemanları ile etkileşimin sağlandığı yapılardır (Eyre ve ark 1987, MacNeil ve ark 1998). Tip XII kollajen, kollajen fiberlerinin ekstraselüler matriksin diğer elemanları ile bağlantısının sağlanmasında görev alır. Tip I kollajen ile ilişkili olduğu ve Tip I kollajenin matriks ile ilişkisinin düzenlenmesinde rolü olduğu bildirilmiştir (Bohme ve ark 1995, Nemoto ve ark 2010). PDL gelişiminin olgunlaşma aşamasında kollajen tip XII ifadesinin yüksek olduğu tespit edilmiştir. PDL fiberlerinin sıralanmasında ve organizasyonunda görevlidir (Karimbux ve ark 1992, MacNeil ve ark 1998, Reichenberger ve ark 2000, Fujii ve ark 2006).

Çizelge 1.3. PDLF işaretleyicileri.

PDLF işaretleyicileri	Kaynak
EGFR	Cho ve ark 1991
Tip XII kollajen	Oh ve ark 1993, Karimbux ve Nishimura 1995
Alkalen fosfataz	Groeneveld ve ark 1993
Osteopontin	Lekic ve ark 1996b
Periostin	Konstantonis ve ark 2013
Sclerotin	
Cementum attachment protein	
Osteonectin	
Osteocalcin	
N-Cadherin	
NCAM-1	

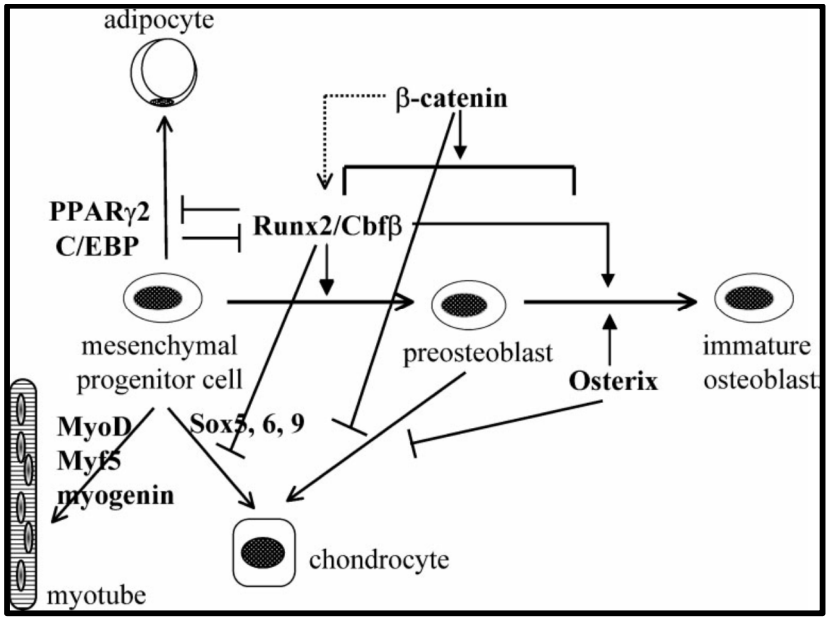
PDLF'nin heterojen bir hücre popülasyonundan oluştuğu bilinmektedir (Nomura ve ark 2012). Aynı zamanda araştırmacılar PDLF'nin sementoblast ve osteoblasta farklanabilen bir hücre popülasyonuna sahip olduğunu göstermişlerdir (McCulloch ve Bordin 1991). PDLF kollajen lifleri gibi matriks elemanlarının yapım-yıkımından da sorumludur (Roberts ve ark 1982).

PDLF osteoblastik farklanma için çok önemli olan temel transkripsiyon faktörü, Runx2'yi de sentezler. PDLF in vitro olarak kültüre edildiklerinde mineral benzeri nodüller oluşturdukları gözlenmiş dolayısıyla osteoblastik farklanma gösterebildikleri bildirilmiştir (Basdra ve Komposch 1997, Carnes ve ark 1997, Ivanovski ve ark 2001, Murakami ve ark 2003, Konstantonis ve ark 2013). Bunun yanısıra, pek çok çalışmada PDLF'nin osteoblastik farklanmanın yanı sıra osteoklastik farklanma potansiyeline de sahip olduğu gösterilmiştir (Kook ve ark 2009b, Kook ve ark 2011, Wattanaroonwong ve ark 2011). Osteoblast benzeri yapıda olan PDLF'nin kemik rezorpsiyonunda görevli osteoklastların öncü hücreleri için gerekli sinyalleri sağladığı, RANKL ve osteoprotegerin (OPG) sentezlediği gösterilmiştir (Joe ve ark 2001, Hasegawa ve ark 2002, Bloemen ve ark 2010).

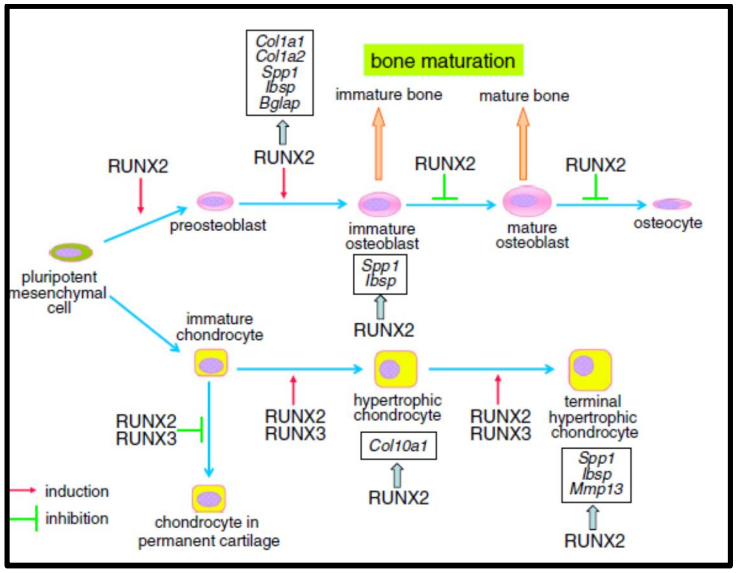
1.6. Runt-Related Transcription Factor 2 (Runx2)

Runx2 geni tarafından sentezlenmesi uyarılan bir protein olan Runx2 transkripsiyon faktörü *Core-binding factor subunit alpha-1* olarak da bilinir. Osteoblast farklanmasında erken aşamada, iskeletsel morfogenezisde, diş gelişiminde, kondrogenezisde ve vaskulogenezisde fonksiyonu vardır. Pluripotent mezenkimal hücrelerden osteoblast farklanması ile ilişkili bir transkripsiyon faktörüdür (Komori ve ark 1997). Deoksiribonükleik asitin (DNA) belirli bölgelerine bağlanarak kemik ve kıkırdak gelişimini kontrol eden diğer genlerle etkileşim halinde olarak görevlerini gerçekleştirir (Komori 2006) (Şekil 1.1).

Pluripotent mezenkimal hücreler Runx2 gen ifadelerinin etkisinde immatür osteoblastlara dönüşür. İmmatür osteoblastlar Spp1 (osteopontin) ifade ederler ve Bglap (osteokalsin) ifade eden matür osteoblastlara farklanırlar. Matür osteoblastlar ilerde osteositlere dönüşmek üzere kemik matriks içerisinde gömülü olarak kalırlar (Komori 2006) (Şekil 1.2).



Şekil 1.1. Pluripotent mezenkimal hücrelerden osteoblast farklanması ile ilişkili bir transkripsiyon faktörü olan Runx2, DNA'nın belirli bölgelerine bağlanarak kemik ve kıkırdak gelişimini kontrol eden diğer genlerle etkileşim halinde olarak görevlerini gerçekleştirir. Osteoblast farklanmasında Runx2, mezenkimal öncü hücreleri preosteoblast oluşumuna yönlendirirken, adiposit ve kondrosit farklanmasını inhibe eder (Komori 2006).



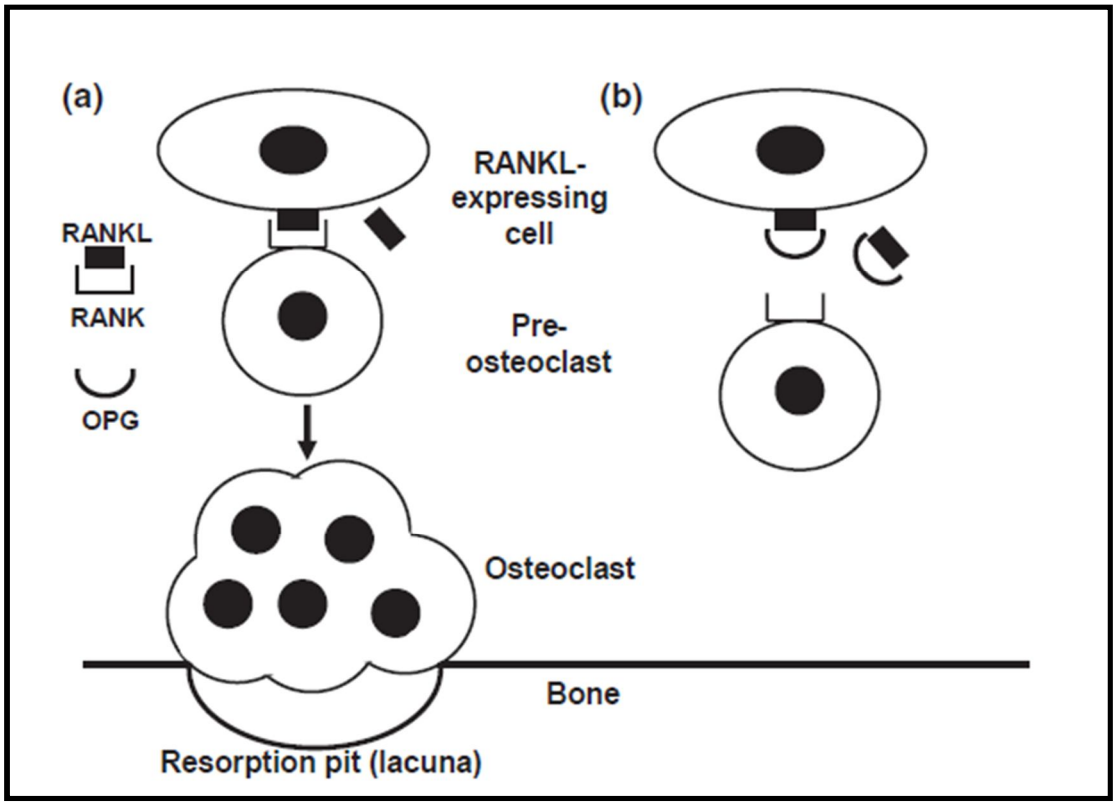
Şekil 1.2. Pluripotent mezenkimal hücreden Runx2 etkileşimi ile kemik ve kıkırdak hücrelerinin gelişimi. Runx2 preosteoblastlardan immatür osteoblast oluşumu sırasında, Col1a1, Col1a2, Spp1, Ibsp ve Bglap ifadesini tetiklerken, immatür osteoblastlarda Spp1 ve Ibsp ifadesini tetikler. Kemik doku oluşum mekanizmasında Runx2 immatür osteoblast sayısını artırırken, osteoblast matürasyonunu inhibe eder (Komori 2010).

Kemik doku oluşum mekanizmasında Runx2 immatür osteoblast sayısını artırırken, osteoblast matürasyonunu inhibe eder (Komori ve ark 1997). Diş gelişiminin erken evrelerinde artan ölçüde ifade edilen Runx2, osteoblast, osteosit, kondrosit, odontoblast, dental folikül hücreleri, sementoblast ve PDL hücrelerinde de sentezlenmektedir (Bronckers ve ark 2001).

1.7. Nüklear Faktör-Kappa B Ligand Reseptör Aktivatörü (RANKL)

Kemik rezorpsiyonunda görevli osteoklast hücreleri hematopoetik osteoklast öncülerinden oluşur. Osteoklastın oluşumu, PDLF'den köken alan osteoblast hücre dizisi tarafından kontrol edilir ve osteoklast öncüleri için uygun sinyaller gönderilir (Bloemen ve ark 2010). Osteoklast farklanmasında gerekli sinyallerin oluşması için osteoblast yüzeyinde RANKL eksprese edilir. RANKL tümör nekroz faktörü (TNF) ailesinin bir üyesidir. RANKL membran bağımlı ve salgılanmış ligand olarak osteoblast, fibroblast ve aktif T ve B hücreleri tarafından sentezlenir. RANKL'ın reseptörü olan nüklear faktör- Kappa B aktivatör reseptörü (RANK), osteoklast öncü hücrelerinde ve olgun osteoklastlarda bulunur. RANKL'ın osteoklast yüzeyinde eksprese edilen RANK reseptörüne bağlanması ile transkripsiyon faktörleri aktive

olur (Boyle ve ark 2003). RANKL aktivitesi, RANKL'ın tuzak reseptörü OPG ile bloke edilebilir (Şekil 1.3). OPG, TNF reseptör ailesinin bir üyesi olup RANK ile benzer bir yapısı vardır. OPG RANKL ile bağlanarak RANK-RANKL bağlanmasını engeller. Böylece osteoklast farklanması ve kemik rezorpsiyonu için oluşacak moleküler mekanizmayı baskılar (Yildirim ve ark 2008, Belibasakis ve Bostanci 2012). Fare pulpa ve odontoblast hücre hattında ve insan PDL hücreleri, pulpa hücreleri, odontoblastlar ve dental follikül hücrelerinde OPG ve RANKL mesajcı ribonükleik asiti (mRNA) ve proteinleri gösterilmiştir (Sakata ve ark 1999, Rani ve MacDougall 2000, Wise ve ark 2000, Hasegawa ve ark 2002, Lossdorfer ve ark 2002, Yildirim ve ark 2008).



Şekil 1.3. RANKL- RANK- OPG ilişkisi. **a)** RANKL'ın osteoklast yüzeyinde eksprese edilen RANK reseptörüne bağlanması ile pre-osteoklastlar olgun osteoklastlara dönüşür ve kemik yüzeyine yapışan osteoklastlar rezorpsiyonu başlatır. **b)** OPG, RANKL ile bağlanarak RANKL-RANK bağlanmasını engeller (Belibasakis ve Bostanci 2012).

1.8. PDL Kök Hücreleri (PDL- KH)

Kendi kendini yenileyebilen ve çeşitli hücre tiplerine farklanabilen hücreler kök hücre olarak tanımlanmaktadır. Kök hücreler embriyogenezisin erken evrelerinde blastokistten (embriyonik kök hücreler) veya yetişkinlerde beyin, kemik iliği, deri, karaciğer, kalp, akciğerler, böbrekler ve dalak gibi dokulardan (yetişkin kök hücreleri) izole edilebilirler (Miletic ve ark 2014). Embriyonik kök hücreler plasenta gibi ekstraembriyonik dokular hariç her üç germ yaprağına (endoderm, mezoderm, ektoderm) ait tüm organizmadaki hücrelere farklanabilirken, yetişkin kök hücreleri aynı germ yaprağından olan sınırlı sayıda hücre dizisine farklanabilirler (Pitaru ve ark 2013). Yetişkin kök hücre tipi olan mezenkimal kök hücreler (MKH), kemik iliğinin stroması içinde yer alan, uzantılı, fibroblast benzeri hücrelerdir. The International Society for Cellular Therapy (ISCT) 2007 yılında MKH özelllikleri standart kültür koşullarında plastiğe yapışabilme kapasitesinin olduğunu ve osteoblastik, adipojenik ve kondroblastik hücre dizilerine farklanabildiğini kabul etmiştir (Dominici ve ark 2006, Yildirim ve ark 2012).

PDL içerisinde çok sayıda hücre tipinin varlığı, bu dokunun periodontal doku rejenerasyonu ve doku homeostazisini sağlayan kök hücreler içerdiğini göstermiştir. İnsan PDL kökenli mezenkimal kök hücreler tanımlanmış ve ilk kez periodontal ligament kök hücreleri (PDL- KH) olarak isimlendirilmiştir (Seo ve ark 2004). PDL- KH'nin de osteojenik, adipojenik ve kondrojenik özellikler gösterebildiği ve plastiğe yapışma özelliğinin olduğu bildirilmiştir (Gay ve ark 2007, Lindroos ve ark 2008, Huang ve ark 2009, Xu ve ark 2009). Bu hücre popülasyonu ayrıca adipositler (yağ hücreleri), sementoblast benzeri hücreler ve kollajen oluşturabilen hücrelere farklanma yeteneğine sahiptirler (Chamila Prageeth Pandula ve ark 2014). PDL- KH'nin farelerde deri altına transplante edildiğinde PDL'ye, semente ve Sharpey liflerine benzer dokuların oluştuğu gözlenmiştir (Pitaru ve ark 2013). PDL- KH, MKH ile ilişkili işaretleyiciler olan STRO-1, CD146 ve embriyonik kök hücre işaretleyicilerini ifade ederler. İmmünhistokimyasal boyama ve Western Blot analizlerinde PDL- KH kültüründe sementoblastik/osteoblastik işaretleyicilerin (alkalen fosfataz, bone sialoprotein, osteokalsin ve transforming growth factor- β1) ifade edildiği bildirilmiştir (Seo ve ark 2004).

1.9. Avülse Diş Saklama Solüsyonları

Avülse diş saklama solüsyonu ağız ortamını taklit ederek PDL hücrelerinin canlılığını koruyabilecek fizyolojik bir solüsyon olarak tanımlanabilir (Udoye ve ark 2012). Avülse dişlerde başarılı bir prognoz için dişin sokete hemen replante edilmesi gerekmektedir. Travma olgularında hastaların avülsiyonun yanı sıra daha ciddi yaralanmaları da olduğu zaman öncelikle hastane koşullarında tedavileri yapılmaktadır. Bu durumda hastalar acil dental tedavi alamayabilirler. Bu nedenle avülse dişin replantasyona kadar saklanabilmesi için uygun ortam sağlanmalıdır. Nitekim avülse dişin replantasyonu sonrasında prognozunu etkileyen en önemli 2 faktörün dişin ağız dışında kuru olarak kaldığı süre ve saklama solüsyonu olduğu bildirilmiştir (Andreasen ve ark 1995a, Andreasen ve ark 1995b, Martin ve Pileggi 2004).

İdeal bir avülse diş taşıma solüsyonunun sahip olması gereken özellikler şunlardır:

- Antimikrobiyal özellik taşımalı
- PDL hücrelerinin canlılığını sürdürebilmesini sağlamalı
- Hücrelerin proliferatif kapasitesini desteklemeli
- Vücut sıvılarıyla aynı osmolaritede olmalı
- Vücut sıvılarıyla reaksiyon göstermemeli
- Antijen- antikor reaksiyonu göstermemeli
- Kök rezorpsiyonu ve ankiloz riskini azaltmalı
- Raf ömrü uzun olmalı
- Farklı sıcaklıklarda etkili olabilmeli
- Azalan hücresel metabolitleri dengeleyebilmeli (Malhotra ve ark 2010).

Kullanılan taşıma solüsyonunun ideal olmasını belirleyen parametreler pH'sı, osmolalitesi ve sıcaklığıdır. Hücresel gelişimin devam edebilmesi için en uygun osmolalite seviyesinin 290-330 mosmol/kg, pH'sının 7,2-7,4 arasında ve sıcaklığının ise 4°C veya 37°C'de olması gerektiği bildirilmiştir (Blomlof ve Otteskog 1980, Lindskog ve Blomlof 1982, Ashkenazi ve ark 2000, Malhotra 2011). Avülse diş taşıma solüsyonu olarak literatürde etkinlikleri değerlendirilen solüsyonlar Çizelge 1.4'de gösterilmiştir.

Çizelge 1.4. Avülse diş saklama solüsyonlarının pH, osmolalite, sıcaklık ve literatürde bu saklama solüsyonları için tavsiye edilen avülse diş saklama süreleri gösterilmiştir (Udoye ve ark 2012, Poi ve ark 2013).

Taşıma Solüsyonu	pH	Osmolalite (mosmol/kg)	Sıcaklık	Önerilen Saklama Süresi
çeşme suyu	7,4-7,79	30	4°C	Başka bir saklama solüsyonuna ulaşılamıyorsa
tükürük	6,5-7,4	60-75	4°C	30 dk
salin	4,5-7	280	4°C	2 saat
süt	6,5-7,2	270	4°C	6 saat
HBSS	7,2- 7-4	280- 320	4°C	48 saat
Minimal Essantial Medium (MEM)	7,0 – 7,4	280 - 320	4°C	120 saat
VİASPAN	7,4	320	4°C	168 saat
ideal solüsyon	7,2-7,4	290-330	4°C veya 37°C	

1.9.1. Çeşme suyu

Çeşme suyu pH'ı 7,4- 7,79, osmolalitesi 30 mosmol/kg olan hipotonik bir sıvıdır. PDL hücrelerinin lizisine neden olduğu için taşıma solüsyonu olarak tavsiye edilmemektedir (Hammarstrom ve ark 1986a, Udoye ve ark 2012). Dişin çeşme suyunda saklanma süresi arttıkça PDL hücre canlılığının azaldığı ve eksternal kök rezorpsiyonunun arttığı gözlenmiştir (Blomlof 1981a, Hammarstrom ve ark 1986b). Kültüre edilen PDL hücrelerinin 1 saat çeşme suyunda saklanmasının diğer saklama solüsyonlarına göre daha çok PDL hücre hasarına neden olduğu bildirilmiştir (Blomlof ve Otteskog 1980). Avülse dişin kuru kalmaması için çeşme suyu yerine alternatif solüsyonlar elde edilemiyorsa yaralanma anında hemen ulaşılabilmesi sebebiyle çeşme suyu kullanılabilmektedir.

1.9.2. Tükürük

Avülse dişin yaralanma sonrasında kuru halde bırakılmaması düşüncesiyle replante edilene kadar hasta ağzında dilaltı bölgesinde veya hastanın tükürüklerinin toplandığı bir kap içerisinde saklanması tavsiye edilmekteydi. Osmolalitesi 60-75 mosmol/kg olan tükürük içerisinde PDL hücrelerine zararlı olabilecek enzimler, bakteri ve bakteri ürünlerinin bulunması sebebiyle avülse dişin 30 dk'dan fazla

tükürük içerisinde saklanmaması gerektiği bildirilmiştir (Khademi ve ark 2008b). Tükürük içerisinde 2-3 saat bırakılan avülse dişin PDL hücrelerinde şişme ve membran hasarı gözlenmiştir (Trope 2002, Malhotra ve ark 2010). Diğer taraftan avülse dişin tükürük içerisinde saklanmasının dişin kuru kalması veya çeşme suyunda saklanmasına göre 1/3 oranında daha az hücre hasarına neden olduğu bildirilmiştir. Avülse dişin ağız dışında geçirdiği süre kısa (30 dk'dan az) ise ve tükürükten daha iyi bir saklama solüsyonuna ulaşılamıyorsa tükürük avülse diş saklama solüsyonu olarak kullanılabilir (Malhotra ve ark 2010).

1.9.3. Salin

Osmolalitesi 280 mosmol/kg olan salin fizyolojik bir tuz solüsyonudur. PDL hücrelerinin metabolik faaliyetleri için gerekli besleyiciler olan magnezyum, kalsiyum ve glikoz içermez (Udoye ve ark 2012). Avülse dişin kısa süre saklanması için uygun olabilecek salin içerisinde 2 saat boyunca PDL hücrelerinin canlılığını sürdürebildiği daha uzun sürede ise hücreler için zararlı olduğu tespit edilmiştir (Khademi ve ark 2008b). Cvek ve ark (1974) yaptığı çalışmaya göre replantasyon öncesinde 30 dakika izotonik salin solüsyonuna bırakılan avülse dişte, 15 ve 40 dakika kuru ortamda bırakılan dişlere göre daha az kök rezorpsiyonu gözlenmiştir (Cvek ve ark 1974). Bu sebeple diğer avülse diş saklama solüsyonlarına ulaşılamıyorsa dişin kuru kalmaması için salin içerisinde bekletilmesi tavsiye edilir.

1.9.4. Süt

Avülse dişin kısa süreli saklanabileceği ve yaralanma sonrası kolayca ulaşılabilecek süt 6,5-7,2 pH değeri ve 270 mosmol/kg osmolalitesi ile tercih edilebilecek bir solüsyondur. Avülse diş saklama solüsyonları ile ilgili çalışmalarda başarılı sonuçlar vermesinin içerisindeki aminoasitler, karbonhidratlar, vitaminler ve büyüme faktörleri sebebiyle olabileceği bildirilmiştir (Udoye ve ark 2012). Kolayca ulaşılabilen süt genellikle pastörize edilmiş süttür ve pastörize sütte PDL fibroblastlarına zararlı olabilecek enzimler inaktive olmuştur (Ashkenazi ve ark 1999). Bununla birlikte süt hücre ölümünü önlemekle birlikte, hücrelerin normal morfolojilerine dönmelerini ve mitoza girmelerini sağlayan fonksiyonlarını sürdürmelerini sağlamaz (Layug ve ark 1998, Udoye ve ark 2012).

Gamsen ve ark (1992)'na göre süt, PDL hücrelerinin osmotik basıncını dengeler ancak azalan hücre metabolitlerini tekrar yerine koyamaz (Thomas ve ark 2008). Lekic ve ark (1998)'na göre süt avülse diş saklama solüsyonu olarak 1 saate kadar HBSS kadar etkili olmakla birlikte, salin, tükürük ve çeşme suyundan da daha iyi sonuçlar vermektedir (Lekic ve ark 1998).

Sütün sadece 6 saat için saklama solüsyonu olarak kullanılabileceğini, 6 saat sonrasında etkinliğini kaybedeceğini savunan araştırmacılar olmakla birlikte (Blomlof ve ark 1983b, Trope ve Friedman 1992) sütte saklanan avülse dişlerin 12 saat sonrasında bile başarılı iyileşme gösterdiğini kanıtlayan çalışmalar da vardır (Lekic ve ark 1998). Marino ve ark (2000) sütün kısa süreli olarak ve sadece soğuk sütün PDL hücrelerinin proliferasyon kapasitesini korumakta etkili olduğunu savunmuşlardır (Marino ve ark 2000).

Aynı zamanda sütün soğuk olması hücrelerin şişmesini azaltır ve metabolik faaliyetlerinin düzenlenmesine yardımcı olur (Lekic ve ark 1998). Sütün sıcaklığı ile ilgili yapılan çalışmalarda 20°C ve 4°C karşılaştırıldığında canlı kalan PDL hücre sayısı en yüksek 4°C'de bulunmuştur (Udoye ve ark 2012). Düşük sıcaklığın avantajının bakteri üremesini azaltması ve sütün yapısının bozulmasını önlemesi olduğu bildirilmiştir (Ashkenazi ve ark 1999).

Harkacz ve ark (1997) sütün yağ oranının hücre canlılığı üzerine etkili olduğunu, düşük oranda yağ içeren sütün yüksek orandakine göre daha iyi sonuçlar verdiğini tespit etmişlerdir (Harkacz ve ark 1997). Yağsız sütün HBSS ile hücre canlılığı ve hücrelerin osteojenik farklanma potansiyeli açısından karşılaştırıldığı bir çalışmada, yağsız sütte daha yüksek oranda canlı hücre tespit edilmiştir. Aynı zamanda yağsız sütte 2 ve 4 saatlik sürelerde saklanan hücrelerde HBSS'e göre daha yüksek oranda mineralizasyon yani osteojenik farklanma gözlendiği bildirilmiştir (Wang ve ark 2013).

İnsanlarda yapılan in vivo çalışmalarda sütte taşındıktan sonra replante edilen avülse dişlerin prognozunun iyi olduğu görülmektedir. Misra ve Toumba (2008), 14 yaşındaki hastanın 90 dk sütte taşındıktan sonra kliniğe getirilen avülse olmuş 21 numaralı dişini replante etmişlerdir. Yapılan 10 yıllık takip sonrasında mobilite, perküsyonda hassasiyet, ağrı veya ankiloz belirtisi göstermeyen dişte radyografik

olarak da periapikal patoloji veya ankiloz oluşumu gözlenmemiştir (Misra ve Toumba 2008). Benzer şekilde Moradi Majd ve ark (2014), 7 yaşındaki bir hastada açık apeksli alt sağ santral dişin avülsiyonu sonrasında 90 dk sütte taşınmasının ardından dişi replante etmişlerdir. İki hafta sonraki kontrollerde periapikal radyolüsensi gözlenince Metapeks ile apeksifikasyon tedavisi yapmaya başlayıp, geçici olarak restore etmişlerdir. Periapikal radyolüsenside 3 ay sonra azalma olduğu için kanal tedavisini tamamlamışlardır. Replantasyondan 12 ay sonra kök gelişiminin devam ettiğini ve 20 ay sonrasında dişin asemptomatik olduğunu, fizyolojik mobilite gösterdiğini bildirmişlerdir (Moradi Majd ve ark 2014). Moradian ve ark (2013), 12 yaşındaki hastanın avülse olan ve 12 saat sütte taşınan 11 numaralı dişini replante etmişlerdir. Replantasyon sonrasında 3 yıl takip edilen hastada fonksiyon ve estetik bir problem olmadığı, perküsyon sesinin ve dişin mobilitesinin normal olduğu aynı zamanda radyografik olarak inflamatuar ve replasman kök rezorpsiyonu gözlenmediği bildirilmiştir (Moradian ve ark 2013).

Yapılan hayvan çalışmalarında sütün avülse diş saklama solüsyonu olarak etkinliği değerlendirilmiş ancak sonuçların insanlarda yapılan klinik çalışmalar kadar başarılı olmadığı görülmüştür. Ratlarda yapılan bir çalışmada dos Santos ve ark (2009) dişi çekip uzun raf ömürlü tam yağlı sütte 60 dk bekletmişler ve çekim soketine replante etmişlerdir. Replante edilen dişler 60 gün sonra histolojik olarak incelendiğinde 60 dk süt içerisinde bekletilen grupta inflamatuar ve replasman rezorpsiyonları görülürken ankilozun oluşmadığı gözlenmiştir (dos Santos ve ark 2009). Aynı zamanda Khademi ve ark (2008), köpeklerde yaptıkları çalışmada çekilen dişleri süt veya yumurta akında +4°C'de 3, 6 ve 10 saat bekletildikten sonra replante etmişler ve 2 ay sonra çekip histolojik olarak incemişlerdir. Süt veya yumurta akı 6 saatlik deney süresinde replasman rezorpsiyonu göstermezken, dişin 6 ve 10 saat sütte saklanmasıyla en yüksek PDL inflamasyonu gözlenmiştir (Khademi ve ark 2008a). Öte yandan Trope ve Friedman (1992), çekilmiş köpek dişlerini 6, 12, 24 ve 36 saatlik saklama sürelerinde Viaspan veya sütte, 36, 48, 72 ve 96 saatlik sürelerde Viaspan veya HBSS'de beklettikten sonra tekrar soketlerine replante etmişlerdir. Replantasyondan 2 ay sonra dişler tekrar çekilip histolojik olarak incelenmiştir. Viaspan'ın 6 saatte süte göre üstün olduğu bildirilirken, sütün 6 saatten sonra dişte rezorpsiyon komplikasyonu riskini arttırdığı bildirilmiştir (Trope ve Friedman 1992).

Avülsiyon yaralanmaları olduğunda hemen hemen her yerde kolayca ulaşılabilecek olmasının yanısıra sütün dezavantajı taze olması ve buzdolabında saklanması gerekliliğidir.

1.9.5. Hank's Balanced Salt Solution (HBSS)

HBSS, 7,2- 7,4 pH ve 280- 320 mosmol/kg osmolaliteye sahip toksik olmayan ve PDL hücreleri ile biyouyumlu izotonik tuz solüsyonudur (Ashkenazi ve ark 1999). Biyomedikal araştırmalarda pek çok hücre tipi için besiyeri ve yara irrigasyon solüsyonu olarak kullanılır (Krasner ve Person 1992). PDL hücrelerinin canlılığını koruyabilme özelliğinden dolayı avülse diş saklama solüsyonlarının etkinliğinin araştırıldığı çalışmalarda referans solüsyon olarak tercih edilmektedir (Malhotra ve ark 2010).

HBSS, sodyum klorid, glikoz, potasyum klorid, sodyum bikarbonat, sodyum fosfat, kalsiyum klorid, magnezyum klorid ve magnezyum sülfat içerir (Malhotra ve ark 2010). Glikoz, kalsiyum ve magnezyum iyonları sayesinde PDL hücrelerinin azalan hücresel içeriğinin yeniden düzenlenmesini sağlar. Hasarlı PDL hücrelerinde azalmış olan metabolitleri yeniden sağlayan tek solüsyonun HBSS olduğu bildirilmektedir (Blomlof 1981b). Krasner ve Rankow (1995), fizyolojik bir solüsyonda bekletilse dahi avülse dişin 30 dk HBSS'de bekletildikten sonra replante edilmesini tavsiye etmektedirler (Krasner ve Rankow 1995). Andreasen (1981) avülse bir dişin 15-60 dk kuru ortamda kaldıktan sonra 30 dk HBSS'de bekletilirse daha az kök rezorpsiyonu oluştuğunu bildirmiştir (Andreasen 1981).

PDL'nin proliferasyon yeteneğini ve canlılığını 48 saat gibi uzun bir süre boyunca HBSS içinde koruyabildiği bildirilmiştir (Malhotra 2011). HBSS'nin PDL hücrelerinin canlılığını in vitro olarak 120 saat, in vivo olarak 96 saate kadar koruyabildiğini savunan araştırmacılar da vardır (Krasner ve Person 1992).

Eagle'ın vasatı, süt, Viaspan ile karşılaştırıldığında HBSS'nin +4°C'de 24 saate kadar PDL hücrelerinin canlılığını, mitojenik ve klonojenik kapasitesini koruduğu bildirilmiştir (Ashkenazi ve ark 1999). Hiltz ve Trope (1991), insan dudak fibroblastlarını kullandıkları çalışmalarında tam yağlı süt, HBSS ve Viaspan'ı karşılaştırmışlardır. Fibroblast hücrelerinin bu solüsyonlarda 2 saatten 168 saate kadar inkübasyonlarını takip eden araştırmacılar 24 saat sonunda HBSS'de %70

oranında canlı hücre olduğunu, bu oranın 48 saatte %38'e düştüğünü bildirmişlerdir (Hiltz ve Trope 1991).

Sütün aksine HBSS'nin buzdolabında bulundurulması gerekmez ve raf ömrü 2 yıldır (Krasner 1992). Diğer taraftan HBSS araştırma laboratuvarlarında kullanılan bir solüsyon olduğu için yaralanma anında kolayca ulaşılamayabilir. Bu sebeple ABD'de HBSS solüsyonu içerisindeki küçük bir sepet şeklinde tasarlanmış 'Save- A- Tooth' (Phoenix Lazerus Inc., Pottstown, PA, USA) ismiyle piyasaya sürülerek acil durumlarda HBSS solüsyonuna ulaşılması sağlanmıştır (Şekil 1.4). Bununla birlikte ürünün her ülkede bulunmaması ve pahalı olması dezavantajıdır (Udoye ve ark 2012). Yapılan bazı çalışmalarda Save- A- Tooth içerisindeki HBSS'nin süt ve yeni hazırlanmış HBSS'ye oranla etkinliğinin daha az olduğu tespit edilmiştir (Marino ve ark 2000, Souza ve ark 2010).



Şekil 1.4. Save- A- Tooth.

HBSS'nin hazırlanıp 6 ay veya 12 ay saklandıktan sonra kullanılmasıyla ilgili yapılan bir çalışmada 12 ay saklandığında içeriğindeki maddelerin konsantrasyonunun değiştiği ve hücreler için yeterli besleyici niteliklerinin kaybolduğu tespit edilmiştir. Dolayısıyla taze olarak kullanılmadığında PDL hücrelerinin canlılığını koruyamadığı sonucuna ulaşılmıştır (de Souza ve ark 2010).

1.9.6.Viaspan

Organ naklinde taşıma solüsyonu olarak kullanılan Viaspan (Belzer VW-CSS, Du Pont Pharmaceuticals, Wilmington, DE, USA) oda sıcaklığında 7,4 pH ve 320 mosmol/kg osmolaliteye sahiptir. Etkili bir hidrojen iyonu tamponu olarak görev yapar ve pH korunmuş olur (Ashkenazi ve ark 2000).

Blomlof ve ark (1983) HBSS ve Viaspan'ı kıyasladıkları çalışmalarında 168 saat saklama süresi sonunda Viaspan'ın %37,6 canlı fibroblast oranı ile en etkili uzun dönem saklama solüsyonu olduğunu bildirmişlerdir (Blomlof ve ark 1983a). Ashkenazi ve ark (1999) Minimal Essantial Medium Alfa Modifikasyonu (αMEM), fötal serum ve antibiyotik içeren αMEM, süt ve HBSS ile kıyasladığı Viaspan ile hücrelerin klonojenik kapasitesinin 8 saat sonunda HBSS ile benzer olarak yüksek değerler gösterdiğini ve süte göre daha etkin olduğunu gözlemlemişlerdir. HBSS ve süte göre 24 saat sonrasında klonojenik kapasitedeki azalma %65 olarak tespit edilmiştir. PDL hücreleri +4°C'de 24 saat Viaspan'da saklandığında canlılığının düşük olduğu gösterilmiştir. Viaspan'ın mitojenik aktivitesi de süt ve HBSS ile kıyaslandığında daha düşük olarak bulunmuştur (Ashkenazi ve ark 1999).

Beagle köpeklerinin diş kökleri 30, 45 ve 60 dakika kuru ortamda bırakıldıktan sonra farklı solüsyonlarda 30 dk bekletilmiş ve replantasyon sonrasında iyileşme potansiyelleri karşılaştırılmıştır. Viaspan'da 30 dk bekletilen grup, kuru ortamda kaldıktan sonra hemen replante edilen kontrol grubu, HBSS ve *conditioned medium*da bekletilen gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı daha yüksek oranda iyileşme göstermiştir (Pettiette ve ark 1997).

Uzun süreli olarak (168 saat gibi) avülse diş saklama solüsyonu olarak kullanılabileceği bildirilse de, Viaspan'ın buzdolabında saklanma gerekliliği, pahalı olması ve kolayca ulaşılamaması dezavantajlarıdır (Udoye ve ark 2012). Açılmamış Viaspan'ın raf ömrü ise 1 yıldır.

1.9.7. Eagle'ın Vasatı

Harry Eagle tarafından hücre kültürü vasatı olarak geliştirilmiş bu vasat Minimal Essantial Medium (MEM) olarak da bilinir ve araştırma laboratuvarlarında kullanılır. Aminoasitler, vitaminler ve bikarbonatlar içermektedir. αMEM formu

non-essential aminoasitler ve ilave vitaminler içermektedir. Avülse diş saklama solüsyonu ile ilgili çalışmalarda sıklıkla pozitif kontrol olarak MEM veya αMEM formlarında kullanılmaktadır.

Ashkenazi ve ark (1999) PDL hücrelerinin αMEM'de +4°C'de 8 saate kadar canlılıklarını sürdürme, mitojenik ve klonojenik kapasitelerinin yüksek oranda olduğunu bildirmiştir. Çalışma süresi 24 saate çıkarıldığında ise HBSS ve süte oranla daha az etkili olduğu tespit edilmiştir (Ashkenazi ve ark 1999). Diğer taraftan Sigalas ve ark (2004) oda sıcaklığında ve 0°C'de MEM kullanıldığında canlı hücre sayısının %67 ile en yüksek değere ulaştığını bildirmişlerdir (Sigalas ve ark 2004). Diğer taraftan Souza ve ark (2011), yağsız süt ve tam yağlı sütü 5°C'de HBSS ve Save- A- Tooth ile karşılaştırdıkları çalışmalarında 37°C'de MEM'yi pozitif kontrol olarak kullanmışlardır. PDLF'yi solüsyonlarda 3, 6, 24, 48, 72, 96 ve 120 saat inkübe ettikten sonra PDLF'nin canlılığını 3-[4, 5-dimetiltiazol-2-yl]-2, 5-difenil tetrazolyum bromid (MTT) testi ile değerlendiren araştırmacılar tüm inkübasyon sürelerinde MEM'nin PDLF'nin canlılığını diğer gruplara göre daha iyi koruyabildiği sonucuna ulaşmışlardır (Souza ve ark 2011).

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) ise MEM'ye göre 2-4 kat fazla glikoz, 4 kat fazla aminoasit ve vitamin içermektedir. Avülse dişlerin kısa (Lekic ve ark 1998) ve uzun süreli (Andreasen ve Kristerson 1981) saklanmasında önerilen bir solüsyondur (Saxena ve ark 2011). DMEM ile Ham's F12 besleyici karışımından oluşan DMEM- F12 içerdiği besleyiciler, büyüme faktörleri ve hormonlar ile pek çok memeli hücresinin (glial hücreler, fibroblastlar, insan endotelyal hücreleri, rat fibroblastları gibi) gelişimini destekleyen hücre kültürü vasatıdır. DMEM- F12'nin, mezenkimal hücrelerin erken yaşlanmasını veya farklanmalarını uyarmadan hücrelerin büyümelerini sağladığı bildirilmiştir (Freshney 2005).

Saxena ve ark (2011), DMEM'nin besleyiciler içermesi ve hücreler için enerji kaynağı olma özelliğine propolisin antibakteriyel ve anti-inflamatuar özelliklerini eklemeyi düşünerek DMEM- propolis kombinasyonunu avülse diş saklama solüsyonu olarak test etmişlerdir. Propolisin %2,5, %5, %10 ve %20'lik konsantrasyonları ile yapay tükürük, süt, HBSS, DMEM ve aynı zamanda %10 propolis- DMEM ve %20 propolis- DMEM kombinasyonlarını karşılaştırmışlardır.

İnsan dişlerinden elde edilen PDLF'nin 30 dk, 1, 3, 6, 12 ve 24 saat sürelerinde 37°C'de yukarıda adı geçen solüsyonlarda inkübasyonu sonucunda tek başına DMEM ve propolis- DMEM kombinasyonlarının 24 saatlik inkübasyon sonrasında PDLF canlılığını en iyi sürdürebilen solüsyonlar olduğu bildirilmiştir. Bu sonucu DMEM içerisinde bulunan besleyiciler ve osmotik dengeyi sağlayan elementler içermesine bağlamışlardır. Aynı zamanda %10 propolis- DMEM kombinasyonunu, %20 propolis- DMEM'e göre daha iyi bulan araştırmacılar %20 propolis içeriğinin hücreler için toksik etki oluşturmuş olabileceğini bildirmişlerdir (Saxena ve ark 2011).

Hücre kültürü vasatları yaralanma anında kolay ulaşılabilecek solüsyonlar olmamaları ve buzdolabında saklanmaları gerekliliği nedeniyle tercih edilen avülse diş saklama solüsyonları değillerdir.

1.9.8. Oral Rehidratasyon Tuz Solüsyonu (ORTS)

Dünya Sağlık Örgütü tarafından şiddetli diyare veya kusma nedeniyle oluşan dehidratasyonun tedavisinde elektrolit kaybını dengelemek amacıyla tavsiye edilen bir solüsyondur. ORTS sodyum klorid, potasyum klorid, trisodyum sitrat tuzları ve glikoz içerir (Sachdev ve Bhargava 1985, Eskandarian ve ark 2013). İçeriğindeki tuzlar ve glikoz nedeniyle PDL hücrelerinin metabolizması için gerekli olan elementleri sağlayabilir düşüncesiyle avülse diş saklama solüsyonu olarak araştırmalarda kullanılmıştır.

Rajendran ve ark (2011) tek köklü 30 insan dişini çekmişler ve 30 dk kuru ortamda bırakmışlar. Daha sonra 3 gruba ayırıp 30 dk Ricetral (ORTS), HBSS ve sütte bekletmişler. Dişlerden elde edilen PDL hücrelerinin ortalama canlı hücre sayılarını karşılaştırmışlardır. HBSS ve Ricetral arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmazken, sütün en az canlı hücre sayısına sahip olduğu bildirilmiştir (Rajendran ve ark 2011). Benzer şekilde yapılmış bir çalışmada Subramaniam ve ark (2014), ORTS'yi HBSS ve süt ile karşılaştırmışlardır. ORTS ve HBSS solüsyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmazken, sütün en az canlı hücre sayısına sahip olduğu bildirilmiştir (Subramaniam ve ark 2014).

Sigalas ve ark (2004) yaptıkları çalışmada başka bir ORTS olan Gatorade solüsyonunu DMEM, az yağlı süt, HBSS, kontakt lens solüsyonları ve çeşme suyu ile karşılaştırmışlardır. PDL hücrelerinin saklama solüsyonlarında 24 ve 48 saat inkübe edilmesinden sonra trypan blue testi ile canlı hücre sayıları belirlenmiştir. Çalışmanın sonucunda Gatorade ile inkübasyonda, canlı PDL hücre sayısının HBSS ve süte göre daha düşük olduğu bildirilmiştir (Sigalas ve ark 2004).

1.9.9. Yeşil Çay

(-) - Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) yeşil çay içerisindeki antioksidatif, antikarsinojenik, antimutajenik, antiinflamatuar, antimikrobial ve antiviral özellikler gösteren bir polifenoldür (Cabrera ve ark 2006). EGCG'nin memeli hücreleri, hemopoietik kök hücreler ve kan damarları, kornea, sinirler, islet hücreleri, myokardiyum gibi dokuların saklanmasında kullanılır (Han ve ark 2006, Chen ve Huang 2012). Guinea domuzlarının kesici dişlerinde ve beagle köpeklerinde yapılan PDL hücreleriyle ilgili çalışmalarda EGCG kullanılarak yüksek oranda hücre canlılığının korunabildiği gözlenmiştir (Jung ve ark 2011). EGCG, HBSS ve sütün karşılaştırıldığı bir çalışmada solüsyonlar içerisinde 2 saat bekletilen dişlerde PDL hücre canlılıkları değerlendirilmiş ve EGCG en yüksek değerlere sahipken bunu, HBSS ve sütün izlediği tespit edilmiştir (Chen ve Huang 2012).

1.9.10. Propolis

Arı kovanlarının içerisinde bulunan rezin yapıda bir madde ve rezin yapıya ilave olarak balmumları, yağ asitleri, esansiyel yağlar, polen proteinleri ve mineraller içerir. Antibakteriyel, antifungal, antioksidan ve anti-inflamatuar etkileri olduğu bilinen propolis, avülse diş saklama solüsyonu olarak literatürde araştırılmaktadır.

Al- Shaher ve ark (2004) propoliste PDL fibroblastlarının 20 saate kadar canlılıklarını sürdürebildiklerini bildirmişlerdir (Al-Shaher ve ark 2004). Saxena ve ark (2011), avülse diş saklama solüsyonu olarak kullanılacak propolis konsantrasyonun PDL hücrelerinin canlılığına etkilerini değerlendirdikleri çalışmalarında, propolisin %2,5, %5, %10 ve %20'lik konsantrasyonları ile yapay tükürük, süt, HBSS, DMEM ve aynı zamanda %10 propolis- DMEM ve %20 propolis- DMEM kombinasyonlarını karşılaştırmışlardır. İnsan dişlerinden elde edilen PDLF'nın 30 dk, 1, 3, 6, 12 ve 24 saat sürelerinde 37°C'de yukarıda adı geçen

solüsyonlarda inkübasyonu sonucunda %10'luk propolis en ideal propolis konsantrasyonu olarak bulunurken, propolis- DMEM kombinasyonları ve DMEM solüsyonları 24 saate kadar PDLF'nın canlılığını koruması açısından diğer solüsyonlardan daha üstün bulunmuşlardır (Saxena ve ark 2011). Martin ve ark (2004) propolis konsantrasyonu ile ilgili yaptıkları çalışmada ise 30 dk kuru olarak bırakılan çekilmiş insan dişleri 45 dk %50'lik propolis, %100'lük propolis, HBSS, süt ve salin solüsyonlarında bekletildikten sonra canlı PDL hücrelerinin ortalama sayıları karşılaştırılmıştır. Propolis gruplarında diğer gruplardan daha fazla canlı PDL hücresi olduğu gözlenirken, %50 ve %100'lük konsantrasyonlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir (Martin ve Pileggi 2004).

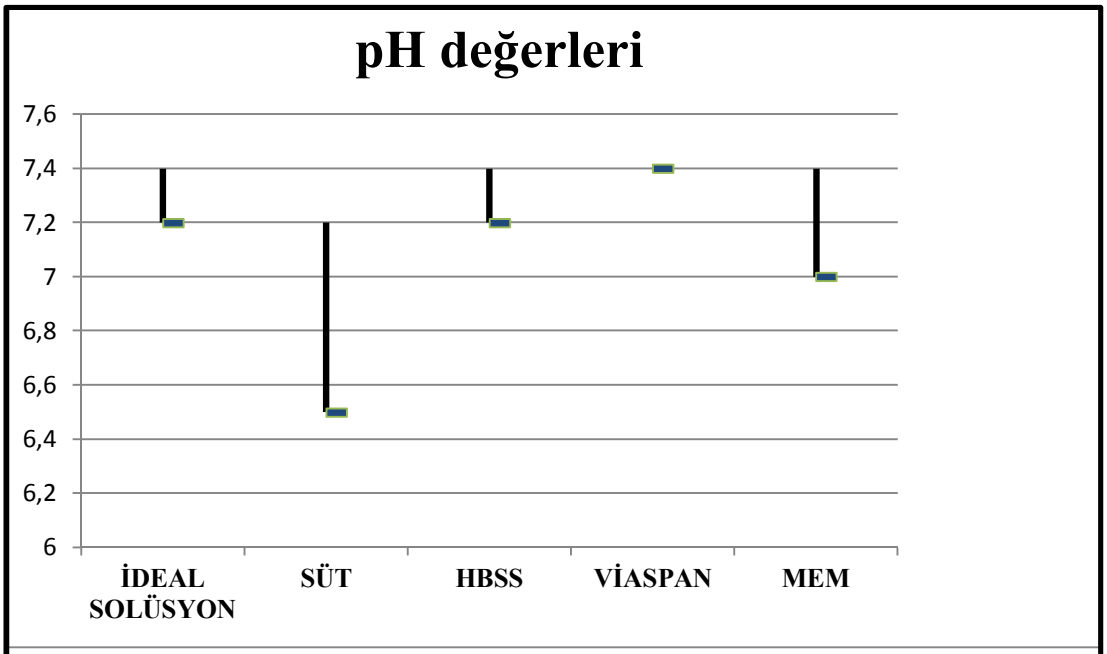
1.9.11. Diğer Avülse Diş Saklama Solüsyonları

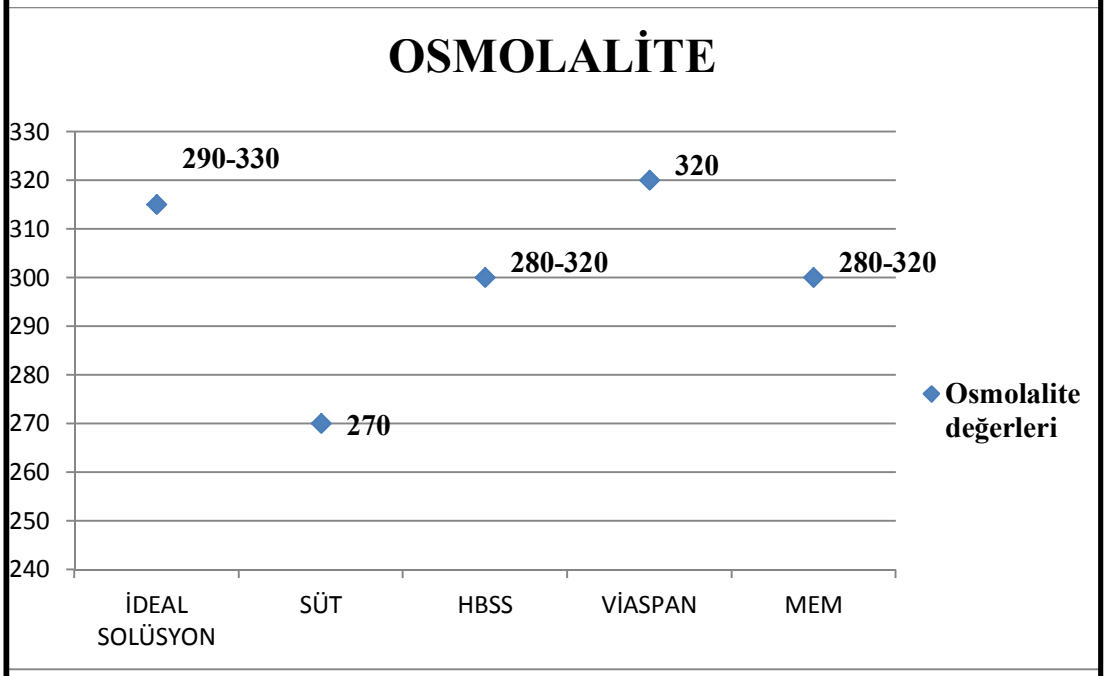
Avülse diş taşıma solüsyonu olarak içeriği sükroz, dekstroz, sitrik asit, su, sodyum klorid, sodyum sitrat ve monopotasyum fosfat olan spor içeceği, Custodiol ticari adıyla anılan, 310 mosmol/L osmolaliteye sahip ve organ transplantasyonunda kullanılan solüsyon, kontakt lens solüsyonları, yumurta beyazı ve hindistan cevizi suyu da araştırılmaya devam edilmektedir.

Birbirinden oldukça farklı metodolojiler kullanılarak yapılan araştırmalar yukarıda bahsedilen saklama solüsyonlarının birbirlerine göre üstünlüklerinin net bir şekilde değerlendirilmesine izin vermemektedir. Bununla birlikte saklama solüsyonunun pH'sı, osmolalitesi, raf ömrü ve kolayca erişilebilmesi açısından bakıldığında, yapılan pek çok in vitro ve in vivo araştırmalarıyla süt PDLF'nin canlılığının korunması açısından öne çıkmaktadır (Şekil 1.5).

Yukarıda anlatıldığı gibi HBSS de kolay ulaşılamaması dezavantajına rağmen, özellikle hücre kültürü araştırmalarında PDLF'nin canlılık ve fonksiyonlarının değerlendirilmesinde referans solüsyon olarak bildirilmektedir (Malhotra ve ark 2010).

PDLF kültürü için DMEM ve DMEM- F12 tercih edilmektedir. DMEM- F12 DMEM'e göre daha zengin bir solüsyon olup, büyüme faktörleri ve hormonlar içerir. Hücre gelişimini destekleyen ancak PDLF'nin farklanmasına yol açmayan bir hücre kültürü ortamıdır (Yıldırım 2012).





Saklama Solüsyonu	Raf Ömrü
Süt (Günlük kullanım)	6 ay
HBSS (laboratuvar kullanımı)	2 yıl
Viaspan (hastane materyali)	1 yıl
MEM (laboratuvar kullanımı)	2 yıl

Şekil 1.5. Avülse diş saklama solüsyonu olarak yapılan çalışmalarda öne çıkan solüsyonların (süt, HBSS, Viaspan ve MEM) pH, osmolalite değerleri ve raf ömürleri verilmiştir.

1.10. Avülse Dişlerin Taşıma Solüsyonlarının Etkinliğinin Değerlendirilmesinde Kullanılan In Vitro Metotlar

Avülse diş saklama solüsyonları büyük çoğunlukla PDL hücre kültürü üzerinde değerlendirilmektedir.

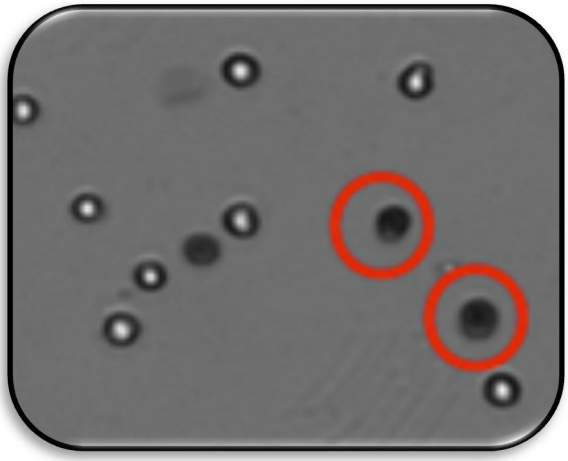
1.10.1. PDL Hücre Kültürü

Avülse dişleri taklit etmek üzere kullanılan ve saklama solüsyonunda bekletilen çekilmiş yirmiyaş dişlerinin kök yüzeyinden PDL'nin kazınmasıyla PDL dokusu elde edilir. PDL'nin enzimatik sindirim yöntemiyle (kollajenaz- dispaz enzimleri) dokudan hücrelere ayrışması sağlanır. Oluşan hücre süspansiyonunda hücreler sayılır ve kültür kabına ekilir. Hücrelerin kültür kabına homojen yayılması sağlanır. Kültür kabı %5 CO_2 içeren nemli ortamda 37°C'de kültüre edilir ve hücrelerin besiyeri değişimleri 3 günde bir yapılarak hücrelerin gelişimi takip edilir.

1.10.2. PDL Kültürlerinde Hücre Canlılığını Tespit Eden Yöntemler

Trypan blue boyası

Canlı hücreleri, hücre membranı zarar görmüş olan ölü hücrelerden ayırt etmeye yarayan bir boyadır. Membran zarar görmüşse stoplazmaya boya geçiş yapar ve ölü hücreler invert mikroskop altında koyu mavi olarak gözlenir. Boyayı içerisine almayan canlı hücreler ise parlak sarı renkli gözlenir (Sigalas ve ark 2004, Subramaniam ve ark 2014) (Şekil 1.6). Trypan blue boyası ile sadece canlı hücrelerin sayısı belirlenir. Hücrelerin proliferasyon yetenekleri ve metabolik aktiviteleri değerlendirilemez. Trypan blue testi uygulaması kolay, hızlı bir yöntem olmasının yanısıra canlı hücreleri ölü hücrelerden çok net olarak pratik bir şekilde ayırt etmemizi sağlar.



Şekil 1.6. Trypan Blue boyasını içerisine almış olan ölü hücreler gösterilmiştir.

PDL hücrelerinin canlılığını tespit eden diğer yöntemler; MTT testi, XTT [2,3-Bis-(2-metoksi-4-nitro-5-sülfofenil)-2H-tetrazolyum-5-karboksianilid tuzu] testi, high-content screening (HCS) Reagent Kit (Fischer Scientific, Pittsburg PA, USA), fluoresin diasetat (FDA) boyasıdır.

1.10.3. Plastik Yüzeye Yapışma Kapasitesinin Değerlendirilmesi

Plastik yüzeye yapışma kapasitesinin (plating efficiency) ölçümü ile hücrelerin, matriks proteinlerinin sentez ve sekresyonu için gerekli olan katı bir substrata bağlanabilme kapasitesi değerlendirilerek, hücrelerin hayatta kalma oranı belirlenebilmektedir (Lekic ve ark 1996a). Diğer taraftan kök hücrelerin plastik yüzeye yapışma kapasitesi olan hücreler olduğu bilinmektedir (Yıldırım 2012). Hücrelerin plastik yüzeye yapışabilmesi hücrelerin matriks proteinlerini sentez ve sekresyonu için önkoşuldur. Aynı zamanda avülsiyon sonrası hasarlı hücrelerin geridönüşümü ile ilgili bir ölçüdür.

1.10.4. Klonojenik Kapasitenin Ölçümü

Klonojenik kapasite aşırı proliferasyon yeteneği ve koloni oluşturma kapasitesi olan hücrelerin oranıdır. Dişin replante edilmesinden sonra kök yüzeyinde yeni bir popülasyon oluşturacak hücreler klonojenik kapasite ile değerlendirilir. Dokunun devamlılığını sağlayıp PDL'de yeni bir hücre popülasyonu oluşması replante edilen dişin iyileşme şansı ile ilgili bilgi verir (Ashkenazi ve ark 1999).

Avülse diş, uygun saklama solüsyonunda taşınarak, kısa sürede dişhekimine ulaştırılsa dahi, avülse dişin orijinal yerine yerleştirilmesi sonrasında, iyileşmenin ideal olup olmadığı bilinmemektedir.

Öte yandan süt ve HBSS ile taşınan avülse dişlerin replante edildiği araştırmalarda normal PDL ile iyileşme, yüzey rezorpsiyonu, replasman rezorpsiyonu ve inflamatuar kök rezorpsiyonu gibi değişen sonuçlar bildirilmiştir. PDL hücrelerinin canlılığını uzun sürelerde korumalarına süt ve HBSS'nin, avülse diş replantasyonundan sonra görülen bu farklı iyileşme tablolarında etkisinin olup olmadığının anlaşılması önem taşımaktadır. Eğer HBSS veya süt, avülse diş üzerindeki PDLF'de bir farklanmaya yol açmakta iseler, replantasyon sonrasında oluşacak iyileşme tahmin edilebilir. Bu sebeple bu tezde hipotezimiz zengin kalsiyum içeriği nedeniyle sütün PDLF'de farklanma yaratacağı, HBSS'nin ise yaratmayacağıdır. Bu hipotezin test edilmesi amacıyla bu tezde, avülse dişleri temsilen kullanılacak olan çekilmiş dişler HBSS, süt ve DMEM- F12'de farklı zamanlarda (30- 60 dk ve 12 saat) bekletildikten (taşıma simülasyonu) sonra, PDL hücre kültürü yapılmıştır. Üretilen PDLF'nin herhangi bir farklanmaya uğrayıp uğramadıklarının test edilmesi için, replantasyon sonrasındaki komplikasyonlar göze alınarak osteoblastik ve osteoklastik yolaklar test edilmiştir. Osteoblastik yolak işaretleyicisi olarak Runx2, osteoklastik yolak işaretleyicisi olarak ise RANKL seçilmiştir. Herhangi bir farklanmanın olmaması durumu içinse PDLF işaretleyicisi olarak COL 12 kullanılmıştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

Tez çalışmamızda avülse diş saklama solüsyonu olarak HBSS ve tam yağlı sütün PDLF farklanma mekanizmaları üzerine etkileri araştırılmıştır. Araştırma için 10.06.2013 tarih ve 2013/06 sayılı Selçuk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Etik Kurulu onayı alınmıştır (Bkz. EK-A).

Hücre kültürü çalışmaları için uygun steril ve tek kullanımlık hücre kültürü materyalleri kullanılmış ve işlemler laminar akışlı steril kabinde, steril koşullar altında gerçekleştirilmiştir. Kontaminasyonun önlenmesi amacıyla; yapılan çalışmalar asepsi koşullarına uygun şekilde gerçekleştirilmiştir.

2.1. Çalışmada Kullanılan Materyaller

2.1.1. Diş

Tez kapsamında Selçuk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı'na başvuran hastalardan avülse dişleri temsil etmek üzere cerrahi kliniklerinin rutin uygulamaları arasında yer alan ve çenede yeterli yer bulamayan ağız içine süremediği için çekilen yirmi yaş dişleri veya ortodontik nedenle çekilmiş premolar dişler kullanıldı. Uygun endikasyonla 15- 35 yaşlarındaki bireylerden çekilmiş yirmi yaş dişlerinde çürük, enfeksiyon, restorasyon, periodontal hastalık ve hipoplazi gözlenmeyen dişler tercih edildi.

2.1.2. Avülse Diş Saklama Solüsyonları

Çalışmamızda kullanılan avülse diş saklama solüsyonlarının, içerikleri ve üretici firmaları Çizelge 2.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.1. Çalışmamızda kullanılan avülse diş saklama solüsyonlarının, içerikleri ve üretici firmaları.

SAKLAMA SOLÜSYONU	**İÇERİK**	**FİRMA**
HBSS	-Kalsiyum klorid dihidrat -Dekstroz -Magnezyumsülfat heptahidrat -Potasyum klorid -Potasyumfosfat monobazik anhidroz -Sodyum bikarbonat -Sodyum klorid -Sodyumfosfat dibazik-7-hidrat	LONZA, Verviers, Belçika
TAM YAĞLI SÜT	-su -protein -yağ -karbonhidrat -laktoz -kolesterol -kalsiyum -demir -fosfor -potasyum -sodyum -vitamin A ve karoten -vitamin C -tiamin -riboflavin -niasin	PINAR SÜT, Pınarbaşı, İzmir

Çizelge 2.1 (Devam). Çalışmamızda kullanılan avülse diş saklama solüsyonlarının, içerikleri ve üretici firmaları.

SAKLAMA SOLÜSYONU	**İÇERİK**	**FİRMA**
DMEM F-12 (1:1 mix)	-aminoasitler (L-glutamine, L-alanine, L-Arginine, Monohydrochloride, L-Asparagine Monohydrate, L-Aspartic Acid…) -tuzlar (kalsiyum klorid, potasyum klorid, sodyum klorid, magnezyum sülfat, monosodyum fosfat…) -dekstroz -vitaminler (B1, B2, B5, B9, B12, D-Biotin, nikotinamid) -HEPES -Phenol red	LONZA, Verviers, Belçika

2.1.3. İmmünfloresan (IF) Antikorlar

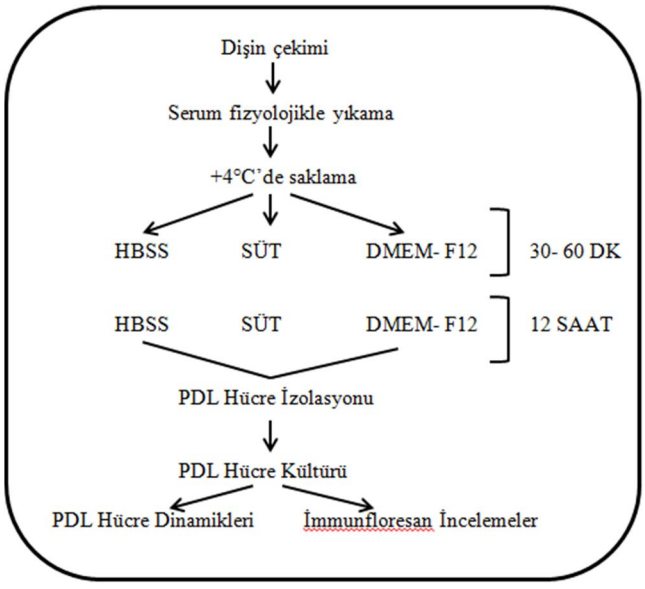
Çalışmamızda kullanılan immünfloresan antikorlar ve üretici firmaları Çizelge 2.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.2. Çalışmamızda kullanılan IF antikorlar ve üretici firmaları.

ANTİKOR	ÖZELLİKLER	ÜRETİCİ FİRMA
Runx2 primer antikoru	Rabbit monoclonal	Cell Signaling Technology, Inc. Beverly, MA, United States
RANKL primer antikoru	Rabbit polyclonal	Abcam, Cambridge, United Kingdom
Alexa Fluor® 488 Conjugate (Runx2 ve RANKL sekonder antikoru)	Goat Anti-Rabbit IgG (H+L), $F(ab')_2$ Fragment	Cell Signaling Technology, Inc. Beverly, MA, United States
Kollajen tip 12 primer antikoru	Rabbit polyclonal	Assay Biotechnology, Inc. Sunnyvale, CA, United States of America
Kollajen tip 12 sekonder antikoru	Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)	Acris Antibodies GmbH, Herford, Almanya

2.2. Yöntem

Çalışmada kullanılan yöntemi ifade eden deney akış şeması Şekil 2.1'de gösterilmiştir.



Şekil 2.1. Deney akış şeması.

2.2.1. Çekilen Dişlerin Avülse Diş Saklama Solüsyonuna Alınması

Diş çekimi öncesinde hastanın ağzı klorheksidin glukonat içerikli gargara ile çalkalatıldı. Çekilecek dişin kronu klorheksidin glukonat içerikli gargara emdirilmiş gazlı bez ile temizlendi. Sadece kron kısmından tutulan dişin kökünün herhangi bir yerle temas etmesi önlendi. Çekilen diş içerisinde serum fizyolojik bulunan steril kaba daldırılarak kan ve pıhtının temizlenmesi sağlandı. Diş, deneyde test edilecek taşıma solüsyonunun bulunduğu 50 ml'lik tüpe alınarak +4°C'de saklandı. HBSS, süt ve DMEM- F12 solüsyonları içerisinde 30- 60 dk ve 12 saat, her bir grupta 3 diş (n=3) olmak üzere bekletildikten sonra PDL hücre izolasyonu yapıldı (3 solüsyon× 2 zaman× 3 diş= 18 diş).

2.2.2. PDL Hücre İzolasyonu

Buz üzerinde laboratuvara getirilen diş tamponlanmış salinde (phosphate buffered saline- PBS) hafifçe yıkandı. Doku kurumadan PDL keskin bir küret veya bistüri ile orta üçlüden kazındı. Steril eppendorfa alınan doku üzerine 1 ml %10 fötal sığır serumu (fetal bovine serum- FBS) ve %1 penisilin-streptomisin-amfoterisin B içeren DMEM- F12'ye konuldu. Keskin makasla doku mümkün olan en küçük parçaya ayrıldı ve 500 rpmde 1 dk santrifüj edilip, süpernatant hafifçe çekilip atıldı. Sonra oluşan pelet üzerine 1 ml vasat eklenerek pipetlendi ve T25 kültür kabına ekildi. Böylece explant kültür yapıldı. Hücrelerin kültür kabına homojen yayılması sağlandı. Kültür kabı %5 CO_2 içeren nemli ortamda 37°C'de kültüre edildi. Vasat değişimi 3 günde bir yapıldı. Yapılan denemeler sonucunda elde edilen canlı hücre sayıları bakımından daha verimli sonuç alındığı için enzimatik sindirim yönteminin uygulanmasına karar verildi.

Diş üzerinden kazınarak elde edilen PDL dokusu keskin makasla küçük parçalara ayrıldıktan sonra 500 rpmde 1 dk santrifüj edilip, süpernatant hafifçe çekilip atıldı. Pelet üzerine 2 mg/ml kollajenaz tip 1 ve 2 mg/ml dispaz (Roche, Mannheim, Almanya) içeren 1 ml enzim karışımı eklendi. Su banyosunda 30-45 dakika enzimatik sindirimin gerçekleşmesi için bekletildi. Parçalanmakta olan doku birkaç kez hafif basınçla pipetlendi. 45 dk sonunda 1000 rpmde 2 dk santrifüj edildi. Süpernatant atılıp, pelet üzerine 1 ml vasat eklendi ve pipetlendi. Oluşan hücre süspansiyonunda hücreler sayıldı ve T25 kültür kabına ekildi. Hücrelerin kültür

kabına homojen yayılması sağlandı. Kültür kabı %5 CO_2 içeren nemli ortamda 37°C'de kültüre edildi. Vasat değişimi 3 günde bir yapıldı.

2.2.3. Pasajlama

Hücreler kültür kabının yüzeyini %80-90 oranında kapladığında, pasajlama işlemi gerçekleştirildi. Birincil kültür birinci pasaj (P1) kabul edilerek, birincil kültürü takip eden her pasajlama işlemi sonrası pasaj sayıları P2, P3, P4 şeklinde belirtilmiştir.

%80-90 kaplama oranına ulaşan hücreler %0.25 tripsin ve 1 µM etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) içeren çözelti kullanılarak kültür kabı tabanından kaldırıldı ve sonra sayıldı. Trypan blue boyası kullanılarak boyayı içerisine almayan canlı hücreler ve boyayı içerisine alan ölü hücrelerin birbirinden ayırt edilmesi yöntemiyle canlı hücrelerin sayımı yapıldı. Sayım işlemi hemositometre kullanılarak invert mikroskop altında gerçekleştirildi. Hücreler cm^2'ye 5000 hücre olacak şekilde yeni T25 kabına ekildi (P2). Aynı işlem 3. pasaja kadar devam ettirildi ve hücreler 3. pasajda dondurulduu.

Pasajlar sırasında hücre morfolojilerinin takip edilebilmesi için her pasajda, pasaj başında ve sonunda invert mikroskopta görüntülenen kültür kaplarındaki hücrelerin görüntüleri kaydedilmiştir.

2.2.4. Hücrelerin Çoğalma Dinamiklerinin Saptanması

Hücrelerin çoğalma dinamiklerinin saptanması için;
- trypan blue testi sonucunda elde edilen canlı hücre sayıları kullanılan avülse diş saklama solüsyonuna göre gruplandırıldı ve proliferasyon grafikleri oluşturuldu.
- hücre sayısının bir pasajdan diğerine 2 katına çıktığı zamanı (saat olarak) ifade eden population doubling time (PDT) değerleri hesaplandı.

PDT değeri; PDT= (T-T0) lg2/(lgNt-lgN0) formülüne göre hesaplandı. "T0" kültürün başlama zamanını, "T" bitiş zamanını gösterirken, "N0" ekilen hücre sayısını, "Nt" ise kültürün bitiş zamanında elde edilen hücre sayısını göstermektedir.

İstatistiksel analiz olarak elde edilen verilerin normal dağılım gösterip göstermediğinin belirlenmesi için Kolmogorov- Simirnov Testi yapıldı. Normal

dağılım gösteren veriler üzerinde parametrik testler kullanıldı ve Bağımsız Örneklem T testi yapıldı.

2.2.5. Plastik Yüzeye Yapışma ve Klonojenik Kapasitenin Değerlendirilmesi

Kültür kabına ekilen hücrelerin kültür kabı tabanına yapışması yani plastik yüzeye yapışması invert mikroskopta değerlendirildi. Yapışan bir tek hücrenin proliferasyon göstererek bir hücre kolonisi oluşturabilmesi olarak tanımlanan klonojenik kapasite invert mikroskopta hücre kolonilerinin gözlenmesi ile tespit edildi.

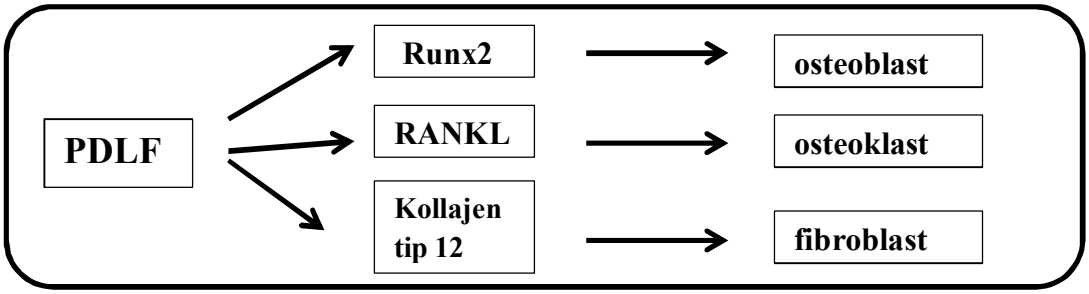
2.2.6. İmmunfloresan İnceleme İçin Hücrelerin Hazırlanması

Hücreler pasaj 3'e ulaştığında 6 kuyucuklu kültür kapları içerisine yerleştirilen yüzey alanı hesaplanmış lameller üzerine 5000 hücre/cm^2 olacak şekilde ekim yapıldı. Üzerine besiyeri ilave edilerek hücrelerin çoğalarak lamellerin yüzeyini %80-90 oranda kaplaması beklendi. Hücreler %80-90 oranında lamellerin yüzeyini kapladığında besiyeri çekilip PBS ile 2-3 kez hafifçe yıkandı ve %3,5 paraformaldehit ile hazırlanmış olan fiksasyon solüsyonu ile kaplanarak 25°C'de 30- 35 dk hücrelerin fikse olması beklendi. Fiksasyon sonunda solüsyon çekilerek PBS ile 3 kez yıkandı ve lameller IF boyama işlemine hazır hale getirildi.

2.2.7. İmmünfloresan Boyama

Her bir dişe ait lamellerden 3 antikorun (Şekil 2.2) her biri için 3'er tane pozitif kontrol, 1'er tane negatif kontrol olmak üzere lameller seçildi. Cam lameller üzerinde büyütülen PDLF hücreleri %3,5 paraformaldehit ile 30 dakika fikse edildikten sonra ve %0,1 Triton-X'den oluşan bloke edici sıvı ile 30 dk 37°C'de inkübe edildi. Her hücre grubuna primer antikorlar 1: 100 konsantrasyonunda 2 saat 37°C'de uygulandı. Daha sonra PBS ile üç kez yıkanan örneklere 1: 100 konsantrasyonunda Fluorescein isothiocyanate (FITC) işaretli sekonder antikorlar uygulandı. Bu antikorlar ile örnekler 37°C'de 2 saat inkübe edildi. 10 dakika PBS ile yıkanan örnekler çekirdek boyamasını sağlayan 7-Aminoactinomycin D (7AAD, BIOLEGEND San Diego, CA, United States) ile 20 dk inkübe edildi. 3 kez PBS ile yıkanan örnekler kapatma solüsyonu ile kapatıldı. Boyamanın özgün olduğunun

saptanması amacıyla negatif kontrol lamellerinde primer antikor kullanmadan aynı işlem yapıldı.



Şekil 2.2. PDLF farklanmasını değerlendirmek için kullanılan işaretleyiciler.

2.2.8. Lazer Taramalı Konfokal Mikroskop Görüntüleri

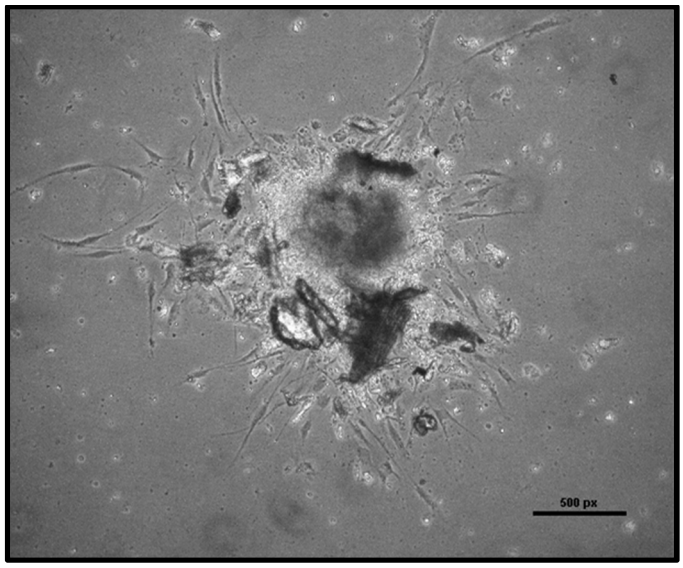
İmmünfloresan boyama yapılan örnekler lazer taramalı konfokal mikroskopta (Zeiss LSM510, Jena, Almanya) görüntülendi. Hücre fotoğrafları kaydedildi ve hücrelerin yüzde kaçında söz konusu antikorların ifade edildiği tespit edildi ve her bir dişten elde edilen kültürden alınan 3 örnek için söz konusu moleküllerin ifadesinin yüzde değerlerinin ortalaması alındı. Avülse diş saklama solüsyonlarına göre antikor ifade eden hücre yüzdeleri grafik haline getirildi.

3. BULGULAR

- Avülse dişin iki saklama solüsyonu içerisinde ve iki farklı sürede (30- 60 dk ve 12 saat) kalmasının ardından elde edilen PDLF'larının çoğalma dinamiklerinin nasıl etkilendiği hücre proliferasyon grafikleri ve PDT değerleri ile
- PDLF'nın osteoblast veya osteoklasta farklanma eğilimi gösterip göstermedikleri ya da fibroblast kimliğini koruyup korumadıkları IF işaretleyiciler kullanılarak konfokal mikroskop ile değerlendirilmiştir.

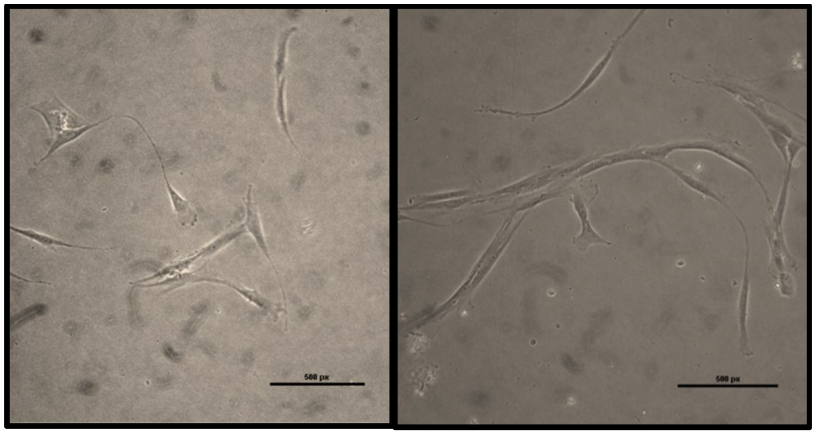
3.1. Hücre İzolasyonu

Bu tezde öncelikle explant kültür denendi (Şekil 3.1) Kültür sonucunda elde edilen PDLF'lerin canlılığı ve hücre sayıları değerlendirildiğinde enzimatik sindirim yöntemiyle daha çok sayıda canlı hücre elde edildiği için enzimatik sindirim yöntemi kullanıldı.

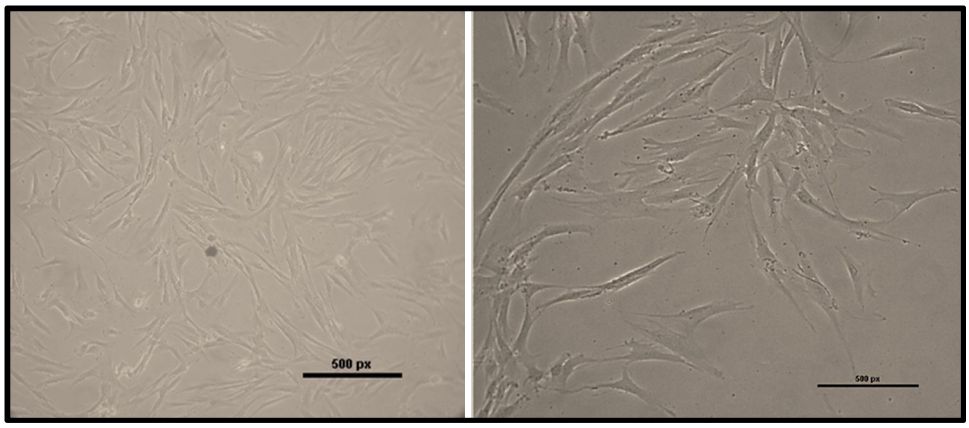


Şekil 3.1. Explant kültür yöntemi ile doku parçası etrafında çoğalmaya başlayan hücreler görülmektedir.

Avülse dişi temsil eden çekilmiş dişlerde ilk pasajda sindirilmiş dokudan elde edilen hücreler kolaylıkla plastik yüzeye yapışmakla birlikte (Şekil 3.2), dişler arasındaki bireysel farklılıkları yansıtan farklı büyüme ve plastik yüzeyi kaplama profilleri gözlendi (Şekil 3.3).



Şekil 3.2. PDLF'nın plastik yüzeye yapışma özelliği gösterilmiştir.



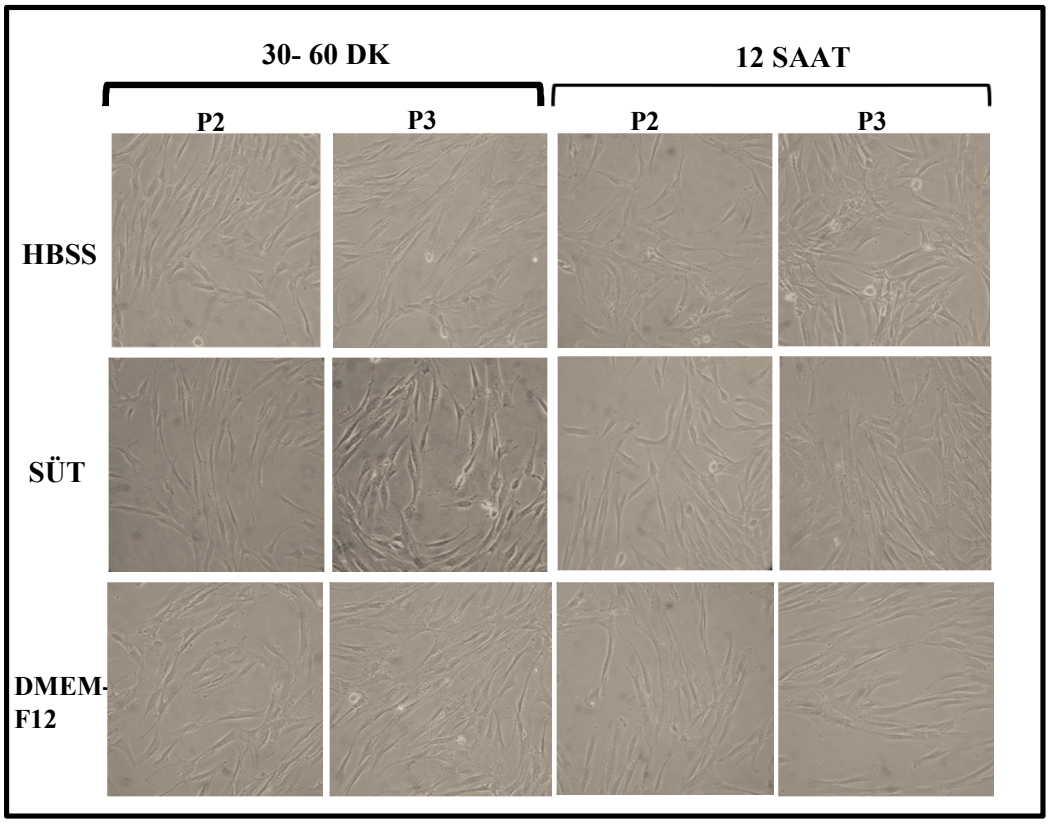
Şekil 3.3. Bireysel farklılıkları yansıtan farklı büyüme ve plastik yüzeyi kaplama profilleri gösterilmiştir.

Bununla birlikte ilk ekimin ardından 10- 14 gün arası yapılan pasajda (P2) tüm gruplarda homojen büyüme ve plastik yüzeyi kaplama modeli gözlendi (Şekil 3.4). Elde edilen PDLF'nin kültürün ilk saatlerinden başlayarak kültür kabı tabanına yapışabildiği görüldü. Hücrelerin plastiğe yapışabilme özelliğinin kullanılan avülse diş saklama solüsyonu ve avülse diş saklama süresine göre farklılık göstermediği tespit edildi.

3.2. Hücre Morfolojileri

Avülse dişi taklit etmek üzere kullandığımız çekilmiş 20 yaş dişlerinden PDLF'nın elde edilmesinden sonra pasajlar sırasında hücre morfolojilerinin takip edilebilmesi için kültür kaplarındaki hücrelerin her pasajda, pasaj başında ve sonunda inverted mikroskopta görüntüleri kaydedildi.

HBSS, süt ve DMEM-F12 solüsyonlarında 2 farklı sürede (30- 60 dk ve 12 saat) bekletilen dişlerden elde edilen PDLF'lerin görüntüleri P2 ve P3 aşamalarına göre Şekil 3.4'de gösterilmiştir.

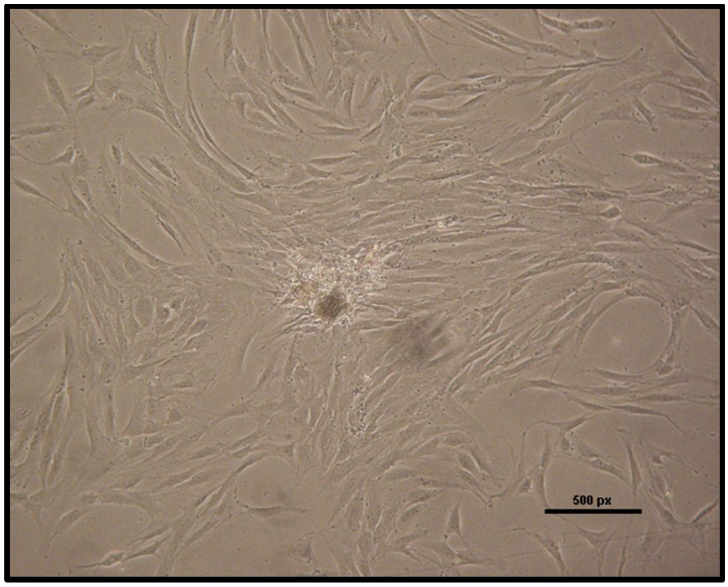


Şekil 3.4. HBSS, süt ve DMEM-F12 solüsyonlarında 2 farklı sürede (30- 60 dk ve 12 saat) bekletilen dişlerden elde edilen PDLF'lerin görüntüleri P2 ve P3 aşamalarına göre gösterilmiştir (20X büyütme). Bütün gruplar için hücrelerin morfolojik değerlendirmeleri yapıldığında, hücrelerin homojen bir dağılımda tipik fibroblastik yapıda, uzun stoplazmik uzantılı hücreler olduğu gözlenmiştir.

HBSS, süt ve DMEM-F12 solüsyonlarında 2 farklı sürede (30- 60 dk ve 12 saat) bekletilen dişlerden elde edilen PDLF'lerin görüntüleri morfolojik açıdan değerlendirildiğinde hücrelerin pasajlar boyunca tipik fibroblastik görünümü koruduğu görülmüştür (Şekil 3.4).

3.3. Klonojenik Büyüme Profili

Tüm gruplarda PDLF'ler tek bir hücrenin çoğalmasıyla hücre kolonisi oluşturabilme yeteneği olan yani klonojenik kapasitesi olan hücreler olduklarını göstermişlerdir (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. Tek bir hücre çevresinde şekillenen tipik bir fibroblastik koloni.

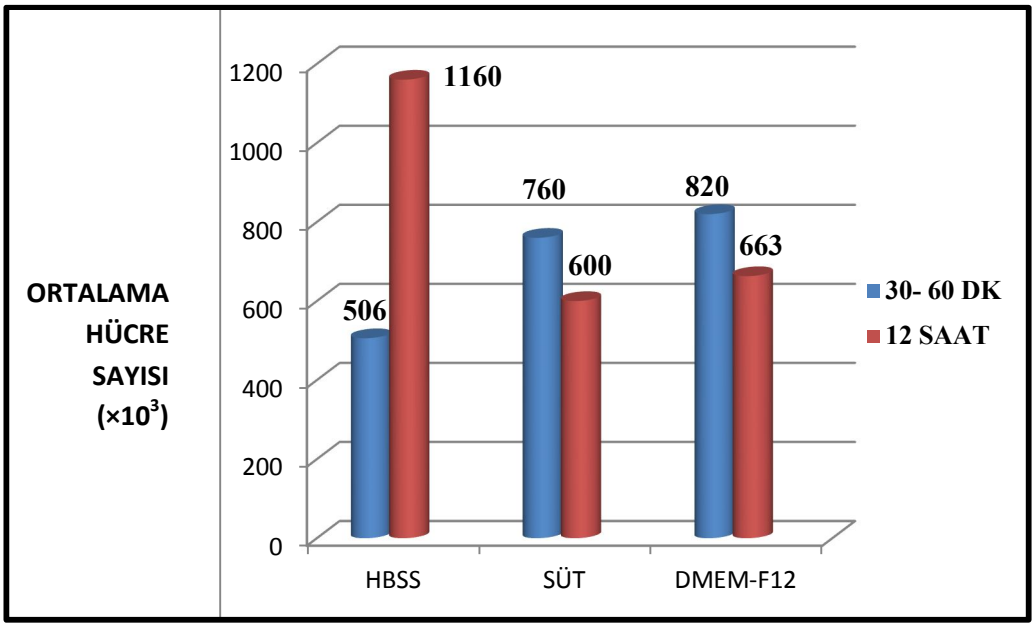
3.4. Hücre Çoğalma Dinamikleri İle İlgili Sonuçlar

Hücrelerin çoğalma dinamiklerinin değerlendirilmesi için;

- Trypan blue testi sonucunda elde edilen PDLF'nın ortalama sayılarına göre tüm deney gruplarını içeren proliferasyon grafikleri oluşturuldu.
- Hücre sayısının bir pasajdan diğerine 2 katına çıktığı zamanı (saat olarak) ifade eden population doubling time (PDT) değerleri hesaplanarak gruplar arasındaki farklılıklar değerlendirildi.

3.4.1. Proliferasyon Grafikleri

Hücre kültürü sonucunda elde edilen PDLF'nin P2- P3 geçişinde yapılan hücre sayımına göre örneklerin ortalama hücre sayıları (n=3) Şekil 3.6'da gösterilmiştir.



Şekil 3.6. PDLF'lerin P2- P3 aşamasında yapılan hücre sayımına göre ortalama hücre sayıları gösterilmiştir.

Ortalama hücre sayıları değerlendirildiğinde süt ve DMEM-F12 solüsyonlarında bekletilen dişlerde 30- 60 dk'lık bekleme süresi 12 saate çıkartıldığında hücre proliferasyonunda azalma gözlenirken, HBSS grubunda hücre proliferasyonunda artış gözlenmiştir ancak gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p > 0,05$).

3.4.2. PDT (Population Doubling Time)

Hücre sayısının bir pasajdan diğerine 2 katına çıktığı zamanı (saat olarak) ifade eden PDT değeri,

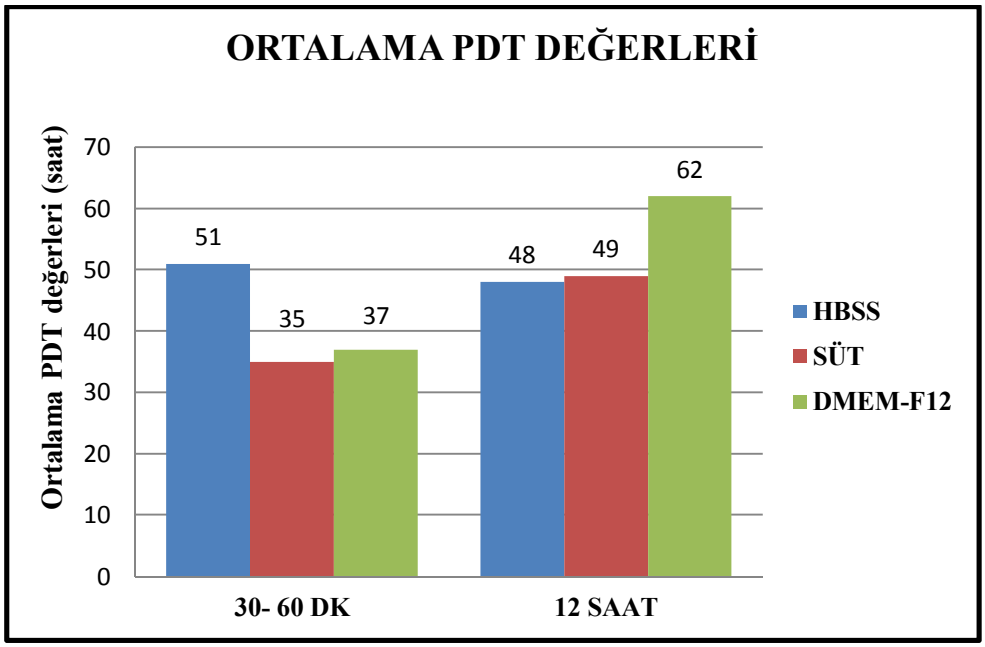
$$PDT = (T-T0)\ lg2/(lgNt-lgN0)$$

formülüne göre hesaplanmıştır. PDLF'nin test edilen avülse diş saklama solüsyonları içerisinde 30- 60 dk ve 12 saatlik saklama süreleri için hesaplanan PDT değerleri Çizelge 3.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. Test edilen avülse diş saklama solüsyonları içerisinde tüm deney grupları için hesaplanan PDT değerleri gösterilmektedir.

	30- 60 dk (n= 3)	**12 saat (n= 3)**
HBSS	46,35	45,30
	40,13	49,10
	67,55	50,77
SÜT	39,11	33,27
	39,11	47,11
	26,72	65,01
DMEM-F12	43,39	44,05
	35,17	58,31
	32,13	84,17

Deney gruplarının PDT değerlerinin ortalaması alındığında elde edilen sonuçlar Şekil 3.7'de gösterilmiştir. Gruplar arasında ortalama PDT değerleri değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur ($p > 0,05$).

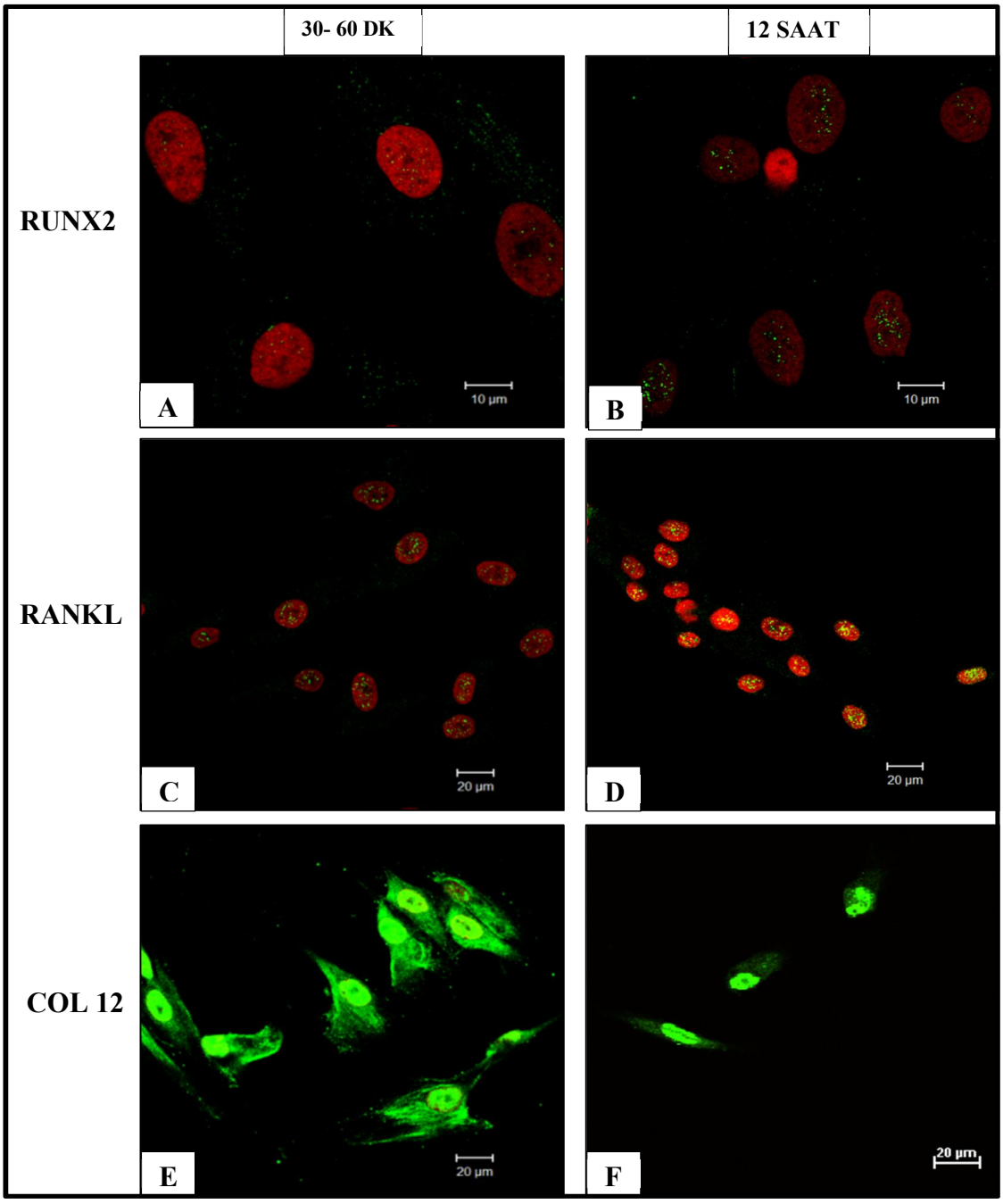


Şekil 3.7. Test edilen avülse diş saklama solüsyonları içerisinde deney gruplarının ortalama PDT değerleri gösterilmektedir.

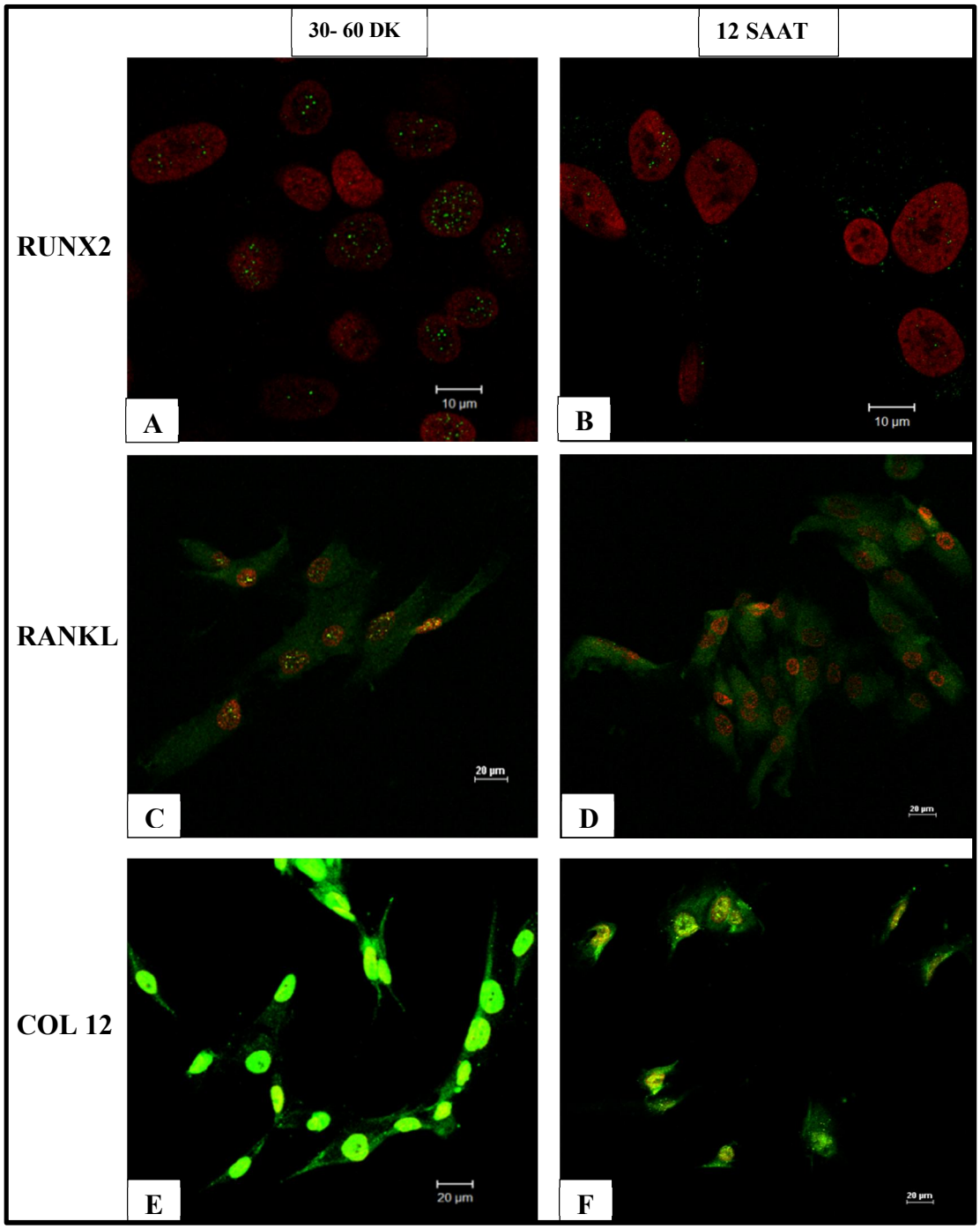
3.5. İmmünfloresan (IF) Boyama- Konfokal Mikroskop Sonuçları

Bu tezde HBSS, süt ve DMEM-F12 avülse diş saklama solüsyonlarının, iki farklı saklama süresinde (30- 60 dk ve 12 saat) IF işaretleyiciler olan Runx2, RANKL ve COL 12 ifadeleri açısından karşılaştırılması planlanmıştır. Deney gruplarına ait hücre preparatları 1:100 konsantrasyonunda primer antikorlar ve 1:100 konsantrasyonunda FITC-işaretli sekonder antikorların 2 saat 37°C'de uygulanması ile IF görüntüleme için hazırlanmıştır. İmmünfloresan boyama yapılan preparatların lazer taramalı konfokal mikroskopta (Zeiss, LSM510) görüntüleri elde edilmiştir.

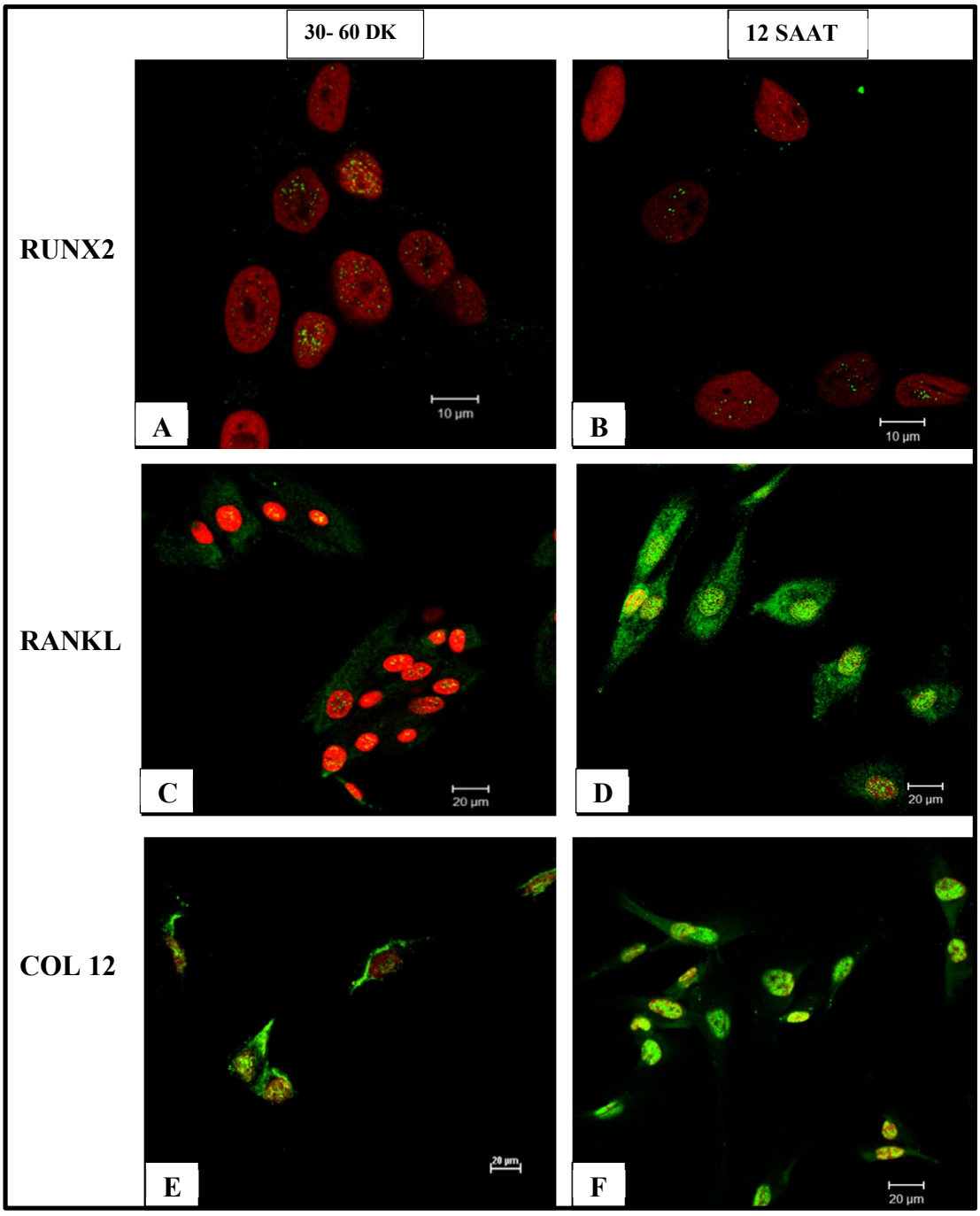
Deney gruplarına ait PDLF'nın konfokal mikroskop görüntüleri incelenmiştir. HBSS grubu değerlendirildiğinde hücre çekirdeği içerisinde noktasal olarak gözlenen Runx2 ifadesinin özellikle HBSS 12 saat grubunda yüksek olduğu tespit edilmiştir (Şekil 3.8). Süt grubu değerlendirildiğinde çekirdek içerisinde ve stoplazmada RANKL ifadesi gözlenmekle birlikte 30-60 dk ve 12 saat gruplarının her ikisinde de belirgin olarak COL 12 ifadesi olduğu dikkat çekmektedir (Şekil 3.9). DMEM-F12 grubu değerlendirildiğinde ise 30- 60 dk'dan 12 saate geçildiğinde RANKL ifadesinin belirgin şekilde arttığı gözlenmiştir (Şekil 3.10)



Şekil 3.8. HBSS grubuna ait PDLF'lerin konfokal mikroskop görüntüleri gösterilmektedir. Hücre çekirdeği içerisinde noktasal olarak gözlenen Runx2 ifadesi yüksek oranda HBSS 12 saat grubunda tespit edilmiştir (A, B). Çekirdek içerisinde ve stoplazmada görülmesi gereken RANKL ifadesinin HBSS grubunda belirgin olmadığı gözlenmiştir (C, D). Stoplazmada yoğun olarak ifade edilen COL 12'nin HBSS 30- 60 dk grubunda belirgin olduğu görülmektedir (E, F).



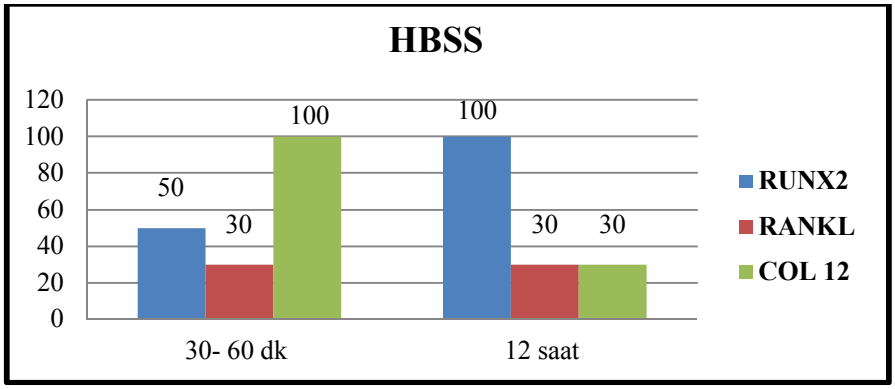
Şekil 3.9. Süt grubuna ait PDLF'lerin konfokal mikroskop görüntüleri gösterilmektedir. Hücre çekirdeği içerisinde noktasal olarak gözlenen Runx2 ifadesi yüksek oranda süt 30- 60 dk grubunda tespit edilmiştir (A, B). Çekirdek içerisinde ve stoplazmada görülen RANKL ifadesinin her iki grupta da belirgin olduğu gözlenmiştir (C, D). Stoplazmada yoğun olarak ifade edilen COL 12'nin tüm gruplarda belirgin olduğu görülmektedir (E, F).



Şekil 3.10. DMEM- F12 grubuna ait PDLF'lerin konfokal mikroskop görüntüleri gösterilmektedir. Hücre çekirdeği içerisinde noktasal olarak gözlenen Runx2 ifadesinin 30- 60 dk grubunda 12 saate göre bir miktar daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (A, B). Çekirdek içerisinde ve stoplazmada görülen RANKL ifadesinin 12 saat grubunda belirgin olduğu gözlenmiştir (C, D). Stoplazmada yoğun olarak ifade edilen COL 12'nin tüm gruplarda belirgin olduğu görülmektedir (E, F).

IF boyama yapılan gruplarda her bir örnekten (n= 3) seçilen her bir mikrograf (X40, n= 3) için sabit eksitasyon ve emisyon dalga boyu değerleri kullanılmış ve örneklerde kuvvetli ifade veren hücreler ile ifade gözlenmeyen hücrelerin oranı yüzde değer olarak ifade edilmiştir. Gruplarda 3 örnek için söz konusu moleküllerin ifadesinin yüzde değerlerinin ortalaması alınmıştır.

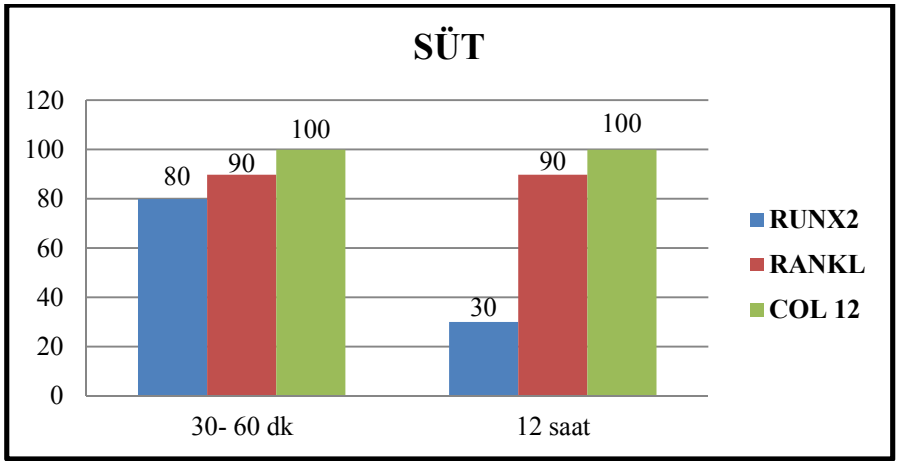
HBSS saklama solüsyonu 30- 60 dk ve 12 saat gruplarında Runx2, RANKL ve COL 12 ifadelerinin yüzde değerleri grafiksel olarak Şekil 3.11'de gösterilmiştir.



Şekil 3.11. HBSS saklama solüsyonu 30- 60 dk ve 12 saat gruplarında Runx2, RANKL ve COL 12 ifadelerinin grafiksel gösterimi.

HBSS grubu sonuçları göz önüne alındığında PDLF'nın Runx2 ifadesinde artış, RANKL ifadesinde değişiklik olmadığı ve COL 12 ifadesinin azaldığı sonucuna ulaşılmaktadır.

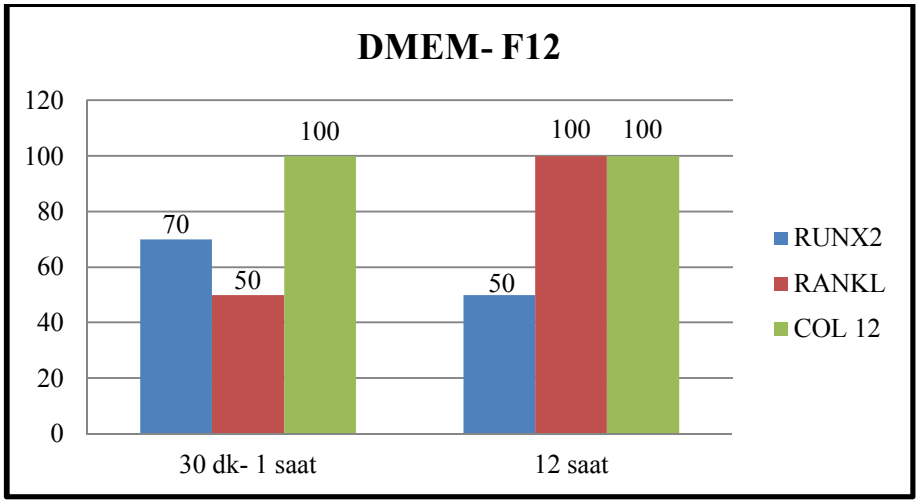
Süt saklama solüsyonu 30- 60 dk ve 12 saat gruplarında Runx2, RANKL ve COL 12 ifadelerinin yüzde değerleri grafiksel olarak Şekil 3.12'de gösterilmiştir.



Şekil 3.12. Süt saklama solüsyonu 30- 60 dk ve 12 saat gruplarında Runx2, RANKL ve COL 12 ifadelerinin grafiksel gösterimi.

Süt grubu sonuçları göz önüne alındığında PDLF'nın Runx2 ifadesinde azalma, RANKL ve COL 12 ifadesinde değişiklik olmadığı sonucuna ulaşılmaktadır.

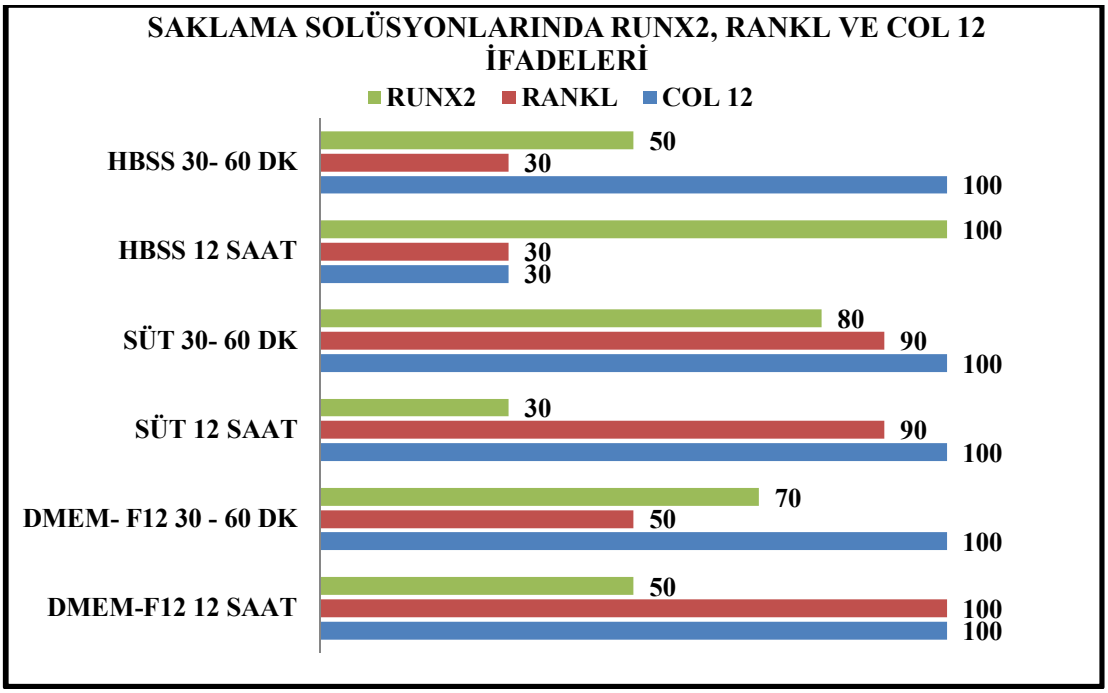
DMEM-F12 saklama solüsyonu 30- 60 dk ve 12 saat gruplarında Runx2, RANKL ve COL 12 ifadelerinin yüzde değerleri grafiksel olarak Şekil 3.13'de gösterilmiştir.



Şekil 3.13. DMEM- F12 saklama solüsyonu 30- 60 dk ve 12 saat gruplarında Runx2, RANKL ve COL 12 ifadelerinin grafiksel gösterimi.

DMEM- F12 grubu sonuçları göz önüne alındığında PDLF'nın Runx2 ifadesinde azalma, RANKL ifadesinde artma ve COL 12 ifadesinde değişiklik olmadığı sonucuna ulaşılmaktadır.

IF boyama yapılan örneklerin HBSS, süt ve DMEM-F12 saklama solüsyonlarına ve saklama sürelerine göre Runx2, RANKL ve COL 12 ifadeleri ortalama yüzde değerler temel alınarak Şekil 3.14'de gösterilmiştir.



Şekil 3.14. HBSS, süt ve DMEM- F12 saklama solüsyonlarında 30- 60 dk ve 12 saat gruplarına göre Runx2, RANKL ve COL 12 ifadelerinin grafiksel gösterimi.

Tüm gruplar birbiriyle karşılaştırıldığında, 30- 60 dk'dan 12 saat deney grubuna geçildiğinde Runx2 ifadesinin HBSS grubunda, RANKL ifadesinin DMEM- F12 grubunda ve COL 12 ifadesinin süt grubunda dikkat çektiği görülmektedir.

4. TARTIŞMA

Tüm diş yaralanmalarının %0,5-3'ünü oluşturan avülsiyon, dişin alveolar soketten tamamen ayrılması olarak tanımlanır. Pulpal ve periodontal dokunun şiddetli hasarıyla karakterizedir. Düşme, çarpma, bisiklet ve trafik kazaları sonucunda oluşabilen avülsiyonun en ciddi dişsel yaralanmalardan biri olduğu, kaza yerinde ve sonrasında yapılacak işlemlerin dişin prognozu açısından son derece önem taşıdığı literatürde bildirilmektedir (Andreasen ve Hjorting-Hansen 1966, Andersson ve ark 1989, Andreasen ve ark 1995a, b, Pohl ve ark 1999, Trope 2002, Day ve Duggal 2010, Andersson 2012).

Avülsiyon olgularında PDL'te meydana gelen kopma sonucunda PDL'nin bir parçası alveolar soket duvarında kalırken diğer parçası da avülse dişin kök yüzeyindedir. Avülse dişin replantasyonu ile ilgili tedavi protokollerinde amaç avülse dişin kök yüzeyinde kalan bu parçadaki hücrelerin canlılığını korumaktır. Dolayısıyla avülsiyon olgularında yaralanmanın olduğu yerde acil müdahalenin yapılarak avülse dişin soketine yerleştirilmesi büyük önem taşımaktadır. Ancak hastanın uyumsuz olması, hastanın yanındaki kişilerin bilinçsiz veya dişi yerine yerleştirmekte cesur davranamaması veya şiddetli yaralanmalarda ilk önce hayati fonksiyonların korunması için gerekli olan tedavilere başlanması nedeniyle dişin hemen replantasyonu çoğu zaman mümkün olamamaktadır (Andersson ve ark 2012). Ayrıca zamanında müdahale edilememiş avülse diş çekim soketine yerleştirilemediğinde diş eksikliği oluşacaktır. Oluşan diş eksikliğinin fonksiyon, konuşma, estetik ve hastanın psikolojisi üzerine olumsuz etkileri olacağı gibi yer kaybı olmaması ve ark bütünlüğünün korunması için de ileri restoratif tedavilere (köprü veya implant uygulamaları) ihtiyaç duyulacak ve hastaya hem manevi hem de maddi büyük yük getirecektir.

Avülse olan diş soketine derhal yerleştirilemediği durumlarda olay yerinden, diş hekimine ulaşıncaya kadar geçen sürede taşınacağı, kolayca elde edilecek ve çevresindeki PDL hücrelerinin canlılığını sürdürmelerine ve fizyolojik fonksiyonlarını devam ettirmelerine yardımcı olacak bir solüsyon içerisinde saklanmalıdır. Aksi takdirde avülse dişin PDL hücreleri replantasyona kadar canlılığını sürdüremez, nekroz meydana gelir. Avülse dişlerin hemen replante edilememesi sonucunda kök yüzey rezorpsiyonu, replasman rezorpsiyonu ve

inflamatuar kök rezorpsiyonlarının oluşması sonucunda dişin kaybedilme riski vardır.

Avülse dişin hemen replante edilememesi veya PDL hücrelerinin fizyolojik fonksiyonlarını devam ettirmelerine yardımcı bir solüsyon içerisinde replantasyona kadar saklanamaması durumunda oluşacak komplikasyonların hangi koşullarda en aza indirilebileceği literatürde araştırılmıştır. Mevcut literatür incelendiğinde avülsiyon saklama solüsyonlarının hangi içeriklere sahip olması gerektiği, hangi sıcaklık, pH ve osmolalite değerlerine sahip olduğunda PDL hücre canlılığını uzun süre koruyabildiği büyük çoğunlukla in vitro koşullarda ve hayvan deneylerinde test edilmiştir. İdeale yakın özellikler sergilediği görülen Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) ve sütün in vitro şartlarda PDL hücrelerin canlılığını koruduğu kanıtlanmıştır fakat in vivo ortamın tüm özelliklerinin in vitro deneylerde yansıtılamadığı bilindiğinden literatür sonuçları kinik açıdan yetersiz kalmaktadır. Öte yandan başta tükürük, çeşme suyu, salin ve süt olmak üzere kaza anında kolayca ulaşılabilecek solüsyonlarda saklandıktan sonra diş hekimine ulaştırılan avülsiyon olgularının klinik takiplerinden oluşan sonuçlar da literatürde yer almaktadır. Ancak yapılan klinik takipler sonucunda saklama solüsyonunun neden başarılı veya başarısız olduğunu açıklamaya yönelik çalışmalar literatürde bulunmamaktadır. Saklama solüsyonlarının PDL hücrelerinin fibroblast özelliklerini koruyup koruyamadığını araştıran bu tezde klinik araştırmaların prognozlarına yönelik yorumlar yapılabilmiş ve saklama solüsyonlarının PDLF'nin farklanma mekanizmasına etkileri değerlendirilmiştir.

Literatürde bugüne kadar pek çok avülse diş saklama solüsyonu test edilmiştir. Bunlardan çeşme suyu, hipotonik bir sıvı olduğu için hızlı bir hücre lizisine neden olur. PDL hücrelerinin canlılığını azaltır ve kök rezorpsiyonunu arttırır. Bu nedenle avülse diş saklama solüsyonu olarak tavsiye edilmemektedir (Blomlof 1981a, Hammarstrom ve ark 1986b). Tükürük, çeşme suyundan daha iyi osmolaliteye sahip olmasına rağmen PDL hücreleri için hipotoniktir. Ayrıca içerdiği bakteriyel ürünler nedeniyle kontaminasyon riski vardır ve saklama solüsyonu olarak 30 dk'dan fazla kullanılmaması bildirilmiştir. Fizyolojik osmolalitesiyle (280 mosmol/kg) salin avülse diş saklama solüsyonu olarak 2 saate kadar tavsiye edilmektedir (Khademi ve ark 2008b). Cvek ve ark (1974), replantasyondan önce 30 dk izotonik salin solüsyonunda bekletilen dişlerde 15 dk ve 40 dk kuru olarak

kalmasına oranla daha az kök rezorpsiyonu gözlendiğini bildirmiştir (Cvek ve ark 1974). Organ naklinde taşıma solüsyonu olarak kullanılan Viaspan ise (Belzer VW-CSS, Du Pont Pharmaceuticals, Wilmington, DE, USA) oda sıcaklığında 7,4 pH ve 320 mosmol/kg osmolaliteye sahiptir (Ashkenazi ve ark 2000). Blomlof ve ark (1983) HBSS ve Viaspan'ı kıyasladıkları çalışmalarında 168 saat saklama süresi sonunda Viaspan'ın %37,6 canlı fibroblast oranı ile en etkili uzun dönem saklama solüsyonu olduğunu bildirmişlerdir (Blomlof ve ark 1983a). Ancak Viaspan'ın buzdolabında saklanma gerekliliği, pahalı olması ve kolayca ulaşılamaması dezavantajlarıdır (Udoye ve ark 2012).

Yukarıda bahsedilen avülse diş saklama solüsyonlarının bazıları PDL hücrelerinin canlılıklarını sürdürmeleri için uygun şartlara (pH, osmolalite) sahip değillerken, bazıları da uygun şartlara sahip olsalar da avülsiyon yaralanmalarının olduğu anda kaza yerinde hemen ulaşılabilecek solüsyonlar değillerdir. In vitro çalışmalarda PDL hücrelerinin canlılığını sürdürebilmek, mitojenik ve klonojenik kapasite açısından yukarıda adı geçen solüsyonlardan üstün olan süt ve HBSS avülse diş saklama solüsyonu olarak en çok tavsiye edilen solüsyonlardır (Malhotra 2011, Udoye ve ark 2012). Sütün PDL hücrelerinin canlılığını 24 saate kadar sürdürebildiğini bildiren çalışmalar (Ashkenazi ve ark 1999) olmakla birlikte ulaşabildiğimiz klinik çalışmalar da (Kinoshita ve ark 2002, Misra ve Toumba 2008, Moradian ve ark 2013, Moradi Majd ve ark 2014) sütün avülse diş saklama solüsyonu olarak başarılı bir solüsyon olduğunu göstermektedir. Ev, okul ve sokak gibi avülsiyon yaralanmalarının olduğu her yerde kolayca ulaşılabildiği ve sıklıkla tercih edildiği için bu tezde sütte taşınan avülse dişin prognozu ile ilgili yorum yapabilmek amacıyla bu solüsyon tercih edilmiştir.

Avülse diş saklama solüsyonu olarak kullanılan sütün yağsız mı veya tam yağlı mı olması gerektiği ile ilgili çalışmalar literatürde mevcuttur. Harkacz ve ark (1997) yaptıkları çalışmada farklı yağ içeriği olan sütlerin PDL hücrelerinin canlılığı üzerine etkilerini değerlendirmişlerdir. Sütün düşük yağ oranının hücre canlılığı üzerine etkili olduğunu, düşük oranda yağ içeren sütün yüksek orandakine göre daha iyi sonuçlar verdiğini bildirmişlerdir (Harkacz ve ark 1997). Souza ve ark (2010) 'nın yaptıkları çalışmada ise yağsız sütün PDL hücre canlılığını 37°C'de 24 saate kadar ve 20°C'de 48 saate kadar HBSS'den daha iyi koruyabildiği bildirilmiştir (Souza ve ark 2010). Bir başka çalışmalarında Souza ve ark (2011), yağsız süt ile tam yağlı sütü

karşılaştırdıklarında sadece 120 saatte anlamlı bir fark gözlenmekle birlikte 120 saatte yağsız sütün daha iyi sonuçlar verdiğini bildirilmişlerdir (Souza ve ark 2011). Diğer taraftan PDL hücrelerinin yağsız pastörize sütte inkübe edildiği bir çalışmada solüsyonların PDL- KH'nin osteojenik farklanmasına etkisini değerlendiren araştırmacılar yağsız sütün PDL- KH'nin osteojenik farklanmasına etkisi olduğunu ayrıca bu etkinin HBSS'nin farklanma yaratmasından daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir (Wang ve ark 2013). Bu çalışmadan yola çıkarak bu tezde yağsız süt yerine tam yağlı süt tercih edilmiştir. Runx2 osteoblastik yolak işaretleyicisi ile PDLF'de osteojenik farklanma olup olmadığını test ettiğimiz çalışmamızda yağsız sütün osteojenik farklanmayı tetiklemesinin elimine edilmiş olacağı düşünülmektedir.

Avülse diş saklama solüsyonu literatürlerinde öne çıkan ideale yakın özellikler sergileyen bir diğer solüsyon HBSS'dir. Hiltz ve Trope (1991), insan dudak fibroblastlarını kullandıkları çalışmalarında 24 saat sonunda HBSS içerisinde inkübe edilen hücrelerin %70 oranında canlı olduğunu, bu oranın 48 saatte %38'e düştüğünü bildirmişlerdir (Hiltz ve Trope 1991). Öte yandan Chen ve ark (2015)'nın yaptıkları çalışmada farklı sıcaklıklarda (4, 22, 37°C) bile HBSS'nin 8 saat ve sonrasında süt ve DMEM'den daha iyi sonuçlar verdiği bildirilmiştir (Chen ve ark 2015). Bu tezde, PDLF'nin proliferasyon yeteneğini ve canlılığını 48 saate kadar koruyabilme özelliğinden dolayı avülse diş saklama solüsyonlarının etkinliğinin araştırıldığı çalışmalarda referans solüsyon olarak tercih edilen HBSS kullanılmıştır.

Avülse diş saklama solüsyonu ile ilgili yapılan in vitro çalışmalarda PDLF'nin canlılığını sürdürebilmeyi başaran hücre kültürü vasatları olarak sıklıkla MEM, αMEM ve DMEM kullanılmaktadır. MEM'e göre 2- 4 kat fazla glikoz, 4 kat fazla aminoasit ve vitamin içermesiyle ön plana çıkan DMEM hücre kültürü vasatı olarak yani hücrelerin gelişmesi için gerekli ortamı sağlayabilen bir solüsyon olması nedeniyle PDL canlılığının test edildiği in vitro çalışmalarda yer bulmuştur. DMEM'in pozitif kontrol olarak kullanılıp süt ve HBSS ile benzer olarak PDL canlılığını korumada başarılı olduğu in vitro çalışmalar literatürde yer almaktadır (Moazami ve ark 2012, Silva ve ark 2013a).

DMEM ile Ham's F12 besleyici karışımından oluşan DMEM-F12 içerdiği besleyiciler, büyüme faktörleri ve hormonlar ile hücrelerin gelişimini destekleyen bir

diğer hücre kültürü vasatıdır. DMEM- F12'nin avülsiyon çalışmalarında kullanılmadığı gözlenmiştir. Ancak mezenkimal hücrelerin erken yaşlanmasını veya farklanmalarını uyarmadan hücrelerin büyümelerini sağladığı bildirildiğinden (Freshney 2005) ve besleyici içeriğinden dolayı hücre gelişimine katkısı olacağı düşünüldüğü için çalışmamızda DMEM- F12'ye yer verilmiştir. Bu tezde DMEM-F12 hem pozitif kontrollerde saklama solüsyonu olarak hem de her 3 grupta da izole edilen PDL hücrelerinin kültür vasatı olarak tercih edilmiştir.

Süt ile ilgili in vitro ve klinik çalışmalarda PDL canlılığı ve devamlılığı açısından başarılı sonuçlar elde edildiği görülmekte, ancak hayvanlarda yapılan çalışmalar, avülse diş prognozunun olumlu sonuçlar vermediğini göstermektedir (Trope ve Friedman 1992, Khademi ve ark 2008a, Mori ve ark 2010). Öte yandan in vitro çalışmalarda diğer solüsyonlara üstünlüğüne rağmen HBSS ile yapılmış klinik çalışma bulunmamaktadır. Pek çok hayvan çalışmasında HBSS avülse diş saklama solüsyonu olarak kullanılmıştır ve bu çalışmalarda replante edilen dişlerde kök rezorpsiyonu komplikasyonu görüldüğü bildirilmiştir (Hupp ve ark 1998, Casaroto ve ark 2010). DMEM ile yapılan in vitro çalışmalarda elde edilmiş farklı sonuçlar literatürde yer almaktadır ve ulaşabildiğimiz DMEM ile yapılmış in vivo çalışma bulunmamaktadır. Dolayısıyla süt, HBSS ve DMEM solüsyonları için in vitro ve hayvan çalışmalarında farklı sonuçlar olmakla birlikte klinik çalışmalarda replantasyon sonrası PDL iyileşmesinin nasıl olacağı öngörülememektedir. Avülsiyon prognozuyla ilgili bilgi verebilecek ve PDL'de farklanma olup olmadığını inceleyen literatür çalışmalarının az olması nedeniyle bu tezde PDL hücre kültürü yapılmıştır. PDLF'lerin saklama solüsyonlarının etkisinde osteojenik veya osteoklastojenik farklanma gösterip göstermedikleri incelenmiştir.

Bu tezde PDL hücre kültürü yapmak için literatürdeki pek çok çalışmada olduğu gibi yirmiyaş dişlerini ve ortodontik nedenle çekilmiş premolar dişlerini kullanarak PDL hücre izolasyonu yapılmıştır. Literatürde yer alan olgularda avülsiyonun sıklıkla kesici dişlerde olduğu bildirilmiştir (Tzigkounakis ve ark 2008). Diş tiplerine göre PDL hücreleri fenotiplerinde farklılıklar olduğu ancak bunların analitik yöntemlerle saptanamayacağı bildirilmiştir (Lin ve ark 2000). Bu tezde yirmiyaş dişleri ve premolar dişlerinden izole edilen PDL hücrelerinin her iki diş tipinde de morfolojik olarak farklılık göstermediği tespit edilmiştir.

Literatürde diş dokusundan PDL hücreleri elde edilirken farklı metotlar kullanılmıştır. Bu metotlardan biri saklama solüsyonları içerisinde bekletilen dişlerden izole edilen PDL hücreleri üzerinde canlılık değerlendirilmesi yapılmasıdır. Diğer metot ise çekilmiş dişlerin PDL dokusundan hücre elde edilerek bu hücrelerin saklama solüsyonları ile inkübasyonu sonrasında hücre canlılıklarının değerlendirilmesidir. Bu tezde diş çekiminden sonra dişi solüsyon içerisinde bekletip daha sonra kök yüzeyinden PDL hücre izolasyonu yapılmıştır. Avülse dişi temsil eden çekilmiş dişin saklama solüsyonunda bekletildikten sonra PDL dokusundaki mevcut hücrelerin canlılığını değerlendirme ve proliferasyon kapasitelerini belirlemenin klinik olguları daha iyi taklit eden bir yöntem olduğu düşünülmektedir.

Avülse dişlerin saklama solüsyonları içerisinde hangi sıcaklıkta taşınması gerektiği araştırmalara konu olmuştur. Vücut sıcaklığı 37°C olmasına rağmen avülse olan bir diş genellikle oda sıcaklığında veya soğuk bir sütün içerisine alınmış olarak kliniğe getirilmektedir. Pek çok çalışma avülse diş saklama solüsyonun sıcaklığının PDL hücrelerinin canlılığına etkisini değerlendirmiştir. Blomlöf ve Otteskog (1980) farklı sıcaklıklardaki sütün PDL hücreleri üzerindeki etkisini inceledikleri çalışmalarında 4°C'de 20°C'ye göre hücre canlılığının daha iyi sonuçlar verdiğini gözlemlemişlerdir (Blomlof ve Otteskog 1980, Malhotra ve ark 2010). Saklama solüsyonunun sıcaklığının düşük olmasının hücresel metabolizmayı azalttığı, sütün yapısının bozulmasını önlediği aynı zamanda da bakteri üremesini engellediği için dişin prognozunu olumlu yönde etkilediği bildirilmiştir (Ashkenazi ve ark 1999). Diğer taraftan Chen ve ark (2015), avülse diş saklama solüsyonlarını 4, 22 ve 37°C'de 1, 2, 4, 8 ve 24 saat süreyle kullanmışlar ve PDLF canlılığını değerlendirmişlerdir. Çeşme suyu, tükürük ve salin solüsyonlarında sıcaklık arttıkça PDLF'nin canlılığının azaldığı görülürken, süt, HBSS ve DMEM solüsyonlarının çalışılan tüm sürelerde 4 ve 22°C'de PDLF aktivitesini korumada 37°C'deki kadar etkili olduğunu ve dolayısıyla sıcaklığın rolünün düşük olduğunu bildirmişlerdir (Chen ve ark 2015). Yukarıdaki literatürlerin ışığında bu tezde sütün bozulmasını ve hassas olan hücre kültürü çalışmasında avülse dişi taklit eden çekilmiş dişin içinde taşındığı sütte bakteri üremesini engellemek için 4°C'de solüsyonlar kullanılmış ve çekilen dişler hücre kültürü yapılana kadar 4°C'deki solüsyonlarda bekletilmiştir.

Avülse diş saklama solüsyonu içerisinde bekletildikten sonra çekilmiş dişler üzerinde PDL'yi oluşturan fibröz bağ doku bandı içerisinde bulunan yüksek miktardaki kollajenin parçalanması için enzimatik yöntemlerin kullanılması daha kısa sürede daha çok sayıda hücre elde edilmesini sağlamaktadır (Martin ve Pileggi 2004, Gopikrishna ve ark 2008). Pileggi ve ark (2002), HBSS, süt, salin ve çeşme suyu ile yaptıkları çalışmada kollajenaz-dispaz enzimlerini kullanarak PDL hücrelerinin canlılığını değerlendirmişlerdir. Bu 2 enzimin kullanılması ile hücre membranında hasara yol açmadan ekstraselüler matriksin parçalanabildiği ve kolayca hücrelerin açığa çıkabildiği bildirilmiştir (Pileggi ve ark 2002). Bu tezde diş örneklerini saklama solüsyonlarında bekletip PDL'nin kazınmasının ardından elde edilen dokudan önce explant kültür yapılmıştır. Sonra en iyi sonuçlar kollajenaz-dispaz enzimlerinin etkisine bırakılan enzimatik sindirim yönteminden alındığı için kollajenaz- dispaz enzimleri kullanılmış ve yukarıda bahsedildiği gibi hücre membran hasarına en az zarar veren ve daha hızlı hücre elde edilmesini sağlayan bu yöntem tercih edilmiştir.

Çalışmamızda avülse dişleri taklit etmek üzere farklı saklama solüsyonlarında farklı sürelerde beklettiğimiz çekilmiş dişlerden PDL hücreleri izole edilmiştir. Kültür koşullarında PDL hücrelerini takip ederken hücrelerin homojen dağılım gösterdikleri ve tipik olarak fibroblastik görünümde oldukları görülmüştür. Hücrelerin iğ şeklindeki fibroblastik görünümü PDL- KH'de olduğu gibidir. Miletic ve ark (2014) insan PDL'sinden izole ettikleri PDL- KH'nin standart kültür koşullarında plastik yüzeye yapışan ve fibroblast benzeri hücreler olduğunu bildirmişlerdir (Miletic ve ark 2014). Scanlon ve ark (2011) kaynağı hangi doku olursa olsun MKH'lerin morfolojik olarak plastiğe yapışabilen, fibroblast benzeri iğ şeklinde görünüme sahip olduklarını ve koloni oluşturma özelliklerinin yüksek olduğunu bildirmişlerdir (Scanlon ve ark 2011).

Lekic ve ark (1996), avülse diş saklama solüsyonları sıcaklığının ve avülse dişin ağız dışında kalma süresinin insan PDL hücrelerinin membran bütünlüğü, hücrenin plastik yüzeye yapışma kapasitesi ile klonojenik kapasitesine etkisini değerlendirmişlerdir. (Lekic ve ark 1996a). Çalışma sonucunda membran bütünlüğünün saklama süresiyle düşük bir ilişkisi olduğu ancak saklama süresinin plastik yüzeye yapışma kapasitesi ve klonojenik kapasiteyi daha çok etkilediği görülmektedir. Dolayısıyla bu tezde hücrelerin plastik yüzeye yapışma ve klonojenik

kapasitesi değerlendirerek yara bölgesinde hücrelerin hayatta kalma şansları ve öncü hücrelerin dişe tutunup koloni oluşturarak rejenerasyona katkıları olup olmadığı değerlendirilmiştir. Tüm gruplarda PDLF'lerin plastiğe yapışma yeteneği olan ve klonojenik büyüme profili gösteren hücreler olduğu tespit edilmiştir.

Literatür incelendiğinde avülse diş saklama solüsyonu ile ilgili çalışmalarda PDL hücre kültüründe canlılık değerlendirmesi yapılırken erken pasajların (P3-P7) kullanıldığı görülmektedir. Erken pasajları kullanmanın avantajı, orijinal dokudaki fibroblastlara yakın hücresel yanıtların alınabilecek olmasıdır. Çünkü pasaj numarası arttıkça biyokimyasal ve fenotipik değişiklikler artar (Scanlon ve ark 2011). Bu tezde de P3 aşamasındaki hücreler kullanılmış ve kültürde homojen morfolojide hücreler olduğu görülmüştür.

Avülse diş saklama solüsyonlarının PDL hücrelerinin canlılığı üzerine etkileri farklı araştırma metotlarıyla değerlendirilmiştir. Hücrenin metabolik aktivitesinin ölçümüne dayalı MTT (Terzioğlu ve ark 2013), XTT testi (Silva ve ark 2013b) ve FDA boyası yöntemi (Patel ve ark 1994) ile hücre canlılığı değerlendirilebilmektedir. Bahsedilen yöntemler hem uygulama zorluğu hem de maliyet açısından dezavantajlara sahiptir. Dolayısıyla bu tezde canlı hücreleri, hücre membranı zarar görmüş olan ölü hücrelerden ayırt etmeye yarayan bir boya olan Trypan Blue boyası tercih edilmiştir. Trypan blue boyası ile sadece canlı hücrelerin sayısı belirlenir. Diğer taraftan hücrelerin proliferasyon yetenekleri ve metabolik aktiviteleri değerlendirilemez. PDLF'nın çoğalma dinamiklerini inceleyen bu tezde proliferasyonu belirlemek üzere PDT değeri ve ortalama canlı hücre sayısı kullanılmıştır. Hücre metabolizması ile ilgili değerlendirmeler yapılması planlanmadığı için uygulaması kolay, hızlı bir yöntem olan ve canlı hücreleri ölü hücrelerden çok net olarak pratik bir şekilde ayırt etmemizi sağlayan Trypan blue boyası kullanılmıştır.

PDL hücre canlılığını değerlendiren çalışmalarda farklı sonuçlar elde edildiği görülmektedir. Chen ve ark (2015), farklı sıcaklıklarda (4, 22, 37°C) süt, DMEM ve HBSS solüsyonlarının PDL hücreleri canlılığı üzerine etkisini değerlendirmişlerdir. Tüm sıcaklık değerlerinde inkübasyon süresi 1, 2 ve 4 saat olduğunda sütün DMEM ve HBSS'e üstünlüğü dikkat çekerken, 8 saat ve sonrasında sütün önemli bir avantajının kalmadığı bildirilmiştir (Chen ve ark 2015). Diğer taraftan Casaroto ve

ark (2010)'nın yaptığı çalışmada ise 25°C'de DMEM ve HBSS solüsyonlarında inkübe edilen PDLF'lerin canlılığı 6 saatten sonra azalmaya başlarken, sütün 24 saate kadar PDLF'lerin canlılığını koruyabildiği bildirilmiştir (Casaroto ve ark 2010). Çalışma sonuçlarında HBSS, süt ve hücre kültürü vasatı DMEM'in farklı sonuçlar verdiği görülürken, başka bir çalışmada süt, HBSS ve αMEM karşılaştırıldığında PDLF'lerin 4°C'de 2, 8 ve 24 saatlik inkübasyonun sonunda PDLF'lerin canlılığını en iyi sürdürebilen solüsyonların süt ve HBSS olduğu ve aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadığı bildirilmiştir (Ashkenazi ve ark 1999). Ashkenazi ve ark (1999)'nın yaptığı çalışmanın sonucuyla benzer olarak bu tezde 4°C'de HBSS, süt ve DMEM- F12 solüsyonlarının PDLF'lerin canlılığı üzerine etkisi değerlendirildiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak fark olmadığı görülmüştür. Kullandığımız solüsyonlara benzer şekilde tam yağlı süt, HBSS ve DMEM kullanan Silva ve ark (2012)'nın yaptığı çalışmada da 37°C'de ve farklı sürelerde (2, 12 ve 24 saat) solüsyonlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadığı bildirilmiştir (Silva ve ark 2013a).

Literatürde PDL hücrelerinin canlılığı, klonojenik ve mitojenik kapasitesi süt içerisindeyken HBSS içerisindeki değerlerle benzer olarak bulunmuştur, ama sütün etkisinin 2 saat sonra kaybolduğu gözlenmiştir (Lekic ve ark 1998). Öte yandan Blomlöf (1981), süt ve tükürüğü karşılaştırdığı çalışmasında süt içerisinde 12 saat sonrasında hücre sayısının %50'sinin canlı olduğunu, tükürük içerisinde ise 3 saat sonrasında canlı hücre kalmadığını tespit etmiştir (Blomlof 1981a, Udoye ve ark 2012). Bu tezde sütün, HBSS ve DMEM- F12 solüsyonlarından farksız olarak 12 saatte bile PDLF canlılığını koruyabildiği tespit edilmiştir.

PDT değerinin hesaplanması ile hücrelerin proliferasyonu sonucunda sayılarının 2 katına ne kadar sürede çıktığı öğrenilir. Yani hücrenin PDT değerinin küçük olması daha hızlı proliferasyon gösterdiğini bildirir. Avülse diş saklama solüsyonları ile ilgili çalışmalarda PDT değerinin kullanılmadığı görülse de bu tezde PDLF'lerin proliferasyon hızını belirlemek amacıyla PDT değeri kullanılmıştır. Literatürde PDT değerinin PDL- KH'leri ile ilgili çalışmalarda hesaplandığı görülmektedir (Tamaki ve ark 2013, Yan ve ark 2014). Dolayısıyla PDT değeri PDLF'lerin kök hücre olarak ifade edilebilecek öncü hücrelere sahip olmasından yola çıkılarak tercih edilmiştir. Tamaki ve ark (2013)'nın yaptığı çalışmada DMEM- F12'de kültüre edilen PDL- KH'lerin PDT değeri 28,1 olarak bulunmuştur

(Tamaki ve ark 2013). Bu tezde ise avülse diş saklama solüsyonları etkisinde PDLF'lerin PDT değerleri ve grup içindeki ortalamaları hesaplanmıştır. HBSS, süt ve DMEM- F12 solüsyonları 30- 60 dk grubu için 51, 35, 37 PDT değerleri bulunurken, 12 saat grubu için 48, 49, 62 olarak bulunmuştur. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı tespit edilmiş dolayısıyla avülse diş saklama solüsyonlarının PDLF'lerin proliferasyonu açısından bir farklılık göstermediği sonucuna ulaşılmıştır.

Hiltz ve Trope (1991), HBSS'nin PDL hücrelerinin canlılığını sürdürmede başarılı olduğunu ve hücrelerin morfolojilerinin değişmeden kalabildiğini bildirmişlerdir (Hiltz ve Trope 1991). Hücrelerin morfolojileri değişmeden kalmış olsa da ifade ettikleri bazı işaretleyiciler o hücrelerin sahip oldukları kimlikleri ortaya çıkarır. Bu tezde PDLF'lerin osteojenik (Runx2) ve osteoklastojenik (RANKL) işaretleyicilere nasıl yanıt verdiği incelenmiştir.

HBSS ile ilgili olarak yapılan bir çalışmada Wang ve ark (2013), PDL hücrelerini yağsız pastörize süt, HBSS, çeşme suyu ve αMEM'de 1, 2 ve 4 saat oda sıcaklığında (25°C) inkübe etmişlerdir. Solüsyonların PDL- KH'nin osteojenik farklanmasına etkisini değerlendiren araştırmacılar, osteojenik indüksiyon ortamı ile hücreleri fikse edip %2'lik alizarin red S boyası ile boyamışlardır. Sonuç olarak HBSS'nin PDL- KH osteojenik farklanmasına yağsız süte göre daha az etkisi olduğu bildirilmiştir (Wang ve ark 2013). Bu tezde osteojenik işaretleyici olarak Runx2 kullanılmış ve sonuçta HBSS'de bekletilen dişlerden elde edilen PDLF'nin Runx2 ifadesinde deney süresi 30- 60 dk'dan 12 saate çıktığında artış olduğu görülmüştür. Bu sonuç HBSS'de PDLF'nin osteojenik farklanma gösterdiğini belirtmektedir. Tam yağlı süt kullanılması ile yukarıda bahsedilen yağsız sütün aksine hücrelerde osteojenik farklanma gözlenmemiş hücrelerin fibroblastik genotipini koruduğu gözlenmiştir. Tez sonuçlarına benzer şekilde Courts ve ark (1983) da sütte inkübe edilen PDL hücrelerinin farklanma yeteneğinin HBSS ile kıyaslandığında daha az olduğunu bildirmişlerdir (Courts ve ark 1983).

Hupp ve ark (1998)'nın köpeklerde yaptığı çalışmada 6, 48 ve 96 saat HBSS'de saklanan dişlerde replantasyondan 6 ay sonra hem replasman rezorpsiyonu hem de inflamatuar rezorpsiyon gözlenmiştir (Hupp ve ark 1998). Casaroto ve ark (2010), köpeklerde yaptıkları çalışmada 1 ve 3 saat HBSS ve sütte beklettikleri

çekilmiş dişleri replante etmişlerdir. Radyolojik olarak 6 ay takip ettiklerinde sütte taşınan dişlerde inflamatuar rezorpsiyon gözlenmiş ve 6 ay süresince de rezorpsiyonda artış olduğu bildirilmiştir. Öte yandan HBSS'de taşınan dişlerde ise replasman rezorpsiyonu gözlenmiş ve 6 ay süresince rezorpsiyonun artış göstermeden sabit kaldığı bildirilmiştir (Casaroto ve ark 2010). Bu çalışmanın sonuçlarından farklı olarak bu tezde sütte taşınan dişlerde Casaroto ve ark (2010)'nın yaptığı çalışma sonucunda olduğu gibi inflamatuar rezorpsiyona yol açacak RANKL osteoklastojenik işaretleyicisinde artış görülmemiştir. Fibroblast işaretleyicisi COL 12'nin sabit kalması ile PDLF'lerin fibroblastik genotiplerini koruduğu görülmüştür. HBSS'de taşınan dişlerde ise Runx2 ifadesinde artış gözlenmiştir ve Casaroto ve ark (2010)'nın çalışmasındaki sonuca benzer şekilde osteojenik aktivitenin PDLF'nın farklanması ile artış gösterdiği, dolayısıyla HBSS'de taşınan dişlerde replasman rezorpsiyonu komplikasyonu oluşma riskinin yüksek olduğu düşünülmektedir.

Sütün in vitro çalışmalarda PDL canlılığını koruyabilmede başarılı bulunmasının aksine mevcut yayınlardan ulaşabildiğimiz süt ile ilgili hayvanlarda yapılan replantasyon çalışmalarında, kök rezorpsiyonları ve PDL inflamasyonu gibi komplikasyonların oluştuğu bildirilmiştir. Khademi ve ark (2008)'nın köpeklerde süt ve yumurta akı ile yaptıkları çalışmada çekilmiş dişlerin 6 ve 10 saat sütte saklanması ile en yüksek PDL inflamasyonu gözlenmiştir (Khademi ve ark 2008a). Köpeklerde yapılan bir başka çalışmada da sütün 6 saatten sonra dişte rezorpsiyon komplikasyonu riskini arttırdığı bildirilmiştir (Trope ve Friedman 1992). Casaroto ve ark (2010), köpeklerde yaptıkları çalışmada 1 ve 3 saat sütte beklettikleri çekilmiş dişleri replante etmişlerdir. Radyolojik olarak 6 ay takip ettiklerinde sütte taşınan dişlerde inflamatuar rezorpsiyon gözlenmiş ve 6 ay süresince de rezorpsiyonda artış olduğu bildirilmiştir (Casaroto ve ark 2010). Replantasyon öncesi dişlerin oda sıcaklığında saklandığı görülmektedir. Saklama süresi 3 saat gibi kısa bir süre olsa da oda sıcaklığında saklanmış olmasının rezorpsiyonu tetiklemiş olabileceği düşünülmektedir. Khademi ve ark (2008)'nın çalışmasında da bu tezde olduğu gibi saklama solüsyonunun sıcaklığı 4°C'dir ve dişlerde rezorpsiyon gözlenmiştir. Ancak yukarıda özetlenen in vivo çalışmalardan farklı olarak bu tezde PDLF'lerin fibroblast genotiplerini koruduğu Runx2, RANKL ve COL 12 ifadeleri ile gösterilmiştir. IF yöntemin sonuçlarına göre süt grubunda 30- 60 dk'dan 12 saate geçildiğinde Runx2 ifadesinde azalma gözlenmiş ancak RANKL ve COL 12 ifadelerinde değişiklik

olmadığı görülmüştür. PDLF hücreleri fibroblast işaretleyicisi olan COL 12 ifadesini tüm zamanlarda koruyarak sütün PDLF'lerde osteojenik veya osteoklastojenik farklanmaya neden olmadığını göstermiştir. Bu sonuçlardan yola çıkarak 12 saat sütte taşınan bir avülse dişte PDL hücrelerinin hem canlılığının hem de fibroblast özelliğinin korunacağı böylece rezorpsiyon komplikasyonu gelişmeyeceği düşünülmektedir.

Süt yaklaşık olarak 120mg/100mL kalsiyum içeriği ile kalsiyum yönünden zengin bir sıvıdır. Avülse diş saklama solüsyonu olarak süt kullanıldığında PDL hücreleri bu kalsiyum içeriği ile temastadır ve hücre gelişiminin kalsiyumdan etkileneceği düşünülmektedir. Literatürde kalsiyum seviyesinin hücrelerin proliferasyon ve farklanmasını nasıl etkilediğini inceleyen çalışmalar yer almaktadır. Kalsiyum iyonunun değişen seviyelerinin insan PDL hücrelerinin proliferasyon, osteojenik farklanma ve mineralizasyonuna etkilerinin değerlendirildiği bir çalışmada artan kalsiyum seviyesinin osteojenik işaretleyici olan Runx2 ifadesinde artışa neden olduğu bildirilmiştir (An ve ark 2012). Koori ve ark (2014) da artan ekstraselüler kalsiyum seviyesinin PDL- KH'lerinin osteojenik farklanmasını tetiklediğini bildirmişlerdir (Koori ve ark 2014). Ayrıca ekstraselüler kalsiyumun osteoklast aktivitesini inhibe edici bir faktör olduğu da kemik rezorpsiyonu çalışmaları sonucunda bulunmuştur (Miyauchi ve ark 1990, Greenfield ve ark 1999). Bu tezde avülse diş saklama solüsyonu olarak süt kullanıldığında değişen saklama süresiyle ile birlikte PDLF'lerde Runx2 ifadesinin azaldığı, RANKL ve COL 12 ifadelerinin değişmediği görülmüştür. Sonuç olarak bu tezde kurulan hipotezin aksine zengin kalsiyum içeriği nedeniyle sütün PDLF'de farklanma yaratmadığı ve fibroblast hücrelerinin genotiplerini koruduğu görülmüştür.

Sütün hücre ölümünü önleyebildiği ancak hücrelerin normal morfolojilerine dönmelerini ve mitoza girmelerini sağlayan fonksiyonlarını sürdürmelerini sağlayamadığı bildirilmiştir (Layug ve ark 1998, Udoye ve ark 2012). Öte yandan Lekic ve ark (1996) yaptıkları çalışmada 4°C'de sütte saklanan dişlerden elde edilen PDL hücrelerinin klonojenik kapasitelerinin yüksek olduğunu bildirmişlerdir (Lekic ve ark 1996a). Klonojenik kapasitenin yüksek olması proliferasyon yeteneği fazla olan öncü hücrelerin oranının yüksek olduğunun göstergesidir. Bu tezde 4°C'de sütün 12 saatte bile PDLF'lerin canlılığını koruyabildiğinin bulunmasının yanısıra PDLF'lerin fibroblast kimliklerini korudukları da bulunmuştur. Artan saklama

süresine rağmen sütün PDL hücrelerini fibroblast olarak koruduğu söylenebileceği gibi PDL dokusunda var olduğu kabul edilen öncü hücrelerin proliferasyonu ile fibroblast kimliğinde yeni hücrelerin gelişmiş olabileceği de düşünülmektedir.

Lin ve ark (2000), avülse dişlerin saklama koşullarının PDL hücrelerinin fenotipine etkisini değerlendirdikleri çalışmalarında 30 dk ve 120 dk kuru olarak veya αMEM'de çekilmiş dişleri beklettikten sonra diş kök yüzeyinden PDL hücreleri izole etmişlerdir. PDL hücrelerindeki COL 12 ifadesi αMEM'de bekletilen dişlerde çekirdek çevresinde boyanma şeklinde gözlenirken, 30 dk kuru kalan dişlerde sadece belirli odaklarda ve 120 dk kuru kalan dişlerde ise zayıf bir boyanma olarak gözlendiği bildirmişlerdir. (Lin ve ark 2000). Deney sonuçlarına göre dişlerin kuru kalma zamanı arttıkça COL 12 ifadesinde azalma gözlenmiştir. Bu azalma PDL hücrelerinin fibroblast genotipinden uzaklaştığını gösterir. IF antikorlarla yaptığımız incelemelerde COL 12 ifadesinin HBSS grubunda azalma gösterdiği, süt ve DMEM gruplarında ise değişmeden kaldığı görülmüştür. Ayrıca COL 12'nin hücredeki lokalizasyonunun yoğun olarak stoplazmada yer aldığı tespit edilmiştir. Ancak DMEM- F12 için 12 saat deney grubunda RANKL ifadesinde gözlenen artış hücrelerin fibroblast genotipinden osteoklast genotipine geçmiş olduğunu göstermektedir. Süt grubunda hücrelerin yoğun olarak COL 12 ifadesi göstermesi sütün PDL hücrelerinin fibroblastik genotipini koruyabildiğini gösterirken, HBSS solüsyonu değerlendirildiğinde ise 12 saate geçildiğinde COL 12 ifadesindeki azalma ve Runx2 ifadesindeki artış HBSS solüsyonu etkisindeki hücrelerin osteoblastik genotip göstermeye başladıklarını göstermektedir.

Avülsiyon olguları prognozunda yüzeyel, inflamatuar ve replasman kök rezorpsiyonu komplikasyonları gelişebilmektedir. Avülsiyon sonrası zarar görmüş olan PDL hücreleri nedeniyle kök yüzeyi sement ile tamir edilemez. Osteoblast hücreleri kemikte fizyolojik yeniden şekillenme (remodeling) oluştururken kök yüzeyindeki rezorbe alanda kemik doku birikimi görülür (Trope 1998, 2011). Replasman rezorpsiyonu olarak tanımlanan bu durumun etkili hücresi osteoblastlardır. PDLF'lerin osteoblastlara farklanabildiği bilinmektedir. Bu tezde PDLF'lerin osteoblastlara farklandığı Runx2 ifadesinin artması ile tespit edilmiştir. Test ettiğimiz solüsyonlar içerisinde sadece HBSS'nin PDLF'lerin osteojenik farklanmasına neden olduğu görülmüştür. Dolayısıyla HBSS solüsyonu içerisinde 12

saat kalan bir dişin replantasyonu sonucunda replasman rezorpsiyonu gelişeceği öngörülmektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Avülse dişin HBSS ve süt içerisinde iki farklı sürede (30- 60 dk ve 12 saat) kalmasının ardından elde edilen PDLF'lerin çoğalma dinamiklerini incelediğimiz bu tezde HBSS, süt ve DMEM- F12 gruplarında ortalama hücre sayıları ve ortalama PDT değerleri incelendiğinde hücre proliferasyonları arasında fark olmadığı görülmüştür.

PDL hücre kültürü sonucunda PDLF'nin osteoblast veya osteoklasta farklanma eğilimi gösterip göstermedikleri ya da fibroblast kimliğini koruyup korumadıkları IF işaretleyiciler kullanılarak konfokal mikroskop ile değerlendirilmiştir.

Süt grubuna ait IF boyama sonuçları değerlendirildiğinde PDLF'nin Runx2 ifadesinin azaldığı, RANKL ve COL 12 ifadesinde farklılık olmadığı gözlenmiştir. COL 12 ifadesinde değişiklik gözlenmemesi PDLF'nin kollajen fenotipi/genotipinin korunduğunu göstermektedir. En iyi taşıyıcı olma özelliğine kollajen ekspresyonunda stabilite ile fibroblastik yapıyı, özel olarak PDL fibroblastlarını koruduğundan sahip olan sütün, avülse diş saklama solüsyonu olarak tercih edilebilecek bir solüsyon olduğu düşünülmektedir.

HBSS grubuna ait IF boyama sonuçlarına göre Runx2 ifadesinin arttığı, RANKL ifadesinde değişiklik olmazken, COL 12 ifadesinin azaldığı görülmektedir. Artan Runx2 ifadesi PDLF'lerin osteoblast genotipi kazandığını göstermektedir. In vitro çalışmalarda hücre canlılığını sürdürme açısından başarılı olan HBSS ile ilgili yapılan in vivo çalışmalarda bu tezin sonuçlarıyla benzer olarak replasman rezorpsiyonu ve inflamatuar rezorpsiyon komplikasyonlarının oluştuğu görülmektedir. Dolayısıyla bu tez sonucunda HBSS'nin avülse diş saklama solüsyonu olarak kullanıldığında rezorpsiyon komplikasyonu riskinin çok yüksek olduğu söylenebilir.

DMEM- F12 grubuna ait IF boyama sonuçları incelendiğinde ise değişen saklama süresi ile birlikte RANKL ifadesinde artış görülmektedir. Bu sonuç PDLF'nin osteoklast yolağına doğru bir eğilimi olduğunu göstermektedir.

HBSS ve DMEM- F12 gibi hücre kültürü vasatlarıyla yapılmış in vitro çalışmalarda hücre canlılığının korunmuş olması avülse dişin prognozuyla ilgili kesin sonuç verememektedir. Çünkü canlı olduğu tespit edilen PDLF'lerin fibroblast kimlikleriyle mi ya da osteoblast veya osteoklast olarak mı canlılığını sürdürdüğü bilinememektedir. Dolayısıyla avülsiyon komplikasyonları öngörülememektedir. Bu nedenle tezimiz avülse diş saklama solüsyonlarının avülsiyon olguları prognozuna etkisinin nasıl olduğu konusunda yanıt verebilmektedir. Böylece bir solüsyon içerisinde kliniğe gelen dişin prognozunun ne olacağı öngörülebilir ve ona göre tedavi planlaması yapılabilir. Belki de bu değişikliklerin nasıl olduğunun mekanizmasının çözülmesiyle yeni tedavi metotları geliştirilebilecektir.

Saklama solüsyonlarının PDLF farklanmasına etkisi hücresel mekanizmalarla IF teknik sayesinde açıklanabilmiştir. Tezimizin IF yöntemin kullanılacağı diğer avülsiyonla ilgili çalışmalara yön vereceği düşünülmektedir.

6. KAYNAKLAR

Al-Shaher A, Wallace J, Agarwal S, Bretz W ve Baugh D, 2004. Effect of propolis on human fibroblasts from the pulp and periodontal ligament. J Endod, 30 (5), 359-61.

Andersson L, 2012. IADT guidelines for treatment of traumatic dental injuries. Dent Traumatol, 28 (1), 1.

Andersson L, Andreasen JO, Day P, Heithersay G, Trope M, Diangelis AJ, Kenny DJ, Sigurdsson A, Bourguignon C, Flores MT, Hicks ML, Lenzi AR, Malmgren B, Moule AJ, Tsukiboshi M ve International Association of Dental T, 2012. International Association of Dental Traumatology guidelines for the management of traumatic dental injuries: 2. Avulsion of permanent teeth. Dent Traumatol, 28 (2), 88-96.

Andersson L, Blomlof L, Lindskog S, Feiglin B ve Hammarstrom L, 1984. Tooth ankylosis. Clinical, radiographic and histological assessments. Int J Oral Surg, 13 (5), 423-31.

Andersson L, Bodin I ve Sorensen S, 1989. Progression of root resorption following replantation of human teeth after extended extraoral storage. Endod Dent Traumatol, 5 (1), 38-47.

Andreasen JO, 1980a. Analysis of pathogenesis and topography of replacement root resorption (ankylosis) after replantation of mature permanent incisors in monkeys. Swed Dent J, 4 (6), 231-40.

Andreasen JO, 1980b. Analysis of topography of surface- and inflammatory root resorption after replantation of mature permanent incisors in monkeys. Swed Dent J, 4 (4), 135-44.

Andreasen JO, 1981. 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, 10 (1), 43-53.

Andreasen JO, 1980c. A time-related study of periodontal healing and root resorption activity after replantation of mature permanent incisors in monkeys. Swed Dent J, 4 (3), 101-10.

Andreasen JO, 1971. Treatment of fractured and avulsed teeth. ASDC J Dent Child, 38 (1), 29-31 passim.

Andreasen JO, Borum MK, Jacobsen HL ve Andreasen FM, 1995a. Replantation of 400 avulsed permanent incisors. 1. Diagnosis of healing complications. Endod Dent Traumatol, 11 (2), 51-8.

Andreasen JO, Borum MK, Jacobsen HL ve Andreasen FM, 1995b. Replantation of 400 avulsed permanent incisors. 4. Factors related to periodontal ligament healing. Endod Dent Traumatol, 11 (2), 76-89.

Andreasen JO ve Hjorting-Hansen E, 1966. Replantation of teeth. II. Histological study of 22 replanted anterior teeth in humans. Acta Odontol Scand, 24 (3), 287-306.

Andreasen JO ve Kristerson L, 1981. The effect of limited drying or removal of the periodontal ligament. Periodontal healing after replantation of mature permanent incisors in monkeys. Acta Odontol Scand, 39 (1), 1-13.

Ashkenazi M, Marouni M ve Sarnat H, 2000. In vitro viability, mitogenicity and clonogenic capacity of periodontal ligament cells after storage in four media at room temperature. Endod Dent Traumatol, 16 (2), 63-70.

Ashkenazi M, Sarnat H ve Keila S, 1999. In vitro viability, mitogenicity and clonogenic capacity of periodontal ligament cells after storage in six different media. Endod Dent Traumatol, 15 (4), 149-56.

Basdra EK ve Komposch G, 1997. Osteoblast-like properties of human periodontal ligament cells: an in vitro analysis. Eur J Orthod, 19 (6), 615-21.

Beertsen W, McCulloch CA ve Sodek J, 1997. The periodontal ligament: a unique, multifunctional connective tissue. Periodontol 2000, 13 20-40.

Belibasakis GN ve Bostanci N, 2012. The RANKL-OPG system in clinical periodontology. J Clin Periodontol, 39 (3), 239-48.

Benatti BB, Silverio KG, Casati MZ, Sallum EA ve Nociti FH, Jr., 2007. Physiological features of periodontal regeneration and approaches for periodontal tissue engineering utilizing periodontal ligament cells. J Biosci Bioeng, 103 (1), 1-6.

Bloemen V, Schoenmaker T, de Vries TJ ve Everts V, 2010. Direct cell-cell contact between periodontal ligament fibroblasts and osteoclast precursors synergistically increases the expression of genes related to osteoclastogenesis. J Cell Physiol, 222 (3), 565-73.

Blomlof L, 1981a. Milk and saliva as possible storage media for traumatically exarticulated teeth prior to replantation. Swed Dent J Suppl, 8 1-26.

Blomlof L, 1981b. Storage of human periodontal ligament cells in a combination of different media. J Dent Res, 60 (11), 1904-6.

Blomlof L, Andersson L, Lindskog S, Hedstrom KG ve Hammarstrom L, 1983a. Periodontal healing of replanted monkey teeth prevented from drying. Acta Odontol Scand, 41 (2), 117-23.

Blomlof L, Lindskog S, Andersson L, Hedstrom KG ve Hammarstrom L, 1983b. Storage of experimentally avulsed teeth in milk prior to replantation. J Dent Res, 62 (8), 912-6.

Blomlof L ve Otteskog P, 1980. Viability of human periodontal ligament cells after storage in milk or saliva. Scand J Dent Res, 88 (5), 436-40.

Bohme K, Li Y, Oh PS ve Olsen BR, 1995. Primary structure of the long and short splice variants of mouse collagen XII and their tissue-specific expression during embryonic development. Dev Dyn, 204 (4), 432-45.

Boyd DH, Kinirons MJ ve Gregg TA, 2000. A prospective study of factors affecting survival of replanted permanent incisors in children. Int J Paediatr Dent, 10 (3), 200-5.

Boyle WJ, Simonet WS ve Lacey DL, 2003. Osteoclast differentiation and activation. Nature, 423 (6937), 337-42.

Bronckers AL, Engelse MA, Cavender A, Gaikwad J ve D'Souza RN, 2001. Cell-specific patterns of Cbfa1 mRNA and protein expression in postnatal murine dental tissues. Mech Dev, 101 (1-2), 255-8.

Brullmann D, Schulze RK ve d'Hoedt B, 2010. The treatment of anterior dental trauma. Dtsch Arztebl Int, 108 (34-35), 565-70.

Burcak Cengiz S, Stephan Atac A ve Cehreli ZC, 2006. Biomechanical effects of splint types on traumatized tooth: a photoelastic stress analysis. Dent Traumatol, 22 (3), 133-8.

Cabrera C, Artacho R ve Gimenez R, 2006. Beneficial effects of green tea--a review. J Am Coll Nutr, 25 (2), 79-99.

Carnes DL, Maeder CL ve Graves DT, 1997. Cells with osteoblastic phenotypes can be explanted from human gingiva and periodontal ligament. J Periodontol, 68 (7), 701-7.

Casaroto AR, Hidalgo MM, Sell AM, Franco SL, Cuman RK, Moreschi E, Victorino FR, Steffens VA ve Bersani-Amado CA, 2010. Study of the effectiveness of propolis extract as a storage medium for avulsed teeth. Dent Traumatol, 26 (4), 323-31.

Chamila Prageeth Pandula PK, Samaranayake LP, Jin LJ ve Zhang C, 2014. Periodontal ligament stem cells: an update and perspectives. Journal of Investigative and Clinical Dentistry, 5 (2), 81-90.

Chen F, Qi S, Lu L ve Xu Y, 2015. Effect of storage temperature on the viability of human periodontal ligament fibroblasts. Dent Traumatol, 31 (1), 24-8.

Chen H ve Huang B, 2012. (-)-Epigallocatechin-3-gallate: a novel storage medium for avulsed teeth. Dent Traumatol, 28 (2), 158-60.

Cho MI, Lin WL ve Garant PR, 1991. Occurrence of epidermal growth factor-binding sites during differentiation of cementoblasts and periodontal ligament fibroblasts of the young rat: a light and electron microscopic radioautographic study. Anat Rec, 231 (1), 14-24.

Choe Y, Yu JY, Son YO, Park SM, Kim JG, Shi X ve Lee JC, 2012. Continuously generated H2O2 stimulates the proliferation and osteoblastic differentiation of human periodontal ligament fibroblasts. J Cell Biochem, 113 (4), 1426-36.

Cortes MI, Marcenes W ve Sheiham A, 2002. Impact of traumatic injuries to the permanent teeth on the oral health-related quality of life in 12-14-year-old children. Community Dent Oral Epidemiol, 30 (3), 193-8.

Cvek M, Granath LE ve Hollender L, 1974. Treatment of non-vital permanent incisors with calcium hydroxide. 3. Variation of occurrence of ankylosis of reimplanted teeth with duration of extra-alveolar period and storage environment. Odontol Revy, 25 (1), 43-56.

Day P ve Duggal M, 2010. Interventions for treating traumatised permanent front teeth: avulsed (knocked out) and replanted. Cochrane Database Syst Rev, (1), 1-18.

de Souza BD, Bortoluzzi EA, da Silveira Teixeira C, Felippe WT, Simoes CM ve Felippe MC, 2010. Effect of HBSS storage time on human periodontal ligament fibroblast viability. Dent Traumatol, 26 (6), 481-3.

Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop D ve Horwitz E, 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy, 8 (4), 315-7.

dos Santos CL, Sonoda CK, Poi WR, Panzarini SR, Sundefeld ML ve Negri MR, 2009. Delayed replantation of rat teeth after use of reconstituted powdered milk as a storage medium. Dent Traumatol, 25 (1), 51-7.

Eskandarian T, Badakhsh S ve Esmaeilpour T, 2013. The effectiveness of oral rehydration solution at various concentrations as a storage media for avulsed teeth. Iran Endod J, 8 (1), 22-4.

Eyre DR, Apon S, Wu JJ, Ericsson LH ve Walsh KA, 1987. Collagen type IX: evidence for covalent linkages to type II collagen in cartilage. FEBS Lett, 220 (2), 337-41.

Flores MT, Andersson L, Andreasen JO, Bakland LK, Malmgren B, Barnett F, Bourguignon C, DiAngelis A, Hicks L, Sigurdsson A, Trope M, Tsukiboshi M ve von Arx T, 2007. Guidelines for the management of traumatic dental injuries. II. Avulsion of permanent teeth. Dent Traumatol, 23 (3), 130-6.

Freshney R. 2005. Culture of animal cells. A manual of basic technique. . Wiley-Liss New York

Fujii S, Maeda H, Wada N, Kano Y ve Akamine A, 2006. Establishing and characterizing human periodontal ligament fibroblasts immortalized by SV40T-antigen and hTERT gene transfer. Cell Tissue Res, 324 (1), 117-25.

Gay IC, Chen S ve MacDougall M, 2007. Isolation and characterization of multipotent human periodontal ligament stem cells. Orthod Craniofac Res, 10 (3), 149-60.

Gopikrishna V, Thomas T ve Kandaswamy D, 2008. A quantitative analysis of coconut water: a new storage media for avulsed teeth. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 105 (2), e61-5.

Gordon MK, Gerecke DR, Dublet B, van der Rest M, Sugrue SP ve Olsen BR, 1990. The structure of type XII collagen. Ann N Y Acad Sci, 580 8-16.

Griffin CJ ve Spain H, 1972. Organization and vasculature of human periodontal ligament mechanoreceptors. Arch Oral Biol, 17 (6), 913-21.

Groeneveld MC, Everts V ve Beertsen W, 1993. A quantitative enzyme histochemical analysis of the distribution of alkaline phosphatase activity in the periodontal ligament of the rat incisor. J Dent Res, 72 (9), 1344-50.

Hammarstrom L, Blomlof L, Feiglin B, Andersson L ve Lindskog S, 1986a. Replantation of teeth and antibiotic treatment. Endod Dent Traumatol, 2 (2), 51-7.

Hammarstrom L, Pierce A, Blomlof L, Feiglin B ve Lindskog S, 1986b. Tooth avulsion and replantation--a review. Endod Dent Traumatol, 2 (1), 1-8.

Han DW, Hyon SH, Park JC, Park KD, Park YH ve Park HK, 2006. Non-frozen preservation of mammalian tissue using green tea polyphenolic compounds. Biomed Mater, 1 (1), R18-29.

Harkacz OM, Sr., Carnes DL, Jr. ve Walker WA, 3rd, 1997. Determination of periodontal ligament cell viability in the oral rehydration fluid Gatorade and milks of varying fat content. J Endod, 23 (11), 687-90.

Hasegawa T, Yoshimura Y, Kikuiri T, Yawaka Y, Takeyama S, Matsumoto A, Oguchi H ve Shirakawa T, 2002. Expression of receptor activator of NF-kappa B ligand and osteoprotegerin in culture of human periodontal ligament cells. J Periodontal Res, 37 (6), 405-11.

Hiltz J ve Trope M, 1991. Vitality of human lip fibroblasts in milk, Hanks balanced salt solution and Viaspan storage media. Endod Dent Traumatol, 7 (2), 69-72.

Hinckfuss SE ve Messer LB, 2009. Splinting duration and periodontal outcomes for replanted avulsed teeth: a systematic review. Dent Traumatol, 25 (2), 150-7.

Huang GT, Gronthos S ve Shi S, 2009. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. J Dent Res, 88 (9), 792-806.

Hupp JG, Mesaros SV, Aukhil I ve Trope M, 1998. Periodontal ligament vitality and histologic healing of teeth stored for extended periods before transplantation. Endod Dent Traumatol, 14 (2), 79-83.

Ivanovski S, Haase HR ve Bartold PM, 2001. Expression of bone matrix protein mRNAs by primary and cloned cultures of the regenerative phenotype of human periodontal fibroblasts. J Dent Res, 80 (7), 1665-71.

Joe BH, Borke JL, Keskintepe M, Hanes PJ, Mailhot JM ve Singh BB, 2001. Interleukin-1beta regulation of adhesion molecules on human gingival and periodontal ligament fibroblasts. J Periodontol, 72 (7), 865-70.

Jung IH, Yun JH, Cho AR, Kim CS, Chung WG ve Choi SH, 2011. Effect of (-)-epigallocatechin-3-gallate on maintaining the periodontal ligament cell viability of avulsed teeth: a preliminary study. J Periodontal Implant Sci, 41 (1), 10-6.

Karimbux NY ve Nishimura I, 1995. Temporal and spatial expressions of type XII collagen in the remodeling periodontal ligament during experimental tooth movement. J Dent Res, 74 (1), 313-8.

Karimbux NY, Rosenblum ND ve Nishimura I, 1992. Site-specific expression of collagen I and XII mRNAs in the rat periodontal ligament at two developmental stages. J Dent Res, 71 (7), 1355-62.

Khademi AA, Atbaee A, Razavi SM ve Shabanian M, 2008a. Periodontal healing of replanted dog teeth stored in milk and egg albumen. Dent Traumatol, 24 (5), 510-4.

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

Kinoshita S, Kojima R, Taguchi Y ve Noda T, 2002. Tooth replantation after traumatic avulsion: a report of ten cases. Dent Traumatol, 18 (3), 153-6.

Komori T, 2010. Regulation of bone development and extracellular matrix protein genes by RUNX2. Cell Tissue Res, 339 (1), 189-95.

Komori T, 2006. Regulation of osteoblast differentiation by transcription factors. J Cell Biochem, 99 (5), 1233-9.

Komori T, Yagi H, Nomura S, Yamaguchi A, Sasaki K, Deguchi K, Shimizu Y, Bronson RT, Gao YH, Inada M, Sato M, Okamoto R, Kitamura Y, Yoshiki S ve Kishimoto T, 1997. Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. Cell, 89 (5), 755-64.

Konstantonis D, Papadopoulou A, Makou M, Eliades T, Basdra EK ve Kletsas D, 2013. Senescent human periodontal ligament fibroblasts after replicative exhaustion or ionizing radiation have a decreased capacity towards osteoblastic differentiation. Biogerontology, 14 (6), 741-51.

Kook SH, Hwang JM, Park JS, Kim EM, Heo JS, Jeon YM ve Lee JC, 2009a. Mechanical force induces type I collagen expression in human periodontal ligament fibroblasts through activation of ERK/JNK and AP-1. J Cell Biochem, 106 (6), 1060-7.

Kook SH, Jang YS ve Lee JC, 2011. Human periodontal ligament fibroblasts stimulate osteoclastogenesis in response to compression force through TNF-alpha-mediated activation of CD4+ T cells. J Cell Biochem, 112 (10), 2891-901.

Kook SH, Son YO, Hwang JM, Kim EM, Lee CB, Jeon YM, Kim JG ve Lee JC, 2009b. Mechanical force inhibits osteoclastogenic potential of human periodontal ligament fibroblasts through OPG production and ERK-mediated signaling. J Cell Biochem, 106 (6), 1010-9.

Krasner P, 1992. Management of dental injuries. J Sch Nurs, 8 (4), 20, 22-3, 26-9.

Krasner P ve Person P, 1992. Preserving avulsed teeth for replantation. J Am Dent Assoc, 123 (11), 80-8.

Krasner P ve Rankow HJ, 1995. New philosophy for the treatment of avulsed teeth. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 79 (5), 616-23.

Layug ML, Barrett EJ ve Kenny DJ, 1998. Interim storage of avulsed permanent teeth. J Can Dent Assoc, 64 (5), 357-63, 365-9.

Lee JY ve Divaris K, 2009. Hidden consequences of dental trauma: the social and psychological effects. Pediatr Dent, 31 (2), 96-101.

Lekic P, Kenny D, Moe HK, Barretti E ve McCulloch CA, 1996a. Relationship of clonogenic capacity to plating efficiency and vital dye staining of human periodontal ligament cells: implications for tooth replantation. J Periodontal Res, 31 (4), 294-300.

Lekic P, Sodek J ve McCulloch CA, 1996b. Osteopontin and bone sialoprotein expression in regenerating rat periodontal ligament and alveolar bone. Anat Rec, 244 (1), 50-8.

Lekic PC, Kenny DJ ve Barrett EJ, 1998. The influence of storage conditions on the clonogenic capacity of periodontal ligament cells: implications for tooth replantation. Int Endod J, 31 (2), 137-40.

Lin DG, Kenny DJ, Barrett EJ, Lekic P ve McCulloch CA, 2000. Storage conditions of avulsed teeth affect the phenotype of cultured human periodontal ligament cells. J Periodontal Res, 35 (1), 42-50.

Lindroos B, Maenpaa K, Ylikomi T, Oja H, Suuronen R ve Miettinen S, 2008. Characterisation of human dental stem cells and buccal mucosa fibroblasts. Biochem Biophys Res Commun, 368 (2), 329-35.

Lindskog S ve Blomlof L, 1982. Influence of osmolality and composition of some storage media on human periodontal ligament cells. Acta Odontol Scand, 40 (6), 435-41.

Lossdorfer S, Gotz W ve Jager A, 2002. Immunohistochemical localization of receptor activator of nuclear factor kappaB (RANK) and its ligand (RANKL) in human deciduous teeth. Calcif Tissue Int, 71 (1), 45-52.

MacNeil RL, Berry JE, Strayhorn CL, Shigeyama Y ve Somerman MJ, 1998. Expression of type I and XII collagen during development of the periodontal ligament in the mouse. Arch Oral Biol, 43 (10), 779-87.

Malhotra N, 2011. Current developments in interim transport (storage) media in dentistry: an update. Br Dent J, 211 (1), 29-33.

Malhotra N, R. C ve S. A, 2010. <Clinical implications of storage media in dentistry.pdf>. ENDO (Long Engl), 4 (3), 179-188.

Marino TG, West LA, Liewehr FR, Mailhot JM, Buxton TB, Runner RR ve McPherson JC, 3rd, 2000. Determination of periodontal ligament cell viability in long shelf-life milk. J Endod, 26 (12), 699-702.

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

McCulloch CA ve Bordin S, 1991. Role of fibroblast subpopulations in periodontal physiology and pathology. J Periodontal Res, 26 (3 Pt 1), 144-54.

Miletic M, Mojsilovic S, Okic-Djordjevic I, Kukolj T, Jaukovic A, Santibacez JF, Jovcic G ve Bugarski D, 2014. Mesenchymal stem cells isolated from human periodontal ligament. Archives of Biological Sciences, 66 (1), 261-271.

Misra SB ve Toumba KJ, 2008. Case report: a combined avulsion and root fracture/avulsion trauma with ten years review. Eur Arch Paediatr Dent, 9 (3), 153-9.

Moazami F, Mirhadi H, Geramizadeh B ve Sahebi S, 2012. Comparison of soymilk, powdered milk, Hank's balanced salt solution and tap water on periodontal ligament cell survival. Dent Traumatol, 28 (2), 132-5.

Moradi Majd N, Zohrehei H, Darvish A, Homayouni H ve Adel M, 2014. Continued root formation after delayed replantation of an avulsed immature permanent tooth. Case Rep Dent, 2014 832637.

Moradian H, Badakhsh S, Rahimi M ve Hekmatfar S, 2013. Replantation of an avulsed maxillary incisor after 12 hours: three-year follow-up. Iran Endod J, 8 (1), 33-6.

Mori GG, Nunes DC, Castilho LR, de Moraes IG ve Poi WR, 2010. Propolis as storage media for avulsed teeth: microscopic and morphometric analysis in rats. Dent Traumatol, 26 (1), 80-5.

Murakami Y, Kojima T, Nagasawa T, Kobayashi H ve Ishikawa I, 2003. Novel isolation of alkaline phosphatase-positive subpopulation from periodontal ligament fibroblasts. J Periodontol, 74 (6), 780-6.

Nemoto T, Kajiya H, Tsuzuki T, Takahashi Y ve Okabe K, 2010. Differential induction of collagens by mechanical stress in human periodontal ligament cells. Arch Oral Biol, 55 (12), 981-7.

Nomura Y, Ishikawa M, Yashiro Y, Sanggarnjanavanich S, Yamaguchi T, Arai C, Noda K, Takano Y, Nakamura Y ve Hanada N, 2012. Human periodontal ligament fibroblasts are the optimal cell source for induced pluripotent stem cells. Histochem Cell Biol, 137 (6), 719-32.

Oh SP, Griffith CM, Hay ED ve Olsen BR, 1993. Tissue-specific expression of type XII collagen during mouse embryonic development. Dev Dyn, 196 (1), 37-46.

Patel S, Dumsha TC ve Sydiskis RJ, 1994. Determining periodontal ligament (PDL) cell vitality from exarticulated teeth stored in saline or milk using fluorescein diacetate. Int Endod J, 27 (1), 1-5.

Petrovic B, Markovic D, Peric T ve Blagojevic D, 2010. Factors related to treatment and outcomes of avulsed teeth. Dent Traumatol, 26 (1), 52-9.

Pettiette M, Hupp J, Mesaros S ve Trope M, 1997. Periodontal healing of extracted dogs' teeth air-dried for extended periods and soaked in various media. Endod Dent Traumatol, 13 (3), 113-8.

Pileggi R, Dumsha TC ve Nor JE, 2002. Assessment of post-traumatic PDL cells viability by a novel collagenase assay. Dent Traumatol, 18 (4), 186-9.

Pitaru S, Narayanan AS, Etikala A ve Treves-Manusevitz S, 2013. Periodontal Stem Cells: a Historical Background and Current Perspectives. Current Oral Health Reports, 1 (1), 26-33.

Pohl Y, Tekin U, Boll M, Filippi A ve Kirschner H, 1999. Investigations on a cell culture medium for storage and transportation of avulsed teeth. Aust Endod J, 25 (2), 70-5.

Poi WR, Sonoda CK, Martins CM, Melo ME, Pellizzer EP, de Mendonca MR ve Panzarini SR, 2013. Storage media for avulsed teeth: a literature review. Braz Dent J, 24 (5), 437-45.

Rajendran P, Varghese NO, Varughese JM ve Murugaian E, 2011. Evaluation, using extracted human teeth, of Ricetral as a storage medium for avulsions--an in vitro study. Dent Traumatol, 27 (3), 217-20.

Rani CS ve MacDougall M, 2000. Dental cells express factors that regulate bone resorption. Mol Cell Biol Res Commun, 3 (3), 145-52.

Reichenberger E, Baur S, Sukotjo C, Olsen BR, Karimbux NY ve Nishimura I, 2000. Collagen XII mutation disrupts matrix structure of periodontal ligament and skin. J Dent Res, 79 (12), 1962-8.

Roberts WE, Smith RK ve Cohen JA, 1982. Change in electrical potential within periodontal ligament of a tooth subjected to osteogenic loading. Prog Clin Biol Res, 101 527-34.

Rodríguez-Lozano FJ, Insausti CL, Iniesta F, Blanquer M, Ramírez MC, Meseguer L, Meseguer-Henarejos AB, Marín N, Martínez S ve Moraleda JM, 2012. Mesenchymal dental stem cells in regenerative dentistry. Medicina Oral Patología Oral y Cirugia Bucal, e1062-e1067.

Sachdev HP ve Bhargava SK, 1985. Oral rehydration therapy of neonates. Indian J Pediatr, 52 (418), 469-74.

Sakata M, Shiba H, Komatsuzawa H, Fujita T, Ohta K, Sugai M, Suginaka H ve Kurihara H, 1999. Expression of osteoprotegerin (osteoclastogenesis inhibitory factor) in cultures of human dental mesenchymal cells and epithelial cells. J Bone Miner Res, 14 (9), 1486-92.

Saxena P, Pant VA, Wadhwani KK, Kashyap MP, Gupta SK ve Pant AB, 2011. Potential of the propolis as storage medium to preserve the viability of cultured human periodontal ligament cells: an in vitro study. Dent Traumatol, 27 (2), 102-8.

Scanlon C, Marchesan J, Soehren S, Matsuo M ve Kapila Y, 2011. Capturing the regenerative potential of periodontal ligament fibroblasts. J Stem Cells Regen Med, 7 (1), 54-6.

Seo BM, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahim J, Young M, Robey PG, Wang CY ve Shi S, 2004. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. Lancet, 364 (9429), 149-55.

Shaw LM ve Olsen BR, 1991. FACIT collagens: diverse molecular bridges in extracellular matrices. Trends Biochem Sci, 16 (5), 191-4.

Sigalas E, Regan JD, Kramer PR, Witherspoon DE ve Opperman LA, 2004. Survival of human periodontal ligament cells in media proposed for transport of avulsed teeth. Dent Traumatol, 20 (1), 21-8.

Silva EJ, Rollemberg CB, Coutinho-Filho TS, Krebs RL ve Zaia AA, 2013a. Use of soymilk as a storage medium for avulsed teeth. Acta Odontol Scand, 71 (5), 1101-4.

Silva EJ, Rollemberg CB, de Souza Coutinho-Filho T ve Zaia AA, 2013b. A multiparametric assay to compare the cytotoxicity of soy milk with different storage media. Dent Traumatol, 29 (4), 319-22.

Soder PO, Otteskog P, Andreasen JO ve Modeer T, 1977. Effect of drying on viability of periodontal membrane. Scand J Dent Res, 85 (3), 164-8.

Souza BD, Luckemeyer DD, Felippe WT, Simoes CM ve Felippe MC, 2010. Effect of temperature and storage media on human periodontal ligament fibroblast viability. Dent Traumatol, 26 (3), 271-5.

Souza BD, Luckemeyer DD, Reyes-Carmona JF, Felippe WT, Simoes CM ve Felippe MC, 2011. Viability of human periodontal ligament fibroblasts in milk, Hank's balanced salt solution and coconut water as storage media. Int Endod J, 44 (2), 111-5.

Subramaniam P, Girija P, Eswara U ve Girish Babu KL, 2014. Oral rehydration salt-liquid as a storage medium for avulsed tooth. Dent Traumatol,

Tamaki Y, Nakahara T, Ishikawa H ve Sato S, 2013. In vitro analysis of mesenchymal stem cells derived from human teeth and bone marrow. Odontology, 101 (2), 121-32.

Terzioğlu G, Keskin A ve Demirel G, 2013. Measurement Methods of Cell Proliferation and a Comparison of

Various Commercial Proliferation Kits. Turkish Journal of Immunology 1(3), 74-89.

Thomas T, Gopikrishna V ve Kandaswamy D, 2008. Comparative evaluation of maintenance of cell viability of an experimental transport media "coconut water" with Hank's balanced salt solution and milk, for transportation of an avulsed tooth: An in vitro cell culture study. J Conserv Dent, 11 (1), 22-9.

Trope M, 2011. Avulsion of permanent teeth: theory to practice. Dent Traumatol, 27 (4), 281-94.

Trope M, 2002. Clinical management of the avulsed tooth: present strategies and future directions. Dent Traumatol, 18 (1), 1-11.

Trope M, 1998. Root resorption of dental and traumatic origin: classification based on etiology. Pract Periodontics Aesthet Dent, 10 (4), 515-22.

Trope M ve Friedman S, 1992. Periodontal healing of replanted dog teeth stored in Viaspan, milk and Hank's balanced salt solution. Endod Dent Traumatol, 8 (5), 183-8.

Tzigkounakis V, Merglova V, Hecova H ve Netolicky J, 2008. Retrospective clinical study of 90 avulsed permanent teeth in 58 children. Dent Traumatol, 24 (6), 598-602.

Udoye CI, Jafarzadeh H ve Abbott PV, 2012. Transport media for avulsed teeth: a review. Aust Endod J, 38 (3), 129-36.

Wang WJ, Zhao YM, Feng XY, Jia WQ ve Ge LH, 2013. Effect of skimmed pasteurized milk and Hank's balanced salt solution on viability and osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells. Dent Traumatol, 29 (5), 365-71.

Wattanaroonwong N, Schoenmaker T, de Vries TJ ve Everts V, 2011. Oestrogen inhibits osteoclast formation induced by periodontal ligament fibroblasts. Arch Oral Biol, 56 (3), 212-9.

Wise GE, Lumpkin SJ, Huang H ve Zhang Q, 2000. Osteoprotegerin and osteoclast differentiation factor in tooth eruption. J Dent Res, 79 (12), 1937-42.

Xu J, Wang W, Kapila Y, Lotz J ve Kapila S, 2009. Multiple differentiation capacity of STRO-1+/CD146+ PDL mesenchymal progenitor cells. Stem Cells Dev, 18 (3), 487-96.

Yamada H, Maeda T, Hanada K ve Takano Y, 1999. Re-innervation in the canine periodontal ligament of replanted teeth using an antibody to protein gene product 9.5: an immunohistochemical study. Endod Dent Traumatol, 15 (5), 221-34.

Yamamoto T, Ugawa Y, Yamashiro K, Shimoe M, Tomikawa K, Hongo S, Kochi S, Ideguchi H, Maeda H ve Takashiba S, 2014. Osteogenic differentiation regulated by Rho-kinase in periodontal ligament cells. Differentiation, 88 (2-3), 33-41.

Yan XZ, Both SK, Yang PS, Jansen JA, van den Beucken JJ ve Yang F, 2014. Human periodontal ligament derived progenitor cells: effect of STRO-1 cell sorting and Wnt3a treatment on cell behavior. Biomed Res Int, 2014 145423.

Yıldırım S. 2012. Dental Pulp Stem Cells. Springer, New York

Yildirim S, Balci D, Akpinar P ve Can A, 2012. Differentiation potentials of two stroma-resident tissue-specific stem cells. Niche Journal, 1 (1), 1-7.

Yildirim S, Yapar M, Sermet U, Sener K ve Kubar A, 2008. The role of dental pulp cells in resorption of deciduous teeth. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 105 (1), 113-20.

8. ÖZGEÇMİŞ

1986 yılında Mersin'de doğdu. İlk ve orta öğrenimini Mersin'de tamamladı. 2010 yılında Ankara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi' nden mezun oldu. 2011 yılında Selçuk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Pedodonti Anabilim Dalı'nda doktora eğitimine başladı ve halen aynı bölümde doktora öğrencisi olarak eğitimine devam etmektedir.