



TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
BEZMİÂLEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ  
DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ ENDODONTİ ANABİLİM DALI

**TROMBOSİTTEN ZENGİN FİBRİN İLE KOMBİNE EDİLMİŞ BORİK  
ASİDİN DENTAL PULPA KÖK HÜCRELERİNİN FARKLILAŞMASI VE  
CANLILIĞI ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

**UZMANLIK TEZİ**

**Gözde KOTAN**

**Tez danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Betül Aycan UYSAL**

**ŞUBAT- 2022**

TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ  
DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ ENDODONTİ ANABİLİM DALI

**TROMBOSİTTEN ZENGİN FİBRİN İLE KOMBİNE EDİLMİŞ BORİK  
ASİDİN DENTAL PULPA KÖK HÜCRELERİNİN FARKLILAŞMASI VE  
CANLILIĞI ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

**UZMANLIK TEZİ**

**Gözde KOTAN**

**Tez danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Betül Aycan UYSAL**

**ŞUBAT 2022**

#### TEZ ONAY FORMU

Kurum : Bezmialem Vakıf Üniversitesi  
Program Adı : Uzmanlık Eğitimi  
Anabilim Dalı : Endokrin Anabilim Dalı  
Tez Sahibi : Gürdal KOTAN  
Tez Başlığı : Transpoziten Tengin Fibrin ile kombine Edilmiş Borik Asidin Dental  
Pulp Kık Hücrelerin Farklılaşması ve Canlılığı Üzerine Etkisinin İncelenmesi  
Tez Sunum Tarihi : 09.02.2022

#### JÜRİ ÜYELERİ

#### İMZA

Üye (Danışman) : Dr. Öğr. Üyesi Betül Ayca Uysal  
Çalıştığı Kurum : Bezmialem Vakıf Üniversitesi  
Üye : Doç. Dr. Mehmet Burak GÜNEŞER  
Çalıştığı Kurum : Bezmialem Vakıf Üniversitesi  
Üye : Doç. Dr. Emre İslim  
Çalıştığı Kurum : Marmara Üniversitesi

#### YEDEK JÜRİ ÜYELERİ

Üye :  
Çalıştığı Kurum :  
Üye :  
Çalıştığı Kurum :

Bu tez, Tıpta ve Diş Hekimliğinde Uzmanlık Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıda belirtilen jüri üyeleri tarafından kabul / ret edilmiştir.

ANABİLİM DALI BAŞKANI

DEKAN

## TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca hekimlik mesleği ve hayata yaklaşımıyla bana örnek olan, bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, tezimin tüm aşamalarında desteğini esirgemeyen, sabır ve hoşgörüsüyle her zaman yanımda olan değerli hocam, tez danışmanım Dr Öğr. Üyesi Betül Aycan Uysal'a,

Uzmanlık eğitimim süresince tecrübe ve tavsiyeleriyle desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, sevgisini ve iyi niyetini her zaman hissettiğim değerli hocam Doç Dr. Mehmet Burak Güneşer'e,

Eğitimim süresince klinik ve akademik bilgilerini benimle paylaşan, değerli fikirleri, yol göstericiliği ve anlayışıyla bana özgüven veren sevgili hocam Doç. Dr. Asiye Nur Dinçer'e,

Uzmanlık eğitimim boyunca tecrübelerinden istifade ettiğim ve her zaman sorularımı hoşgörü ile cevaplayan hocalarım Uzm. Dt. Gamze Nalcı'ya, Dr. Fatma Kaplan'a ve Uzm. Dt. Fatma Begüm Peker'e,

Burada geçirdiğim günlerimi güzelleştiren arkadaşlarım Dt. Melike Özbek'e, Dt. Abdülkadir Tiftik'e ve Dt. Nurefşan Gürsoy'a,

Zor günlerimde destek ve sevgilerini her zaman hissettiğim, hep yanımda olan Dt. Çağrı Ceyli'ye, Uzm. Dt. Günay Mammadova'ya ve Dt. Fuad Sadıqlı'ya,

Sonsuz fedakarlıkları ile hayatımdaki en büyük şansım anneme ve babama,

İçtenlikle teşekkür ederim.

Ocak 2022

Gözde Kotan

Bu tez, Bezmialem Vakıf Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından 20200901 numaralı proje ile desteklenmiştir.

## **BEYAN**

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Gözde KOTAN



## İÇİNDEKİLER

|                                                                 | <u>Sayfa</u> |
|-----------------------------------------------------------------|--------------|
| TEŞEKKÜR .....                                                  | iv           |
| BEYAN . ....                                                    | v            |
| İÇİNDEKİLER .....                                               | vi           |
| KISALTMALAR . ....                                              | viii         |
| SEMBOLLER .....                                                 | ix           |
| TABLO LİSTESİ .....                                             | x            |
| ŞEKİL LİSTESİ.....                                              | xi           |
| ÖZET. ....                                                      | xii          |
| SUMMARY.....                                                    | xiv          |
| 1. GİRİŞ VE AMAÇ .....                                          | 1            |
| 2. GENEL BİLGİLER .....                                         | 3            |
| 2.1 Endodontide Rejeneratif Tedaviler.....                      | 3            |
| 2.2 Rejeneratif Endodontide Doku Mühendisliği .....             | 4            |
| 2.3 Kök hücreler.....                                           | 5            |
| 2.3.1 Kaynaklarına göre kök hücreler .....                      | 6            |
| 2.3.1.1 Embriyonik kök hücreler .....                           | 6            |
| 2.3.1.2 Erişkin kök hücreler.....                               | 6            |
| 2.3.2 Farklılaşma Kapasitelerine Göre Kök Hücreler .....        | 7            |
| 2.3.2.1 Totipotent Kök Hücreler .....                           | 7            |
| 2.3.2.2 Pluripotent Kök Hücreler .....                          | 7            |
| 2.3.2.3 Multipotent kök hücreler .....                          | 7            |
| 2.3.3 Mezenkimal kök hücreler (MKH) .....                       | 7            |
| 2.3.4 Dental doku kaynaklı mezenkimal kök hücreler .....        | 8            |
| 2.3.4.1 Dental pulpa mezenkimal kök hücresi .....               | 10           |
| 2.3.5 Dental pulpa kök hücresi eldesi ve karakterizasyonu ..... | 12           |
| 2.4 Doku İskeleleri .....                                       | 13           |
| 2.4.1 Doku İskelelerinin Sınıflandırılması .....                | 14           |
| 2.4.1.1 Kaynağına göre doku iskeleleri .....                    | 15           |
| 2.4.1.1.1 Biyolojik veya doğal iskeleler .....                  | 15           |
| 2.4.2 Otolog trombosit konsantreleri.....                       | 16           |
| 2.4.2.1 Trombositten zengin plazma (TZP) .....                  | 16           |
| 2.4.2.2 Trombositten zengin fibrin (TZF) .....                  | 17           |

|                                                                                                                          |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.4.2.3 Enjekte edilebilen trombosit zengin fibrin (I-PRF) .....                                                         | 19 |
| 2.5 Bor .....                                                                                                            | 22 |
| 2.5.1 Borik asit .....                                                                                                   | 22 |
| 2.5.2 İnsanlarda borun fizyolojik etkileri .....                                                                         | 23 |
| 2.5.3 Borun tıp ve diş hekimliği alanında önemi .....                                                                    | 24 |
| 2.6 Sitotoksikite ve Sitotoksikite Testleri .....                                                                        | 25 |
| 2.6.1 Sitotoksikite sonuçlarının değerlendirilmesi .....                                                                 | 26 |
| 2.6.1.1 Canlılığı değerlendiren testler .....                                                                            | 26 |
| 2.6.1.2 Yaşamı değerlendiren testler .....                                                                               | 27 |
| 2.6.1.3 Proliferasyon değerlendiren testler .....                                                                        | 27 |
| 2.6.1.4 Metabolizma değerlendiren testler .....                                                                          | 27 |
| 2.7 Hücre Ölüm Tipleri: Apoptoz, Nekroz .....                                                                            | 27 |
| 2.7.1 Apoptozun saptanmasında kullanılan yöntemler ve akım sitometri .....                                               | 28 |
| 2.8 Akım sitometri yöntemi .....                                                                                         | 30 |
| 3.GEREÇ VE YÖNTEM .....                                                                                                  | 32 |
| 3.1. Deney Gruplarının Belirlenmesi .....                                                                                | 32 |
| 3.2 Tam Gömük Yirmi Yaş Dişinin Temini .....                                                                             | 32 |
| 3.3. Hücre Kültürü, DP-MKH'in İzolasyonu ve Karakterizasyonu .....                                                       | 33 |
| 3.3.1. Tam Gömük Yirmi Yaş Diş Pulpası Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin İzolasyonu .....                               | 33 |
| 3.3.2. İzole edilen DP-MKH'lerin pasajlanması .....                                                                      | 36 |
| 3.3.3 İzole edilen DP-MKH'in sayımı.....                                                                                 | 37 |
| 3.3.4 İzole edilen DP-MKH'in osteojenik, kondrojenik ve adipojenik olarak farklılaşma kapasitelerinin belirlenmesi ..... | 37 |
| 3.3.5 DP-MKH karakterizasyonu ve akım sitometri .....                                                                    | 40 |
| 3.4. Materyal Örneklerinin Hazırlanması .....                                                                            | 41 |
| 3.4.1. Borik asit solüsyonu hazırlanması .....                                                                           | 41 |
| 3.4.2. I-PRF'in hazırlanması .....                                                                                       | 41 |
| 3.5. DP-MKH'lerin Kuyucuklu Plaklara Ekilmesi ve Materyallerin Uygulanması .....                                         | 42 |
| 3.6 Canlılık Değerlendirme Testlerinin Uygulanması ve Değerlendirilmesi....                                              | 44 |
| 3.6.1 Canlılık değerlendirme testlerinin uygulanma yöntemi.....                                                          | 44 |
| 3.6.2 DP-MKH'leri canlılığının akım sitometri ile analiz edilmesi .....                                                  | 44 |
| 3.7 DP-MKH'nin Odontojenik Farklılaştırılması .....                                                                      | 45 |
| 3.8 İstatistiksel Analiz Yöntemi .....                                                                                   | 46 |

|                                                                                                                                                     |            |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>4.BULGULAR .....</b>                                                                                                                             | <b>48</b>  |
| <b>4.1. Gömük Yirmi Yaş Dışından Elde Edilen Pulpadan Dental Pulpa Mezenkimal Kök Hücrelerin İzolasyonu ve Pasajlanması.....</b>                    | <b>48</b>  |
| <b>4.2 İzole Edilen DP-MKH Adipojenik Kondrojenik ve Osteojenik Farklılaşma Kapasitelerinin ve Hücre Marker Ekspresyonlarının Belirlenmesi.....</b> | <b>49</b>  |
| <b>4.2.1 DP-MKH Osteojenik Farklılaşma Kapasitelerinin Belirlenmesi .....</b>                                                                       | <b>49</b>  |
| <b>4.2.2 DP-MKH Kondrojenik Farklılaşma Kapasitelerinin Belirlenmesi.....</b>                                                                       | <b>50</b>  |
| <b>4.2.3 DP-MKH Adipojenik Farklılaşma Kapasitelerinin Belirlenmesi.....</b>                                                                        | <b>51</b>  |
| <b>4.2.4. DP-MKH Marker Ekspresyonlarının Belirlenmesi.....</b>                                                                                     | <b>51</b>  |
| <b>4.3. Materyallerin DP-MKH Canlılığı Üzerine Etkilerinin 24. 48. ve 72. Saat Sonunda Sonunda Değerlendirilmesi .....</b>                          | <b>52</b>  |
| <b>4.3.1. Dental Pulpa Mezenkimal Kök Hücrelerin Akım Sitometri ile Analizine ait Bulgular .....</b>                                                | <b>52</b>  |
| <b>4.3.1.1 Akım Sitometri Analizinde Canlı Hücre Bulgularının Değerlendirilmesi .....</b>                                                           | <b>56</b>  |
| <b>4.3.1.2 Akım Sitometri Analizinde Erken Apoptotik Hücre Bulgularının Değerlendirilmesi .....</b>                                                 | <b>61</b>  |
| <b>4.3.1.3. Akım Sitometri Analizinde Geç Apoptotik Hücre Bulgularının Değerlendirilmesi .....</b>                                                  | <b>66</b>  |
| <b>4.3.1.4 Akım Sitometri Analizinde Nekrotik Hücre Bulgularının Değerlendirilmesi .....</b>                                                        | <b>71</b>  |
| <b>4.3.1.5 Akım Sitometri Analizinde Ölü Hücre Bulgularının Değerlendirilmesi.....</b>                                                              | <b>75</b>  |
| <b>4.4 DP- MKH Odontojenik Farklılaşma Bulgularının Değerlendirilmesi .....</b>                                                                     | <b>80</b>  |
| <b>TARTIŞMA .....</b>                                                                                                                               | <b>87</b>  |
| <b>SONUÇ VE ÖNERİLER .....</b>                                                                                                                      | <b>95</b>  |
| <b>KAYNAKÇA .....</b>                                                                                                                               | <b>96</b>  |
| <b>EKLER .....</b>                                                                                                                                  | <b>114</b> |

## KISALTMALAR

|               |                                                       |
|---------------|-------------------------------------------------------|
| <b>MTA</b>    | : Mineral Trioksit Agregat                            |
| <b>TZP</b>    | : Trombositten Zengin Plazma                          |
| <b>TZF</b>    | : Trombositten Zengin Fibrin                          |
| <b>I-PRF</b>  | : Enjekte Edilebilir Trombositten Zengin Fibrin       |
| <b>DP-MKH</b> | : Dental Pulpa Mezenkimal Kök Hücresi                 |
| <b>MKH</b>    | : Mezenkimal Kök Hücreler                             |
| <b>AAE</b>    | : Amerikan Endodonti Birliği                          |
| <b>ESE</b>    | : Avrupa Endodonti Derneği                            |
| <b>MHK</b>    | : Mezenkimal Kök Hücre                                |
| <b>KİKH</b>   | : Kemik İliği Kök Hücreleri                           |
| <b>PBS</b>    | : Fosfat Tamponlu Salin                               |
| <b>DPBS</b>   | : Dulbecco'nun Fosfat Tamponlu Salini                 |
| <b>EDTA</b>   | : Etilen Diamin Tetraasetik Asit                      |
| <b>LAF</b>    | : Laminar Flow                                        |
| <b>İAS</b>    | : İnferior alveolar sinir                             |
| <b>PCR</b>    | : Polimeraz Zincir Reaksiyonu                         |
| <b>I-PRF</b>  | : Enjekte edilebilir trombositten zengin fibrin       |
| <b>ESE</b>    | : Avrupa Endodonti Derneği                            |
| <b>NADP</b>   | : Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat               |
| <b>NAD+</b>   | : Nikotinamid adenin dinükleotit                      |
| <b>Ort</b>    | : Ortalama                                            |
| <b>SS</b>     | : Standart sapma                                      |
| <b>DPSCs</b>  | : Dental Pulp Stem Cells (Dental pulpa kök hücreleri) |
| <b>SCAPs</b>  | : Apikal papilla kök hücreleri                        |
| <b>SHEDs</b>  | : İnsan süt dişlerinden elde edilen kök hücreler      |
| <b>PDLSCs</b> | : Periodontal ligament kök hücreleri                  |
| <b>DFSCs</b>  | : Dental folikül progenitör kök hücreleri             |
| <b>TGF-</b>   | : Dönüştürücü büyüme faktörü                          |
| <b>BMP</b>    | : Kemik Morfogenetik Proteinleri                      |
| <b>ECMD</b>   | : Hücre dışı matris yatağı                            |
| <b>PDGF</b>   | : Trombosit kaynaklı büyüme faktörü,                  |
| <b>TGF</b>    | : Dönüştürücü büyüme faktörü                          |
| <b>VEGF</b>   | : Vasküler endotelyal büyüme faktörü                  |
| <b>EGF</b>    | : Epitelyal büyüme faktörü                            |
| <b>IGF-1</b>  | : İnsülin benzeri büyüme faktörü                      |
| <b>L-PRP</b>  | : Lökosit ve trombositten zengin plazma               |
| <b>L-PRF</b>  | : Lökosit ve trombositten zengin fibrin               |
| <b>CGF</b>    | : Konsantre büyüme faktörü                            |

## TABLO LİSTESİ

### Sayfa

|                                                                                                                                 |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tablo 2.1</b> : Doku iskeleleri sınıflandırması.....                                                                         | 14 |
| <b>Tablo 3.1</b> :Çalışma planı .....                                                                                           | 32 |
| <b>Tablo 4.1</b> : Zaman ve gruplara göre canlı hücre değerlerinin karşılaştırılması .....                                      | 56 |
| <b>Tablo 4.2</b> : Farklı deney sürelerinde ve ortamlarında saptanan canlı hücre değerlerinin karşılaştırılması .....           | 57 |
| <b>Tablo 4.3.</b> : Zaman ve gruplara göre erken apoptoz değerlerinin karşılaştırılması...                                      | 62 |
| <b>Tablo 4.4</b> : Farklı deney sürelerinde ve ortamlarında saptanan erken apoptotik hücre değerlerinin karşılaştırılması ..... | 63 |
| <b>Tablo 4.5</b> :Zaman ve gruplara göre geç apoptoz değerlerinin karşılaştırılması .....                                       | 66 |
| <b>Tablo 4.6</b> :Farklı deney sürelerinde ve ortamlarında saptanan geç apoptotik hücre değerlerinin karşılaştırılması .....    | 67 |
| <b>Tablo 4.7</b> : Zaman ve gruplara göre nekrotik hücre değerlerinin karşılaştırılması....                                     | 71 |
| <b>Tablo 4.8</b> :Farklı deney sürelerinde ve ortamlarında saptanan nekrotik hücre değerlerinin karşılaştırılması .....         | 72 |
| <b>Tablo 4.9</b> : Zaman ve gruplara göre ölü hücre değerlerinin karşılaştırılması.....                                         | 76 |
| <b>Tablo 4.10:</b> Farklı deney sürelerinde ve ortamlarında saptanan ölü hücre değerlerinin karşılaştırılması .....             | 76 |

## ŞEKİL LİSTESİ

### Sayfa

|                                                                                                                                                           |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 2.1 : RET yaklaşımlarının şematik gösterimi .....                                                                                                   | 5  |
| Şekil 2.2 : Dental doku kaynaklı mezenkimal hücrelerin şematik gösterimi.....                                                                             | 9  |
| Şekil 2.3 : Toplanan kanın santrifüjü sonucu oluşan katmanlar .....                                                                                       | 19 |
| Şekil 2.4 : Enjekte edilebilir trombosit zengin fibrin hazırlanması.....                                                                                  | 21 |
| Şekil 2.5 : Anneksin V ve PI boya ile erken, geç apoptotik/nekroz ve canlı hücrelerin boyanması .....                                                     | 30 |
| Şekil 3.1 : Cerrahi operasyonla alınmış tam gömük 38 numaralı dişin panoramik radyografi görüntüsü .....                                                  | 33 |
| Şekil 3.2 : Laminar akışlı steril kabin.....                                                                                                              | 34 |
| Şekil 3.3 : Yirmi yaş dişinden pulpa dokusunun elde edilmesi.....                                                                                         | 34 |
| Şekil 3.4 : Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM).....                                                                                                  | 35 |
| Şekil 3.5 : Santrifüj cihazı .....                                                                                                                        | 36 |
| Şekil 3.6 : Kültür kabına yerleştirilen hücreler.....                                                                                                     | 36 |
| Şekil 3.7 : İnkübatör .....                                                                                                                               | 36 |
| Şekil 3.8 : Işık mikroskobu .....                                                                                                                         | 37 |
| Şekil 3.9 : Osteojenik farklılaştırma deney düzeneği .....                                                                                                | 39 |
| Şekil 3.10 : Kondrojenik farklılaştırma deney düzeneği .....                                                                                              | 40 |
| Şekil 3.11 : Adipojenik farklılaştırma deney düzeneği .....                                                                                               | 40 |
| Şekil 3.12 : Borik asit solüsyonunun filtreden geçirilmesi .....                                                                                          | 42 |
| Şekil 3.13 : I-PRF ile karıştırılmış DMEM ortamının 6 kuyucuklu plakada görüntüsü .....                                                                   | 43 |
| Şekil 3.14 : Hücre ekimi için plak hazırlanışı .....                                                                                                      | 44 |
| Şekil 3.15 : Çalışma gruplarına göre DP-MKH'ler üzerine uygulanması için hazırlanan besiyerleri .....                                                     | 44 |
| Şekil 3.16 : Akım sitometri cihazı .....                                                                                                                  | 46 |
| Şekil 3.17 : Odontojenik farklılaştırma deney düzeneği .....                                                                                              | 47 |
| Şekil 4.1 : P1 DP-MKH invert mikroskop görüntüsü, 10x büyütme .....                                                                                       | 48 |
| Şekil 4.2 : P2 DP-MKH invert mikroskop konfluent görüntüsü.....                                                                                           | 49 |
| Şekil 4.3 : Dental pulpa mezenkimal kök hücrelerin osteojenik farklılaşma potansiyelinin Alizarin Red boyama ile saptanması. ....                         | 50 |
| Şekil 4.4 : Dental pulpa mezenkimal kök hücrelerin kondrojenik farklılaşma potansiyelinin Alcian blue boyama ile saptanması .....                         | 50 |
| Şekil 4.5 : Dental pulpa mezenkimal kök hücrelerin adipojenik farklılaşma potansiyelinin Oil Red O boyama ile saptanması .....                            | 51 |
| Şekil 4.6 : P3 Dental pulpa mezenkimal kök hücrelerin akım sitometri analizi ile mezenkimal kök hücre pozitif ve negatif markerlerinin belirlenmesi ..... | 52 |
| Şekil 4.7 : Hücre kontrol ve materyal test gruplarının 24. saate ilişkin akım sitometri grafiği örneği .....                                              | 53 |
| Şekil 4.8 : Hücre kontrol ve materyal test gruplarının 48. saate ilişkin akım sitometri grafiği örneği .....                                              | 54 |
| Şekil 4.9 : Hücre kontrol ve materyal test gruplarının 72. saate ilişkin akım sitometri grafiği örneği .....                                              | 55 |
| Şekil 4.10 : Zaman ve gruplar göre canlı hücre değerlerinin karşılaştırılması.....                                                                        | 58 |
| Şekil 4.11 : 24. saat için gruplar arasında canlı hücre değerlerinin karşılaştırılması...                                                                 | 59 |
| Şekil 4.12 : 48. saat için gruplar arasında canlı hücre değerlerinin karşılaştırılması...                                                                 | 60 |

|                     |                                                                                                                                                   |    |
|---------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Şekil 4.13 :</b> | 72. saat için gruplar arasında canlı hücre değerlerinin karşılaştırılması..                                                                       | 61 |
| <b>Şekil 4.14 :</b> | Zaman ve gruplar göre erken apoptotik hücre değerlerinin karşılaştırılması .....                                                                  | 64 |
| <b>Şekil 4.15 :</b> | 24. saat için gruplar arasında erken apoptotik hücre değerlerinin karşılaştırılması .....                                                         | 64 |
| <b>Şekil 4.16 :</b> | 48. saat için gruplar arasında erken apoptotik hücre değerlerinin karşılaştırılması .....                                                         | 65 |
| <b>Şekil 4.17 :</b> | 72. saat için gruplar arasında erken apoptotik hücre değerlerinin karşılaştırılması .....                                                         | 66 |
| <b>Şekil 4.18 :</b> | Zaman ve gruplar göre geç apoptotik hücre değerlerinin karşılaştırılması.....                                                                     | 68 |
| <b>Şekil 4.19 :</b> | 24. saat için gruplar arasında geç apoptotik hücre değerlerinin karşılaştırılması .....                                                           | 69 |
| <b>Şekil 4.20 :</b> | 48. saat için gruplar arasında geç apoptotik hücre değerlerinin karşılaştırılması .....                                                           | 70 |
| <b>Şekil 4.21 :</b> | 72. saat için gruplar arasında geç apoptotik hücre değerlerinin karşılaştırılması .....                                                           | 71 |
| <b>Şekil 4.22 :</b> | Zaman ve gruplar göre nekrotik hücre değerlerinin karşılaştırılması.....                                                                          | 73 |
| <b>Şekil 4.23 :</b> | 24. saat için gruplar arasında nekrotik hücre değerlerinin karşılaştırılması.....                                                                 | 74 |
| <b>Şekil 4.24 :</b> | 48. saat için gruplar arasında nekrotik hücre değerlerinin karşılaştırılması.....                                                                 | 74 |
| <b>Şekil 4.25 :</b> | 72. saat için gruplar arasında nekrotik hücre değerlerinin karşılaştırılması.....                                                                 | 75 |
| <b>Şekil 4.26 :</b> | Zaman ve gruplar göre ölü hücre değerlerinin karşılaştırılması.....                                                                               | 77 |
| <b>Şekil 4.27 :</b> | 24. saat için gruplar arasında ölü hücre değerlerinin karşılaştırılması.....                                                                      | 78 |
| <b>Şekil 4.28 :</b> | 48. saat için gruplar arasında ölü hücre değerlerinin karşılaştırılması....                                                                       | 79 |
| <b>Şekil 4.29 :</b> | 72. saat için gruplar arasında ölü hücre değerlerinin karşılaştırılması....                                                                       | 80 |
| <b>Şekil 4.30 :</b> | DMEM kontrol grubundaki DP-MKH'nin (G1) odontojenik farklılaşma ortamına bırakıldıktan sonraki ALR boyama görüntüleri.....                        | 81 |
| <b>Şekil 4.31 :</b> | G1 grubu ALR boyama öncesi görüntüsü (10X).....                                                                                                   | 81 |
| <b>Şekil 4.32 :</b> | DMEM ve I-PRF grubundaki DP-MKH'nin (G2) odontojenik farklılaşma ortamına bırakıldıktan sonraki ALR boyama görüntüleri.....                       | 82 |
| <b>Şekil 4.33 :</b> | G2 grubu ALR boyama öncesi görüntüsü.....                                                                                                         | 83 |
| <b>Şekil 4.34 :</b> | DMEM ve borik asit grubundaki DP-MKH'nin (G3) odontojenik farklılaşma ortamına bırakıldıktan sonraki ALR boyama görüntüleri .....                 | 83 |
| <b>Şekil 4.35 :</b> | G3 grubu ALR boyama öncesi görüntüsü.....                                                                                                         | 84 |
| <b>Şekil 4.36 :</b> | DMEM, I-PRF ve BA grubundaki DP-MKH'nin (G4) odontojenik farklılaşma ortamına bırakıldıktan sonraki ALR boyama görüntüleri .....                  | 85 |
| <b>Şekil 4.37 :</b> | G4 grubu ALR boyama öncesi görüntüsü.....                                                                                                         | 85 |
| <b>Şekil 4.38 :</b> | Odontojenik farklılaşma ortamında kültüre edilen tüm deney grubu hücrelerinin 21 gün sonunda ALR ile boyanmadan önce ve sonraki görüntüleri ..... | 86 |

# **TROMBOSİTTEN ZENGİN FİBRİN İLE KOMBİNE EDİLMİŞ BORİK ASİDİN DENTAL PULPA KÖK HÜCRELERİNİN FARKLILAŞMASI VE CANLILIĞI ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

## **ÖZET**

Bu tez çalışmasının amacı enjekte edilebilir trombosit zengin fibrin ile kombine kullanılan borun insan pulpa hücreleri üzerine sitotoksik etkisinin ve odontojenik farklılaşmaya olan etkisinin karşılaştırmalı olarak in vitro koşullarda incelenmesi ve bu ürünlerin rejeneratif endodonti için potansiyel bir materyal olarak kullanılabilirliğinin değerlendirilmesidir.

Çalışmamızda kullanılan dental pulpa mezenkimal kök hücresi 19-25 yaş aralığında bulunan bireylerin çekim endikasyonu konulmuş gömük üçüncü büyük azı dişlerinden elde edilmiştir. 3. pasaja getirilen dental pulpa mezenkimal kök hücrelerine hem canlılık hem de odontojenik farklılaşma değerlendirmesi için yalnız enjekte edilebilir trombosit zengin fibrin (I-PRF), yalnız 1  $\mu$ M derişimde borik asit ve I-PRF ile borik asitin kombinasyonu hazırlanarak direkt temas yöntemiyle uygulanmıştır. Tüm materyallerin 24., 48. ve 72. saatlerdeki sitotoksik etkileri Anneksin V ve Propidium iyodür (PI) ile hücreler boyanarak canlı hücre, nekrotik hücre, erken ve geç apoptoza uğramış hücreler akım sitometri ile analiz edilmiştir. Elde edilen bulgular Minitab 17 ile istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Odontojenik farklılaşma değerlendirmesi için odontojenik besi ortamında bekletilen hücrelere alizarin red boyama protokolü uygulanarak inceleme yapılmıştır. Akım sitometri değerleri karşılaştırılmasında iki yönlü varyans analizi kullanılmış ve çoklu karşılaştırmalar Tukey HSD Testi ile yapılmıştır.

Veriler değerlendirildiğinde canlı hücre bulguları açısından I-PRF uygulanan grup en yüksek ortalama canlı hücre değerine sahiptir. Erken apoptoz bulguları açısından ise gruplar arasında anlamlı bir farklılık görülmemiştir ( $p > 0,05$ ). Geç apoptoz bulguları açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık vardır ve en düşük geç apoptotik hücre değeri I-PRF grubuna aittir. ( $p < 0,001$ ). Nekrotik hücre bulguları açısından ise borik asit en düşük nekrotik hücre değerine sahip olup gruplar arasında anlamlı bir farklılık görülmemiştir ( $p > 0,05$ ). Alizarin red boyama sonrası niteliksel inceleme sonucu en yüksek kalsifiye nodül oluşumu ve dağılımı I-PRF ile kombine borik asit grubunda gözlemlenmiştir. Bu çalışmada I-PRF ve borik asidin biyouyumluluk ve odontojenik farklılaşma açısından etkinliği gösterilmiş olup, diş doku mühendisliğinde kullanım potansiyelini daha fazla araştırmak için ilave hayvan ve klinik çalışmalar gereklidir.

**Anahtar Kelimeler:** Trombosit Zengin Fibrin, Borik asit, İnsan dental pulpa kök hücresi, Anneksin V testi

# INVESTIGATION OF THE EFFECT OF BORIC ACID COMBINED WITH PLATELET RICH FIBRIN ON THE DIFFERENCE AND VITALITY OF DENTAL PULP STEM CELLS

## SUMMARY

The aim of this study was to evaluate the biocompatibility and compare the potential in vitro cytotoxic effects of boric acid and injectable platelet-rich fibrin on human dental pulp stem cells (DPSCs) and their effects on odontogenic differentiation of DPSCs for dental tissue engineering.

Human dental pulp tissue were isolated from extracted impacted third molars from healthy adult patients aged from 18 to 25 years. Injectable platelet-rich fibrin (I-PRF), 1  $\mu$ M concentration of boric acid and a combination of them were prepared and applied to the cells by direct contact method. The viability of the stimulated cells with experimental material and DMEM control group were evaluated on the flow cytometry device with Annexin-V and Propidium iodide at the end of the 24th, 48th and 72nd hours. To evaluate the odontogenic differentiation capacity of both cells, Alizarin-red (ALR) staining were performed. Two-way analysis of variance was used to compare flow cytometry values, and multiple comparisons were made with the Tukey HSD Test.

When the data were evaluated, I-PRF group had the highest mean live cell value in terms of viable cell viability. In terms of cell viability findings, there is a statistically significant differences were noted between the sampled hours ( $p > 0.05$ ). There was no significant difference between the groups in terms of early apoptosis findings ( $p > 0.05$ ). There is a statistically significant difference between the groups in terms of late apoptosis findings and the lowest late apoptotic cell value belongs to the I-PRF group. ( $p < 0.05$ ). In terms of necrotic cell findings, boric acid had the lowest necrotic cell value and no significant difference was observed between the groups ( $p > 0.05$ ). The best odontogenic differentiation potential on DPSCs was determined in the group combined with boric acid and I-PRF.

In this study, I-PRF and boric acid were demonstrated for biocompatibility and odontogenic differentiation, and additional animal and clinical studies are required to further explore their potential for use in dental tissue engineering.

**Keywords:** Injectable platelet rich fibrin, Boric acid, Human dental pulp stem cell, Annexin V

## 1. GİRİŞ ve AMAÇ

Kök gelişimi sırasında, immatur dişlerin pulpasında; diş travması, dental anomaliler veya çürük nedeniyle enflamasyon oluşabilir ve diş pulpası nekrotik hale gelebilir [1, 2]. Pulpa nekrotik hale geldiğinde kök gelişimi durmakta, uzun vadede diş nispeten zayıf kalarak yüksek kök kırığı riski ile karşı karşıya kalabilmektedir. Bu dişlerin sahip olduğu ince ve kırılğan dentin duvarları, geniş kök kanalları ve apikal açıklık nedeniyle endodontik tedavi uygulamaları güçleşmektedir [3]. Nekrotik pulpalı veya apikal periodontitisli immatur kalıcı dişlerin tedavisinde, geleneksel olarak apikal bölgede sert doku bariyeri oluşumunu indüklemek için kalsiyum hidroksitin kullanıldığı apeksifikasyon prosedürleri, kök kanal dolgusundan önce apikal bölgede Mineral Trioksit Agregat (MTA) ile bariyer oluşturulması gibi yöntemler veya rejeneratif endodontik tedavi seçenekleri tercih edilmektedir [4, 5].

Rejeneratif tıp ve doku mühendisliği alanında son dönemlerde yaşanan hızlı gelişmeler; tıp dallarında olduğu kadar, diş hekimliğinde de rejeneratif uygulamaların gündeme gelmesine ve büyük ilgi görmesine sebep olmuştur. Hermann tarafından 1952 yılında uygulanan vital amputasyon tedavisi ile başlayan diş hekimliğinde rejeneratif uygulamalar son yirmi yılda hızla gelişmekte ve klinik endodontide yaygın olarak kullanılmaktadır [6, 7]. Rejeneratif endodontik uygulamalarda amaç; pulpa-dentin kompleksinin, çürük veya diğer nedenlerle açığa çıkmış olan koronal dentin dokusunun, rezorbe olmuş apikal kök dentininin ya da servikal dentinin yenilenmesidir [8].

Zarar görmüş doku ve organların tekrar oluşumunu hedefleyen rejeneratif tıp gelişmelerinde olduğu gibi rejeneratif endodontinin de temeli doku mühendisliğine dayanmaktadır. Dental pulpa rejenerasyonu için klasik doku mühendisliği kavramı, kök hücreler, doku iskeleleri ve büyüme faktörleri olmak üzere üç temel faktöre dayanmaktadır [9, 10]. Doku iskeleleri, üç boyutlu olarak hücrelere fiziksel bir destek sağlamak, hücre-hücre etkileşimlerini organize etmek, hücrelerin yapışması, göçü, çoğalması, farklılaşması için çeşitli biyokimyasal ve biyofiziksel uyarılar oluşturmak gibi görevleri yerine getirmektedir [11, 12]. Kök hücreler ise vücudumuzda bütün dokuları ve organları oluşturan ana hücrelerdir. Henüz farklılaşmamış olan bu hücreler

bölünebilme ve kendini yenileme, doku ve organlara dönüşebilme yeteneğine sahiptirler [13].

Kan konsantreleri tıp ve diş hekimliği alanında uzun zamandır çok çeşitli ürünler olarak kullanılmaktadır. 1954 yılında Kingsley tarafından geliştirilen trombosit zengin plazma (TZP) birinci nesil trombosit konsantresidir [14]. Birinci nesil TZP'nin dezavantajları nedeniyle, cam kaplı tüpte kanın herhangi bir antikoagülan ilavesi yapılmadan santrifüj edilmesiyle elde edilen ikinci nesil kan ürünü trombosit zengin fibrin (TZF) geliştirilmiştir [15]. Daha sonra tüpün tipi, santrifüj döngüsü ve süresi değiştirilerek çeşitli TZF malzemeleri ortaya çıkmıştır [16]. Düşük hızlı santrifüj konseptine göre üretilen trombosit zengin fibrin tiplerinin, inflamatuvar hücre sayısını ve büyüme faktörü salınımını önemli ölçüde arttırdığı ve bu nedenle rejeneratif potansiyellerinin yüksek olduğu bildirilmiştir [17, 18]. 2017 yılında tek başına veya çeşitli biyomalzemeler ile kolayca kombine edilebilen, sıvı formülasyonu ile hekime kullanım kolaylığı sağlayan enjekte edilebilir bir trombosit konsantresi olan I-PRF geliştirilmiştir [19]. Son yıllarda trombosit zengin fibrin ürünlerinin dental kaynaklı kök hücreler üzerine rejeneratif potansiyellerini değerlendirmeye yönelik ilgide artış olmuştur [20-22].

Dünyadaki en büyük rezervlerinden biri Türkiye olan bor elementinin birçok metabolik yolda görev aldığı ve kemik metabolizması üzerine önemli bir etkisinin olduğu bilinmektedir [23, 24]. Ayrıca, insan dental pulpa mezenkimal kök hücresinin (DP-MKH) osteojenik ve odontojenik hücre tiplerine farklılaşmasında da başarılı sonuçlar ortaya koyduğu gösterilmiştir [25]. Yapılan literatür taraması sonucunda bor materyalinin hücreler üzerine etkisinin araştırıldığı çok az sayıda çalışma bulunduğu görülmüştür [26-28]. İlgili literatürde enjekte edilebilir trombosit zengin fibrin (I-PRF) ile kombine bor materyalinin DP-MKH üzerine olan etkilerine ilişkin bir veriye rastlanmamıştır.

Bu tez çalışmasının amacı, DP-MKH üzerinde I-PRF ve borik asidin 24., 48. ve 72. saatlerdeki sitotoksik etkisinin ve hücrelerin odontojenik farklılaşmasına olan etkisinin karşılaştırmalı olarak *in vitro* koşullarda incelenmesi ve bu ürünlerin rejeneratif endodonti için potansiyel bir materyal olarak kullanılabilirliğinin değerlendirilmesidir. Konu ile ilgili literatür bilgileri, bu tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen çalışmalar ve elde edilen sonuçlar devam eden bölümlerde sunulmuştur.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1 Endodontide Rejeneratif Tedaviler

Yüksek oranda mineralize yapılar arasındaki tek yumuşak bağ dokusu olan ve diş canlılık özelliği kazandıran pulpa, dişlerin homeostazını sağlamada vazgeçilmez bir rol oynamaktadır [29]. Dental pulpa dokusu, diş gelişimi, beslenme temini, dentin mineralizasyonu, duysal ve immün yanıt işlevlerini yerine getiren pulpa-dentin kompleksi olarak çalışmaktadır [30]. Ancak pulpa, çeşitli çevresel irritanlardan kaynaklanan travmalara ve enfeksiyonlara karşı savunmasızdır ve kendi kendini onarma kapasitesi sınırlıdır, bu durum geri dönüşü olmayan pulpitis veya nekroza ve dentinogenezin kesintiye uğramasına neden olabilmektedir [31].

İltihaplı veya nekrotik pulpa dokusunun yapay dolgu materyalleri ile değiştirilmesine dayanan bir prosedür olan kök kanal tedavisi veya kök ucunda mineralize bir doku bariyeri oluşturularak apikal kapanmanın sağlandığı yöntem olarak tanımlanan apeksifikasyon tedavileri bugüne kadar pulpa nekrozu için en kabul edilebilir tedavi yöntemleri olmuştur [32]. Bununla birlikte, bu geleneksel tedavilerde, hasarlı pulpanın canlılığını geri kazanması veya nörovasküler sistemin yeniden oluşması söz konusu değildir [33, 34]. Özellikle immatür daimi dişler için vital pulpa varlığında yapımı devam eden reperatif dentin oluşumu, apikal gelişim ve dentin duvarlarının gelişimi sebebiyle oldukça önemlidir. Nekrotik pulpalı kök gelişimini tamamlanmamış daimi dişlerin kök kanal tedavisi belirsiz prognoz, ince dentin duvarlarına bağlı kırık riski ve apeksin oldukça geniş olması nedeniyle tedavi protokolleri oldukça güç olmaktadır [35, 36]. Diş hekimliğinde rejeneratif endodontik prosedürlerin rutin tedavi uygulamaları arasına girmesi için güncel prosedür ve protokoller geliştirmeye yönelik ilgide bu nedenle artış görülmektedir ve rejeneratif endodontik tedavi (RET) klasik kök apeksifikasyonuna rasyonel bir alternatif haline gelmektedir [12, 37]. Kök kanal tedavisinden farklı olarak, RET’de dezenfekte edilen kanalların biyoyumlu vital olmayan yabancı maddeler yerine vital doku ile doldurulması amaçlanmaktadır [38].

Rejeneratif endodonti, pulpa-dentin kompleksine ait hücrelerle birlikte dentin ve kök yapısını da içeren zarar görmüş, hasarlı diş yapısını yenilemek için tasarlanmış biyolojik temelli prosedürler olarak tanımlanmaktadır [8]. Bu tanıma dayanarak RET,

nekrotik pulpaya sahip kalıcı dişlerin enfeksiyon, travma veya gelişimsel anomalisi nedeniyle hasar gören pulpa-dentin kompleksini yenilemeyi amaçlamaktadır [34]. Nygaard-Ostby (1961) ve Nygaard-Ostby ve Hjortdal'ın (1971) deneysel çalışmaları özellikle vital dişlerde elde ettikleri sonuçlar ile rejeneratif endodontiye öncülük etmiştir [39, 40]. Iwaya ve ark. (2001) ise, apikal periodontitis ve sinüs yoluna sahip olgunlaşmamış kalıcı dişleri tedavi etmek için revaskülarizasyon kavramını klinik olarak uygulayan ilk gruptur [41]. Rejeneratif endodonti terimi, 2007 yılında Amerikan Endodonti Birliği (AAE) tarafından doku mühendisliği kavramına dayalı olarak kabul edilmiştir [8]. Revitalizasyon terimi ise, 2016 yılında Avrupa Endodonti Derneği'nin (ESE) beyanı ile kullanılmıştır [42]. Endodontik literatürde bu tedavi prosedürlerinin tanımlanması ile ilgili farklı görüşler mevcuttur. Ancak literatürde genellikle revaskülarizasyon, revitalizasyon ve rejeneratif endodonti eş anlamlı ve birbirinin yerine kullanılmaktadır [34].

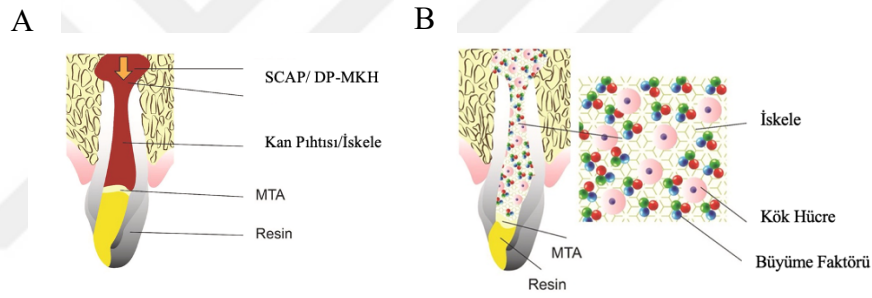
## **2.2 Rejeneratif Endodontide Doku Mühendisliği**

Rejeneratif endodontik tedavi prensiplerinin uygulamaya aktarılmasında doku mühendisliği uygulamalarının büyük bir önemi olduğu gösterilmiştir [43]. RET, odontoblastik tabakaların revaskülarizasyonu, innervasyonu ve restorasyonunu sağlamak için doku mühendisliği kavramını uygular [34, 44]. Doku mühendisliği kavramı, 1990'lı yılların başında Langer ve Vacanti tarafından biyolojik doku rejenerasyon tekniğini tanımlamak için tasarlanmıştır [10]. Doku mühendisliği, normal işlevi kazandırmak amacıyla insan hücrelerini, dokularını veya organlarını değiştiren, yenileyen biyolojik ikameler geliştirmek için biyoloji ve mühendislik ilkelerini bütünleştiren disiplinler arası bir alandır [45].

RET'ler klinik yaklaşımda, eksojen kök hücrelerin dahil edilip edilmemesine göre hücre esaslı ve hücresiz (hücre çağırma) yöntemler olarak sınıflandırılabilir (Şekil 2.1) [46]. Hücre çağırma yöntemi, pulpa ya da periapikal alanda bulunan endojen kök hücrelerin, biyoyumlu ve biyobozunur doku iskeleleri ile hücre göçü, çoğalması ve farklılaşmasını uyaran sinyal moleküllerinin birlikte kullanılmasına dayanmaktadır [47]. Pulpa ve dentinin rejenerasyonu için eksojen olarak hazırlanmış hücreler konakçıya aktarılmamaktadır. İskele tercihi ise genellikle klinikte kolayca hazırlanabilen kan ürünleri gibi konakçı kaynaklı biyoaktif materyaller olmaktadır. Büyüme faktörlerinden bazıları, endojen kök hücrelerin kök

hücre nişlerinden yaralanma bölgesine göçünü uyarabilmektedir. Randomize klinik çalışmalarda hücresiz RET'nin, klinik belirti ve semptomların kaybolması, var olan periapikal lezyonun iyileşmesi normal diş fonksiyonunun sürdürülebilmesinde yüksek başarı oranları sergilediği gösterilmiştir [7, 48].

Kök hücre esaslı yaklaşımlarda ise kök kanalının dezenfeksiyonu sonrası, kök hücreler büyüme faktörü yüklenmiş doku iskeleleri ile kök kanallarına uygulanmakta ve kök kanallarında pulpa benzeri doku oluşumu hedeflenmektedir. Bugüne kadar, bu prosedürler çoğunlukla hayvan modellerinde deneysel olarak gerçekleştirilmiştir ve insanlarda klinik denemelerin ilk aşamaları değerlendirilmiştir. Bu insan çalışmalarının bazıları, olumlu klinik ve radyografik sonuçların yanı sıra pulpa-dentin kompleksinin potansiyel rejenerasyonunu içeren umut verici sonuçlar bildirmiştir [49, 50].



**Şekil 2.1** RET yaklaşımlarının şematik gösterimi A) Hücre çağırma yaklaşımı  
B) Hücre esaslı yaklaşım [7].

Doku mühendisliği veya rejeneratif mühendislik, hasarlı dokuların iyileştirilmesi için kök hücre, sinyal molekülleri ve bunların ikamet edebileceği ortamlar olan biyomateryallerden oluşan hücre iskelesi bileşenlerinin tek başına ya da kombine olarak bir araya getirilerek işlevsellik kazandırılması esasına dayanmaktadır [10, 51].

### 2.3 Kök hücreler

Kök hücreler, kendi kendine devamlı bölünme yeteneğine sahip, çok yönlü farklılaşma potansiyeli olan ve belirli koşullar altında çeşitli fonksiyonel hücrelere

veya doku ve organlara farklılaşabilen özelleşmemiş hücreler olarak tanımlanmaktadır [52].

Kök hücrelerin yaşam boyu sayılarını korumak üzere gerektiğinde çoğalmaları anlamına gelen kendini yenileme, kök hücrenin farklılaşmadan çoğalmasını tanımlamaktadır. Farklılaşma ise, fonksiyonel olarak olgun bir hücre olma yolunda kök hücrenin geçirdiği biyokimyasal ve fenotipik değişikliklerin bir bütünüdür. Hücrelerin yenilenmesi ve doku onarımı, kök hücrelerin çoğalması ve farklılaşmasıyla başarılmaktadır. Hücrede farklılaşma başlıca sinyal iletim sistemi tarafından kontrol edilmektedir ve farklılaşmayı kontrol eden sinyal molekülleri büyüme faktörleridir [53].

### **2.3.1 Kaynaklarına göre kök hücreler**

Kök hücreler kökenlerine bağlı olarak embriyonik (fetal) ve erişkin (postnatal) olarak sınıflandırılabilir [54].

#### **2.3.1.1 Embriyonik (fetal) kök hücreler**

Embriyonik kök hücreler, blastosist olarak bilinen erken, implantasyon öncesi aşamadaki bir embriyodan elde edilen kök hücrelerdir. Pluripotent özellik gösteren bu kök hücreler, döllenme sonrasında blastosit adı verilen embriyonun iç hücre kitlesinden elde edilirler. Bu hücreler kendilerini yenileyebilir ve organizmadaki pek çok hücre tipine farklılaşabilmektedirler [55].

#### **2.3.1.2 Erişkin (postnatal) kök hücreler**

Erişkin kök hücreler ise, kemik iliği, deri, beyin, kas dokusu veya diş pulpası gibi pek çok farklılaşmış doku ve organdan izole edilebilen kendi kendini yenileyebilen hücrelerdir [56]. Yetişkin kök hücrelerin başlıca rolü bulundukları dokunun tamirinin ve devamlılığının sağlanmasıdır. Bu hücrelerin kök hücre nişleri olarak adlandırılan özel alanlarda bulundukları düşünülmektedir [57]. Embriyonik kök hücre kullanımı ile ilgili etik, yasal tartışmalar ve teratom oluşturma riski nedeniyle doku mühendisliğinde erişkin kök hücreler daha uygun bir hücresel kaynak tercihi olmaktadır [58].

### **2.3.2 Farklılaşma Kapasitelerine Göre Kök Hücreler**

Kök hücreler ayrıca farklılaşabilme yeteneklerine göre totipotent, pluripotent, multipotent olmak üzere üç alt gruba ayrılmaktadır [8].

#### **2.3.2.1 Totipotent Kök Hücreler**

Totipotent hücreler sınırsız farklılaşma potansiyeline sahip organizmayı oluşturan tüm doku ve hücre çeşitlerine farklılaşma kapasitesine sahip hücrelerdir. Bir organizmayı tümüyle meydana getirebilme potansiyeli olan bu hücreler özelliklerini döllenmeden sonraki 5. güne kadar devam ettirmektedirler [59].

#### **2.3.2.2 Pluripotent Kök Hücreler**

Pluripotent hücreler birçok farklı hücre tipine dönüşebilen, fetal veya yetişkin hücre tiplerini oluşturabilen ancak tek başına organizmayı oluşturamayan hücrelerdir [59].

#### **2.3.2.3 Multipotent kök hücreler**

Multipotent kök hücreler ise tek bir germ yaprağına ait hücrelere farklılaşma yeteneği gösteren erişkin farklılaşmış dokularda bulunan hücrelerdir [60]. Pluripotent hücrelere göre çok daha sınırlı sayıda hücre tipine farklılaşabilmekte ve daha özel fonksiyonlara sahiptirler [61].

Günümüzde kök hücre biyolojisi, hasarlı veya eksik dokuları sağlıklı yenilenmiş dokularla değiştirilerek daha iyi sonuçlar elde etme umudunu artıran bilimin en büyüleyici alanlarından biridir [62].

### **2.3.3 Mezenkimal kök hücreler (MKH)**

Kendi kendini yenileyebilen ve özel hücrelere farklılaşma yeteneğine sahip kök hücre popülasyonları yetişkin dokuların rejeneratif kapasitesini belirlemektedir. Kök hücreler, köken aldıkları dokuya göre farklı isimler almaktadırlar. Bunlar arasında hematopoietik, mezenkimal, endotelyal, meme, bağırsak, sinir, deri, kas ve saç folikülü kök hücreleri vardır [63]. Kemik iliğinde bulunan kendini yenileme ve kemik dokusuna farklılaşma özelliğine sahip, hematopoietik olmayan hücrelerin varlığı Alexander Friedenstein tarafından 1970 yılında bildirilmiştir [64]. Kemik iliği üzerine

yapılan araştırmalar ile başlayan çalışmalar sonucunda kemik iliği ve çeşitli erişkin dokularda bulunan multipotent özellikte, hematopoietik olmayan ve stromal karakterdeki kök hücrelerin varlığı belirlenmiştir. Bu hücreler mezenkimal kök hücreler veya diğer bir isimlendirme ile mezenkimal stromal kök hücreler olarak adlandırılmaktadır [65].

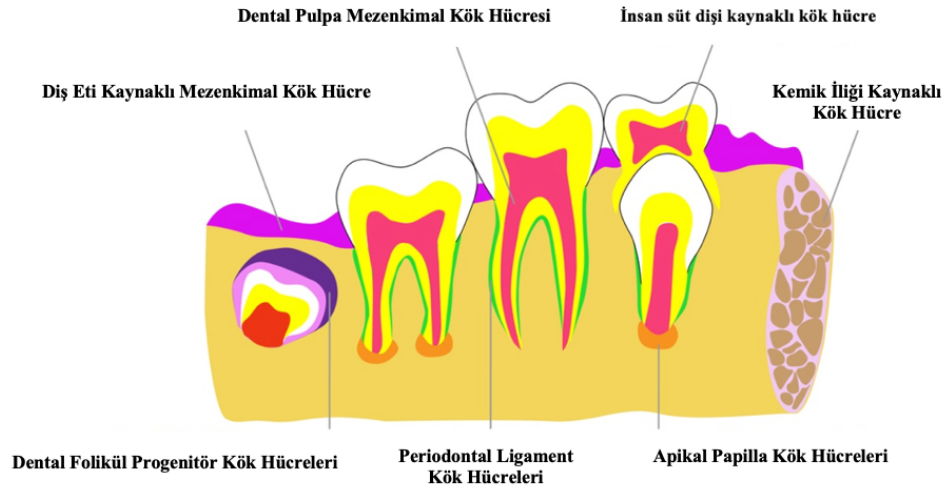
Kendi kendini yenileme ve çok soylu farklılaşma kapasitesine sahip MKH, son birkaç yılda doku mühendisliği ve rejenerasyon alanında kullanılabilecek progenitör hücre kaynakları olarak dünya çapında dikkat çekmiştir [66]. Multipotent progenitör hücreler olan bu hücreler uygun koşullarda osteoblastlara, kondrositlere ve adipositlere farklılaşma yeteneğine sahiptirler ve bu özelliklerine plastisite adı verilmektedir [67]. MKH, CD105 (SH2) ve CD13 (SH3/4) ve CD73 genlerinin pozitif ekspresyonu ile belirlenirken, CD34 ve CD45 gibi hematopoietik belirteçler için negatiftirler [68, 69].

#### **2.3.4 Dental doku kaynaklı mezenkimal kök hücreler**

Diş hekimliği alanında, doku mühendisliği uygulamaları için aday olan birkaç potansiyel MKH kaynağı tanımlanmıştır. Bunlar arasında kemik iliği [70], göbek kordon kanı [71], yağ dokusu [72] ve diş dokuları [73] bulunmaktadır. Diş dokusu kaynaklı yüksek proliferatif kapasiteye ve çok yönlü farklılaşma potansiyeline sahip MKH popülasyonları en umut verici adaylar olarak görülmektedir [66, 74].

Dental doku kaynaklı mezenkimal kök hücreler şöyle sıralanabilir (şekil 2.2).:

- Dental pulpa mezenkimal kök hücreleri (DP-MKH) [75],
- Apikal papilla kök hücreleri (SCAP) [76],
- İnsan süt dişlerinden elde edilen kök hücreler (SHED) [77],
- Periodontal ligament kök hücreleri (PDLSC) [78],
- Dental folikül progenitör kök hücreleri (DFSC) [79].



**Şekil 2.2** Dental doku kaynaklı mezenkimal hücrelerin şematik gösterimi.

Dental kök hücreler çalışmalarda 20 yaş dişlerinden, ortodontik amaçlı çekilen dişlerden, ortognatik cerrahide elde edilen alveol kemik parçalarından ve düşen süt dişlerinden elde edilmektedir [80]. Fibroblast benzeri hücre morfolojisine sahip olma, koloni oluşturma ve çoğalma potansiyellerinin yüksek olması bu hücre popülasyonlarının taşıdığı benzer özelliklerdir. Ancak bu hücreler farklılaşma potansiyelleri ile birbirlerinden farklılık göstermektedirler [66, 81].

Geçmişte yayınlanmış birkaç vaka serisi, nekrotik olgunlaşmamış kalıcı dişlerin tedavisinde apikalden kanamanın indüklenmesiyle gerçekleştirilen rejeneratif endodontik prosedürler sayesinde başarılı sonuçlar elde edilebileceğini göstermiş ve bu alandaki potansiyelin giderek daha fazla tanınmasına yol açmıştır [82-85]. Ancak bu tarz rejeneratif endodontik tedavilerde devam eden kök gelişiminden ve rejeneratif yanıtın sorumlu hücrelerin kesin mekanizması ve kaynağı 2011 yılına kadar bilinmemekteydi. Lovelace ve ark. yaptıkları çalışma ile apeksleri açık immatür dişlerde rejeneratif endodontik tedaviler sırasında apikal bölgeden uyarılan kanama ile kanal boşluğuna mezenkimal kök hücrelerin taşındığı ilk kez göstermişlerdir. Aynı zamanda elde edilen bulgulara kanal içindeki bazı mezenkimal kök hücre belirteçlerinin (CD105) görülme oranının sistemik dolaşıma göre 700 kat daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışma ile rejeneratif endodontik uygulamaların kök hücre esaslı tedaviler olduğu ilk kez klinik olarak gösterilmiştir [86].

#### 2.3.4.1 Dental pulpa mezenkimal kök hücresi

Embriyonik diş gelişimi, intrauterin 6. haftada oral ektodermal epitel ve mezoderm arasındaki epitelyal-mezenkimal etkileşime bağlı olarak başlamaktadır. Mine oral kavitenin ektoderminden kaynaklanırken, dental papilla ve diş folikülü nöral krest hücrelerini de kapsayan mezenkimden farklılaşmaktadır. Söz konusu bu ektomezenkimal köken diş dokusunu özel kılmaktadır [87, 88]. MKH, dentin, pulpa, sement ve periodontal ligament gibi diş yapılarının oluşumlarına yol açmaktadır [89].

Her dişin pulpa odası olarak adlandırılan merkezi pulpa boşluğundan apikal foramen yoluyla periodonsiyuma açıldığı noktaya kadar kök kanalı boyunca uzanan gevşek bağ dokusu yapısındaki pulpanın damarları çevresinde yer alan diş pulpası kök hücre popülasyonunun MKH oldukları düşünülmektedir. Bu hücreler, yüksek proliferasyon kapasitesi gösterebilen, klonlanabilen ve yüksek plastisite yeteneğine sahip multipotent hücrelerdir [75, 90]. Klon oluşturma potansiyeli, kök hücrelerin önemli özelliklerinden biridir. Klonalite tek bir hücreden çok sayıda yeni kök hücrenin gelişmesi olarak tanımlanmakta, klonun büyüklüğüne göre ve klon oluşturma hızına göre kök hücreler arasında yapılacak kıyaslamalarda kullanılan ölçütlerden biri olmaktadır. Klonları oluşturan hücreler kültürde canlılıklarını koruyabilir, başarıyla dondurulup çözülebilir ve pasajlanabilir [53].

Pulpa dokusunda bulunan DP-MKH, yetişkin insan diş pulpasından elde edilen ilk kök hücrelerdir. DP-MKH'leri Gronthos ve ark. tarafından gömük üçüncü büyük azı dişlerinden izole edilmişlerdir ve kök hücre özelliklerinin *in vitro* ve *in vivo* koşullarda kemik iliği stromal hücrelerinin özellikleriyle karşılaştırılabilir olduğu ortaya konmuştur [75]. Bu çalışmada DP-MKH'nin subkutan olarak immün sistemi baskılanmış farelere transplante edildiğinde dentin-pulpa kompleksi oluşturma yeteneklerinin gösterilmesi bu hücrelerin *in vivo* olarak insan diş dokularını yenileme potansiyellerini kanıtlamıştır [55, 75]. DP-MKH araştırmalarındaki en önemli gelişmelerden bir diğeri de, perivasküler bölgedeki kök hücre nişlerinin açığa çıkarılmasıdır [91].

Diş pulpasına ait hücrelerin alkalın fosfataz, tip I kollajen, kemik sialoproteini, osteokalsin, osteopontin, dönüştürücü büyüme faktörü (TGF-) ve kemik morfogenetik proteinleri (BMP) gibi osteojenik belirteçleri eksprese ettiği daha önce gösterilmiştir [92, 93]. Bu kanıtlar erişkin insan diş pulpa dokusunun daha önce bilinen kemik iliği

kök hücreleri (KİKH) gibi çok potansiyelli kök hücre popülasyonu içerebileceğini düşündürmüştür [75]. Diş pulpası ve kemik iliği kök hücrelerinin gen ekspresyonları karşılaştırıldığında aralarında çok az farklılık olduğu gözlemlenmiştir. DP-MKH, KİKH'nden hücre döngüsü ile ilişkili genleri eksprese etmeleri yönüyle ayırt edilebilmektedir [94, 95]. Yapılan bir çalışmada, hücresel büyüme eğrisi analizinde, DP-MKH'nin 3 ila 5 gün arasında logaritmik fazda kaldığı, 10 günlük süre boyunca KİKH'nin DP-MKH'nden daha uzun bir popülasyon ikiye katlama süresine sahip olduğu bulunmuştur. Ayrıca BrdU immünohistokimya ile yapılan hücre proliferasyon testi DP-MKH'nin KİKH'nden daha yüksek proliferatif yeteneğe sahip olduğunu göstermiştir [96]. DP-MKH'nin kolay izole edilebilmesi ve daha yüksek bir proliferasyon hızı göstermesi bu hücreleri KİKH'nden üstün kılmaktadır [94, 95].

Dental pulpa kök hücreleri yüksek bir farklılaşma kapasitesine ve dentin/pulpa benzeri bir kompleksi yeniden oluşturma yeteneğine sahiptir [97]. DP-MKH'nin belirli bir hücre soyuna farklılaşması temel olarak büyüme faktörleri, reseptör molekülleri, sinyal molekülleri, transkripsiyon faktörleri ve hücre dışı matris proteini gibi yerel mikro çevrenin bileşenleri tarafından belirlenmektedir [81]. Örneğin, temel fibroblast büyüme faktörü (bFGF), dönüştürücü büyüme faktörü- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), sinir büyüme faktörü (NGF), trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) ve BMP gibi büyüme faktörleri DP-MKH'nin farklılaşma ve hücre çoğalması gibi özelliklerini etkileyebilmektedir [97].

Zhang ve ark. [98] tarafından, olgun diş pulpasından alınan hücrelerin nöron, odontoblast, yağ, kıkırdak ve kas hücresi gibi hücre tiplerine dönüşebildiği gösterilmiştir. Daha sonra yapılan çalışmada, diş pulpası kök hücrelerinin *in vivo* olarak, odontojenik, miyojenik ve adipojenik farklılaşma gösterebildiği bildirilmiştir [99]. DP-MKH'nin mezodermal kökenli hücre tiplerine farklılaşabildiklerinin gösterilmesiyle MKH kimlikleri doğrulanmıştır [55, 100, 101].

DP-MKH'nin bol miktarda hücre dışı matriks salgılayan ve örgü kemik yapısı oluşturabilen osteoblastlara farklılaşabildiği *in vitro* olarak gösterilmiştir [102-104]. Ayrıca DP-MKH, *in vivo* koşullarda entegre bir kan desteğine sahip yetişkin kemik benzeri doku üretebilen osteoblastlara ve endotel hücrelerine farklılaşabilmektedir [105].

DP-MKH'nin bu çok yönlü farklılaşma kapasitesi, rejeneratif tıbbın çeşitli alanlarında kullanımlarını önermektedir [106]. Kök hücrelerin temel iki özelliği olan

kendi kendini yenileme ve çok yönlü farklılaşma kapasitesinin yanı sıra, DP-MKH'nin doku mühendisliğindeki uygulamalarıyla ilgili bazı avantajları vardır [107]:

- Bu hücrelerin elde edildiği alana erişim kolaydır ve çok düşük morbidite riski mevcuttur,
- Kök hücreler pulpa dokusundan oldukça verimli şekilde elde edilmektedir,
- Kapsamlı bir farklılaşma kabiliyetine sahiptir,
- Biyomateryallerle birlikte gerçekleştirilen uygulamalarda dokuların yeniden yapılandırılması için etkin olarak kullanımlarının uygun olduğu gösterilmiştir,
- Uygun şartlarda dondurularak saklandıktan sonra çözülduğünde yüksek canlılık oranı sergilemektedir [108].

DP-MKH'nin kolay eldesi ve işlenmesi, onları insanlar üzerinde yapılan klinik deneylerde kullanım için umut verici ve uygun bir hücre kaynağı haline getirmektedir [109]. Dentin-pulpa komplekslerinin rejenerasyonu üzerine yapılan çalışmaların çoğunluğunda (%52), DP-MKH'nin kullanıldığı gösterilmiştir [110].

### **2.3.5 Dental pulpa kök hücresi eldesi ve karakterizasyonu**

Mine ve dentin ile kaplı sert bir yapı içerisinde bir bağ doku olarak bulunan dental pulpa diğer doku kaynakları ile kıyaslandığında izolasyon yönteminin invaziv olmaması ve çok sayıda hücre içermesi sebebiyle yetişkin kök hücreler için önemli bir kaynak olarak görülmektedir [111].

DP-MKH'nin izolasyonu için iki temel yöntem tanımlanmıştır [112]:

- Eksplant yöntem,
- Pulpa dokusunun enzimatik parçalanması.

Eksplant yöntemde pulpa dokusu cerrahi olarak çıkarılmakta ve hücreler bölünen doku parçalarında gelişmektedir [113]. İkinci yöntemde ise; dental pulpa kollajenaz ve dispaz enzimleri kullanılarak sindirilmekte, daha sonra hücrelerin ekimi yapılarak proliferasyonları gözlemlenmekte ve spesifik belirteçlerle akım sitometri yöntemi kullanılarak karakterizasyonları gerçekleştirilmektedir [114] .

İki yöntemin karşılaştırılmasında, enzimatik parçalama metodu ile DP-MKH'nin daha yüksek bir çoğalma hızı ve farklılaşma kapasitesi sergilediği, diğer yüzey belirteçlerini ifade ettiği gösterilmiştir [114, 115]. Buna karşılık Hilkens ve ark. [113] iki yöntemi karşılaştırdıkları çalışmalarında, hücre yüzey belirteci ekspresyonu

ve farklılaşma potansiyeli açısından iki yöntem arasında önemli bir fark bulamamışlardır.

Hücre kültürü popülasyonlarının belirli bir farklılaşma aşamasında homojenliğini elde etmek, temel ve klinik araştırmalarda tekrarlanabilirliği ve güvenliği sağlamak için önemli olmaktadır. Hücre ayırma teknikleri esas olarak yoğunluk, yapışma veya antikor bağlanmasına dayanmaktadır [116]. DP-MKH için, mevcut hücre seçim yöntemleri Floresansla Aktifleştirilmiş Hücre Ayırma (FACS) ve Manyetik Boncuklarla Aktifleştirilmiş Hücre Ayırma (MACS) yöntemlerini içermektedir. Mezenkimal Kök Hücreler ve Dokular Komitesi ve Uluslararası Hücresel Tedavi Derneğine göre mezenkimal kök hücre grubundan olan DP-MKH, CD73, CD90, CD105 için pozitif, CD11b, CD14, CD19, CD34, CD45, CD79a ve HLA-DR yüzey antijenleri için negatiftirler [63]. Diğer pozitif belirteçleri ise CD9, CD10, CD13, CD29, CD44, CD106, CD146, CD166, STRO-1, CD13, CD146, CD117, SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81, NANOG, Oct4 ve Sox2 olarak bildirilmiştir [117, 118].

## **2.4 Doku İskeleleri**

Doku mühendisliği yaklaşımının bir diğer basamağı ise doku iskeleleridir. Kök hücrelere destek sağlayan, hücrelerin bu yapılara tutunması ile çoğalmaları, farklılaşmaları ve fonksiyon göstermeleri için gerekli olan üç boyutlu ortamı sunan, tek başlarına veya hücre ve büyüme faktörleri ile implante edilebilen materyallerdir [119].

İskeleler, aşağıdaki işlevler için tasarlanmış üç boyutlu gözenekli biyomalzemeler olarak tanımlanmaktadır [120]:

- a) Hücre konumunu uzamsal olarak doğru bir pozisyonda tutmak [121],
- b) Hücre-biyomateryal etkileşimlerini, hücre yapışmasını ve hücre dışı matris yataklarını (ECMD) teşvik etmek,
- c) Hücrenin hayatta kalması, çoğalması ve farklılaşması için gazların, besinlerin ve düzenleyici faktörlerin yeterli şekilde taşınmasına izin vermek,
- d) İlgilenilen dokunun rejenerasyon hızına yakın kontrol edilebilir bir hızda parçalanmak,
- e) Minimal inflamasyon oluşturmak.

Doku mühendisliği uygulanan dokular için en iyi doku iskelesi doğal durumundaki ekstraselüler matrikstir [122]. Bu nedenle RET'lerde ideal bir iskele,

biyolojik ve mekanik özellikler açısından pulpa-dentin kompleksinin hücre dışı matriksine çok benzemelidir [123, 124].

#### 2.4.1 Doku İskelelerinin Sınıflandırılması

Çeşitli iskele biyomalzemeleri mevcuttur. İskeleler bozunma özelliklerine [125], şekillerine [126], hücrelerin varlığına veya yokluğuna [127], kaynağına [128] göre sınıflandırılabilir (Tablo 2.1).

| <b>Bozunma Özelliğine Göre İskeleler</b>                                                                                                                                                   | <b>Yapısına Göre İskeleler</b>                                                                                                                                                                                          | <b>Hücre Bulundurması veya Bulundurmamasına Göre İskeleler</b> |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|
| Biyobozunur iskele<br>Biyostabil iskele                                                                                                                                                    | Levhalar<br>Katı bloklar<br>Pöröz süngerler<br>Hidrojeller                                                                                                                                                              | Hücresiz iskele<br>Kök hücre eklenmiş iskele                   |
| <b>Kaynağına Göre İskeleler</b>                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                                                                                         |                                                                |
| <b>Biyolojik veya Doğal İskeleler</b>                                                                                                                                                      | <b>Yapay veya Sentetik İskeleler</b>                                                                                                                                                                                    |                                                                |
| Kan pıhtısı<br>Trombositten zengin plazma<br>Trombositten zengin fibrin<br>Kollajen<br>Kitosan<br>Glikozaminoglikanlar/ hyaluronik asit<br>Demineralize veya doğal dentin matriksi<br>İpek | <b>Polimerler</b><br>PLA (Polilaktik asit)<br>PGA (Poliglikolik asit)<br>PLGA (Poli(laktik asit-ko-glikolik asit)<br>PCL<br><b>Biyoseramikler</b><br>Kalsiyum /fosfat materyaller<br>Biyoaktif camlar<br>Cam seramikler |                                                                |

**Tablo 2.1** Doku iskeleleri sınıflandırması

##### 2.4.1.1 Kaynağına göre doku iskeleleri

###### 2.4.1.1.1 Biyolojik veya doğal iskeleler

Sentetik polimer yapı iskelelerine kıyasla biyoyumluk ve spesifik hücre etkileşimlerine izin verme yönünden daha avantajlı olduğu düşünülerek biyomimetik yapı iskelelerinin kullanımına artan bir ilgi söz konusudur. Bununla birlikte, büyük miktarlarda elde etmenin güç olması, sınırlı tasarım olanağına izin vermesi ve mekanik

özelliklerin yetersizliği gibi eksikliklere sahiptirler. Buna karşılık, sentetik iskeleler tekrarlanabilir iyi mekanik özelliklere ve kontrollü bozunma süresine sahiptir, ancak doku mühendisliği için gereken hücresel sinyallerin varlığından yoksundurlar [129].

Kabuklularda bulunan bir polisakkarit olan kitinden elde edilen kitosan, doğal enzimler yoluyla bozunma göstermesi ve biyouyumluluğu nedeniyle doku rejenerasyonu amacıyla çeşitli alanlarda kullanılmıştır [130]. Başka bir doğal ajan olan kollajen de birçok hayvan modeli çalışmasında pulpa benzeri dokuları rejenere etme amacıyla dental pulpa kök hücreleri ile kullanılmıştır [119, 130].

Periapiksten kanamanın kasıtlı olarak indüklenmesi ile kanal içinde oluşturulan kan pıhtısı rejeneratif endodontik prosedürlerde önerilen ve sıklıkla kullanılan bir iskele türüdür [131-133]. Dental pulpa dokularını yenilemek için bir kan pıhtısının kullanılması ilk olarak Ostby tarafından uygulanmıştır ve kök kanalında granülasyon dokusu, fibroz doku veya sement benzeri dokuların gelişimiyle sonuçlanmıştır [39]. Daha sonra çok sayıda çalışma, kök kanal sisteminin dezenfeksiyonu, periapikal dokuların manipülasyonu ile kanal boşluğuna kanamanın indüklenmesi ve yeterli koronal tıkaçtan sonra kök gelişiminin devam edebileceğini göstermiştir [37, 41, 82, 84]. Bu tedavi protokollerinin kullanımı, doku rejenerasyonuna atfedilen iyileşme ve ardından kök gelişiminin radyografik ve klinik kanıtlarıyla sonuçlanabilmektedir. Apikal bölgede kanamanın uyarılması ile önemli miktarda farklılaşmamış kök hücre kök kanal boşluğuna aktarılmaktadır [86]. Uyarılmış kanama sonrası kan pıhtısı yeniden organize olmakta ve hücrelerin bağlanması, göçü için bir kılavuz görevi görmektedir [134]. Yöntemin düşük maliyeti, klinik basitliği, tedavi süresinin kısa oluşu diş hekimleri için bu otolog iskele türünü çekici bir seçenek haline getirmektedir [135].

Genel olarak, bu teknik kanal içi iskele oluşturmada etkili olmakla birlikte, bu prosedürün birkaç dezavantajı vardır. Öncelikle, periapikal kanamayı indüklemek için kullanılan manipülasyon tekniği oldukça duyarlıdır. Klinik olarak, istenen seviyede kanamanın hızını ve hacmini kontrol etmek zor olmaktadır. Çok az kanama, gerekli yapı iskelesini sağlamak için yetersiz olurken, çok fazla kanama pulpa boşluğunu doldurarak çevredeki diş kronu ile temas edebilir ve dezenfekte edilmiş kök kanal sisteminin yeniden kontaminasyonuna yol açabilmektedir [136]. Ayrıca bu tür pıhtılar, iskele kriterlerine göre ideal olmaktan uzaktır. Sonuncu ve en önemli dezavantajı mandibular premolarları ve molarları tedavi ederken bu tekniğin inferior alveolar sinire (İAS) veya mental sinire zarar verme riski taşımasıdır [137]. Çalışmalar

özellikle premolar dişlerin kök uçlarının İAS ve mental foramenlere yakınlığını doğrulamıştır [138, 139]. Ayrıca yapılan bir insan klinik araştırması ve bir hayvan çalışmasında başarısız rejeneratif endodonti vakalarında kanal içi kan pıhtısının yokluğu gösterilmiştir [140, 141]. Bu nedenle, rejeneratif endodontik uygulamalarda kan pıhtı iskelesine alternatif bulma gerekliliği doğmuştur [137].

#### **2.4.2 Otolog trombosit konsantreleri**

Yara iyileşme sürecinde temel düzenleyiciler olarak rol oynayan trombositler kanın önemli bir bileşenidir [142, 143]. Aktivasyon sonrası degranüle olan trombositlerden büyüme faktörlerinin salınımı, kök hücre göçünü, proliferasyonunu ve farklılaşmasını indüklerken, bölgenin vaskülarizasyonunu aktif olarak desteklemektedir. Serbest bırakılan büyüme faktörleri arasında trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), dönüştürücü büyüme faktörü (TGF), vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), epitelyal büyüme faktörü (EGF) ve insülin benzeri büyüme faktörü (IGF-1) yer almaktadır [124, 144]. Otolog trombosit konsantreleri, yüksek konsantrasyonda trombosit içeren hastanın kendi kanının santrifüj edilmesiyle elde edilen, kolay erişilebilir, son derece biyouyumlu, ekonomik olması gibi bir dizi avantaj ile bildirilmiş rejeneratif potansiyel sunan biyomateryallerdir. Lökosit ve fibrin yapısının varlığına bağlı olarak trombosit konsantreleri, trombosit zengin plazma (TZP), trombosit zengin fibrin (TZF), lökosit ve trombosit zengin plazma (L-PRP) ve lökosit ve trombosit zengin fibrin (L-PRF) dahil olmak üzere dört aileli bir sistemde sınıflandırılabilir [143]. Konsantre büyüme faktörü (CGF) ise, otolog trombosit konsantrelerinin en yeni neslidir [145].

##### **2.4.2.1 Trombosit zengin plazma (TZP)**

TZP, ilk nesil otolog plazmayı temsil eden ve tam kandan 5 kat daha fazla trombosit konsantrasyonuna sahip bir trombosit konsantresidir [146]. İlk olarak 1997 yılında Whitman ve ark. tarafından tanımlanan TZP [147], baş boyun cerrahisi, kulak burun boğaz cerrahisi, kardiyovasküler cerrahi, ağız ve çene cerrahisi gibi çeşitli cerrahi alanlarda yaygın olarak kullanılmaktadır [148]. TZP'den salınan TGF- $\beta$ 1, PDGF, fibroblast büyüme faktörü, VEGF gibi büyüme faktörleri, DP-MKH'nin büyümesini, göçünü ve farklılaşmasını uyarmaktadır [149, 150]. TZP aynı zamanda bir iskele görevi gören 3 boyutlu bir fibrin matrisi oluşturabilmektedir [51]. Bu nedenle TZP, rejeneratif endodontik prosedür için potansiyel bir iskele olarak

önerilmiştir [151]. Torabinejad ve Turman [152] ile Bezgin ve ark. [153] TZP'nın başarılı bir iskele oluşturma potansiyelini klinik vaka raporları ile göstermişlerdir.

Lee ve ark'ın [154] TZP'nın DP-MKH'nin çoğalması ve farklılaşması üzerindeki biyolojik etkisini değerlendirdikleri çalışmalarında, TZP uygulandıktan sonra DP-MKH'nde mineral nodüllerin oluşumunda artış gözlenmiştir. Ayrıca gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonunda (RT-PCR), TZP ile muamele edilen hücrelerde daha yüksek odontojenik ve osteojenik gen ekspresyonları gösterilmiştir.

Marx ve arkadaşları tarafından diş hekimliği alanında, ilk nesil trombosit konsantresi TZP'nın kullanımına öncülük edilmesinden beri, anjiyogenezi artırma yeteneklerine dayanarak dokuların rejenerasyonu için diş hekimliği, ortopedi ve estetiğin birçok alanında kullanımları yaygınlaşmasına rağmen doku rejenerasyonunun baskılayıcısı olduğu bilinen anti-koagulanları içermesinden dolayı rejeneratif potansiyellerinde sınırlamalar olduğu bildirilmiştir [155-158]. Ayrıca yapay trombin ve antikoagülan katkısı nedeniyle biyogüvenliği ve stabilitesi konusunda tartışmalar mevcuttur [159].

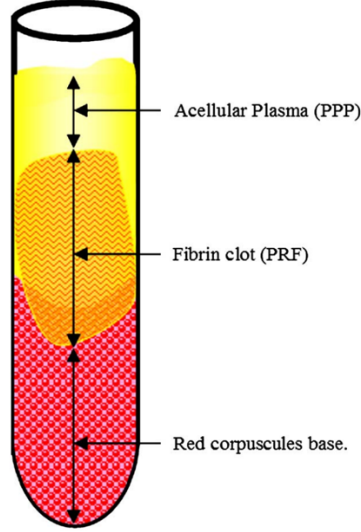
#### **2.4.2.2 Trombositten zengin fibrin (TZF)**

Yeni nesil trombosit konsantresi olarak kabul edilen TZF ilk olarak 2001 yılında Fransa'da Choukroun ve ark. tarafından özellikle oral ve maksillofasiyal cerrahide spesifik kullanım için geliştirilmiştir. TZF, yapısında sitokin, trombosit ve kök hücreler bulunduran tetra moleküler yapıda bir fibrin matrisinden oluşan parçalanabilen bir yapı iskelesidir [160].

TZF, öncülü TZP'dan başlıca hazırlanmasının basitliği ve uygulama yönüyle farklılık göstermektedir. TZF, yapay trombin veya harici antikoagülan gibi ek faktörlerle doğrudan aktivasyon gerektirmediğinden, hem hazırlık süresi hem de hazırlama maliyeti TZP'dan daha düşük olmaktadır [161]. Ayrıca TZF'de büyüme faktörlerinin fibrin pıhtısından salınımı, zaman içinde daha uzun ve kademeli olmaktadır. Bu durum doku onarımı için daha ideal kabul edilmektedir [162]. Yapılan çalışmalar, TZF'in en az 1 hafta olmak üzere 28 güne kadar birçok önemli büyüme faktörünün yavaş salınımına neden olan bir biyolojik iskele olduğunu göstermiştir [163, 164]. TZF'in TZP'ya bir diğer üstün yönü enfeksiyon kontrolünde önemli rol oynayan lökosit gibi bağışıklık savunma hücrelerini daha fazla sayıda içermesidir [165].

TZF hazırlama protokolü, cam bazlı toplama tüplerinde herhangi bir antikoagülan olmadan taze alınan kanın santrifüjlenmesini içermektedir. Bu işlemde 10 mL'lik tüplere toplanan kan örneği genelde 12 dakika boyunca yaklaşık 2700-3000 rpm'de (yaklaşık 400g'lık bir kuvvette) santrifüj işlemine tabi tutulmaktadır. Antikoagülanın yokluğunda, tüplerde yeni alınan kan toplandığında, kan örneğindeki trombositlerin çoğu birkaç dakika içinde tüp duvarları ile temas haline gelip aktive olmakta ve pıhtılaşma kaskadı hemen başlamaktadır. Fibrinojen, trombin onu fibrine dönüştürmeden önce, başlangıçta tüpün üst kısmında yoğunlaşır. Santrifüj sonucunda altta kırmızı korpüskül tabakasında kan hücreleri, üstte trombositten fakir plazma tabakası ve arada fibrin pıhtısı (TZF) olmak üzere üç tabaka oluşmaktadır [166].

Santrifüjde, santrifüjleme kuvveti altında kanın pıhtılaşması ve kanın ayrılması şeklinde aynı anda iki işlem gerçekleşmektedir. Santrifüj işlemi sırasında kana etki eden birkaç kuvvet vardır. Merkezkaç kuvveti tüpün altına doğru etki ederken, sürtünme ve kaldırma kuvveti buna karşı koymaktadır. Santrifüjde belirli bir süre kanın yüksek devirlere maruz bırakılmasıyla, yüksek miktarda merkezkaç kuvveti üretilir ve bu kuvvet, kaldırma ve sürtünme kuvvetlerini aşar. Bu durum, rotasyon merkezinden uzağa yani tüpün dip tarafına doğru yönelen net bir merkezkaç kuvveti ile sonuçlanmaktadır. Uygulanan santrifüjleme kuvveti, tek tek her parçacığın kütlesi ile doğru orantılıdır. Bu nedenle, santrifüj kuvveti altında nispeten daha yüksek kütleye sahip eritrositler tüpün dibine çökmekte, nispeten daha düşük kütleye sahip olan beyaz kan hücreleri, trombositler, plazma ve pıhtılaşma faktörleri tüpün üst kısmına doğru itilmektedir. Bu ayrılma gerçekleşirken aynı anda gerçekleşen bir diğer süreç de antikoagülan olmamasına bağlı kanın pıhtılaşmasıdır [167, 168].



**Şekil 2.3** Toplanan kanın santrifüjü sonucu oluşan katmanlar [166].

Son yıllarda TZF'in pulpa rejenerasyonu üzerindeki etkileri hayvan modelleri ve klinik çalışmalarla kanıtlanmıştır [169-171]. TZF'nin *in vitro* apikal papilla kök hücreleri, insan dental pulpa hücreleri, insan oral kemik mezenkimal kök hücreleri ve periodontal kök hücreleri gibi mezenkimal kök hücre türlerinin çoğalmasını desteklediği gösterilmiştir [172-175].

Huang ve ark. TZF'in insan diş pulpa hücreleri üzerindeki biyolojik etkileri üzerine bir araştırma yürütmüştür [173]. TZF'in, zamana bağlı olarak diş pulpa hücresinin proliferasyonunu ve osteoprotegerin (OPG) ekspresyonunu arttırdığı gösterilmiştir. Alkalın fosfataz (ALP) aktivitesi de TZF tarafından önemli ölçüde artırılmıştır. Bu bulgular, TZF'in kayıp veya hasarlı dental pulpa dokularının rejenerasyonunu teşvik etmede ve onarıcı dentinogenezi uyarmada rolünü ele alan klinik öncesi çalışmalara temel teşkil edebilmektedir.

#### **2.4.2.3 Enjekte edilebilen trombosit zengin fibrin (I-PRF)**

Santrifüjün rolü, hücre yoğunluğuna göre kan hücresi katmanlarını ayırmaktır. TZF'in orijinal santrifüjleme hızı, 10 ila 12 dakika boyunca yüksek hızlarda (2500-2700 rpm arasında değişen) olacak şekilde tanımlanmıştır. Ancak TZF, kanın toplandığı tüpün üst kısmında bulunduğu için, yüksek hızlarda ve uzun süreli santrifüjlemenin, hücreleri TZF pıhtısının toplandığı üst katmandan uzağa, tüpün altına doğru ittiği bilinmektedir [176, 177]. Bu gelişmeden bir süre sonra, santrifüjleme hız ve süresini daha da azaltarak, pıhtı oluşumundan önce bile katmanların ayrılmasının sağlanabileceği bildirilmiştir [19]. Günümüze kadar santrifüj

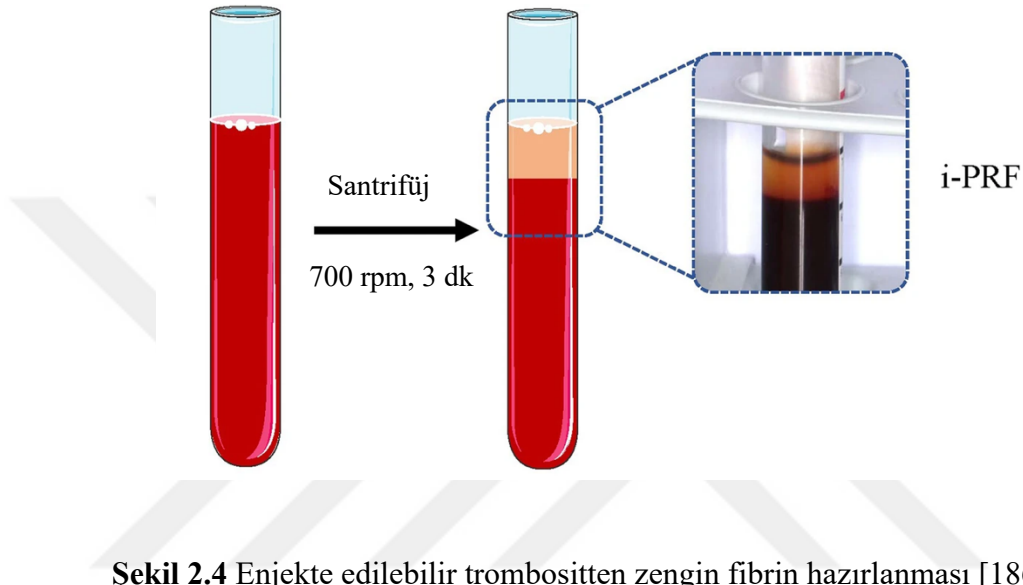
süresi ve hızı değiştirilerek konsantre büyüme faktörü (CGF), A-PRF (Advanced platelet rich fibrin) ve enjekte edilebilir trombosit zengin fibrin (I-PRF) gibi farklı otojen trombosit zengin fibrin materyalleri geliştirilmiştir [177, 178]. Wend ve ark. düşük ve sabit santrifüjleme süresinde (3 dakika) kademeli olarak azaltılan G kuvvetinin (yüksek G kuvveti:2800 rpm, orta G kuvveti:1400 rpm ve düşük G kuvveti: 700 rpm) etkisini inceledikleri çalışmalarında lökosit, nötrofil, monosit ve lenfositlerin toplam hücre sayısını, düşük G kuvveti kullanılan grupta istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha yüksek bulmuşlardır [17].

Düşük hızlı santrifüj konseptinin geliştirilmesi ile, 2017 yılında yeni bir sıvı kan türevi olarak enjekte edilebilir trombosit zengin fibrin (I-PRF) geliştirilmiştir. [19]. I-PRF, doku rejenerasyonuna ve yara iyileşmesine daha iyi yardımcı olabilen bir lökosit zengin trombosit konsantresidir [179]. Bu sıvı kan türevi, yüksek konsantrasyonlarda trombosit, lökosit ve büyüme faktörleri içermektedir. [180, 181]. Başlangıçta sıvı fazda olmasına rağmen, I-PRF zamanla büyüme faktörlerinin yavaş salınımını sağlayan dinamik bir fibrin jel yapısı oluşturmaktadır [19]. I-PRF'in doğal fizyolojik pıhtılaşması yaklaşık 15 dakika sonra gerçekleştiği için ürünün yaklaşık 10-15 dakikalık çalışma süresi vardır [182]. I-PRF'in; trombositler, lökositler, tip I kollajen, osteokalsin ve büyüme faktörlerini içine alan üç boyutlu bir fibrin ağı oluşturduğu göz önüne alındığında, yumuşak ve mineralize doku iyileşmesi için iyi bir materyal olabileceği düşünülmüştür [183].

I-PRF, kemik greftleri ve bariyer membranlar birleştirilerek uygulama, temporomandibular ekleme enjeksiyon, şiddetli ayak ülserlerinin tedavisi veya kozmetik uygulamalar dahil olmak üzere çeşitli uygulamalar için enjekte edilebilir bir biyomateryal olarak kullanılabilecek sıvı formülasyonu nedeniyle doktorlara TZF'nin daha kolay uygulanabilir ve pratik bir versiyonunu sunmaktadır [181, 184].

Santrifüj süresi tüm trombosit zengin fibrin ürünlerinden çok daha kısadır. Katı PRF materyallerini üretmek için kullanılan tüplerde cam yüzey katı fizyolojik pıhtı oluşumunu desteklemektedir. Ancak plastik tüpler hidrofobik bir yüzeye sahip olması sebebiyle pıhtılaşma sürecini etkin bir şekilde aktifleştirememektedir. Bu nedenle sıvı fazın idamesini desteklemesi amacıyla enjekte edilebilir kan konsantresinin üretiminde bu özel camsız plastik tüpler geliştirilmiştir [17].

I-PRF elde etmek için, antikoagülan içermeyen kaplamasız plastik tüplere venöz kan alınarak, 700 rpm devir sayısında 3 dakika santrifüj edilmektedir [19]. Santrifüj işlemi sırasında I-PRF'i oluşturan kan bileşenleri, 3 dakikada santrifüj kuvveti altında tüpün üst kısmında toplanmakta ve ayrılan plazma ve trombositler, tüpün tepesinde açık sarı renkli bir tabaka oluşturmaktadır. Bu kısım aspire edilebilen ve enjekte edilebilen bir form halinde bulunmaktadır [185].



**Şekil 2.4** Enjekte edilebilir trombositten zengin fibrin hazırlanması [186] .

TZP ve I-PRF'in gingival fibroblast hücreleri üzerine etkisinin incelendiği bir çalışmada, TGF- $\beta$  ve PDGF gibi büyüme faktörleri salınımının başlangıçta TZP'de daha yüksek olmasına rağmen, onuncu günün sonunda I-PRF'in büyüme faktörleri toplam salınımını daha fazla sağlayarak, daha yüksek hücre göçünü indükleyebildiği gösterilmiştir [19].

Biyomalzemelere karşı bağışıklık tepkisi, bir enflamatuvar reaksiyonu ya da biyomateryal aracılı doku rejenerasyonunu etkilemede önemli bir role sahiptir [187]. I-PRF trombosit konsantrisine karşı bağışıklık hücresi tepkileri üzerine yapılan çalışmada I-PRF'in tam kandan daha fazla anti-inflamatuvar yanıtı sahip olduğu gösterilmiştir [188].

Wang ve ark. I-PRF'in ve TZP'nin osteoblast davranışı ve kemik oluşumu üzerine etkilerini karşılaştırdıkları çalışmalarında, I-PRF'in TZP'ya kıyasla insan osteoblastlarının proliferasyonunu, farklılaşmasını ve göçünü etkileyerek osteoblast davranışını daha belirgin şekilde etkileyebileceğini göstermişlerdir [189].

Diş hekimliğinde, alveoler kretlerdeki atrofinin önlenmesi, yara iyileşmesinin desteklenmesi, diş çekimi sonrası soketin korunması ve maksiller sinüs tabanının yükseltilmesi gibi cerrahi işlemlerde kemikte rejenerasyon sürecini hızlandırmak ve rejenerasyonu arttırmak için kemik greft materyalleri ile birlikte, periodontal yumuşak doku rejenerasyonu işlemlerinde, dişeti çekilmelerinin rejenerasyon tedavilerinde I-PRF kullanımı oldukça yaygınlaşmıştır [190-192].

## 2.5 Bor

Atom numarası 5, molekül ağırlığı 10.81 g/mol olan bor (B), periyodik tabloda IIIA grubu elementleri içerisinde bulunmakta ve grubun metal olmayan tek elementidir. [193] Metal ve ametal özelliklerin ikisine de sahip yarı metal bir elementtir. Doğada elemental bir formda ortaya çıkmaz, diğer elementlerle bileşikler (boratlar) oluşturmaktadır [194].

Cam, temizlik ürünleri, beyazlatma, kozmetik, tarım, nükleer sanayi, uçak, metalürji, bilgisayar, enerji sektörü ve sağlık alanı bor materyallerinin kullanım alanları içine girmektedir. Ayrıca bor türevleri sağlık alanında; romatoid artrit, osteoporoz ve yanık tedavilerinde, beyin tümörlerinin Bor Nötron Yakalama Tedavisi (Boron Neutron Capture Therapy, BNCT) ile iyileştirilmesinde, yara iyileşmesinde ve antiseptik olarak lens solüsyonlarında, gargaralarda, merhemlerde ve göz damlalarında kullanılmaktadır [195].

Dünyanın en büyük bor yatakları, Akdeniz ülkelerinden Kazakistan'a kadar olan topografik bir bölgede bulunmaktadır [196]. Türkiye günümüzde sahip olduğu bor rezervleri ile dünyanın önde gelen ülkelerinden biri konumunda olup dünya bor cevheri rezervlerinin %72'sine sahiptir. Borun geniş bir kullanım alanına sahip olması Türkiye'nin jeopolitik ve ekonomik önemini daha da ortaya çıkarmaktadır [197].

### 2.5.1 Borik asit

Borik asit ve borat, bor elementinin doğada en çok bulunan ve en çok kullanılan formlarıdır. ABD Farmakopesi-Uluslararası Kodeksi ve İngiliz Farmakopesi borik asiti ve sodyum boratları tıbbi açıdan önemli bileşikler olarak sınıflandırmıştır. Borik asit, pKa'sı 9.2 olan zayıf bir asittir. Fizyolojik pH'da disosiyasyon olamayan asitin sulu çözeltisi olarak bulunmaktadır [198]. Borik asit, ortoborik asit olarak da adlandırılan kokusuz, beyaz, kristal yapıya sahip, molekül ağırlığı 61.83 g/mol, özgül ağırlığı ise 1.44 g/cm<sup>3</sup> olan bir formdur. Borun çözünür formları arasında en çok karşılaşılan borik

asit ( $H_3BO_3$ ); borakstan, kolemanitten, kernitten ve üleksitten elde edilmektedir ve en yaygın görülen formu ortoborik asittir [194].

### 2.5.2 İnsanlarda borun fizyolojik etkileri

Bor, cilt, beyin gibi organlar, sindirim, iskelet ve bağışıklık sistemleri dahil olmak üzere çeşitli organları ve vücut sistemlerini etkilemektedir. Borun insan için esansiyel olduğu bildirilmemiştir, ancak Dünya Sağlık Örgütü tarafından muhtemel esansiyel element olarak kabul edilmektedir [199]. Bor elementi bitkilerde, hayvanlarda ve ayrıca insanlarda bazı biyolojik süreçlerde önemli işlev gösteren minerallerden biri sayılmaktadır [200]. Borun faydalı bir element olduğu ve hayvanlar için esansiyel olabileceğini öne süren ilk çalışmada, borun kısmen D vitamini yönünden eksik bir diyetle beslenen civcivlerde kemik kalsifikasyonunu iyileştirebileceği gösterilmiştir [201].

Bor, hayvan ve insan biyolojisi için temel öneme sahip dinamik bir besin olup, piridoksin, riboflavin, polisakkaritler, dehidroaskorbik asit, piridin nükleotidi, bor ile etkileşebilecek biyolojik maddelerden bazılarıdır. Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADP) ve nikotinamid adenin dinükleotit ( $NAD^+$ ), enerji metabolizmasında aktif olan ve riboz içeren bileşenlerdir. Bu moleküllerin bor için güçlü bir afinitesi vardır. Bu nedenle, bu spesifik metabolik yollar, bor ve bu moleküller arasındaki bağlantıdan etkilenebilmektedir [202]. Ayrıca bor, haberci RNA'nın (mRNA) ana bileşeni olan ribozu stabilize etmektedir ve ekspresyonunu düzenlemektedir [203]. Bu düzenleme, çeşitli hücre dışı proteinleri, kollajen tip I, kemik sialoproteini, osteopontin ve osteokalsin gibi mineralize doku proteinlerini etkilemektedir. Bu aktivitelerin birleşik etkisi, kemik hücrelerinin mineralizasyonu, proliferasyonu, osteoblast hücre canlılığı ve morfolojisini geliştirmektedir [204]. Ayrıca bor, çok sayıda mikro besin maddesinin metabolizmasında yol gösterici bir işleve sahiptir. Bu mikro besinlerden olan kalsiyum, magnezyum, fosfor ve D vitamini, kemik metabolizmasıyla ilgilidir. Bunların ışığında bor, osteogenezde önemli işlev gören bir moleküldür. Bor eksikliğinin kemik rejenerasyonunu ve gelişimini olumsuz etkilediği gösterilmiştir [205, 206].

Borun, yara iyileşmesinde önemli bir rol oynayan ve fibroblastlarda bulunan tripsin benzeri enzimleri, elastazı, kollajenazı, alkalın fosfataz gibi spesifik enzimleri doğrudan etkileyerek anahtar enzim aktivitelerini kolaylaştırdığı, hücre dışı matris döngüsünün iyileşmesine neden olduğu gösterilmiştir [207]. Bor takviyesi, idrarla

atılımı azaltıp plazmadaki iyonize kalsiyum konsantrasyonlarını artırarak kalsiyum metabolizmasına etki etmektedir [208]. Son yıllarda borun osteogenez ve kemiğin sağlığının korunması üzerindeki etkisi *in vivo* olarak incelenmiştir [209]. Doğan ve arkadaşları tarafından borun sıçan adipoz kaynaklı kök hücreleri üzerinde çoğalma ve adezyonu artırdığı, farklılaşma yönünden olumlu etkileri olduğu tespit edilmiştir [210].

### 2.5.3 Borun tıp ve diş hekimliği alanında önemi

Son dönemde borik asitin tıp ve diş hekimliği alanında, hem hayvanlarda hem de insanlarda tıbbi amaçlı kullanımını irdeleyen çalışmalar yapılmaktadır [195].

Bor sağlıklı bir kemik yapısının oluşmasında son derece önemli rol oynayan minerallerin metabolizmasını olumlu yönde etkilemektedir. Literatürde besinsel borun menapoz sonrası kadınlarda kalsiyum kaybı ve kemik demineralizasyonunu azalttığı, borik asitten eksik beslenen (günlük 0.1 mg/kg) sıçanlarda ek bor (günlük 3 mg/kg) ile beslenen sıçanlara göre kemik hacminde önemli derecede azalma meydana geldiği gösterilmiştir [211, 212].

Hakkı ve ark. [204] borik asitin moleküler seviyesinin MC3T3-E1 fare osteoblastik hücre hattının çoğalmasını, mineralizasyon seviyesini ve kolajen tip I ve osteokalsin gibi kemik büyümesiyle ilgili mRNA düzeylerini artırdığını göstermiştir.

Bor katkılı doku iskelelerinin ve materyallerin kemik doku mühendisliğindeki etkinliğinin değerlendirildiği çalışmalardan elde edilen bulgular ile borun osteoindüktif bir ajan olarak kullanılabileceği, hücrelerin farklılaşmasını desteklediği ve mineralizasyonunu arttırdığı gösterilmiştir [213, 214].

Borun kıkırdak ve kemik oluşumu ve devamlılığında etkili bir element olduğu bilinmekle birlikte, mine, dentin ve sement gibi diş yapılarını etkileyip etkilemediği belirsizliğini korumaktadır. Bor, süt ve daimi dişlerin diş minesinde bulunmaktadır [215]. Haro-Durand ve ark. [216], bor eksikliğinin diş minesinin kalınlığı ve kimyasal yapısı üzerindeki etkisini araştırmak için sıçan daimi kesici dişlerini kullanarak bir çalışma gerçekleştirmişlerdir. Çalışmada 14 gün boyunca diyetinde 3 mg/kg bor ile beslenen sıçanlarla karşılaştırıldığında, bordan eksik bir diyet (0,07 mg/kg) ile beslenen sıçanların mine kalınlığında bir azalma görülmüş, ancak mineralizasyonda önemli bir değişiklik bulunmamıştır. Ayrıca bordan yoksun bir diyetle kemik ve diş büyümesinin önemli ölçüde etkilendiği bildirilmiştir [217].

Tavşanlar ile yapılmış bir başka deneysel çalışmada 4 hafta boyunca yüksek enerjili diyetle ek olarak sodyum borat dekahidrat takviyesi ile bor alımının arttırılmasının dişteki mineral kompozisyonunu değiştirdiği ve alveolar kemik gelişimine yararlı etkileri olduğu gösterilmiştir [218].

Deneysel periodontitis oluşturulan sıçanlara, oral yoldan günlük 3 mg borik asit 11 gün boyunca sistemik olarak verilip, klinik olarak alveoler kemikteki değişiklikler ve histopatolojik olarak doku örnekleri incelemiştir. Çalışma sonucunda borik asit verilen sıçanlarda borik asit verilmeyen kontrol grubuna göre enflamatuvar hücre infiltrasyonu, osteoklast sayısı ve alveoler kemik kaybının daha az olduğu tespit edilmiştir [219].

## 2.6 Sitotoksisite ve Sitotoksisite Testleri

Hücrelerin canlılık seviyeleri veya çoğalma oranları, hücre sağlığının göstergesi olarak sayılmaktadır. Fiziksel ve kimyasal ajanlar hücre sağlığını ve metabolizmasını etkileyebilmektedir. Sitotoksisite incelenen ajanın dozuna ve maruziyet süresine bağlı olarak hücrelere değişik derecelerde zarar veren bir durumdur. Sitotoksik maddeler hücre zarının yıkımı, protein sentezinin önlenmesi, reseptörlere geri dönüşümsüz bağlanma, polideoksinükleotid uzamasının inhibisyonu veya enzimatik reaksiyonlar gibi farklı mekanizmalarla hücrelerde toksisiteye neden olabilmektedir [220]. Sitotoksisite sonucu hücrelerde apoptoz, otofaji ve nekroz gibi olaylar sonucu ölüm meydana gelebilmekte ya da sitostazis nedeniyle proliferasyon özellikleri kaybolabilmektedir [221]. Çeşitli sebeplerle meydana gelen hücre ölümünü belirlemek için ucuz, güvenilir ve tekrarlanabilir kısa süreli sitotoksisite ve hücre canlılığı analizlerine ihtiyaç vardır. Uygulanan sitotoksisite test yönteminin türü ne olursa olsun, önemli olan çalışma sonundaki canlı ve ölü hücre miktarının belirlenmesidir [222].

Günümüzde materyallerin insanlara uygulanmadan önce biyouyumluluk değerlendirmelerinin yapılması için çeşitli testler kullanılmaktadır [223]. Dental materyallerin biyolojik özelliklerinin test edilmesinde ilk basamak olarak genellikle hücre kültürlerinin kullanıldığı basit ve hızlı olan *in vitro* test yöntemleri uygulanır. Hücre kültürü yönteminde amaç canlı dokudan elde edilen parçaların *in vitro* koşullarda yaşama ve üremelerini sağlamaktır. Dokudan alınan yapılar 37°C sıcaklık, %5 CO<sup>2</sup> ve %95 nem içeren koşullarda kültüre edilmekte, vücudun özđün fizyolojik

durumunu taklit eden besleyici sıvılarda beslenmesi sağlanarak çoğaltılmaktadır [224]. Hücre kültürü uygulamaları ile materyalin fiziksel ve kimyasal etkileri, mutajen faktörleri, neden olduğu yapısal bozukluklar belirlenmektedir. Yöntemin temeli; materyallerin kültürdeki hücreler üzerine doğrudan veya indirekt uygulanması ve doz-cevap eğrisi sayesinde potansiyel sitotoksitenin belirlenmesi prensibine dayanmaktadır [225]. *In vitro* incelemelerden sonra daha maliyetli ve uzun zaman gerektiren hayvan testleri ile devam edilir ve istenilen sonuçlar elde edildiğinde kullanım testleri (*in vivo* değerlendirme) gibi daha kapsamlı çalışmalar yapılmaktadır [223].

### 2.6.1 Sitotoksite sonuçlarının değerlendirilmesi

Materyallerin sitotoksitesi değerlendirilirken hücre canlılığı, hücre proliferasyonu, membran geçirgenliği, DNA, RNA ve protein sentezi, metabolik olayların değerlendirilmesi gibi biyolojik faktörler incelenmektedir. Sitotoksitenin değerlendirilmesinde dört farklı test yöntemi kullanılmaktadır:

1. Canlılığı değerlendiren testler
2. Yaşamı değerlendiren testler
3. Hücre proliferasyonunu değerlendiren testler
4. Hücre metabolizmasını değerlendiren testler

#### 2.6.1.1 Canlılığı değerlendiren testler

Hücre canlılığı, bir numunedeki sağlıklı hücre sayısı olarak tanımlanır. Hücre canlılığının ölçümü, tüm hücre kültürü formları için önemli bir rol oynamaktadır. Canlılık değerlendirme testleri esas olarak, etkene bağlı kısa zaman aralığında meydana gelen sitotoksik reaksiyonları değerlendirmek için kullanılmaktadır [226]. Canlı hücre sayısını belirlemek için kullanılabilecek birkaç tür test vardır. Bu tahliller, enzim aktivitesi, hücre zarı geçirgenliği, hücre yapışması, adenozin trifosfat (ATP) üretimi, ko-enzim üretimi ve nükleotid alım aktivitesi dahil olmak üzere hücrelerin çeşitli işlevlerine dayanmaktadır [227]. Hücre canlılık değerlendirme deneylerinde iki farklı tipte boya kullanılmaktadır. Bunlardan biri canlı hücrelerin içerisine aktif olarak girebilen ve zar geçirgenliği artıncaya kadar hücre içinde tutulabilen vital boyalar, diğeri ise ancak sitotoksite nedeniyle membran geçirgenliği bozulduğu zaman hücre içine girebilen vital olmayan boyalardır [228].

#### **2.6.1.2 Yaşamı değerlendiren testler**

Bu yöntemde kullanılan koloni oluşturma (plating efficiency) düzeyi testi tek tip hücrelerin hayatta kalabilme ve koloniler oluşturabilme kapasitelerini belirleyen bir test tipidir. Uzun dönemde meydana gelen toksik reaksiyonların incelendiği bu canlılık değerlendirme testinin uygulanabilirliği daha kolay ve hızlıdır. Ancak sadece değerlendirme anındaki ölü hücreleri tespit etmeleri bu testlerin bir dezavantajı olarak görülmektedir [223].

#### **2.6.1.3 Proliferasyon değerlendiren testler**

DNA sentezinin değerlendirildiği bir sitotoksite değerlendirme yöntemidir. Hücre proliferasyonu sırasında DNA sentezinin gösterilmesinde kullanılan timin analogu bir belirteç olan bromodeoksiuridin immünohistokimyasal testi ve hücre proliferasyonu sırasında uygulandığında hücre içine alınarak radyoaktivitesi sayesinde DNA sentezi yapan hücreleri belirleyen radyoaktif bir nükleotit olan H-Timidin testi proliferasyonu değerlendiren testlerdendir. Bu testlerde incelenen hücrelerin testin erken aşamalarında ve üreme fazı içerisinde bulunduğu andaki büyüme eğrileri kullanılarak sonuçlar elde edilir [223].

#### **2.6.1.4 Metabolizma değerlendiren testler**

Ölmekte olan hücreler; hücre canlılığı, fonksiyon devamlılığı ve hücre büyümesi için gerekli enerjiyi sağlayamazlar. Ölü hücrelerde mitokondri enzimleri aktivitesini kaybetmektedir. Bu yöntemde mitokondri enzimlerinin substratı olan maddeler hücrelere verilerek kolorimetrik analiz yapılmaktadır. Ucuz ve hızlı bir yöntemdir. MTT testi (3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium Bromide), alamar mavisi testi ve laktat dehidrogenaz testi gibi testler metabolizmayı değerlendiren yöntemde kullanılan testlerdir [229].

### **2.7 Hücre Ölüm Tipleri: Apoptoz, Nekroz**

Hücre ölümünün, birincisi nekroz diğeri ise apoptozis olmak üzere farklı morfolojik özellikli iki tipi bulunmaktadır. Programlı hücre ölümü olan apoptoz, hücresel homeostatik dengenin sürekliliği, hücre çoğalması ve farklılaşmasında öneme sahip hücre eliminasyonu için gerekli bir fizyolojik olaydır [230]. Apoptozisin,

embriyogenezis sırasında hücrelerin lokal olarak ortadan kaldırılmasından sorumlu olduğu ve erişkinlerde birçok dokuda normal hücre döngüsünde gerçekleşen fizyolojik bir olay olduğu bilinmektedir. Apoptoz, normal fizyolojik koşullarda gerçekleştiği gibi aynı zamanda herhangi bir zararlı etkenden dolayı koruyucu bir mekanizma olarak da ortaya çıkabilmektedir [231].

Apoptozise ait morfolojik değişiklikler üç aşamada gerçekleşmektedir; birinci aşamada, çekirdek ve hücre yoğunlaşması, ikinci aşamada, hücre tomurcuklanmasını takiben apoptotik cisimciklerin oluşumu ve son safha ise bu cisimciklerin fagositozudur [232].

Diğer ölüm şekli olan nekroz ise, fiziksel ve kimyasal uyarılar (UV, ağır metaller, ısı, toksik madde) sonucunda hücrelerin iyon dengesinde değişime bağlı meydana gelen patolojik bir durumdur. Bu süreçte hücre membran geçirgenliğinin artmasına bağlı olarak lipid peroksidasyonu sonucu meydana gelen ürünler hücreler arası sıvıya geçiş gösterir ve enflamatuvar yanıt gelişir.

### **2.7.1 Apoptozun saptanmasında kullanılan yöntemler ve akım sitometri**

Araştırmacılar materyallerin neden olduğu toksisitenin sonucu meydana gelen hücre ölüm tiplerini araştırmışlar ve canlı hücreleri erken apoptoz, geç apoptoz ve nekroza uğramış hücre tiplerinden ayırt edebilmek adına yeni yöntemler geliştirmişlerdir [229]. Apoptozun saptanmasında kullanılan yöntemler şu şekilde sıralanabilmektedir [233]:

#### **1) Morfolojik görüntüleme yöntemleri**

- a. Işık Mikroskobu ile görüntüleme
  - i. Hematoksilen Boyama
  - ii. Giemsa Boyama
- b. Floresan Mikroskobu ile görüntüleme
- c. Elektron Mikroskobu ile görüntüleme
- d. Faz Kontrast Mikroskobu ile görüntüleme

#### **2) İmmünohistokimyasal yöntemler**

- a. Anneksin V Yöntemi
- b. TUNEL Yöntemi
- c. M30 Yöntemi
- d. Kaspaz-3 Yöntemi

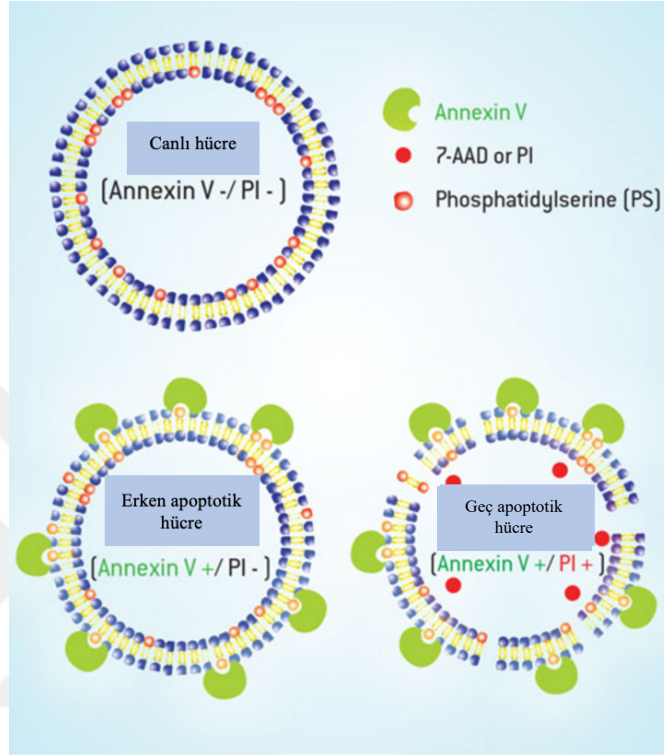
#### **3) Biyokimyasal yöntemler**

- a. AgaroZ Jel Elektroforezi
  - b. Western Blotting
  - c. Akım Sitometri
- 4) İmmunolojik yöntemler
- a. ELİSA
  - b. Fluorimetrik yöntem
- 5) Moleküler biyoloji yöntemleri

Yalnızca ökaryotik hücrelerde bulunan anneksinler, kalsiyum bağlayıcı membran proteinleridir. Hücre bölünmesi, apoptozis, büyümenin düzenlenmesi, ekzositoz, endositoz, mitogenik sinyal transdüksiyonu, farklılaşma ve koagülasyon gibi çeşitli fizyolojik süreçlerde fonksiyonları bulunmaktadır [234]. Membran lipidlerinden biri olan fosfatidilserin (PS) hücrelerin hücre zarının sitoplazmik yüzeyinde bulunmaktadır. Hücre apoptoza gittiğinde normalde zarın iç yüzeyine yerleşmiş olan PS molekülleri hücre zarının dış yüzüne transloke olmaktadır. Bu yer değiştirme durumu hücre membran bütünlüğünün henüz bozulmadığı apoptotik hücre ölümünün erken dönemlerinde meydana gelmektedir. Anneksin V etkili biçimde negatif yüklü fosfolipidlere, fosfatidilserine (PS) bağlanabilen bir protein olduğu için, floresan bir madde ile (örn. FITC) işaretlenerek apoptotik hücreleri görünür hale getirebilmektedir [235-237]. Anneksin V bağlama deneyi, apoptozu akım sitometri veya floresan mikroskobu ile belirlemede kullanılan kesin, hızlı ve güvenilir bir tekniktir. Akım sitometrisi ile lazer ışığı kullanılarak floresan maddelerle işaretlenmiş antikolar yardımıyla hücre ya da partiküller hakkında, verdikleri sinyaller toplanarak veriler elde edilmektedir. Böylelikle apoptotik hücreler rahatlıkla belirlenebilmektedir [238]. Anneksin-V nekrotik hücrelerin yüzeylerine de bağlanma gerçekleştirebildiği için apoptotik hücreyi nekrotik hücreden ayırmak için ikinci olarak hazırlanan süspansiyon Propidium iyodür (PI) ile boyama tercih edilmektedir. Anneksin V boyalı hücrelere PI ilavesi; canlı hücreler ve erken apoptotik hücreler ile geç apoptotik veya nekrotik hücreler arasında ayırım yapılmasına izin vermektedir [239].

Anneksin V/ PI ile boyalı hücrelerin akım sitometride analizi, anneksin V ve PI negatif (çift negatif), anneksin V pozitif ve PI negatif (tek pozitif) veya anneksin V ve PI pozitif (çift pozitif) kesimlenmiş hücrelerin tespitini sağlamaktadır. Apoptozun erken safhalarında hücreler, tek pozitif Anneksin V bağlı hücreler olarak noktasal grafiğin alt sağ köşesinde konumlanır ve bu aşamada hücre membranları hala bütünlük

gösterdiğinden PI hücre içerisine penetre olamamaktadır. Apoptozun ileri safhalarında ve hücre ölümüne nekroz olarak giden hücrelerde, PI hücre içerisine penetre olarak Anneksin V ve PI çift pozitif popülasyon oluşturmaktadır [240, 241] (Şekil 2.5).



**Şekil 2.5** Anneksin V ve PI boyaları ile erken, geç apoptotik ve canlı hücrelerin boyanması [242].

## 2.8 Akım sitometri yöntemi

Gelişimi 1950'lere dayanan akım sitometrisinin ilkesi, lazer aracılığıyla sıvı akışı içindeki hücreleri karakterize etmek veya fenotiplendirmektir. Akım sitometrisi genelde lazer veya akustik temele dayanan bir tekniktir. Akım sitometrisinde hücreler genellikle floresan işaretleyicilerle etiketlenmektedir, bu şekilde ışık hücre tarafından absorbe edilmekte ve daha sonra bir dalga boyu bandında yayılmaktadır. Böylece çok sayıda hücre hızlıca incelenebilmekte ve toplanan veriler bir bilgisayar tarafından işlenmektedir [243].

Kantitatif bir hücre analiz tekniği olan akım sitometrisinde hücreler, büyüklüklerine, taneciklerine veya belirli bir floresan molekülü taşıyıp taşımadığına bağlı olarak karakterize edilebilmektedir [244]. Akım sitometri ile hücrelerin fiziksel

özelliklerinin yanında enzim aktiviteleri, DNA içeriği, DNA degradasyonu, granülleri, canlılığı ve mitokondriyel membran potansiyeli gibi özellikleri de değeriendirilebilmektedir [245].

Akım sitometrisinde, hücre canlılığı ve toksisite analizleri, bir hücre tipinin farklılaşma durumunu belirlemek, karışık bir kültürden belirli bir hücre tipini analiz etmek, bağışıklık aktivasyon durumunu belirlemek gibi amaçlar için diğer boyalarla kolayca kombine edilebilmektedir [246].



### 3.GEREÇ VE YÖNTEM

Enjekte edilebilir trombositten zengin fibrin ve bor materyalinin DP-MKH üzerindeki sitotoksitesinin ve farklılaşmaya olan etkisinin değerlendirildiği bu araştırma, Bezmialem Vakıf Üniversitesi Girişimsel Araştırmalar Etik Kurulu'nun 19.08.2020 tarih ve 2020/45 dosya numaralı raporu ile onaylandı (Ek A). Çalışmamız Bezmialem Vakıf Üniversitesi Bilimsel araştırmalar Proje Birimi'nin 20200901 numaralı projesi ile desteklendi. Kök hücre izolasyonu amacıyla kullanılan 6 adet tam gömük yirmi yaş dişinin temini Bezmialem Vakıf Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Ağız Diş Çene Cerrahisi Anabilim Dalı'ndan sağlandı. Kök hücre izolasyonu ve çalışmanın diğer tüm aşamaları Marmara Üniversitesi Çocuk İmmünoloji Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi.

Bu çalışma üç aşamada gerçekleştirildi. Çalışma planı Tablo 3.1'de gösterilmiştir.

|                                                                                                                                                 |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. <b>Aşama:</b> Gömük yirmi yaş dişin çekilmesiyle elde edilen dokulardan dental pulpa kök hücrelerinin eldesi, proliferasyonu ve pasajlanması |
| 2. <b>Aşama:</b> Test materyal örneklerinin hazırlanması                                                                                        |
| 3. <b>Aşama:</b> Canlılık ve odontojenik farklılaştırma testlerinin yapılması ve değerlendirilmesi                                              |

**Tablo 3.1** Çalışma planı

#### 3.1. Deney Gruplarının Belirlenmesi

Canlılık ve farklılaşma deneyleri için, pozitif (+) kontrol grubu (complete DMEM), borik asit, I-PRF, borik asit ve I-PRF kombinasyonu olmak üzere 4 çalışma grubu belirlendi.

### 3.2 Tam Gömük Yirmi Yaş Dişinin Temini

Hazırlanmış olan "Gönüllü Bilgilendirme Formu" (Ek B) çalışmaya dahil edilen bireylere okutuldu imzalatıldı. Bezmialem Vakıf Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Ağız, Diş Çene ve Cerrahisi Anabilim Dalı polikliniklerinde, pulpa mezenkimal kök hücresi elde edilecek olan diş radyografide periapikal patoloji saptanmayan gönüllülerden çekim endikasyonlu tam gömük yirmi yaş dişleri alınarak elde edildi (Şekil 3.1). Tam gömük yirmi yaş dişlerinin çekilmesi etik ve asepsi kurallarına uygun şekilde gerçekleştirildi. Çekilen dişlerin dış yüzeyi %70 alkol ile dezenfekte edildikten sonra %1 Penisilin/Streptomisin içeren fosfat tamponlu salin (PBS) ile dolu tüpe alınarak, buz kalıpları içerisinde, maksimum 1 saatlik süre zarfında çalışmanın gerçekleştirileceği Marmara Üniversitesi Çocuk İmmünoloji Laboratuvarı'na getirildi. Dental pulpa mezenkimal kök hücresi izolasyonu için toplamda 6 adet çekilmiş diş kullanıldı.



**Şekil 3.1** Cerrahi operasyonla alınmış tam gömük 38 numaralı dişin panoramik radyografi görüntüsü

### 3.3. Hücre Kültürü, DP-MKH'in İzolasyonu ve Karakterizasyonu

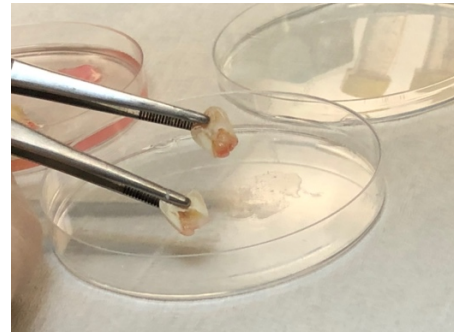
#### 3.3.1. Tam Gömük Yirmi Yaş Dişi Pulpası Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin İzolasyonu

Diş uygun şartlarda laboratuvara ulaştırıldıktan sonra, aseptik ortamda LAF (laminar flow) kabinde (Şekil 3.2) mesiodistal yönde dentin dokusunun orta üçlüsüne kadar, çift taraflı elmas disk takılmış düşük devirde dönen aletle, ara ara serum fizyolojik ile nemlendirilerek, ortadan kesilip bir el aletiyle (pens) iki parçaya ayrıldı

ve iç kısmında yer alan pulpa dokusu çıkarıldı (Şekil 3.3). Pulpa mekanik parçalama için bistüri ile 0,1-0,5 mm'lik küçük parçalara bölündükten sonra, enzimatik parçalama için DPBS (Dulbecco'nun fosfat tamponlu salini, Thermofisher, ABD) içinde 3mg/ml tip I kollajenaz (Gibco, ABD) içeren 2 ml'lik enzim solüsyonuna aktarıldı. Steril tüp içerisinde ayrılmış olan dokular 37°C sıcaklık, %5 CO<sub>2</sub> ve nemli ortam sağlayan inkübatörde 45 dk kadar bekletildi.



**Şekil 3.2** Laminar akışlı steril kabin.



**Şekil 3.3** Yirmi yaş dişinden pulpa dokusunun elde edilmesi.

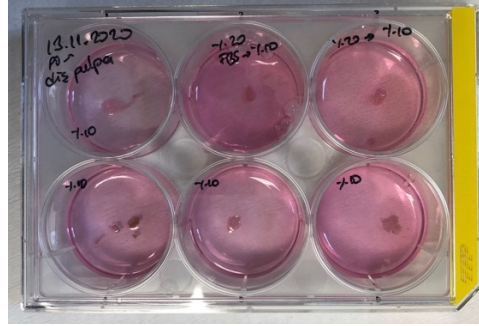
Tüpler inkübatörden çıkarıldıktan sonra dokuların homojenliğini sağlamak için Dulbecco's Modified Eagle Medium'da (DMEM; Gibco, ABD) (Şekil 3.4) pipetaj işlemi yapıldı ve kollejenaz enzim aktivasyonunu durdurmak için DMEM ile yıkanan hücreler 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi (Şekil 3.5). Üstte kalan sıvı (süpernatant) atıldı, hücreler tüpün alt kısmında kaldı. Hücreler ekim işlemi için, 2 ml %1 Penisilin/Streptomisin (Biowest, Fransa) ve %10 fetal sığır serumu (FBS, Gibco, ABD) içeren Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Biowest, Fransa) kültür ortamına alındı (Şekil 3.6). Kültürdeki hücreler 37°C sıcaklık, %5 CO<sub>2</sub> ve nemli ortam sağlayan inkübatöre konuldu (Şekil 3.7). Besi ortamı her 2-3 günde bir tazelenerek hücrelerin çoğalmaları ve yayılmaları ışık mikroskobu (EVOS-AMG, ABD) altında düzenli aralıklarla takip edildi (Şekil 3.8).



**Şekil 3.4** Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)



Şekil 3.5 Santrifüj cihazı



Şekil 3.6 Kültür kabına yerleştirilen hücreler



Şekil 3.7 İnkübatör



**Şekil 3.8 Işık mikroskobu**

### **3.3.2. İzole edilen DP-MKH'lerin pasajlanması**

Üreyen ve tabana yapışan hücrelerin %70-80 taban yayılma oranına ulaştıkları ışık mikroskobunda kontrol edildikten sonra inkübe edilip tripsinizasyon yöntemi kullanılarak hem morfolojilerini korumak hem de canlılıklarını yitirmemeleri amacıyla pasajlama işlemine geçildi. 7 gün sonunda flask üzerinde yoğunluk göstermeye başlayan hücrelerin birinci pasajlama işlemi gerçekleştirildi. Birinci kültür işlemi sıfırıncı pasaj (P0) olarak kabul edilerek, birinci kültür işleminden sonra her kültür işlemi için pasaj sayıları P1, P2, P3 şeklinde belirlendi. Laminar akışlı steril kabin içerisinde gerçekleştirilen pasajlama işleminde; hücre ortamı steril pipetlerle uzaklaştırılarak, %0,25 tripsin-EDTA (Biowest, ABD) ile 4 dk. 37°C'de tripsinizasyon işlemine tabi tutuldu. 4 dk. sonunda enzim aktivitesi DMEM ile durdurularak hücreler toplandı. Toplanan hücreler 15 ml'lik steril falkon tüpe aktarıldı, 1500 RPM'de 5 dk. santrifüjlenerek yüzeydeki süpernatant atıldı ve kalan hücre pelleti 1 ml DMEM solüsyonda süspanse edilerek hücre sayısı hesaplandı. Her  $5 \times 10^5$  hücre için 1 adet T75 kültür kabı kullanılarak bu işlem P3'e kadar aynı şekilde devam ettirildi. P3'e gelen DP-MKH'nden  $1 \times 10^6$  kadarı karakterizasyon işlemi için ayrılırken kalan hücreler DP-MKH'nin farklılaştırma analizlerinde ve deney gruplarına göre Annexin / PI (Biolegend, cat no: 640914) ile apoptoz analizi işlemlerinde kullanıldı. Hücreler materyallerin uygulanacağı güne kadar dondurma medyumuna ve hücre

süspansiyonu oranı 1:1 olacak şekilde dondurma tüplerine alınarak -80°C’de derin dondurucuya kaldırıldı.

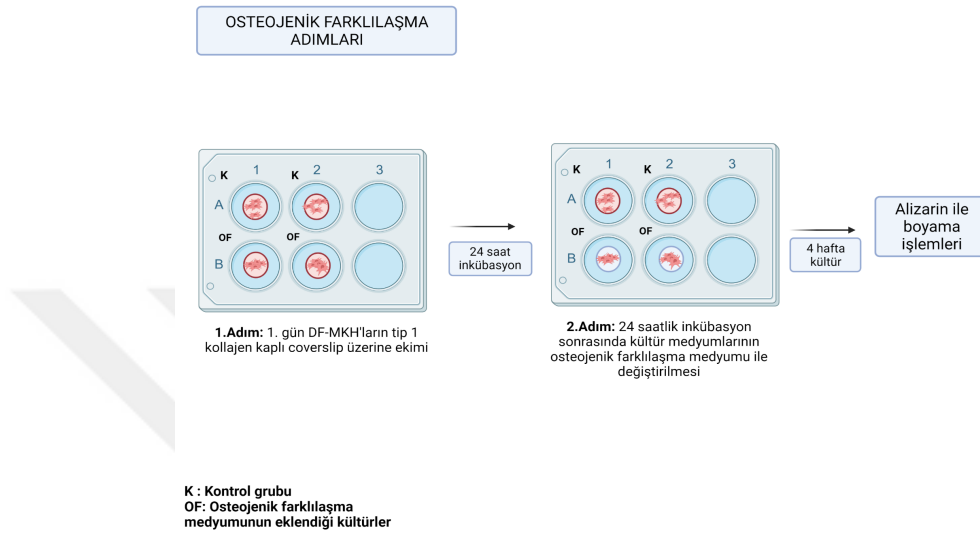
### **3.3.3 İzole edilen DP-MKH’in sayımı**

Pulpa dokusundan izolasyonu sağlanan kök hücreler için pasajlama işlemleri sırasında, karakterizasyon işlemleri öncesinde ve dondurma işlemleri sonrasında hücre sayımı gerçekleştirildi. Hücre sayımı için; homojenize edilen hücrelerden eppendorf tüpüne aktarılan 10 µl hücre süspansiyonu üzerine, mikropipet yardımıyla 10 µl %0,4 tripan mavisi solüsyonu (Sigma Aldric, ABD) eklendi. Hücre sayımı için hemositometre kullanıldı. Düz bir zemin üzerine konulan hemositometrenin sayım yapılacak olan çerçevesinin üzeri lamel ile kapatıldı. Tripan mavisi solüsyonu eklenerek eppendorf tüpünde hazırlanmış olan süspansiyondan 10 µl mikropipet yardımıyla alınarak ile thoma lamında, ışık mikroskobu altında 40x büyütme ile sayımı gerçekleştirildi.

### **3.3.4 İzole edilen DP-MKH’in osteojenik, kondrojenik ve adipojenik olarak farklılaşma kapasitelerinin belirlenmesi**

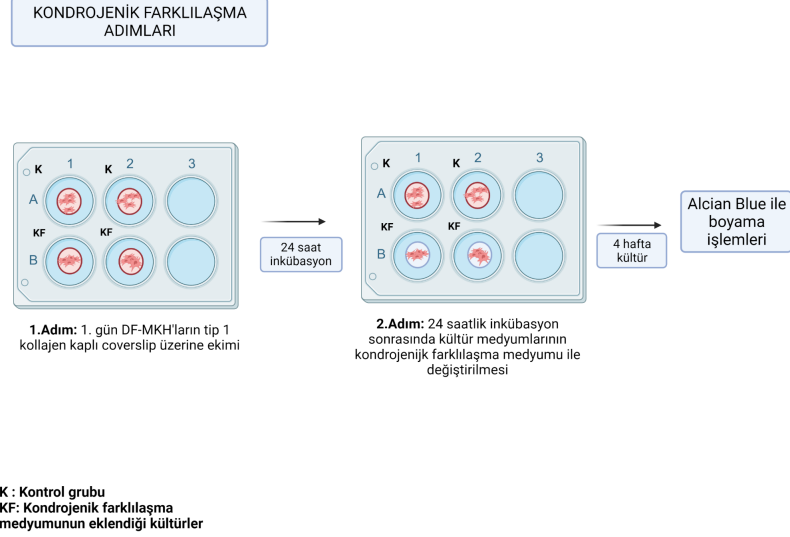
Yukarda anlatıldığı şekilde izole edilen, sayımı yapılan ve 3. Pasaja getirilen hücrelerin adipojenik, kondrojenik ve osteojenik farklılaşma kapasitelerini belirlemek için 6 kuyucuklu plaklara her bir kuyusuna tip I kollajen kaplı lameller üzerine  $1 \times 10^5$  hücre ekildi. 37°C de %5 CO<sub>2</sub> inkübatörde %80-90 konfluent olana kadar inkübe edildi. Konfluent hücrelerin üzerinden besiyeri çekilip atıldı hücreler 3 farklı kültür kuyusuna ayrıldı ve her bir kuyucuğa 2 ml olmak üzere osteojenik farklılaşma besiyeri (Osteogenesis Differentiation Kit, StemPro, Thermo Fischer, ABD, A1007201), adipojenik farklılaşma besiyeri (Adipogenesis Differentiation Kit, StemPro, Thermo Fischer, ABD, A1007001), kondrojenik farklılaşma besiyeri (Chondrogenesis Differentiation Kit, StemPro, Thermo Fischer, ABD, A1007101) ilave edildi. 37°C de Hücreler %5 CO<sub>2</sub> inkübatörde inkübe edildi. Farklılaşma besi yerleri 3 günde bir yenilendi ve 21-28. gün sonunda farklılaşmaları tespit edebilmek için boyama işlemine geçildi. Boyama işlemleri için; adipojenik, osteojenik ve kondrojenik farklılaşma ortamları aspire edildi, 1 dakika boyunca 2 ml DPBS eklenerek bekletildi, DPBS aspire edilip 2 ml formalin ile 45 dakika karanlık ortamda inkübe edildi. 2 kere distile su ile yıkandıktan sonra;

Osteojenik farklılaşmanın belirlenmesi için Alizarin Red (ALR) boyama protokolü uygulandı. Hücreler 2 ml ALR (Alizarin Red, Sigma-Aldrich, ABD; A5533-25G) ile ortalama 45 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra distile su ile yıkandı. Osteojenik farklılaşma belirteci olan hücre dışı kalsifikasyonu gözlemlemek için, mikroskopta kalsiyum birikimlerinin varlığı incelendi (Şekil 3.9).



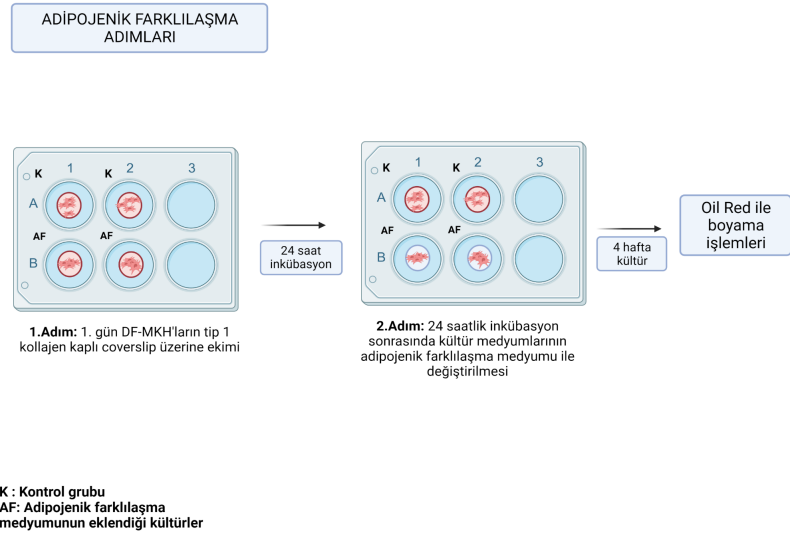
**Şekil 3.9** Osteojenik farklılaştırma deney düzeneği

Kondrojenik farklılaşmanın belirlenmesi için Alcian blue boyama protokolü uygulandı. Kuyucuklara 3 ml Alcian Blue (Alcian Blue Sigma- Aldrich, ABD; A5268-10G) eklendikten sonra ortalama 45 dakika karanlık ortamda oda sıcaklığında bekletildi. Daha sonra 15 dakika 1,2 ml etil alkol, 800 µl asetik asit ile inkübe edildi ve DPBS ile yıkandıktan sonra mikroskopta proteoglikanların varlığı gözlemlendi (Şekil 3.10).



**Şekil 3.10** Kondrojenik farklılaştırma deney düzeneği

Adipojenik farklılaşmanın belirlenmesi için Oil Red O ile boyama protokolü uygulandı. Hücrelere 5 dakika 2 ml isopropanol (%60) uygulandıktan sonra 2 ml Oil Red O (Sigma-Aldrich, ABD; O0625-100G) ile 45 dakika karanlık bir ortamda bekletildi. Daha sonra hücreler 1 dakika hematoksilin ile muamele edildi ve mikroskopta yağ damlacıklarının varlığı incelendi (Şekil 3.11).



**Şekil 3.11** Adipojenik farklılaştırma deney düzeneği

### 3.3.5 DP-MKH karakterizasyonu ve akım sitometri

İzole edilen ve flasklara yapışan hücrelerin morfolojik özellikleri ters ışık mikroskopunda çalışma süresi boyunca incelendi, daha sonra DP-MKH'nin P3 sonrası fenotipik özelliklerinin belirlenmesi için akım sitometri analizine tabi tutuldu. Kök hücreler bulunduğu kültür kaplarından tripsinizasyon ile kaldırılıp hücre sayımı yapıldı ve DPBS ile yıkandı. Hücreler  $1 \times 10^6$  hücre/ml yoğunlukta DPBS içerisinde homojenize edildi. Homojenize edilen hücreler polystyrene tüplere aktarıldıktan sonra belirlenen hücre yüzey işaretleyicilerine özel floresan izotiyosiyonat (FITC), fikoeritrin (PE), allofikosyanin (APC) konjuge monoklonal antikorlar; CD73 PE, CD90 PE, CD105 PE, CD146 FITC, CD29 APC, CD45 FITC, CD34 PE, CD25 APC, CD28 PE, CD14 PE ve izotip kontrollerinden (Mouse IgG1,  $\kappa$ ) 10  $\mu$ l eklenerek 15 dakika boyunca oda sıcaklığında, karanlık bir ortamda inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında 400  $\mu$ l DPBS eklendi ve 1200 rpm' de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı ve 500  $\mu$ l hücre yıkama solüsyonu (Cell Wash, BD Biosciences, ABD) eklenip resüspanse edildi. Hazırlanan hücre süspansiyonu FACS Calibur akım sitometri cihazında (BD San Jose, CA, ABD) okutuldu.

### 3.4. Materyal Örneklerinin Hazırlanması

Bu çalışmada borik asit (Ulusal Bor Araştırma Enstitüsü-BOREN) ve I-PRF kan ürünü, dental pulpa kök hücresi üzerine sitotoksik etkileri ve odontojenik farklılaşma değerlendirilmesi amacı ile karşılaştırmalı olarak incelendi.

#### 3.4.1. Borik asit solüsyonu hazırlanması

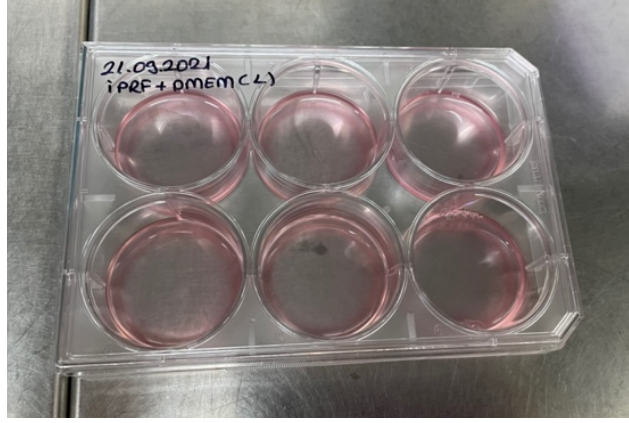
Ulusal Bor Araştırma Enstitüsü-BOREN (Ankara, Türkiye) tarafından sağlanan borik asit çözeltileri 0.1 g/ml stok çözeltisi içinde çözülerek hazırlandı ve 0.2  $\mu$ m'lik bir filtreden (Sartorius AG, Göttingen, Almanya) süzülerek kullanıma hazır hale getirildi (Şekil 3.12). Daha sonra düşük glukozlu DMEM solüsyonu kullanılarak ana stoklardan 1  $\mu$ M konsantrasyonda elde edildi.



**Şekil 3.12** Borik asit solüsyonunun filtreden geçirilmesi

#### **3.4.2. I-PRF'in hazırlanması**

Hastadan 10 ml enjektörle tek seferde alınan venöz kan, 10 ml tam kan olacak şekilde zaman kaybetmeden anti-pıhtılaştırıcı içermeyen plastik I-PRF tüplerine aktarıldı. Tüpler santrifüj cihazına simetrik olarak yerleştirildi. Oda sıcaklığında, 700 rpm'de (bir dakikadaki devir sayısı) 3 dakika santrifüj edildi. Elde edilen materyalin üst plazma tabakası sıvı PRF olarak otomatik pipet yardımıyla toplandı. Toplanan sıvı PRF'nin her 1 mL'i için 5 mL DMEM ortamı kullanılarak hemen 6 oyuklu plakalara aktarıldı (Şekil 3.13) ve 37°C'de inkübatörde %5 CO<sub>2</sub> ile 3 gün boyunca inkübe edildi. Daha sonra, gelecekteki deneyler için ortam toplandı, kullanılana kadar -20 °C'de tutuldu. Toplanan ortamın %20'si, deneylerden önce bazal kültür ortamına veya farklılaşma ortamına ilave edildi.

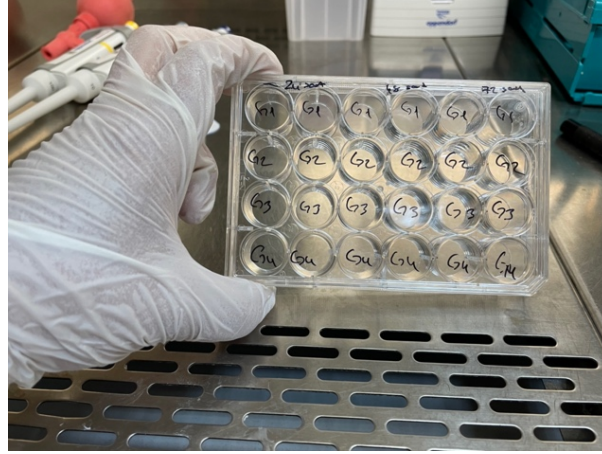


**Şekil 3.13** I-PRF ile karıştırılmış DMEM ortamının 6 kuyucuklu plakada görüntüsü

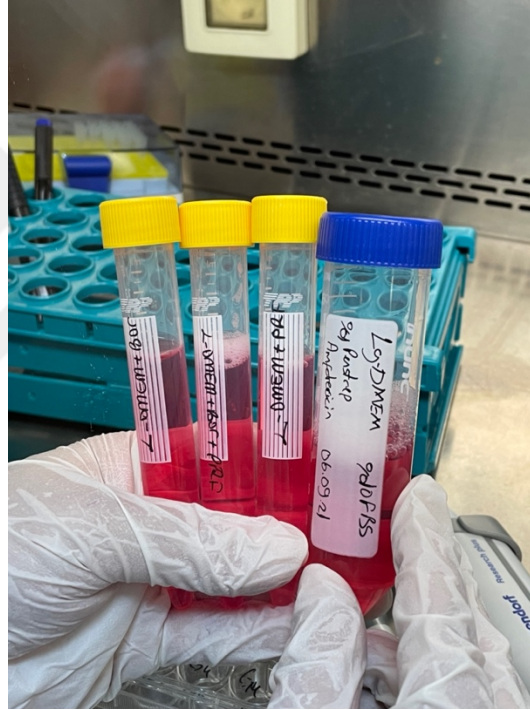
### 3.5. DP-MKH'lerin Kuyucuklu Plaklara Ekilmesi ve Materyallerin Uygulanması

Hücre ekimi için 24 kuyucuklu plak gruplara göre isimlendirilerek hazırlandı (Şekil 3.14). İşlemlerden 24 saat önce hücreler saklama ortamları olan  $-80^{\circ}\text{C}$ 'den çıkarılarak  $37^{\circ}\text{C}$ 'deki su banyosunda kısa sürede çözündürülüp, santrifüj işlemi uygulandıktan sonra, 24 kuyucuklu plaklara her birinde  $5 \times 10^5$  hücre bulunacak şekilde her grup için ayrı ayrı olmak üzere ekim yapıldı ve kültür ortamı eklendi. 24 saat sonra kültür ortamı uzaklaştırıldı. Çalışma gruplarına göre hücreler için besiyerleri hazırlandı (Şekil 3.15) ve uygulandıktan sonra plak inkübatöre konuldu. 24'lü kuyucuklu plakaya her saat dilimi için ikişer kuyucuk olacak şekilde sırayla;

- G1 grubu (kontrol) için kök hücreler üzerine yalnızca DMEM ilave edildi.
- G2 grubu için daha önce tarif edildiği gibi, kök hücreler üzerine toplam ortam hacminin %20'si I-PRF ile hazırlanan ortam olacak şekilde kuyucuklara DMEM (500  $\mu\text{l}$  /çukur) ilave edildi [21, 189].
- G3 grubu için kök hücreler üzerine DMEM solüsyonu kullanılarak ana stoklardan hazırlanan  $1\mu\text{M}$  konsantrasyonda borik asit solüsyonu ilave edildi [247].
- G4 grubu için kök hücreler üzerine %20'si sıvı PRF olacak şekilde DMEM (500  $\mu\text{l}$  /çukur) solüsyonu kullanılarak ana stoklardan hazırlanan  $1\mu\text{M}$  konsantrasyonda borik asit solüsyonu ilave edildi.



Şekil 3.14 Hücre ekimi için plak hazırlanışı



Şekil 3.15 Çalışma gruplarına göre DP-MKH'ler üzerine uygulanması için hazırlanan ortamlar

Üç farklı grubun deney ortamı ve pozitif kontrol grubunu oluşturan DMEM her bir kuyucukta 500 µl olacak şekilde hücrelerle temas ettirildi. Gün içerisinde besiyerleri değiştirilerek 24. 48. ve 72. saat sonundaki kuyucuklardaki hücre canlılıkları değerlendirildi. Bu işlem 3 kez tekrarlandı.

### **3.6 Canlılık Değerlendirme Testlerinin Uygulanması ve Değerlendirilmesi**

#### **3.6.1 Canlılık değerlendirme testlerinin uygulanma yöntemi**

24 kuyucuklu plakada her bir çalışma grubu için uygun ortam hazırlandıktan sonra tripsin (%0,25 tripsin-EDTA solusyonu, Gibco, Grand Island, ABD) ile 4 dakika tripsinizasyon işlemine tabi tutuldu. Hücrelerin bulunduğu sıvının 150 µl'si 5 ml'lik polistiren tüplere alınarak santrifüj edildi ve üstte kalan medyum atıldı. Hücre yıkama suyu (Cell Wash, BD Biosciences, ABD) ile vortekslendi ve tekrar 1500 Rpm de 5 dakika santrifüj edildi. Üstte kalan medyumun atılmasını takiben tüm tüplere üretici firmanın talimatları doğrultusunda 200 µL bağlama tamponu eklendi ve vortekslendi. Tüplere 4 µL FITC-Annexin V (Biolegend, ABD) ilave edilerek 15 dk kadar karanlık ortamda bekletildi. Ardından 200 µl bağlama tamponu ilave edilip, 1500 Rpm de 5 dakika tekrar santrifüj edildi ve üstte kalan medyum atıldı. Son aşamada tekrar bağlama tamponu ile vortekslendikten sonra bu kez 10 µl Propidium Iodide eklenerek akım sitometri cihazında okutma işlemi yapıldı.

#### **3.6.2 DP-MKH'leri canlılığının akım sitometri ile analiz edilmesi**

Akım Sitometri (BD, FACS Calibur)'de okuma gerçekleştirildi ve sonuçlar otomatik olarak hesaplandı (Şekil 3.16). Her okutmada 1000 hücre sayıldı. Annexin V (-) ve PI (-) canlı, Annexin V (+) ve PI (-) erken apoptotik hücre, Annexin V (+) ve PI (+) geç apoptotik hücre, Annexin V (-) ve PI (+) nekrotik hücre olarak kabul edildiği akım sitometri analizinde apoptoz oranları oluşan grafikler ile belirlendi. Grafikte mevcut dört bölgeye ait hücre değer ortalama yüzdeleri istatistiksel olarak değerlendirilmek üzere kaydedildi.

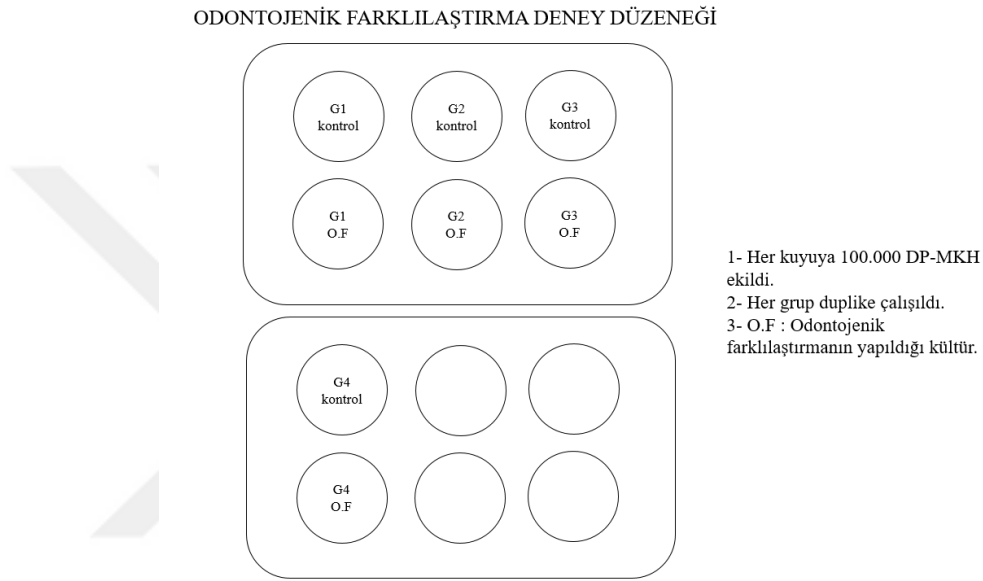


**Şekil 3.16** Akım sitometri cihazı

### **3.7 DP-MKH'nin Odontojenik Farklılaştırılması**

T75 Flask içerisinde yüzey alanını %80 ve üzerinde kaplamış olan hücrelerin öncelikle üzerindeki besiyeri uzaklaştırıldı. DBPS ile yıkanıp, yüzeyden uzaklaştırıldı. T75 Flask içerisinde hücreler %0,25 tripsin-EDTA çözeltisinde 4 dk. 37°C de bekletildi. İnkübasyon süresinin sonunda DMEM ile tripsin inaktif hale getirildi ve T75 flask içindeki hücreler DMEM ile birlikte pipetle çekilip ve 15 ml' lik falkona toplandı. 1500 rpm'de 5 dk santrifüj edildi ve ardından süpernatant atıldı. Hücre pelletinin üzerine DMEM eklenip, pipetaj yapıldı. Santrifüj işlemi tekrarlanıp süpernatant atıldıktan sonra Trypan blue solüsyonu (Thermo Fisher, ABD) ile thoma lamında hücre sayımı yapıldı. 6 kuyucuklu plakada her bir kuyusuna kollajen kaplı lameller üzerine  $1 \times 10^5$  hücre ekildi. 37°C de %5 CO<sub>2</sub> inkübatörde %80-90 konfluent olana kadar inkübe edildi. Konfluent hücrelerin üzerinden besiyeri çekilip atıldı. DP-MKH'nin odontoblastlara farklılaşmasını sağlamak amacıyla, DMEM içerisinde 50 µg/mL askorbik asit (Sigma; Saint-Louis, MO, Amerika), 10 nM deksametazon (Sigma; Saint-Louis, MO, Amerika) ve 50 nM β-gliserofosfat (Sigma; Saint-Louis, MO, Amerika) kullanılarak odontojenik besiyeri hazırlandı. Hazırlana hücreler 4 farklı kültür kuyusunda ayrıldı ve odontojenik farklılaşma için 2 ml odontojenik farklılaşma besiyeri üzerlerine eklendi. 37°C de %5 CO<sub>2</sub> inkübatörde inkübe edildi. 3 günde bir besiyeri değiştirilerek, 21-28 gün boyunca inkübasyona devam edildi. 21-28 gün sonunda odontojenik farklılaşma gösteren hücrelerin oluşumu Alizarin Red (ALR) boyama protokolü uygulanarak gözlemlendi. ALR ile boyama için kuyucuklardaki

deney ortamları uzaklaştırıldı ve kuyucuklara 2 ml DPBS eklenerek 1 dakika bekleme sonrasında uzaklaştırıldı. Kuyucuklara 2 ml formalin eklenerek hücrelerin fiksasyonu sağlandı ve 45 dakika boyunca karanlık ortamda oda sıcaklığında bekletildi. Formalin uzaklaştırıldı ve hücreler distile su ile yıkandı. Oyuklu plakaların her bir kuyucuğuna 500µl %2'lik ALR boyası eklenerek 45 dakika boyunca bekletildi.



**Şekil 3.17** Odontojenik farklılaştırma deney düzeneği

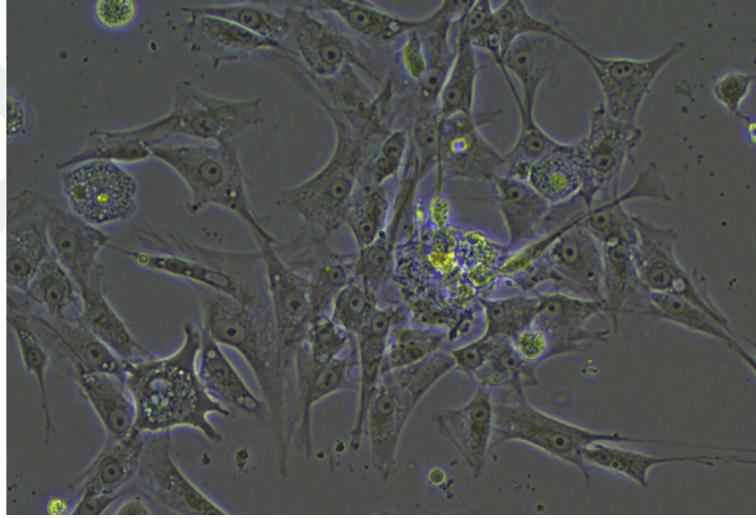
### 3.8 İstatistiksel Analiz Yöntemi

Verilerin analizi için Minitab 17 programı kullanılmıştır. Normal dağılıma uygunluk Shapiro-Wilk Testi ile incelendi. Grup ve zamana göre canlı, erken apoptotik, geç apoptotik ve nekrotik hücre değerlerinin karşılaştırılmasında iki yönlü varyans analizi kullanıldı ve çoklu karşılaştırmalar Tukey HSD Testi ile yapıldı. Sonuçlar ortalama  $\pm$  standart sapma şeklinde sunuldu. Önem düzeyi  $p < 0,05$  olarak alındı.

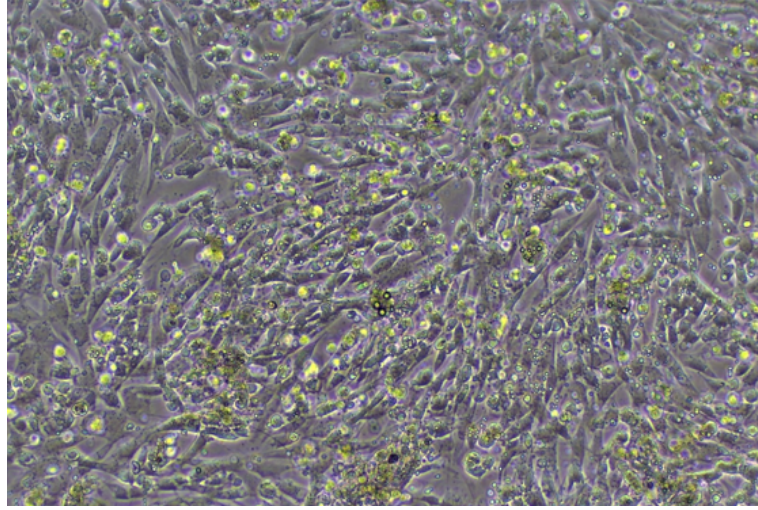
## 4.BULGULAR

### 4.1. Gömük Yirmi Yaş Dişinden Elde Edilen Pulpadan Dental Pulpa Mezenkimal Kök Hücrelerin İzolasyonu ve Pasajlanması

Tam gömük 20 yaş dişlerinden DP-MKH izole edildikten sonra ekim işlemi yapılarak hücrelerin çoğalmaları ve morfolojik özellikleri invert mikroskop altında incelendi. Dental pulpa mezenkimal kök hücrelerinin fibroblasta benzeyen iğsi bir morfolojiye ve belirgin hücre konturuna sahip oldukları görüldü. 2. pasajda plastisite yetenekleri sebebiyle flask yüzeyine tamamen yapıştıkları ve yüzeyi tamamen kaplayarak konfluent hale geldikleri gözlemlendi. (şekil 4.1 ve 4.2).



şekil 4.1 P1 DP-MKH invert mikroskop görüntüsü, 10x büyütme

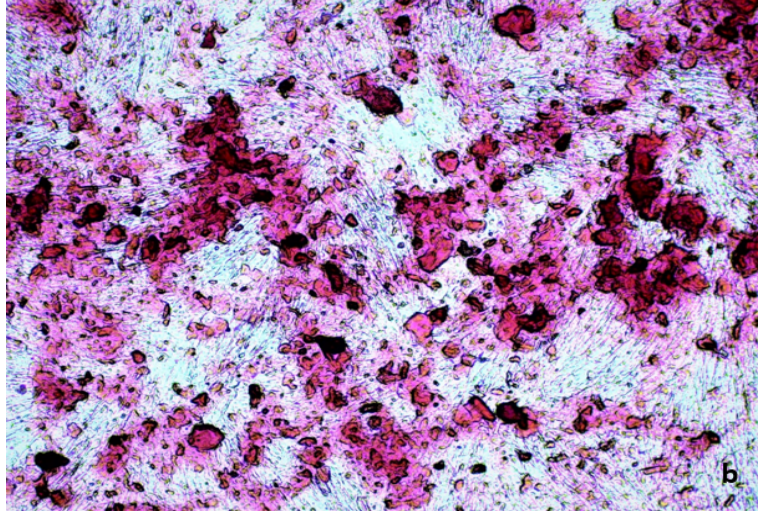


**Şekil 4.2** P2 DP-MKH invert mikroskop konfluent görüntüsü.

#### **4.2 İzole Edilen DP-MKH Osteojenik, Kondrojenik ve Adipojenik Farklılaşma Kapasitelerinin ve Hücre Marker Ekspresyonlarının Belirlenmesi**

##### **4.2.1 DP-MKH Osteojenik Farklılaşma Kapasitelerinin Belirlenmesi**

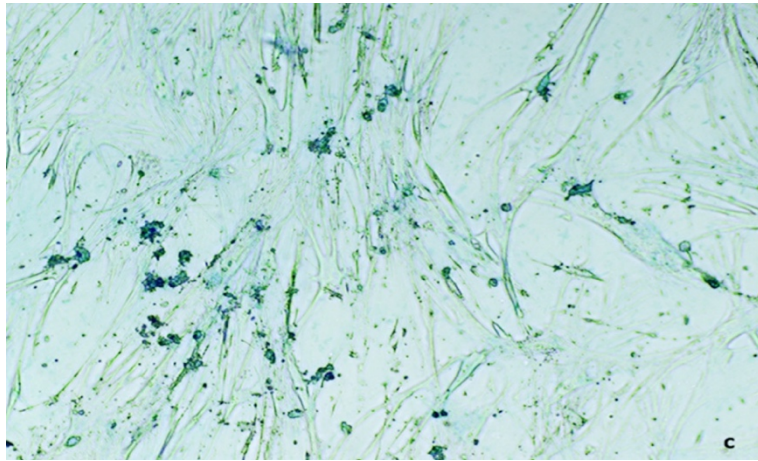
Osteojenik besiyerinde kültüre edilen DP-MKH'nin 21 gün sonunda Alizarin Red ile boyanması ile odontojenik farklılaşmaları incelendi. Osteoblast benzeri hücrelere farklılaştıkları ve mineralize kemik nodüllerinin oluşumu gözlemlendi (Şekil 4.3)



**Şekil 4.3** Dental pulpa mezenkimal kök hücrelerin osteojenik farklılaşma potansiyelinin Alizarin Red boyama ile saptanması.

#### **4.2.2 DP-MKH Kondrojenik Farklılaşma Kapasitelerinin Belirlenmesi**

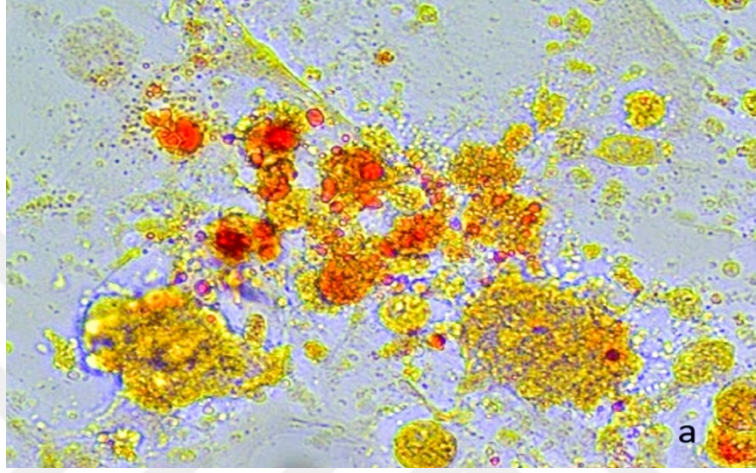
Kondrojenik farklılaşma besiyeri eklenerek 21 gün sonunda Alcian blue ile boyanan DP-MKH Binoküler Mikroskop (Olympus BH2-RFCA) ile incelendi. Kondrojenik benzeri hücrelere farklılaştıkları ve kondrositler tarafından üretilen mavi renkte boyanan proteoglikanlar tespit edildi (Şekil 4.4).



**Şekil 4.4** Dental pulpa mezenkimal kök hücrelerin kondrojenik farklılaşma potansiyelinin Alcian blue boyama ile saptanması

#### 4.2.3 DP-MKH Adipojenik Farklılaşma Kapasitelerinin Belirlenmesi

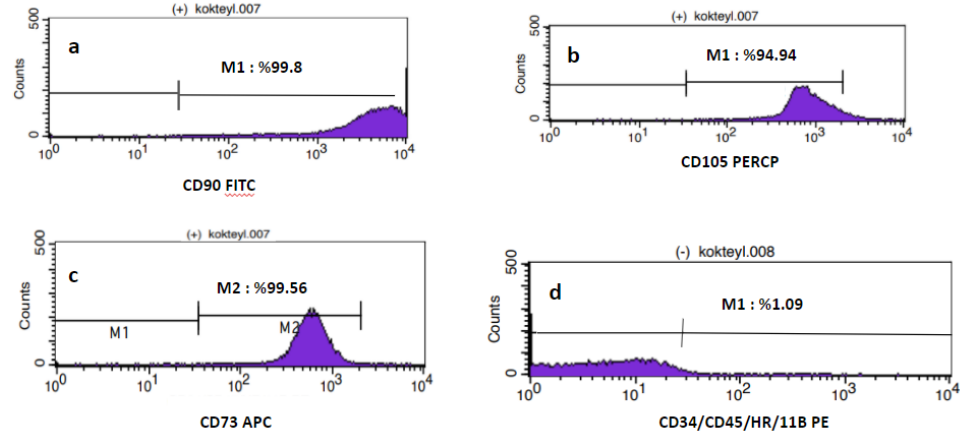
Adipojenik farklılaşma besiyeri ile stimüle edilen hücre kültüründe 14 gün sonunda DP-MKH Oil Red O ile boyanarak adipojenik farklılaşmaları mikroskopta (Olympus BH2-RFCA) incelendi. Kırmızı renkte hücre içi yağ damlacıkları ve adiposit benzeri hücelere farklılaştıkları gösterildi (Şekil 4.5).



**Şekil 4.5:** Dental pulpa mezenkimal kök hücrelerin adipojenik farklılaşma potansiyelinin Oil Red O boyama ile saptanması

#### 4.2.4. DP-MKH Marker Ekspresyonlarının Belirlenmesi

Dental pulpa dokusundan izole edilen hücreler 3. pasaja getirildikten sonra akım sitometri analizi ile hücre marker ekspresyonları belirlenmiştir. Bu hücrelerin analiz sonucunda CD45, CD34, HR, 11B PE işaretlerini göstermedikleri, mezenkimal kök hücre belirteci olan CD73, CD90, CD105 işaretlerini yüzeylerinde gösterdikleri görüldü (Şekil 4.6).

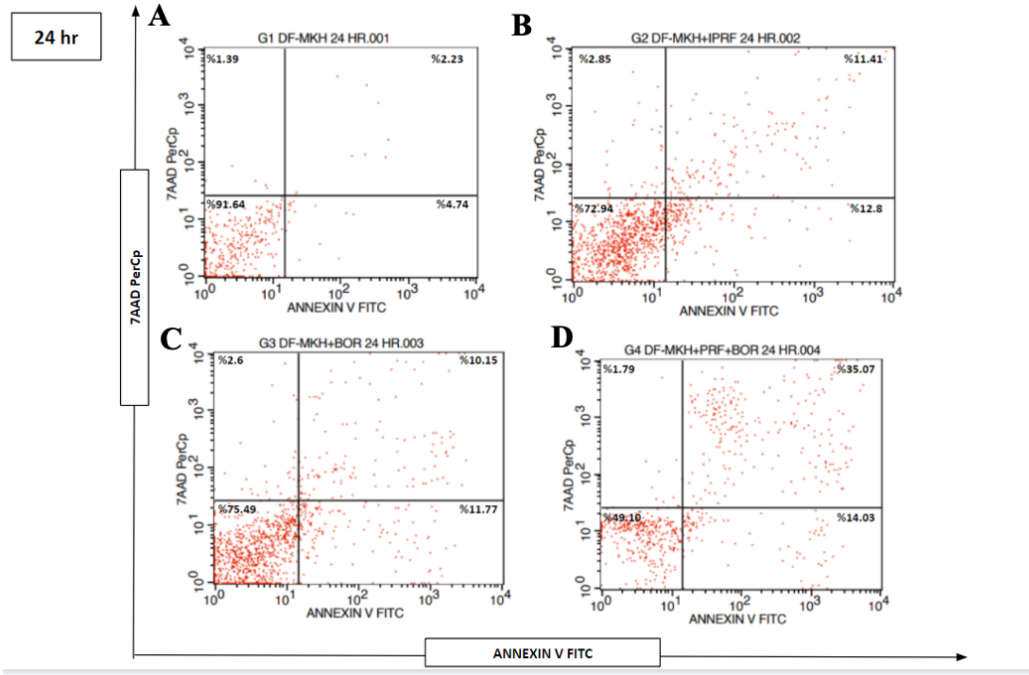


**Şekil 4.6** P3 Dental pulpa mezenkimal kök hücrelerin akım sitometri analizi ile mezenkimal kök hücre pozitif ve negatif markerlarının belirlenmesi

### **4.3. Materyallerin DP-MKH Canlılığı Üzerine Etkilerinin 24. 48. ve 72. Saat Sonunda Sonunda Değerlendirilmesi**

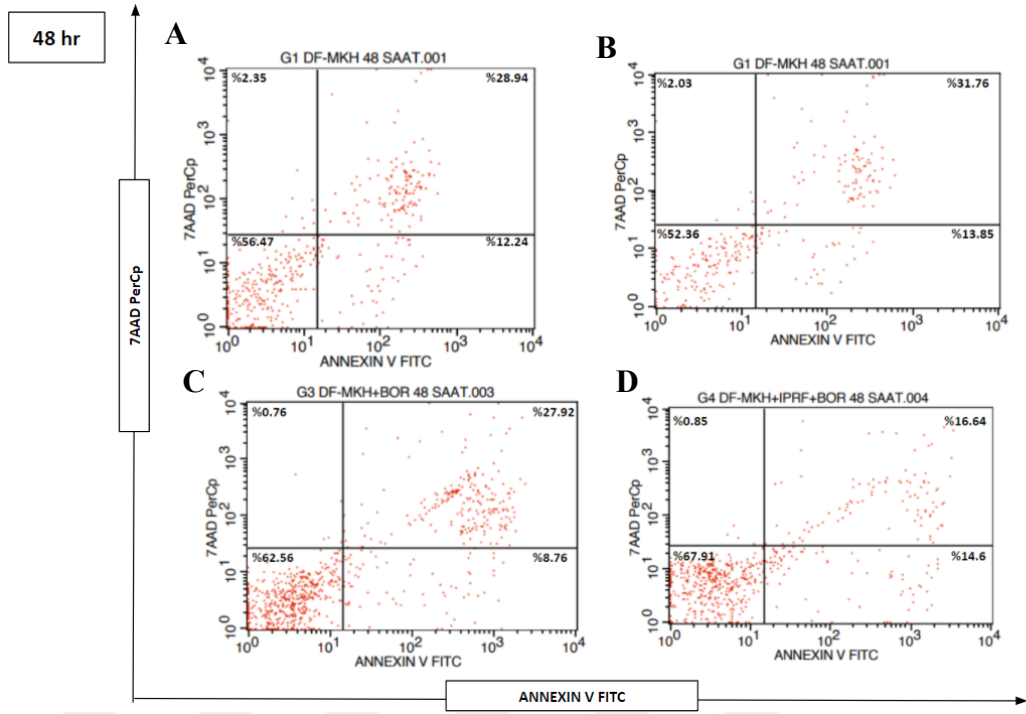
#### **4.3.1. Dental Pulpa Mezenkimal Kök Hücrelerin Akım Sitometri ile Analizine ait Bulgular**

Hücre kontrol ve test gruplarının 24. saate ait akım sitometri grafiği örneği şekil 4.7’de, 48. saate ait akım sitometri grafiği örneği şekil 4.8’de, 72. saate ait akım sitometri grafiği örneği şekil 4.9’da verildi. Grafik görüntülerinde alt-sol bölge canlı hücreleri, alt-sağ bölge erken apoptotik hücreleri, üst-sol bölge nekrotik ve üst-sağ bölge geç apoptotik hücreleri temsil etmektedir.



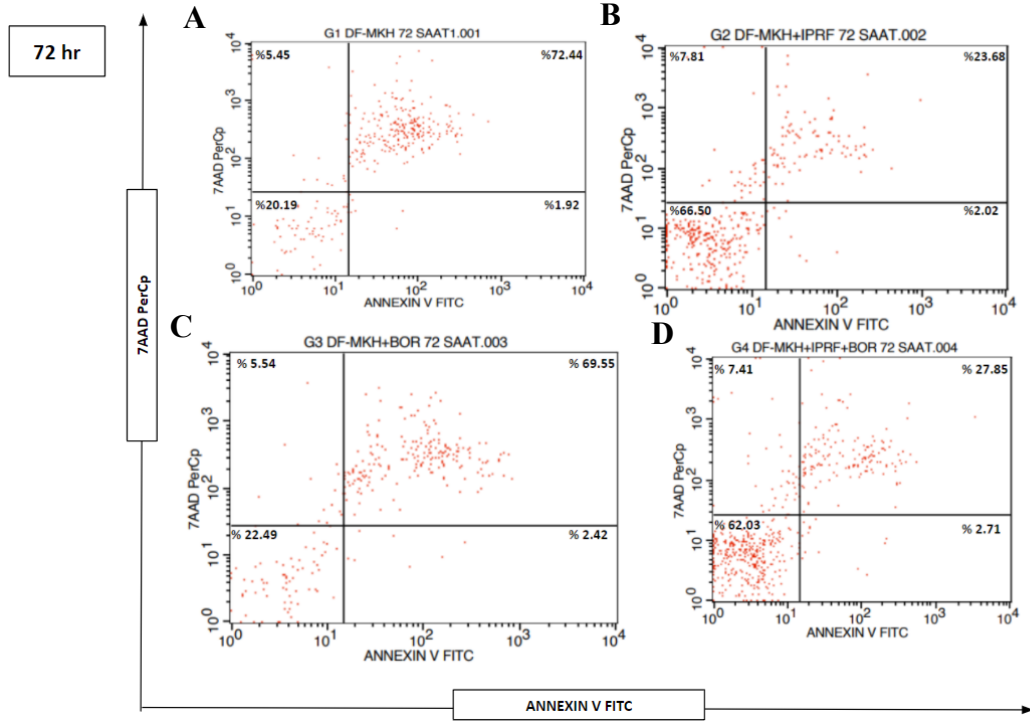
**Şekil 4.7** Hücre kontrol ve materyal deney gruplarının 24. saate ait akım sitometri grafiği örneği (x: ANNEXIN V FITC, y: 7AAD PerCp)

A) Kontrol grubu, B) I-PRF, C) Borik asit, D) I-PRF ve Borik asit



**Şekil 4.8** Hücre kontrol ve materyal deney gruplarının 48. saate ait akım sitometri grafiği örneği (x: ANNEXIN V FITC, y: 7AAD PerCp)

**A)** Kontrol grubu, **B)** I-PRF, **C)** Borik asit, **D)** I-PRF ve Borik asit



**Şekil 4.9** Hücre kontrol ve materyal deney gruplarının 72. saate ait akım sitometri grafiği örneği (x: ANNEXIN V FITC, y: 7AAD PerCp)

**A)** Kontrol grubu, **B)** I-PRF, **C)** Borik asit, **D)** I-PRF ve Borik asit

#### 4.3.1.1 Akım Sitometri Analizinde Canlı Hücre Bulgularının Değerlendirilmesi

Akım sitometri analizi ile kontrol grubu ve üç farklı materyal grubunun dental pulpa mezenkimal kök hücreler üzerindeki etkisini inceleyen çalışmamızda canlı hücre değeri üzerine grubun ana etkisi istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p=0,011$ ). Canlı hücre değeri üzerine zamanın ana etkisi istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p<0,001$ ). Buna ek olarak, canlı hücre değeri üzerine grup ve zaman etkileşiminin etkisi arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık mevcuttur ( $p<0,001$ ). Canlı hücre değeri üzerine grup, zaman ve grup-zaman etkileşiminin ana etkisinin karşılaştırılması Tablo 4.1’de gösterilmektedir.

**Tablo 4.1** Zaman ve gruplara göre canlı hücre değerlerinin karşılaştırılması

|            | Test İstatistiği | sd | p                |
|------------|------------------|----|------------------|
| Grup       | 4,64             | 3  | <b>0,011</b>     |
| Zaman      | 66,25            | 2  | <b>&lt;0,001</b> |
| Grup*Zaman | 34,43            | 6  | <b>&lt;0,001</b> |

sd: serbestlik derecesi

\*0,05 düzeyinde anlamlı p değeri

Kontrol grubunda canlı hücre değerinin ortalaması 56,1; I-PRF grubunda 63,93; BA grubuna 53,51 ve I-PRF + BA grubunda ise 59,68 olarak elde edilmiştir. Burada farklılık I-PRF ile BA grubunda elde edilen canlı hücre ortalama değeri arasında görülmüştür ( $p<0,05$ ). Kontrol, I-PRF ve I-PRF + BA grubu arasında ise istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yoktur ( $p>0,05$ ). En yüksek toplam ortalama canlı hücre oranı, I-PRF grubuna, en düşük toplam ortalama canlı hücre oranı ise BA grubuna aittir. Hücre canlılık değer ortalamaları 24. saatte 72,29; 48. saatte 59,83 ve 72. saatte 42,8 olarak elde edilmiştir (Tablo 4.2).

**Tablo 4.2** Farklı deney sürelerinde ve ortamlarında saptanan canlı hücre değerlerinin karşılaştırılması

|                 | Canlı Hücre (LL)           |                              |                                        | Toplam                     |
|-----------------|----------------------------|------------------------------|----------------------------------------|----------------------------|
|                 | 24. saat                   | 48. saat                     | 72. saat                               |                            |
|                 | Ort ± SS<br>(medyan)       | Ort ± SS<br>(medyan)         | Ort ± SS<br>(medyan)                   |                            |
| Kontrol (G1)    | 91,64 ± 3,53 <sup>A</sup>  | 56,47 ± 2,68 <sup>CDE</sup>  | 20,19 ± 6,08 <sup>F</sup>              | 56,1 ± 31,17 <sup>ab</sup> |
| I-PRF (G2)      | 72,94 ± 4,25 <sup>BC</sup> | 52,36 ± 7,62 <sup>DE</sup>   | 66,5 ± 2,69 <sup>B<sup>CDE</sup></sup> | 63,93 ± 10,2 <sup>a</sup>  |
| BA (G3)         | 75,49 ± 10,4 <sup>AB</sup> | 62,56 ± 2,67 <sup>BCDE</sup> | 22,48 ± 2,4 <sup>F</sup>               | 53,51 ± 24,56 <sup>b</sup> |
| I-PRF + BA (G4) | 49,1 ± 14,42 <sup>E</sup>  | 67,91 ± 1,74 <sup>BCD</sup>  | 62,03 ± 2,07 <sup>BCDE</sup>           | 59,68 ± 11,1 <sup>ab</sup> |
| Total           | 72,29 ± 17,74 <sup>a</sup> | 59,83 ± 7,2 <sup>b</sup>     | 42,8 ± 22,71 <sup>c</sup>              | 58,31 ± 20,68              |

a-c: Aynı harfe sahip grup – zaman ortalamaları arasında fark yoktur.

A-F: Aynı harfe sahip grup\* zaman etkileşimleri ortalamaları arasında fark yoktur.

\*0,05 düzeyinde anlamlı p değeri

Ort ± SS: Ortalama ± Standart sapma

Tablo 4.2’deki bulgulara göre;

**Kontrol grubu için;** canlı hücre değerleri açısından 24. saat, 48. saat ve 72. saat arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık vardır ( $p<0,05$ ). En yüksek canlılık oranı 24. saatte görülmüştür.

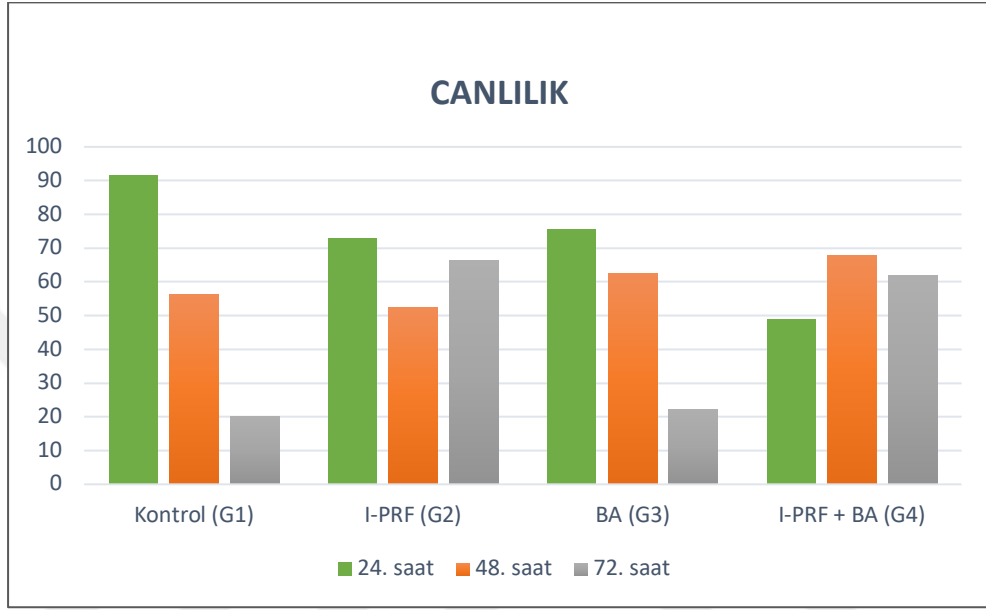
**I-PRF grubu için;** canlı hücre değerleri açısından 24. ve 48. saat arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık vardır. Ancak 24. ile 72. saat ve 48. ile 72. saat arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ( $p>0,05$ ).

**BA grubu için;** canlı hücre değerleri açısından 24. ve 48. saat arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yoktur ( $p>0,05$ ). Ancak 72. saat ile 24. saat ve 72. saat ile 48. saat arasından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık mevcuttur ( $p<0,05$ ).

**I-PRF + BA grubu için;** canlı hücre değerleri açısından 24. ve 72. saat ile 48. ve 72. saat arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yoktur ( $p>0,05$ ). Ancak 24. ve 48. saat arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık vardır ( $p<0,05$ ).

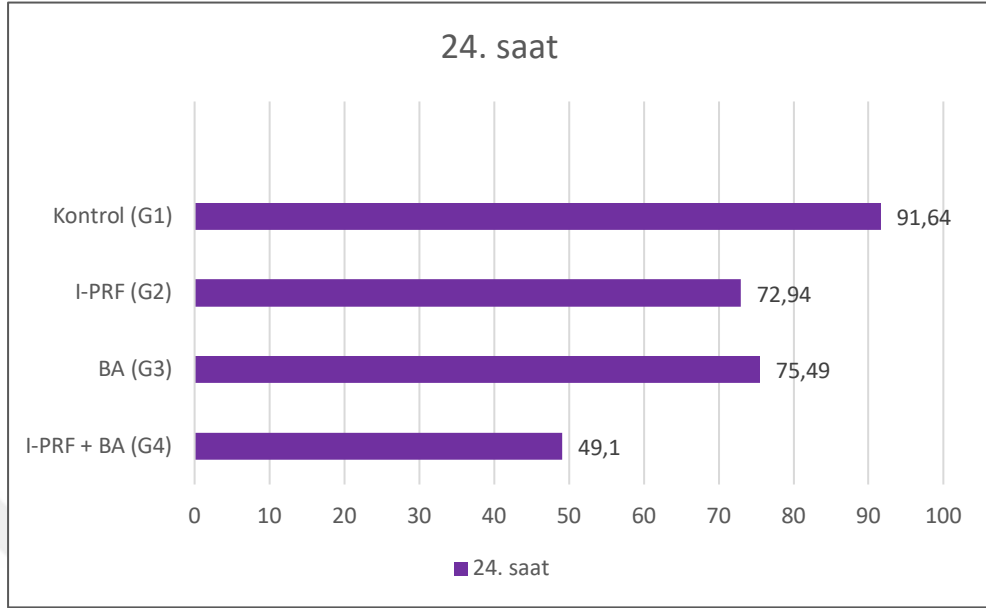
Zamana göre karşılaştırdığımızda, 24. saatte en yüksek ortalama hücre canlılık değeri kontrol grubuna ait olmak ile beraber I-PRF ve I-PRF + BA grubu ile arasında

istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmaktadır ( $p<0,05$ ). Kontrol grubu ile BA grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur ( $p>0,05$ ). En düşük ortalama hücre canlılık değeri ise I-PRF + BA grubunda görülmüştür ve diğer gruplarla arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır ( $p<0,05$ ). 24., 48., ve 72. saate ait canlı hücre bulguları Şekil 4.10’da gösterilmektedir.



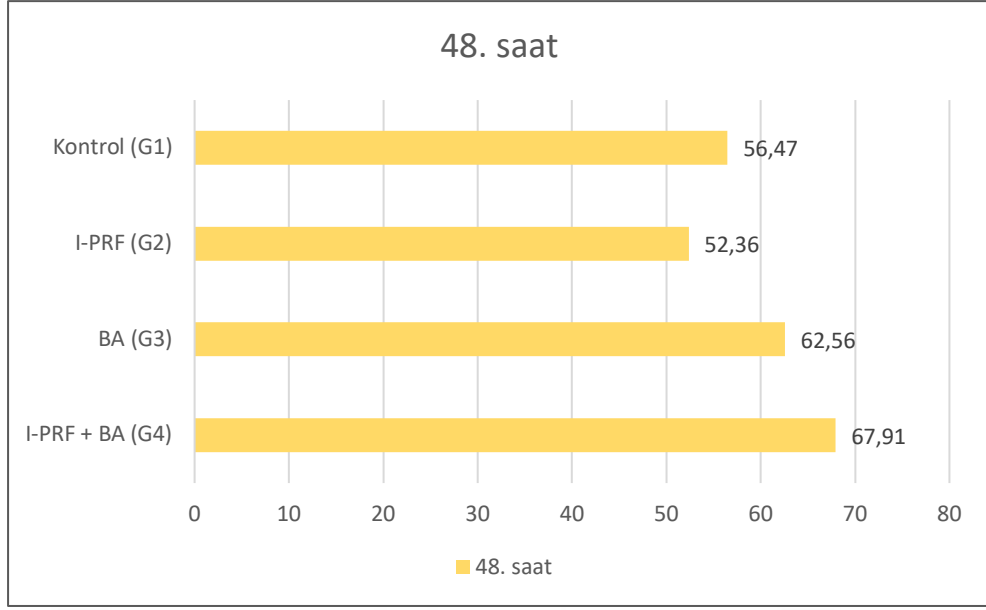
**Şekil 4.10** Zaman ve gruplar göre canlı hücre değerlerinin karşılaştırılması

24. saate ait canlı hücre bulguları Şekil 4.11’de gösterilmiştir.



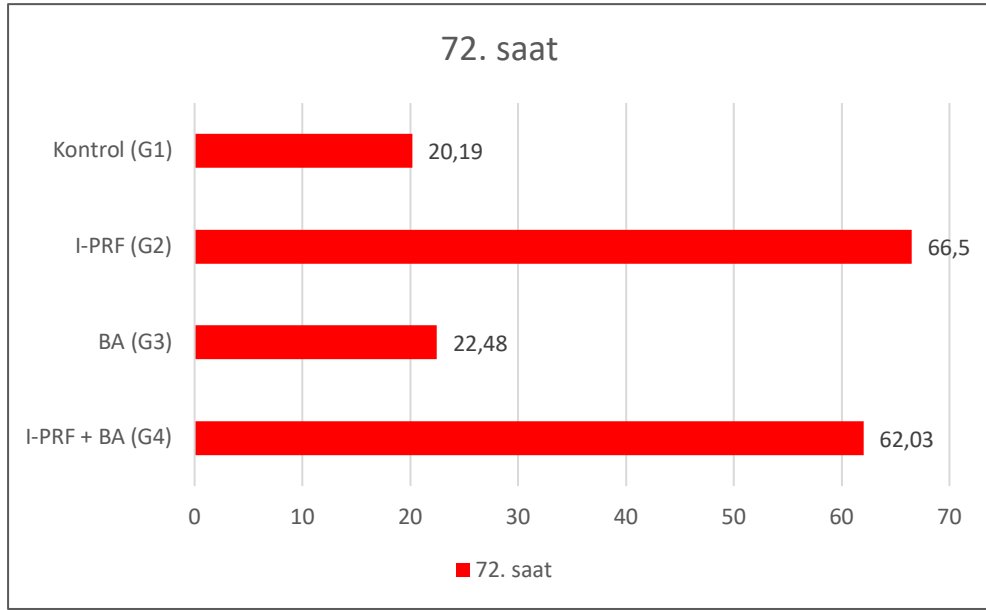
**Şekil 4.11** 24. saat için gruplar arasında canlı hücre değerlerinin karşılaştırılması

48. saat için canlı hücre bulguları açısından en yüksek ortalama değeri I-PRF + BA grubuna aitken, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yoktur ( $p>0,05$ ). 48. saatteki en düşük ortalama hücre canlılık değeri ise 52,36 olmak üzere I-PRF grubuna aittir. 48. saate ait canlı hücre bulguları Şekil 4.12’de gösterilmektedir.



**Şekil 4.12** 48. saat için gruplar arasında canlı hücre değerlerinin karşılaştırılması

72. saat için en yüksek ortalama hücre canlılık değeri I-PRF grubuna ait olmakla beraber kontrol ve BA grubu ile arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık vardır ( $p < 0,05$ ). Ancak I-PRF ve I-PRF + BA grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yoktur ( $p > 0,05$ ). Kontrol ve BA grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamaktadır ( $p > 0,05$ ). 72. saatteki en düşük ortalama hücre canlılık değeri ise 20,19 olmak üzere kontrol grubuna aittir. 72. saate ait canlı hücre bulguları Şekil 4.13'te gösterilmektedir.



**Şekil 4.13** 72. saat için gruplar arasında canlı hücre değerlerinin karşılaştırılması

#### **4.3.1.2 Akım Sitometri Analizinde Erken Apoptotik Hücre Bulgularının Değerlendirilmesi**

Akım sitometri analizi ile kontrol grubu ve üç farklı materyal grubunun dental pulpa mezenkimal kök hücreler üzerindeki etkisini inceleyen çalışmamızda erken apoptotik hücre değeri üzerine grubun ana etkisi istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ( $p=0,317$ ). Akım sitometri analizi ile yapılan değerlendirmede zaman ana etkisinin erken apoptoz parametresi üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir etkisi vardır ( $p<0,001$ ). Akım sitometri analizi ile yapılan değerlendirmede grup ve zaman etkileşiminin ana etkisinin erken apoptoz parametresi üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir etkisi bulunmamıştır ( $p=0,548$ ). Erken apoptotik hücre değeri üzerine grup, zaman ve grup-zaman etkileşiminin ana etkisinin karşılaştırılması Tablo 4.3'te gösterilmektedir.

**Tablo 4.3** Zaman ve gruplara göre erken apoptoz değerlerinin karşılaştırılması

|            | Test İstatistiği* | sd | p                |
|------------|-------------------|----|------------------|
| Grup       | 1,24              | 3  | 0,317            |
| Zaman      | 14,34             | 2  | <b>&lt;0,001</b> |
| Grup*Zaman | 0,85              | 6  | 0,548            |

sd: serbestlik derecesi

\*0,05 düzeyinde anlamlı p değeri

Erken apoptotik hücre bulguları açısından kontrol grubunun ortalaması 6,3; I-PRF grubunun ortalaması 9,33; BA grubunun ortalaması 7,65; I-PRF + BA grubunun ortalaması 10,45 olarak elde edilmiştir (Tablo 4.4). Gruplara göre erken apoptotik parametresinin ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yoktur ( $p>0,05$ ). 24. ile 48. saat arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yoktur ( $p>0,05$ ). 72. ile 48. saat ve 72. saat ile 24. saat arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık vardır ( $p<0,05$ ). Farklı deney sürelerinde ve ortamlarında saptanan erken apoptotik hücre değerlerinin karşılaştırılması Tablo 4.4'te gösterilmektedir.

**Tablo 4.4** Farklı deney sürelerinde ve ortamlarında saptanan erken apoptotik hücre değerlerinin karşılaştırılması

|                 | Erken Apoptoz             |                          |                                | Toplam       |
|-----------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------------|--------------|
|                 | 24. saat                  | 48. saat                 | 72. saat                       |              |
|                 | Ort ± SS<br>(medyan)      | Ort ± SS<br>(medyan)     | Ort ± SS<br>(medyan)           |              |
| Kontrol (G1)    | 4,74 ± 2,4                | 12,24 ± 2,17             | 1,92 ± 0,47                    | 6,3 ± 4,9    |
| I-PRF (G2)      | 12,8 ± 0,52               | 13,18 ± 0,63             | 2,01 ± 0,71                    | 9,33 ± 5,52  |
| BA (G3)         | 11,76 ± 12,54             | 8,76 ± 4,59              | 2,43 ± 0,17                    | 7,65 ± 7,85  |
| I-PRF + BA (G4) | 14,03 ± 8,46              | 14,6 ± 5,12              | 2,71 ± 1,65                    | 10,45 ± 7,67 |
| Total           | 10,83 ± 7,55 <sup>a</sup> | 12,2 ± 3,82 <sup>a</sup> | <b>2,27 ± 0,86<sup>b</sup></b> | 8,43 ± 6,52  |

a-c: Aynı harfe sahip grup – zaman ortalamaları arasında fark yoktur.

A-F: Aynı harfe sahip grup\* zaman etkileşimleri ortalamaları arasında fark yoktur.

\*0,05 düzeyinde anlamlı p değeri

Ort ± SS: Ortalama ± Standart sapma

Tablo 4.4'teki bulgulara göre;

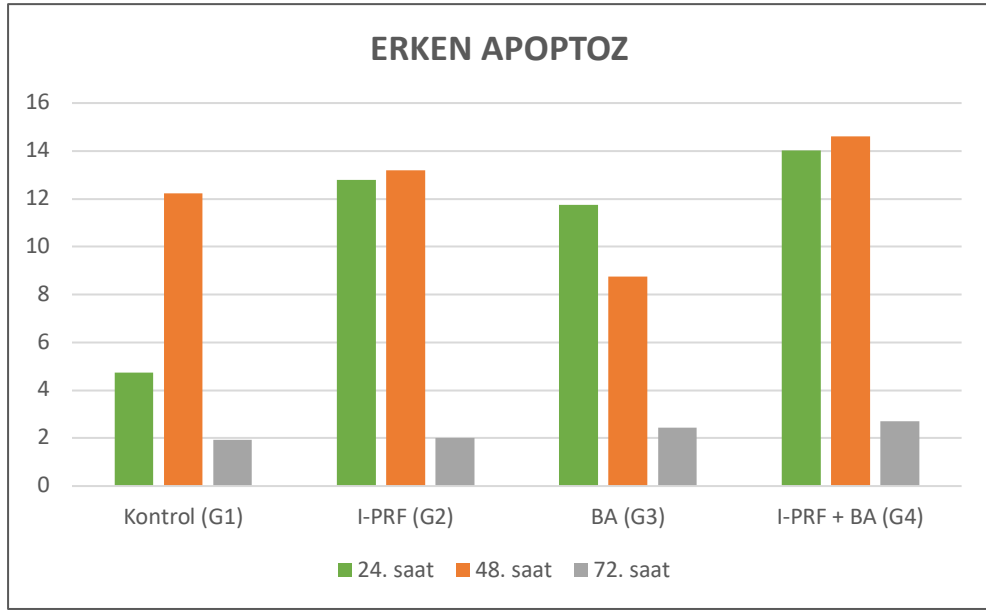
**Kontrol grubu için;** erken apoptotik hücre değerleri açısından saatler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ( $p>0,05$ ).

**I-PRF grubu için;** erken apoptotik hücre değerleri açısından saatler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ( $p>0,05$ ).

**BA grubu için;** erken apoptotik hücre değerleri açısından saatler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ( $p>0,05$ ).

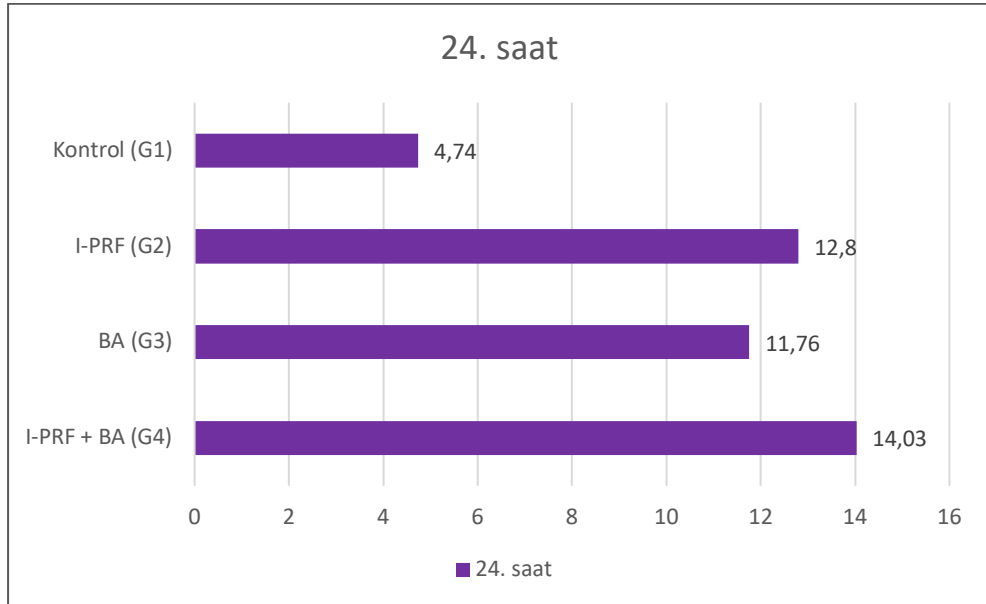
**I-PRF + BA grubu için;** erken apoptotik hücre değerleri açısından saatler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ( $p>0,05$ ).

24. 48. ve 72. saate ait erken apoptoz hücre bulguları ise şekil 4.14'te gösterilmektedir.



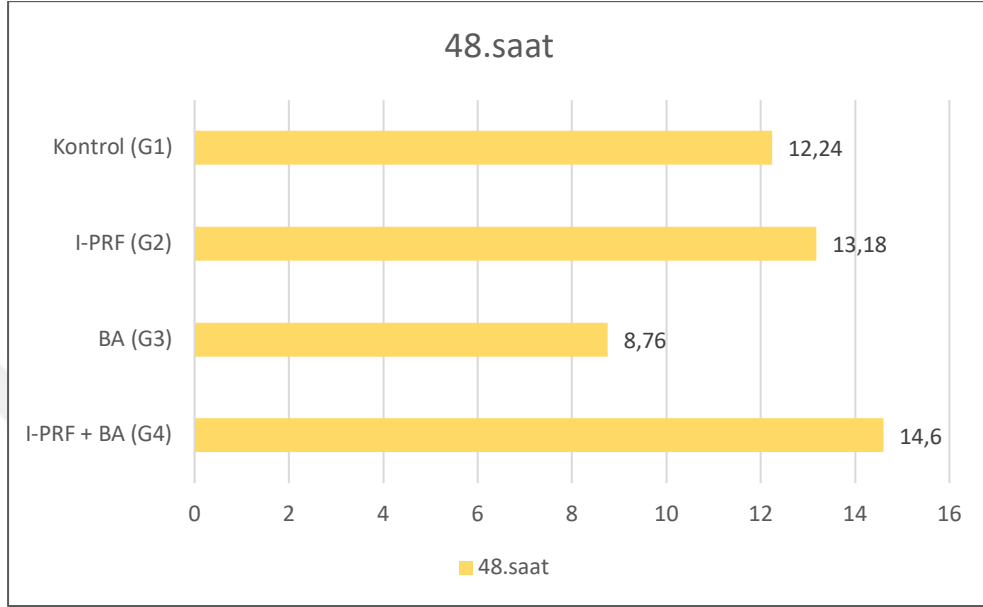
**Şekil 4.14** Zaman ve gruplar göre erken apoptotik hücre değerlerinin karşılaştırılması

24. saat için erken apoptotik hücre bulguları açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur ( $p>0,05$ ). En yüksek ortalama erken apoptotik hücre bulgusu 14,03 ile I-PRF + BA grubuna aittir. 24. saate ait nekroz hücre bulguları Şekil 4.15'te gösterilmektedir.



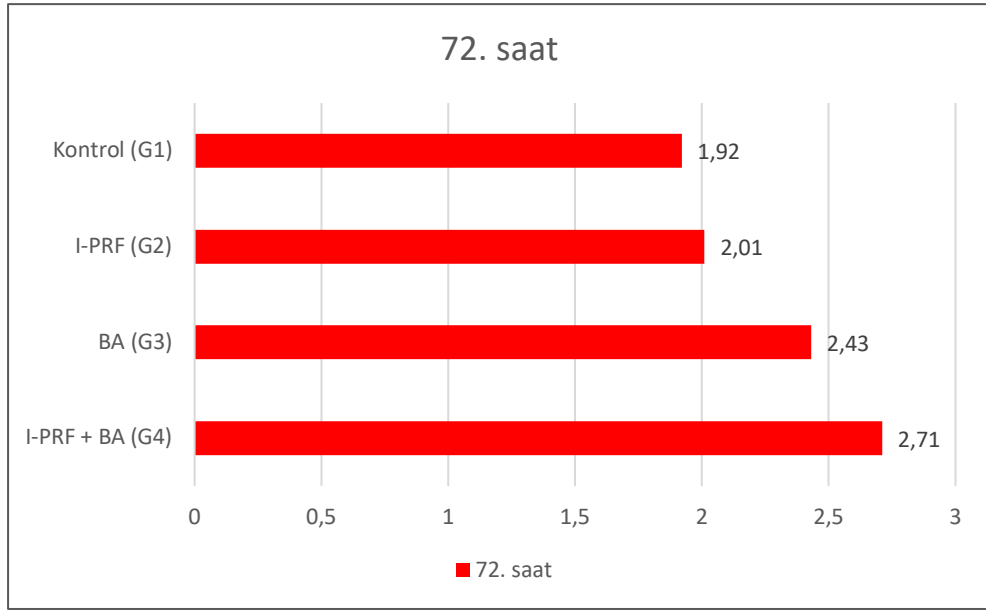
**Şekil 4.15** 24. saat için gruplar arasında erken apoptotik hücre değerlerinin karşılaştırılması

48. saat için erken apoptotik hücre bulguları açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur ( $p>0,05$ ). 48. saat için en yüksek ortalama erken apoptotik hücre bulgusu 14,6 ile I-PRF + BA grubuna aittir. 48. saate ait nekroz hücre bulguları Şekil 4.16’da gösterilmektedir.



**Şekil 4.16** 48. saat için gruplar arasında erken apoptotik hücre değerlerinin karşılaştırılması

72. saat için erken apoptotik hücre bulguları açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur ( $p>0,05$ ). 72. saat için en yüksek ortalama erken apoptotik hücre bulgusu 2,71 ile I-PRF + BA grubuna aittir. 72. saate ait nekroz hücre bulguları Şekil 4.17’de gösterilmektedir.



**Şekil 4.17** 72. saat için gruplar arasında erken apoptotik hücre değerlerinin karşılaştırılması

#### 4.3.1.3. Akım Sitometri Analizinde Geç Apoptotik Hücre Bulgularının Değerlendirilmesi

Akım sitometri analizi ile kontrol grubu ve üç farklı materyal grubunun dental pulpa mezenkimal kök hücreler üzerindeki etkisini inceleyen çalışmamızda geç apoptoz hücre değeri üzerine grubun ana etkisi istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p=0,003$ ). Geç apoptotik hücre değeri üzerine zamanın ana etkisi istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p<0,001$ ). Geç apoptotik hücre değerleri üzerine grup ve zaman etkileşiminin etkisi istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p<0,001$ ). Geç apoptotik hücre değeri üzerine grup, zaman ve grup-zaman etkileşiminin ana etkisinin karşılaştırılması Tablo 4.5'te gösterilmektedir.

**Tablo 4.5** Zaman ve gruplara göre geç apoptoz değerlerinin karşılaştırılması

|            | Test İstatistiği | sd | p                |
|------------|------------------|----|------------------|
| Grup       | 6                | 3  | <b>0,003</b>     |
| Zaman      | 56,87            | 2  | <b>&lt;0,001</b> |
| Grup*Zaman | 19,74            | 6  | <b>&lt;0,001</b> |

sd: serbestlik derecesi

\*0,05 düzeyinde anlamlı p değeri

Kontrol grubunda geç apoptotik hücre değerinin ortalaması 34,54; I-PRF grubunda 22,51; BA grubuna 35,87 ve I-PRF + BA grubunda ise 26,52 olarak elde edilmiştir. Kontrol, BA ve I-PRF + BA grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yoktur ( $p>0,05$ ). I-PRF grubu geç apoptotik hücre ortalama değeri kontrol ve BA grubunun ortalama geç apoptotik hücre değerinden istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde farklı bulunmuştur ( $p<0,05$ ). En yüksek toplam ortalama geç apoptotik hücre oranı BA grubuna, en düşük toplam ortalama geç apoptotik hücre oranı ise I-PRF grubunda aittir (Tablo 4.6).

**Tablo 4.6** Farklı deney sürelerinde ve ortamlarında saptanan geç apoptotik hücre değerlerinin karşılaştırılması

|                 | Geç Apoptoz                    |                                 |                                 | Toplam                          |
|-----------------|--------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
|                 | 24. saat                       | 48. saat                        | 72. saat                        |                                 |
|                 | Ort $\pm$ SS<br>(medyan)       | Ort $\pm$ SS<br>(medyan)        | Ort $\pm$ SS<br>(medyan)        |                                 |
| Kontrol (G1)    | 2,23 $\pm$ 1,16 <sup>D</sup>   | 28,94 $\pm$ 3,27 <sup>BC</sup>  | 72,44 $\pm$ 7,48 <sup>A</sup>   | 34,54 $\pm$ 30,97 <sup>a</sup>  |
| I-PRF (G2)      | 11,41 $\pm$ 6,84 <sup>CD</sup> | 32,43 $\pm$ 8,21 <sup>BC</sup>  | 23,68 $\pm$ 3,12 <sup>BCD</sup> | 22,51 $\pm$ 10,7 <sup>b</sup>   |
| BA (G3)         | 10,15 $\pm$ 7,09 <sup>CD</sup> | 27,92 $\pm$ 7,22 <sup>BC</sup>  | 69,55 $\pm$ 3,31 <sup>A</sup>   | 35,87 $\pm$ 26,93 <sup>a</sup>  |
| I-PRF + BA (G4) | 35,08 $\pm$ 20,4 <sup>B</sup>  | 16,64 $\pm$ 3,31 <sup>BCD</sup> | 27,85 $\pm$ 2,57 <sup>BC</sup>  | 26,52 $\pm$ 13,16 <sup>ab</sup> |
| Total           | 14,72 $\pm$ 16,06 <sup>c</sup> | 26,48 $\pm$ 8 <sup>b</sup>      | 48,38 $\pm$ 24,01 <sup>a</sup>  | 29,86 $\pm$ 21,97               |

a-c: Aynı harfe sahip grup – zaman ortalamaları arasında fark yoktur.

A-F: Aynı harfe sahip grup\* zaman etkileşimleri ortalamaları arasında fark yoktur.

\*0,05 düzeyinde anlamlı p değeri

Ort  $\pm$  SS: Ortalama  $\pm$  Standart sapma

Tablo 4.6'daki bulgulara göre;

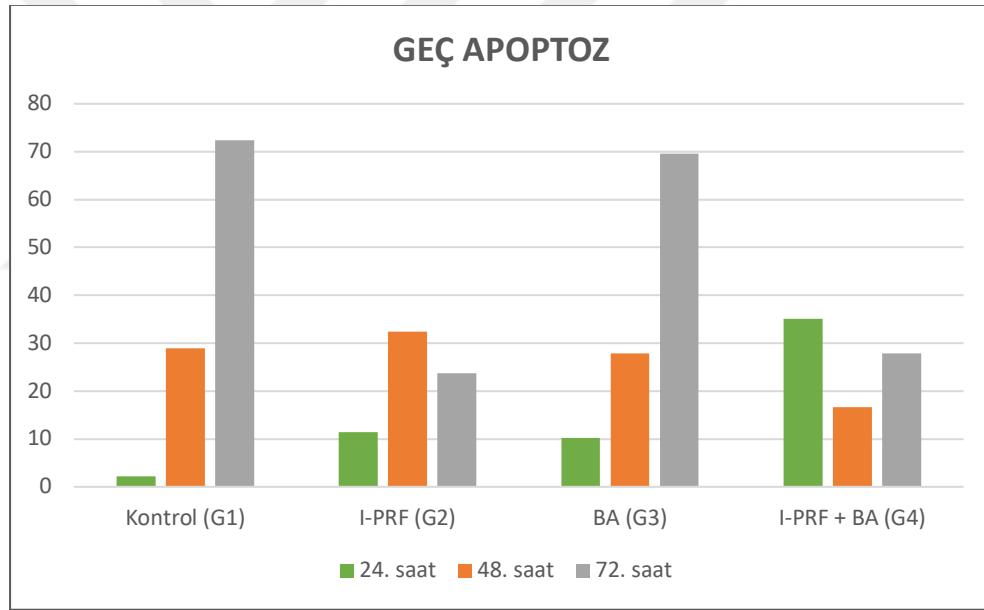
**Kontrol grubu için;** geç apoptotik hücre değerleri açısından 24. 48. ve 72. saat arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık vardır ( $p<0,05$ ). En yüksek geç apoptotik hücre değeri 72. saatte görülmüştür.

**I-PRF grubu için;** geç apoptotik hücre değerleri açısından 24. 48. ve 72. saat arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yoktur ( $p>0,05$ ).

**BA grubu için;** geç apoptotik hücre değerleri açısından 24. ve 48. saat arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yoktur ( $p>0,05$ ). Ancak 72. saat ile 24. saat ve 72. saat ile 48. saat arasından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık mevcuttur ( $p<0,05$ ).

**I-PRF + BA grubu için;** geç apoptotik hücre değerleri açısından 24. ve 72. saat ile 48. ve 72. saat arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yoktur ( $p>0,05$ ). Ancak 24. ve 48. saat arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık vardır ( $p<0,05$ ).

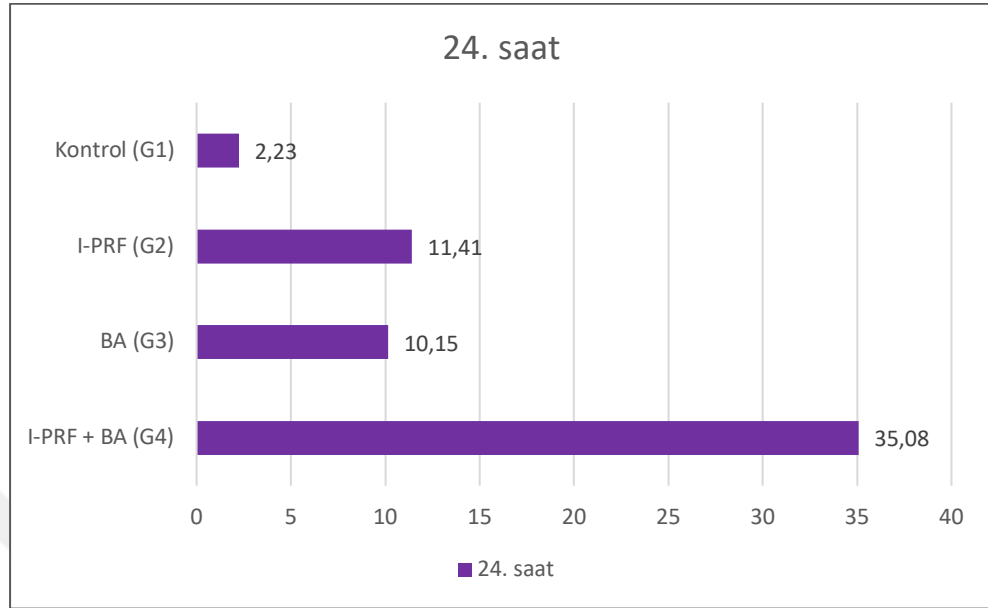
24. saatteki geç apoptotik hücre ortalama değeri 14,72; 48. saatteki ortalama değeri 26., 48. ve 72. saatteki ortalama değeri ise 48,38 olarak elde edilmiştir. Üç zamandaki ortalamalar birbirinden farklılık göstermiştir. 24., 48. ve 72. saate ait geç apoptotik hücre bulguları ise Şekil 4.18’de gösterilmektedir.



**Şekil 4.18** Zaman ve gruplar göre geç apoptotik hücre değerlerinin karşılaştırılması

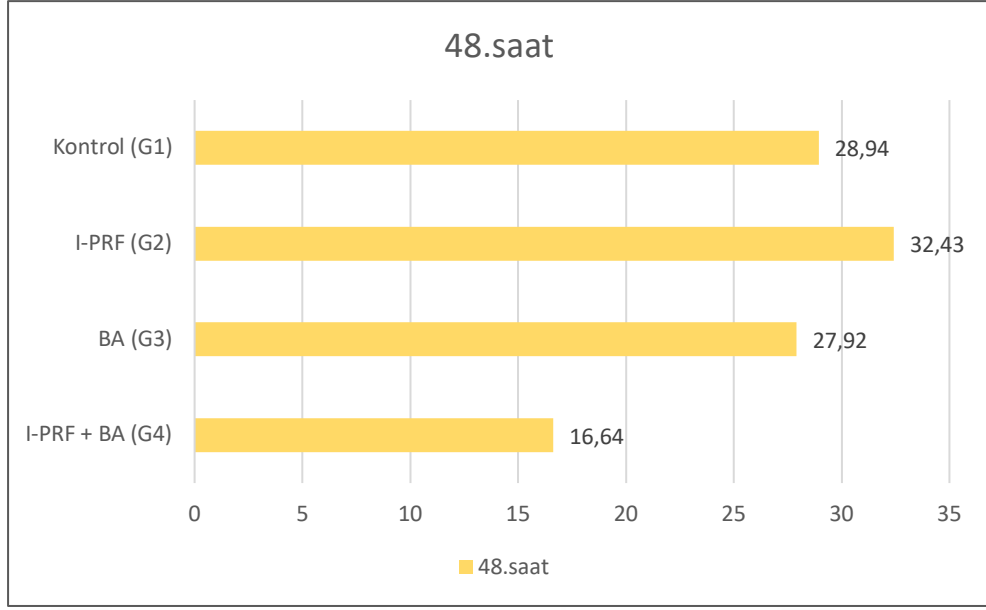
24. saat hücre geç apoptotik hücre değer ortalamaları kontrol grubunun 34,54, I-PRF grubunun 22,51, BA grubunun 35,87 ve I-PRF + BA grubunun 26,52 olarak elde edilmiştir. 24. saatte en yüksek ortalama geç apoptotik değeri I-PRF + BA grubuna ait olmak ile beraber diğer gruplar ile arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmaktadır ( $p<0,05$ ) (Tablo 4.6). En düşük ortalama geç apoptotik hücre

değeri ise kontrol grubunda görülmüştür. 24. saate ait geç apoptotik hücre bulguları şekil 4.19’da gösterilmiştir.



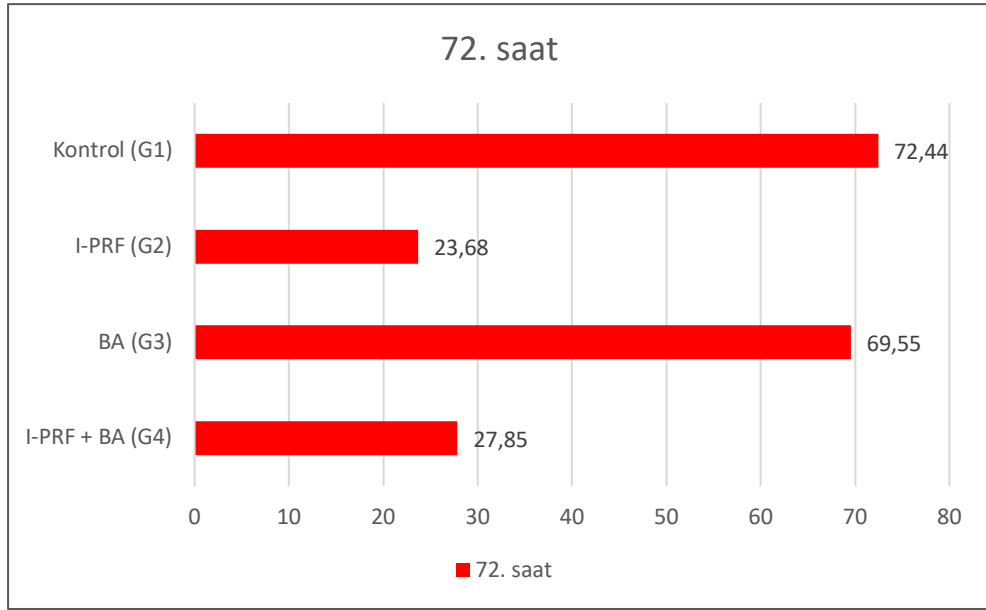
**Şekil 4.19** 24. saat için gruplar arasında geç apoptotik hücre değerlerinin karşılaştırılması

48. saat için geç apoptotik hücre bulguları açısından en yüksek ortalama değeri I-PRF grubuna aitken, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yoktur ( $p>0,05$ ) (Tablo 4.6). 48. saatteki en düşük ortalama geç apoptotik hücre değeri ise 16,64 olmak üzere I-PRF + BA grubuna aittir. 48. saate ait geç apoptotik hücre bulguları Şekil 4.20’de gösterilmektedir.



**Şekil 4.20** 48. saat için gruplar arasında geç apoptotik hücre değerlerinin karşılaştırılması

72. saat için en yüksek ortalama geç apoptotik hücre değeri kontrol grubuna ait olmakla beraber I-PRF ve I-PRF + BA ile arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık vardır ( $p < 0,05$ ). Ancak kontrol ve BA grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yoktur ( $p > 0,05$ ) (Tablo 4.6). 72. saatteki en düşük ortalama geç apoptotik hücre değeri ise 23,68 olmak üzere I-PRF grubuna aittir. 72. saate ait geç apoptotik hücre bulguları Şekil 4.21’de gösterilmektedir.



**Şekil 4.21** 72. saat için gruplar arasında geç apoptotik hücre değerlerinin karşılaştırılması

#### 4.3.1.4 Akım Sitometri Analizinde Nekrotik Hücre Bulgularının Değerlendirilmesi

Akım sitometri analizi ile kontrol grubu ve üç farklı materyal grubunun dental pulpa mezenkimal kök hücreler üzerindeki etkisini inceleyen çalışmamızda nekrotik hücre değeri üzerine grubun ana etkisi istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ( $p=0,250$ ). Zaman ana etkisinin nekroz parametresinin üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir etkisi vardır ( $p<0,001$ ). Grup ve zaman etkileşiminin nekroz parametresinin üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir etkisi yoktur ( $p=0,332$ ). Nekrotik hücre değeri üzerine grup, zaman ve grup-zaman etkileşiminin ana etkisinin karşılaştırılması Tablo 4.7’de gösterilmektedir.

**Tablo 4.7** Zaman ve gruplara göre nekrotik hücre değerlerinin karşılaştırılması

|            | Test İstatistiği | sd | p                |
|------------|------------------|----|------------------|
| Grup       | 1,46             | 3  | 0,250            |
| Zaman      | 44,49            | 2  | <b>&lt;0,001</b> |
| Grup*Zaman | 1,22             | 6  | 0,332            |

sd: serbestlik derecesi

\*0,05 düzeyinde anlamlı p değeri

Grup ana etkisi incelendiğinde, nekrotik hücre bulguları açısından kontrol grubunun ortalaması 3,06; I-PRF grubunun ortalaması 4,23; BA grubunun ortalaması 2,97; I-PRF + BA grubunun ortalaması 3,35 olarak elde edilmiştir (Tablo 4.8). Gruplara göre nekroz parametresinin ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yoktur ( $p>0,05$ ). 24. saatteki nekrotik hücre ortalama değeri 2,16; 48. saatteki ortalama değeri 1,5 ve 72. saatteki ortalama değeri 6,55 olarak elde edilmiştir. Burada 72. saatteki ortalama değer, 24. saat ve 48. saatteki ortalama değerinden anlamlı farklılık göstermiştir ( $p<0,05$ ). 24. ve 48. saatteki ortalama değerler arasında anlamlı bir farklılık bulunamamıştır ( $p>0,05$ ).

**Tablo 4.8** Farklı deney sürelerinde ve ortamlarında saptanan nekrotik hücre değerlerinin karşılaştırılması

|                 | Nekrotik Hücre           |                         |                                | Toplam      |
|-----------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------------|-------------|
|                 | 24. saat                 | 48. saat                | 72. saat                       |             |
|                 | Ort ± SS<br>(medyan)     | Ort ± SS<br>(medyan)    | Ort ± SS<br>(medyan)           |             |
| Kontrol (G1)    | 1,39 ± 0,43              | 2,35 ± 1,48             | 5,45 ± 1,8                     | 3,06 ± 2,19 |
| I-PRF (G2)      | 2,85 ± 2,24              | 2,03 ± 1,21             | 7,81 ± 1,61                    | 4,23 ± 3,1  |
| BA (G3)         | 2,6 ± 1,93               | 0,76 ± 0,45             | 5,54 ± 1,36                    | 2,97 ± 2,41 |
| I-PRF + BA (G4) | 1,79 ± 1,6               | 0,85 ± 0,53             | 7,41 ± 1,06                    | 3,35 ± 3,23 |
| Total           | 2,16 ± 1,57 <sup>b</sup> | 1,5 ± 1,14 <sup>b</sup> | <b>6,55 ± 1,69<sup>a</sup></b> | 3,4 ± 2,69  |

a-c: Aynı harfe sahip grup – zaman ortalamaları arasında fark yoktur.

A-F: Aynı harfe sahip grup\*zaman etkileşimleri ortalamaları arasında fark yoktur.

\*0,05 düzeyinde anlamlı p değeri

Ort ± SS: Ortalama ± Standart sapma

Tablo 4.8'deki bulgulara göre;

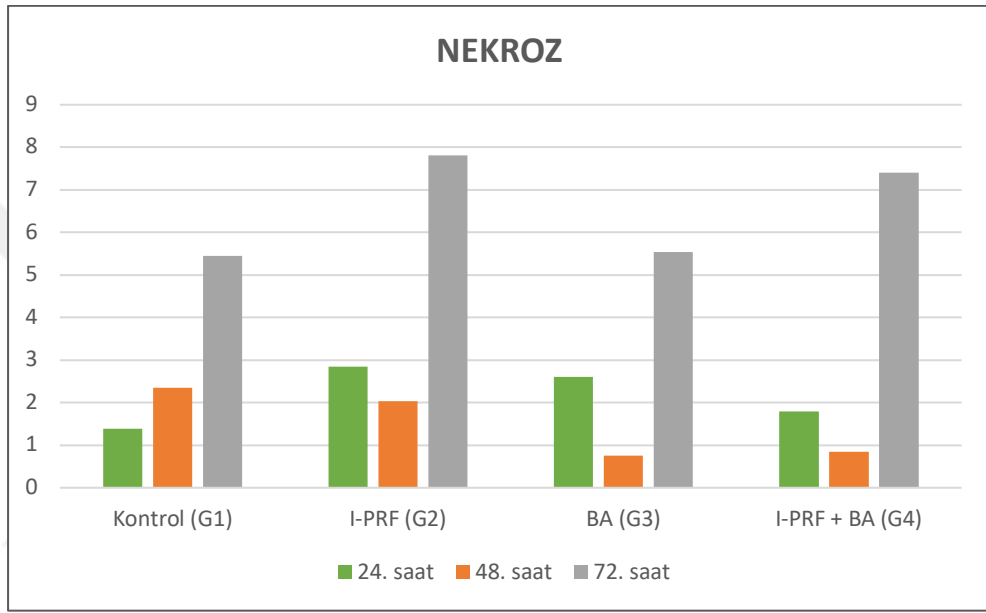
**Kontrol grubu için;** nekrotik hücre değerleri açısından saatler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yoktur ( $p>0,05$ ).

**I-PRF grubu için;** nekrotik hücre değerleri açısından saatler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yoktur ( $p>0,05$ ).

**BA grubu için;** nekrotik hücre değerleri açısından saatler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yoktur ( $p>0,05$ ).

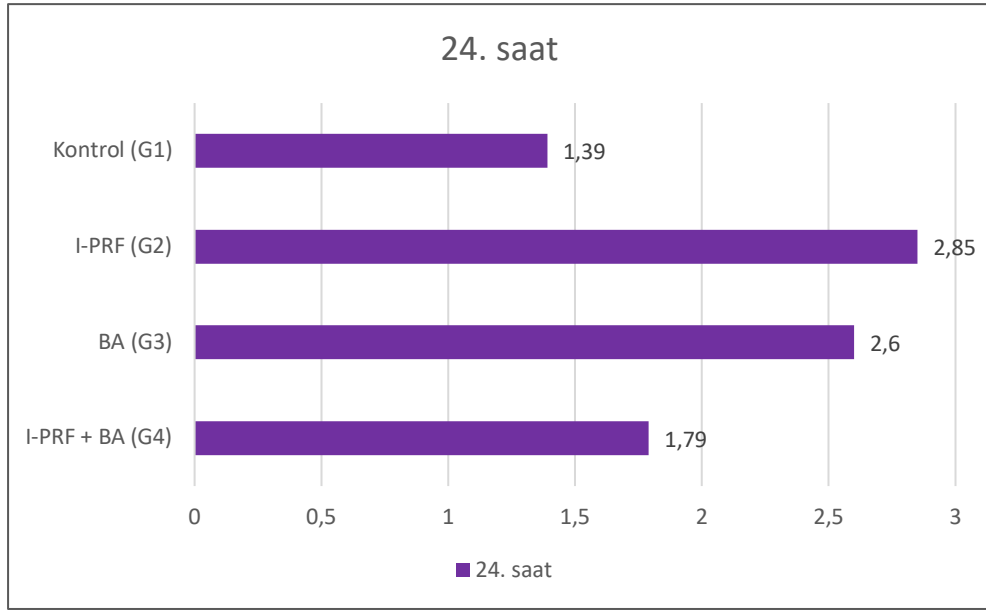
**I-PRF + BA grubu için;** nekrotik hücre değerleri açısından saatler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yoktur ( $p>0,05$ ).

24., 48. ve 72. güne ait nekroz hücre bulguları ise Şekil 4.22’de gösterilmektedir.



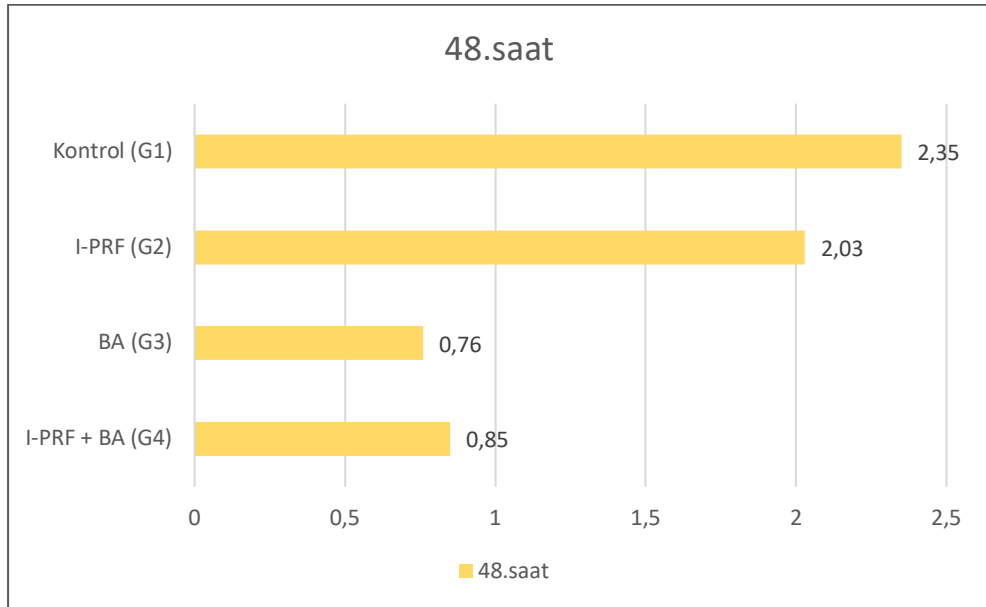
**Şekil 4.22** Zaman ve gruplar göre nekrotik hücre değerlerinin karşılaştırılması

24. saat için en yüksek ortalama nekrotik hücre değeri 2,85 ile I-PRF grubuna aittir. 24. saate ait nekroz hücre bulguları Şekil 4.23’te gösterilmektedir.



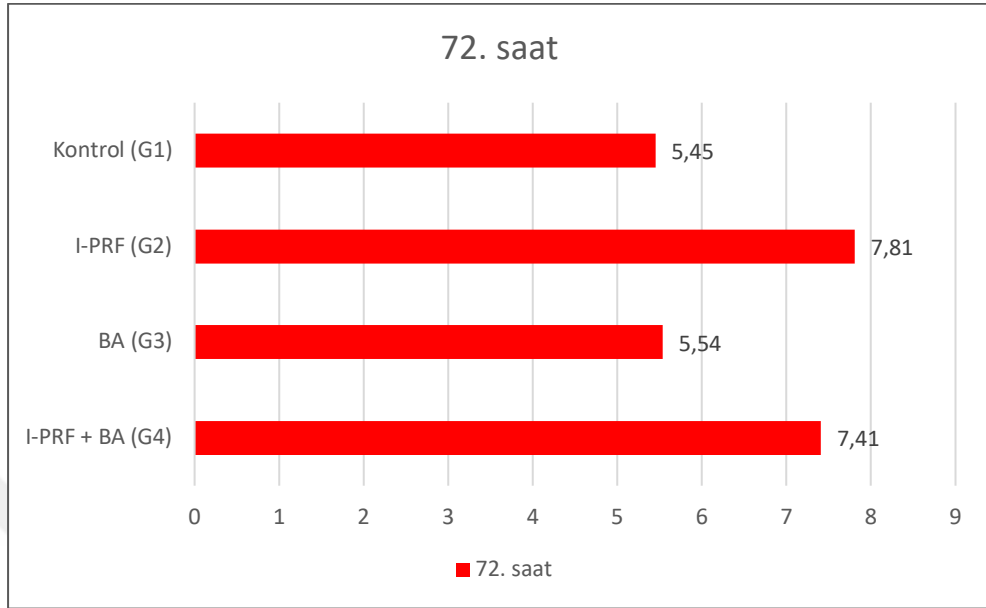
**Şekil 4.23** 24. saat için gruplar arasında nekrotik hücre değerlerinin karşılaştırılması

48. saat için en yüksek ortalama nekrotik hücre değeri 2,35 ile kontrol grubuna aittir. 48. saate ait nekroz hücre bulguları Şekil 4.24'te gösterilmektedir.



**Şekil 4.24** 48.saat için gruplar arasında nekrotik hücre değerlerinin karşılaştırılması

72. saat için en yüksek ortalama nekrotik hücre değeri 7,81 ile I-PRF grubuna aittir. 72. saate ait nekroz hücre bulguları Şekil 4.25'te gösterilmektedir.



**Şekil 4.25** 72.saat için gruplar arasında nekrotik hücre değerlerinin karşılaştırılması

#### 4.3.1.5 Akım Sitometri Analizinde Ölü Hücre Bulgularının Değerlendirilmesi

Akım sitometri analizi ile kontrol grubu ve üç farklı materyal grubunun dental pulpa mezenkimal kök hücreler üzerindeki etkisini inceleyen çalışmamızda ölü hücre (Nekroz+ Geç Apoptoz+ Erken Apotoz) değeri üzerine grubun ana etkisi istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p=0,11$ ). Ölü hücre değeri üzerine zamanın ana etkisi istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p<0,001$ ). Ölü hücre değeri üzerine grup ve zaman etkileşiminin etkisi istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p<0,05$ ). Ölü hücre değeri üzerine grup, zaman ve grup-zaman etkileşiminin ana etkisinin karşılaştırılması Tablo 4.9'da gösterilmektedir.

**Tablo 4.9** Zaman ve gruplara göre ölü hücre değerlerinin karşılaştırılması

|            | Test İstatistiği | sd | p                |
|------------|------------------|----|------------------|
| Grup       | 4,64             | 3  | <b>0,011</b>     |
| Zaman      | 66,25            | 2  | <b>&lt;0,001</b> |
| Grup*Zaman | 34,43            | 6  | <b>&lt;0,001</b> |

sd: serbestlik derecesi

\*0,05 düzeyinde anlamlı p değeri

Kontrol grubunda ölü hücre değerinin ortalaması 43,9, I-PRF grubunda 36,07, BA grubuna 46,49 ve I-PRF + BA grubunda ise 40,32 olarak elde edilmiştir (Tablo 4.10). Burada farklılık I-PRF ile BA grubunda elde edilen ölü hücre ortalama değeri arasında görülmüştür ( $p < 0,05$ ). Kontrol, I-PRF ve I-PRF + BA grubu arasında ise istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yoktur ( $p > 0,05$ ). En yüksek toplam ortalama ölü hücre oranı, BA grubuna, en düşük toplam ortalama ölü hücre oranı ise I-PRF grubuna aittir.

**Tablo 4.10** Farklı deney sürelerinde ve ortamlarında saptanan ölü hücre değerlerinin karşılaştırılması

|                 | Ölü Hücre                      |                                  |                                  | Toplam                         |
|-----------------|--------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|--------------------------------|
|                 | 24. saat                       | 48. saat                         | 72. saat                         |                                |
|                 | Ort $\pm$ SS<br>(medyan)       | Ort $\pm$ SS<br>(medyan)         | Ort $\pm$ SS<br>(medyan)         |                                |
| Kontrol (G1)    | 8,36 $\pm$ 3,53 <sup>F</sup>   | 43,53 $\pm$ 2,68 <sup>BCD</sup>  | 79,81 $\pm$ 6,08 <sup>A</sup>    | 43,9 $\pm$ 31,17 <sup>ab</sup> |
| I-PRF (G2)      | 27,06 $\pm$ 4,25 <sup>DE</sup> | 47,64 $\pm$ 7,62 <sup>BC</sup>   | 33,5 $\pm$ 2,69 <sup>BCDE</sup>  | 36,07 $\pm$ 10,2 <sup>b</sup>  |
| BA (G3)         | 24,51 $\pm$ 10,4 <sup>EF</sup> | 37,44 $\pm$ 2,67 <sup>BCDE</sup> | 77,52 $\pm$ 2,4 <sup>A</sup>     | 46,49 $\pm$ 24,56 <sup>a</sup> |
| I-PRF + BA (G4) | 50,9 $\pm$ 14,42 <sup>B</sup>  | 32,09 $\pm$ 1,74 <sup>CDE</sup>  | 37,97 $\pm$ 2,07 <sup>BCDE</sup> | 40,32 $\pm$ 11,1 <sup>ab</sup> |
| Total           | 27,71 $\pm$ 17,74 <sup>c</sup> | 40,18 $\pm$ 7,2 <sup>b</sup>     | 57,2 $\pm$ 22,71 <sup>a</sup>    | 41,69 $\pm$ 20,68              |

a-c: Aynı harfe sahip grup – zaman ortalamaları arasında fark yoktur.

A-F: Aynı harfe sahip grup\*zaman etkileşimleri ortalamaları arasında fark yoktur.

\*0,05 düzeyinde anlamlı p değeri

Ort  $\pm$  SS: Ortalama  $\pm$  Standart sapma

Tablo 4.10'daki bulgulara göre;

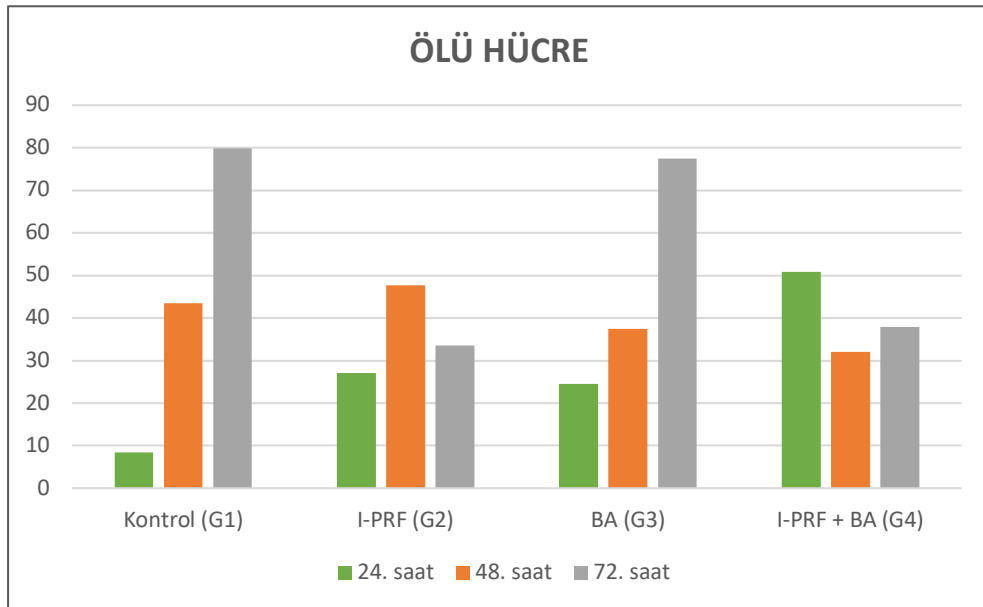
**Kontrol grubu için;** ölü hücre değerleri açısından 24. saat, 48. saat ve 72. saat arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık vardır ( $p<0,05$ ). En yüksek ölü hücre oranı 72. saatte görülmüştür.

**I-PRF grubu için;** ölü hücre değerleri açısından 24. ve 48. saat arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık vardır. Ancak 24. ile 72. saat ve 48. ile 72. saat arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ( $p>0,05$ ).

**BA grubu için;** ölü hücre değerleri açısından 24. ve 48. saat arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yoktur ( $p>0,05$ ). Ancak 72. saat ile 24. saat ve 72. saat ile 48. saat arasından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık mevcuttur ( $p<0,05$ ).

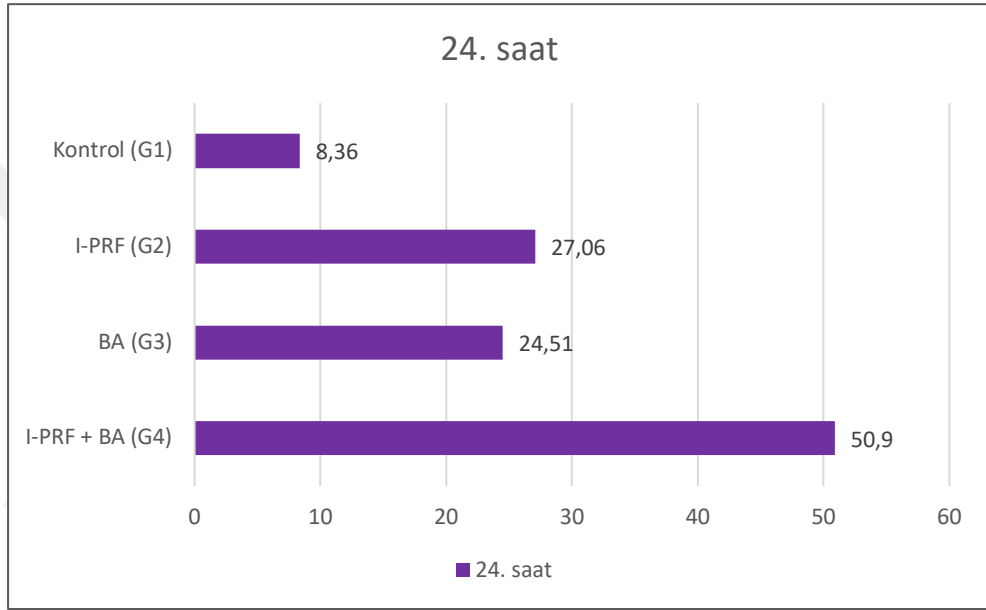
**I-PRF + BA grubu için;** ölü hücre değerleri açısından 24. ve 72. saat ile 48. ve 72. saat arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yoktur ( $p>0,05$ ). Ancak 24. ve 48. saat arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık vardır ( $p<0,05$ ).

Ölü hücre değeri ortalamaları 24. saatte 27,71; 48. saatte 40,18 ve 72. saatte 57,2 olarak elde edilmiştir. 24. 48. ve 72. saate ait ölü hücre bulguları ise Şekil 4.26'da gösterilmektedir.



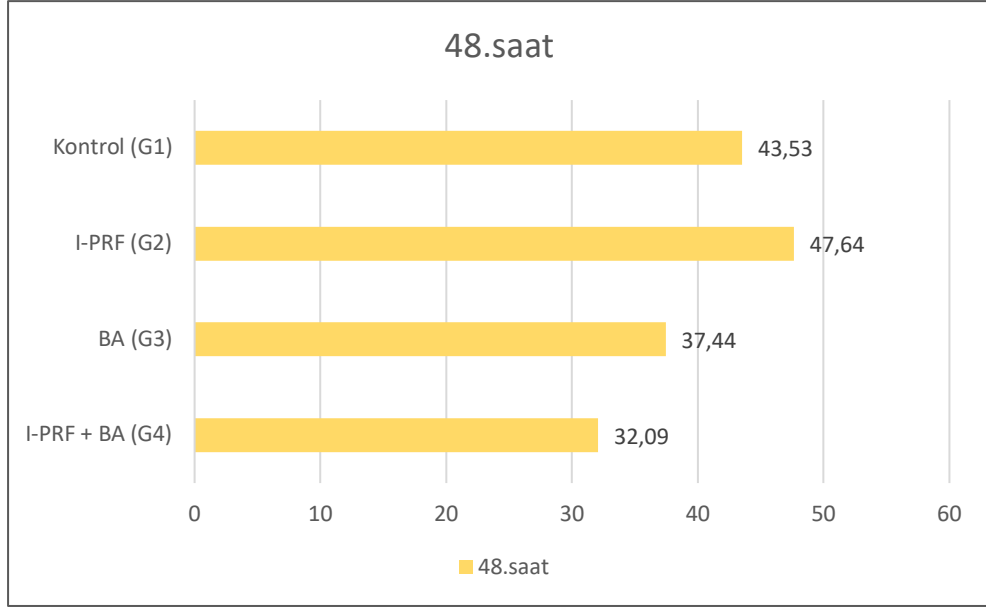
Şekil 4.26 Zaman ve gruplar göre ölü hücre değerlerinin karşılaştırılması

24. saat ölü hücre değeri ortalamaları kontrol grubunun 8,36, I-PRF grubunun 27,06; BA grubunun 24,51 ve I-PRF + BA grubunun 50,9 olarak elde edilmiştir. 24. saatte en yüksek ortalama ölü hücre değeri I-PRF + BA grubuna aittir ve diğer gruplar ile arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmaktadır ( $p<0,05$ ). Kontrol grubu ile BA grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur ( $p>0,05$ ). En düşük ortalama ölü hücre değeri ise kontrol grubunda görülmüştür, I-PRF ve I-PRF + BA grupları ile arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır ( $p<0,05$ ). 24. saate ait ölü hücre bulguları Şekil 4.27’de gösterilmiştir.



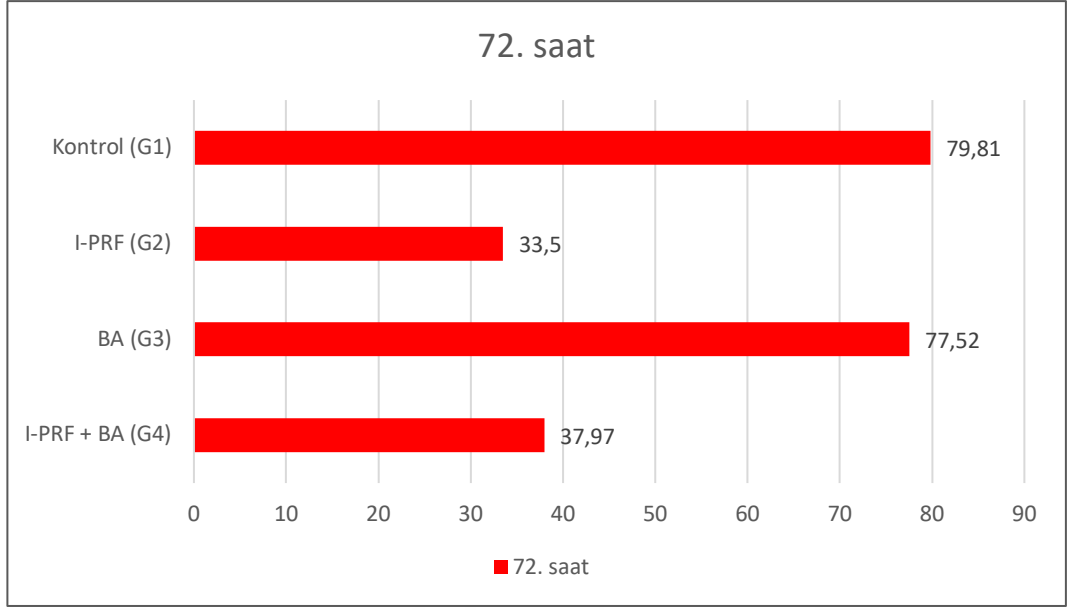
**Şekil 4.27** 24. saat için gruplar arasında ölü hücre değerlerinin karşılaştırılması

48. saat için ölü hücre bulguları açısından en yüksek ortalama değeri I-PRF grubuna aitken, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yoktur ( $p>0,05$ ). 48. saatteki en düşük ortalama ölü hücre değeri ise 32,09 olmak üzere I-PRF + BA grubuna aittir. 48. saate ait ölü hücre bulguları Şekil 4.28’de gösterilmektedir.



**Şekil 4.28** 48.saat için gruplar arasında ölü hücre değerlerinin karşılaştırılması

72. saat için en yüksek ortalama ölü hücre değeri kontrol grubuna ait olmakla beraber I-PRF ve I-PRF + BA grubu ile arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık vardır ( $p < 0,05$ ). Ancak I-PRF ve I-PRF + BA grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yoktur ( $p > 0,05$ ). Kontrol ve BA grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamaktadır ( $p > 0,05$ ). 72. saatteki en düşük ortalama ölü hücre değeri ise 33,5 olmak üzere I-PRF grubuna aittir. 72. saate ait ölü hücre bulguları Şekil 4.29’te gösterilmektedir.



**Şekil 4.29** 72.saat için gruplar arasında ölü hücre değerlerinin karşılaştırılması

#### 4.4 DP- MKH Odontojenik Farklılaşma Bulgularının Değerlendirilmesi

Dört deney grubu için odontojenik farklılaşma potansiyelleri Binoküler Araştırma Mikroskobu (Olympus BH2-RFCA, Japonya) ile görüntüler alınarak incelendi.

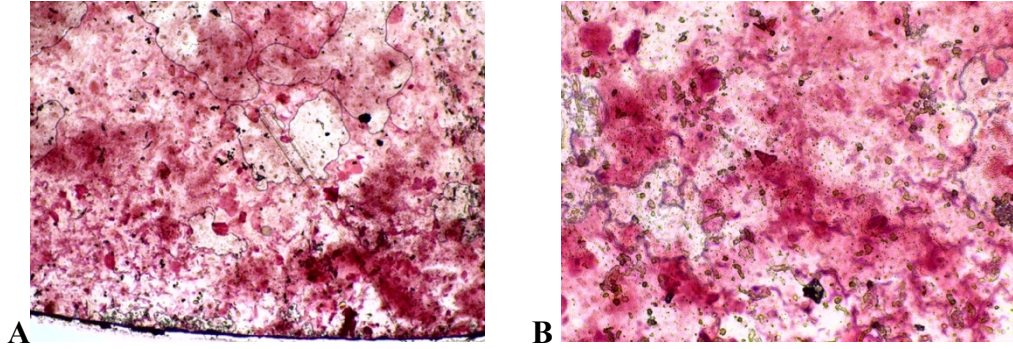
Dental pulpadan elde edilen kök hücrelerde, odontojenik farklılaşmanın değerlendirilmesi Alizarin Red boyaması (ALR) ile hücre kültüründeki kalsiyum birikiminin görüntülenmesi ile yapılmaktadır. Boyama yönteminde, kalsiyum depoları hidroksil grubuyla reaksiyona girerek bir çökelti oluşturur. Hücre kültüründeki kalsiyum içeren bölgelerin ALR ile teması sonucu, kırmızı-turuncumsu bir renkte boyanır. Her ne kadar kantitatif bir ölçüm yapılmamış olsa da mikroskop ile incelemede belirgin farklar saptanmıştır.

Her bir hücre kültüründeki kalsifikasyon yoğunluklarının ve hücre farklılaşmalarının incelendiği gruplar arası karşılaştırmalar değerlendirildiğinde;

G1: DMEM içeren kontrol grubunda DP-MKH odontojenik farklılaşma deney sonuçları:

DMEM kontrol grubuyla stimüle edilen DP-MKH'nin grubunda, diğer tüm gruplara kıyasla en düşük mineralizasyon seviyeleri gözlenmiştir. Hücrelerde görüldüğü zamana bağlı olarak apoptotik hücrelerin görüldüğü, düzensiz mineralize

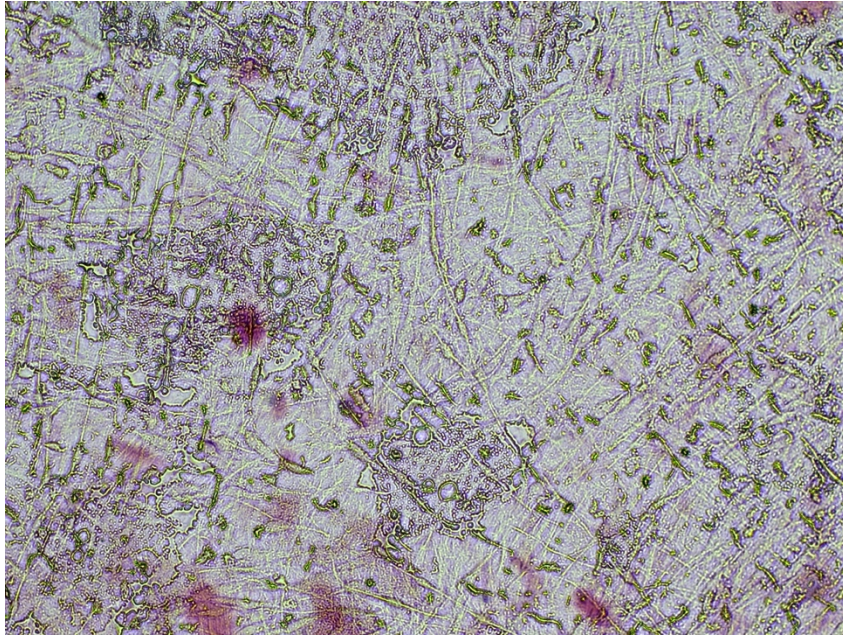
kalsiyum birikimlerin olduğu saptandı. ALR ile boyanan mineralize kalsiyum birikimleri görüldü. Farklılaşan hücrelerde kalsiyum birikimine bağlı olarak hücrelerin turuncu-kırmızı renkte boyandığı tespit edilmiştir (Şekil 4.30).



**Şekil 4.30** DMEM kontrol grubundaki DP-MKH'nin (G1) odontojenik farklılaşma ortamına bırakıldıktan sonraki ALR boyama görüntüleri.

A: 4X, B: 10X

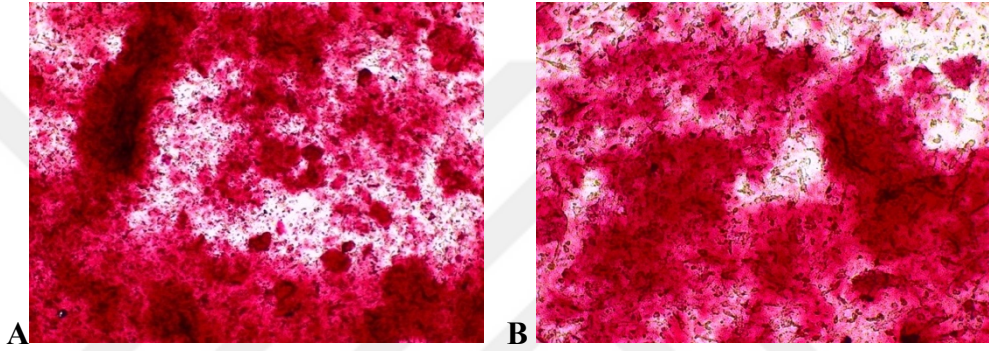
Gruba ait hücrelerin morfolojik olarak odontoblast benzeri hücrelere kısmen dönüştüğü, hücrelerin toplanmaya ve yüksek yoğunluklu kümeler oluşturmaya başladığı gözlemlendi (Şekil 4.31).



**Şekil 4.31** G1 grubu ALR boyama öncesi görüntüsü (10X).

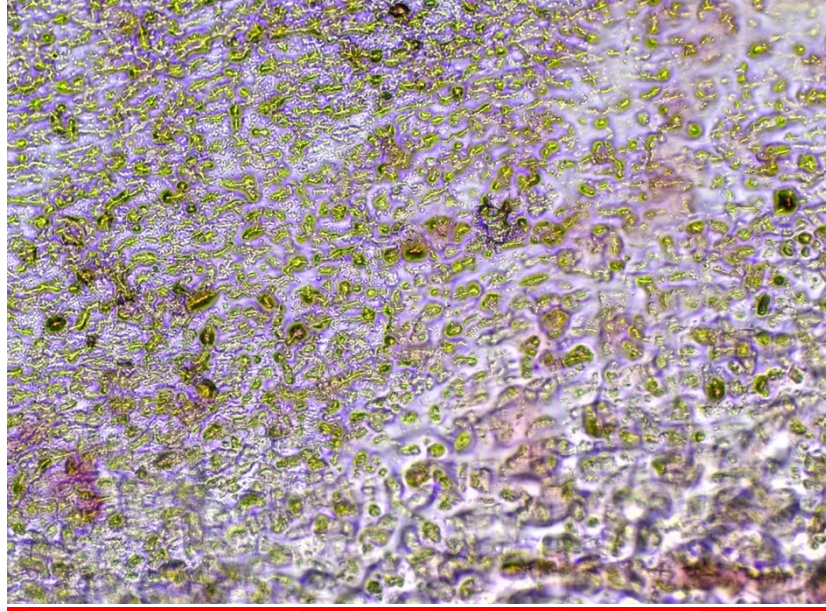
G2: DMEM ve I-PRF içeren ortam ile stimüle edilen gruptaki DP-MKH'nin odontojenik farklılaşma deneyi sonuçları:

Mezenkimal kök hücrelerinin işlem gördükten sonra yapışık tek tabaka şeklinde yayıldığı ve yüzeyin yaklaşık %75' ini kapladığı gözlemlendi. Hücrelerde kalsiyum mineral depozitlerinin ise özellikle siyah noktacıklar şeklinde oldukça fazla artış gösterdiği tespit edildi. Mineralizasyon kademeli olarak arttı ve yapışık tek tabaka boyunca birden fazla alanda bir araya gelerek mineralize bölgeler oluşturdu (Şekil 4.32 ve 4.33).



**Şekil 4.32** DMEM ve I-PRF grubundaki DP-MKH'nin (G2) odontojenik farklılaşma ortamına bırakıldıktan sonraki ALR boyama görüntüleri.

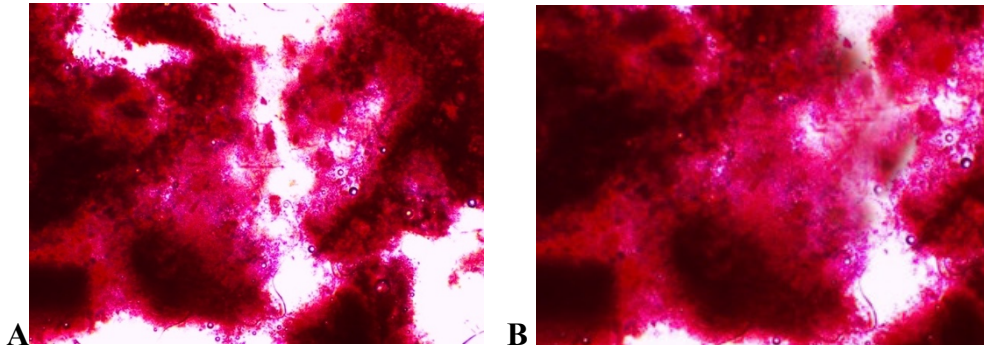
A: 4X, B: 10X



**Şekil 4.33** G2 grubu ALR boyama öncesi görüntüsü.

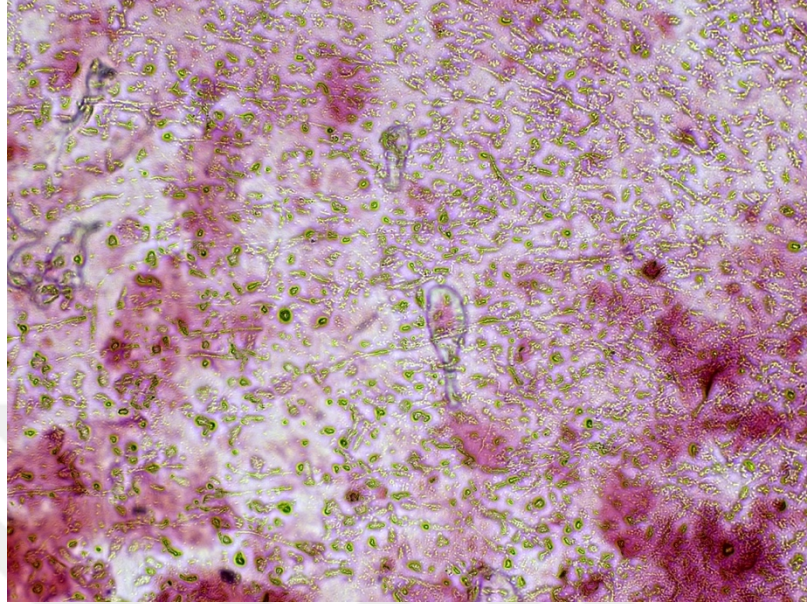
G3: DMEM ve borik asit (BA) içeren ortam ile stimüle edilen gruptaki DP-MKH'nin odontojenik farklılaşma deneyi sonuçları:

Kalsifiye nodüllerin varlığını tespit etmek için odontodiferansiyasyonun indüklenmesinden sonra diğer gruptaki hücrelere kıyasla kalsiyum nodül oluşumunun belirgin şekilde arttığı gösterildi. Alanda iğsi yapıda yaygın bir dağılım gözlenirken üst üste yoğun bir şekilde kümelenmiş kalsifiye alanlar dikkat çekti. Hücreler arasındaki yapıların bağlantı yapılarının yer yer kaybolduğu alanlar gözlemlendi (Şekil 4.34).



**Şekil 4.34** DMEM ve borik asit grubundaki DP-MKH'nin (G3) odontojenik farklılaşma ortamına bırakıldıktan sonraki ALR boyama görüntüleri A: 4X, B: 10X

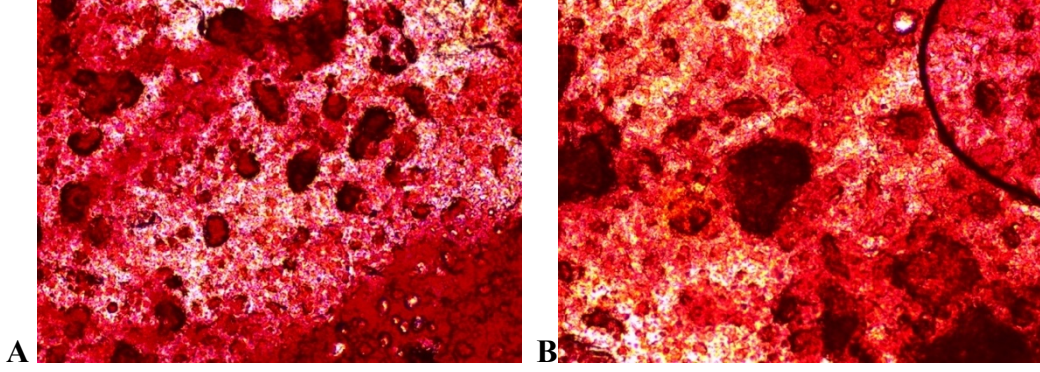
G3 grubuna ait hücrelerin morfolojik olarak odontoblast benzeri hücrelere farklılaşmadığı izlendi. Ancak mineralize kalsiyum odakları ALR ile boyanan parlak kırmızı renkte gözlendi (Şekil 4.35).



**Şekil 4.35** G3 grubu ALR boyama öncesi görüntüsü

G4: DMEM, I-PRF ve BA içeren ortam ile stimüle edilen gruptaki DP-MKH'nin odontojenik farklılaşma deneyi sonuçları:

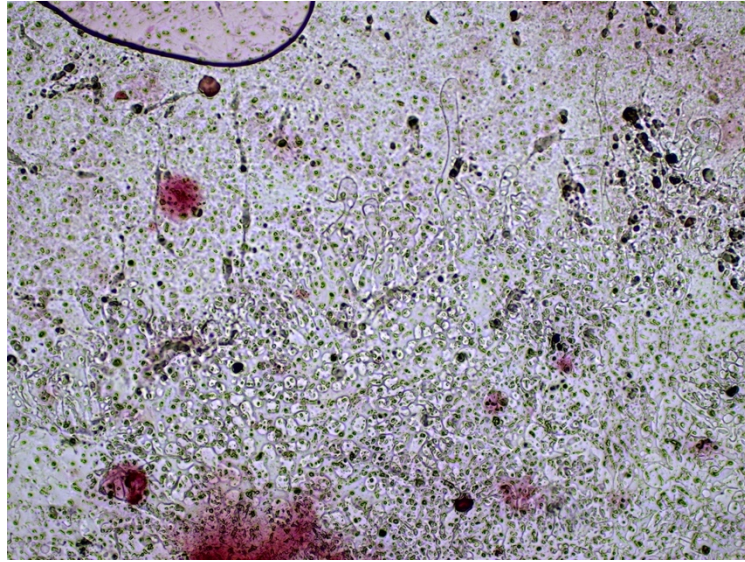
Bu gruptaki DP-MKH, kontrol grubu hücrelerine göre yoğun kalsifiye tortu gösterdi. Kalsifiye alanlar gruplar halinde yoğunlaşmış ve etrafı siyah boyanmış halkalar ile sınırlanmış izole alanlar şeklinde dikkati çekti. Genel yapının yaklaşık %90'ının ALR ile boyanarak kalsifiye olduğu gözlendi (Şekil 4.36).



**Şekil 4.36** DMEM, I-PRF ve BA grubundaki DP-MKH'nin (G4) odontojenik farklılaşma ortamına bırakıldıktan sonraki ALR boyama görüntüleri

A: 4X, B: 10X

Boyanmadan önceki haline bakıldığında ise her grupta görülen iğsi yapıların yanında osteoblastlar ve lakunalar içinde osteosit benzeri yapılar gözlemlendi. Hücrelerin daha belirgin bir şekilde koloni oluşturma ve çoğalma eğiliminde oldukları izlendi (Şekil 4.37).

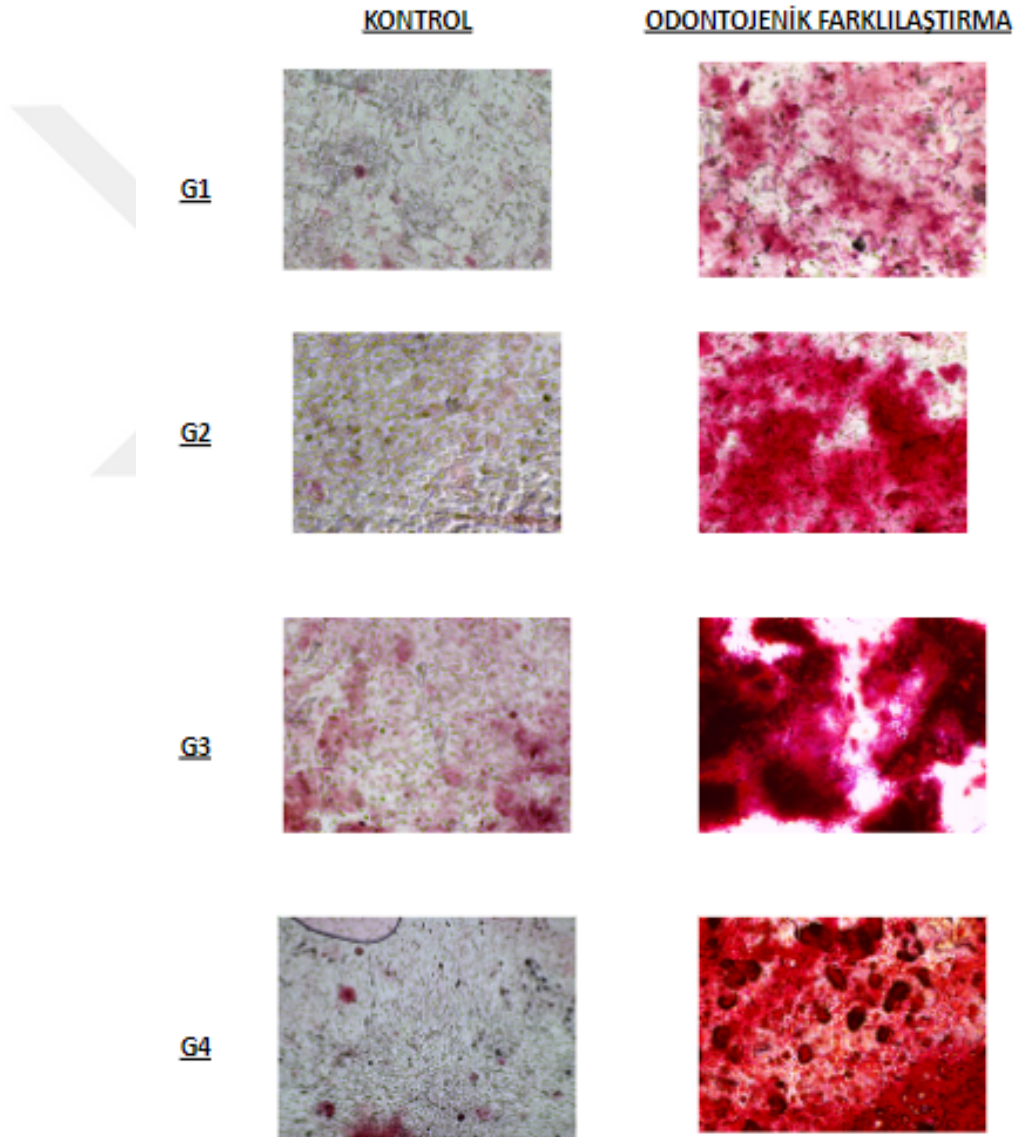


**Şekil 4.37** G4 grubu ALR boyama öncesi görüntüsü

DMEM, I-PRF ve BA ile stimüle edilen grupta (G4) görülen mineralize nodüllerin sayısı DMEM ve I-PRF grubuyla stimüle edilen grupta oluşan nodüllere göre daha fazla bulunmuştur. Ayrıca G4 grubundaki mineralize nodüller DMEM ve

BA ile stimüle edilen gruptan niteliksel olarak daha büyük ve daha yoğun olarak gözlemlendi. Bu durumun odontojenik farklılaşmayı ve ekstrasellüler matriks mineralizasyonunu tetiklediği düşünülmüştür.

Hem DMEM ve I-PRF ortamıyla hem de DMEM ve BA ortamıyla stimüle edilen gruplara ait hücrelerin tüm deney sürelerinde morfolojik olarak odontoblast benzeri hücrelere dönüştüğü ancak en yoğun mineralize kalsiyum birikimlerinin DMEM, I-PRF ve BA içeren ortamda bulunan DP-MKH grubunda olduğu görülmüştür (Şekil 4.38).



**Şekil 4.38** Odontojenik farklılaşma ortamında kültüre edilen tüm deney grubu hücrelerinin 21 gün sonunda ALR ile boyanmadan önce ve sonraki görüntüleri

## TARTIŞMA

Bu çalışmada I-PRF ve borik asit materyalinin DP-MKH canlılığı üzerine etkisinin Annexin V boyası kullanılarak 24., 48. ve 72. saatlerde belirlenmesi ve odontojenik farklılaşma düzeylerinin saptanması amaçlanmıştır.

Dental pulpa, kan damarları, sinir demetleri ve mineralize dentini oluşturabilen pulpa odası boyunca uzanan odontoblast tabakası ile kök kanalında organize olmuş yumuşak bir bağ dokusudur [248]. Çürük, periodontal hastalık, travma ve çeşitli iatrojenik faktörlerin bir sonucu olarak, dentin-pulpa kompleksi, geri dönüşümlü pulpitis ve tedavi edilmediğinde geri dönüşü olmayan pulpitis veya pulpa nekrozuna ilerleyecek hastalıklar geliştirebilmektedir [249, 250]. İyi organize olmuş yapıları içeren diş pulpasının rejenerasyonunun sağlanması, diş pulpasının işlevini sürdürmek ve tüm dişin canlılığını geri kazandırmak için oldukça önemlidir.

Mühendislik ve yaşam bilimleri prensiplerini temel alan ve yeni gelişen interdisipliner bir bilim olan doku mühendisliği yaklaşımları içerisindeki en önemli basamaklardan biri kök hücrelerdir [251].

Osteojenik, adipojenik ve kondrojenik farklılaşma yetenekleri göz önüne alındığında gelecekteki kemik ve dentin mineralizasyonunu hedefleyen tedavi stratejileri için umut verici adaylar olan diş kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin tanımlanması rejeneratif tıp alanında önemli bir kilometre taşı olmuştur [252]. Hücre bazlı doku mühendisliği üzerine yapılmış çalışmalar, pulpa rejenerasyon araştırmalarında büyük bir potansiyel göstermiştir. Nöral krest kaynaklı mezenkimal kök hücre grubundan olan dental pulpa kök hücrelerinin, izolasyon ve karakterizasyonlarından bu yana, *in vitro* koşullarda odontoblastlara farklılaşma ve yapı iskeleleri ile birlikte nakledildiğinde *in vivo* dentin-pulpa kompleksini oluşturma yetenekleri onları diş doku mühendisliği alanında umut vaat eden hücreler haline getirmiştir [253-255]. Günümüzde doku mühendisliği çalışmalarında yaşanan bu gelişmeler sayesinde nekrotik bir pulpanın tekrar canlılığına kavuşması artık hayal olmaktan çıkmıştır [256-258].

Dental pulpa kök hücreleri kültür koşullarında kendini yenileme özelliklerini ve farklılaşabilme yeteneklerini korumakta bu özellikleri kök hücre transplantasyonu içeren ve doku rejenerasyonunu amaçlayan tedavilerde kolaylık sağlamaktadır [55, 259]. DP-MKH'nin elde edileceği bölgeye cerrahi erişimin kolaylığı, verimli eldesi, ilgili bölgede düşük morbidite riski [55], dondurularak saklanabilmesi ve birçok yapı

iskelesi ile yeniden birleştirilebilmesi [98, 260] gibi diğer özellikleri sebebiyle de doku mühendisliği çalışmaları için tercih edilecek adaylar olmaktadır.

Literatürde, DP-MKH'nin hücre büyüme, farklılaşma kapasitesi ve kök hücre fonksiyonlarına öncülük etme potansiyeli gibi özelliklerini değerlendiren birçok çalışma mevcuttur [261, 262]. Çalışmamızda söz konusu avantajları sebebiyle ve rejeneratif tedaviler ile pulpa-dentin kompleksini yeniden oluşturma amacıyla kullanımı en sık tercih edilen kök hücreler olduğu için DP-MKH kullanımı tercih edildi. Yapılan çalışmalar değerlendirildiğinde, dental dokulardan kök hücrelerin elde edilmesi için genellikle 19-25 yaş arası sağlıklı bireylerin herhangi bir patolojik sebebi bulunmayan çekim endikasyonu olan gömük 20 yaş dişleri kullanılmaktadır. Hücresel açıdan zengin olmaları, yüksek çoğalma potansiyelleri, gömük olmaları nedeniyle steril kalabilmeleri ve çekim endikasyonu sıklığı gibi avantajları sebebiyle çalışmamızda 20 yaş dişleri dental pulpa kök hücre kaynağı olarak tercih edilmiştir [107].

Yetişkin kök veya progenitör hücreler, morfojenler ve uygun bir iskele olmak üzere 3 temel unsura dayalı olarak, rejeneratif endodontinin odak noktası, kaybedilen diş dokusunu, yani pulpa-dentin kompleksini yeniden oluşturmaktır [263]. Rejeneratif dental uygulamalar için tasarlanan iskelelerin, kök kanalında gözlenen mikro ortamı taklit etmesi ve mekanik destek sağlaması beklenmektedir [264]. Klinik ve deneysel olarak, iskele olarak en sık tercih edilen yapılarından biri, kasıtlı olarak provoke edilen periapikal kanama sonucu dezenfekte edilmiş kanal içinde oluşan kan pıhtısıdır. Kök hücre, inflamatuvar hücre, fibroblast ve yara iyileşmesi için gerekli olan büyüme faktörleri açısından zengin olduğunun gösterilmesi [8], kan pıhtısının rejeneratif endodontide güvenilir bir doku mühendisliği iskelesi olarak işlev görebileceğini göstermektedir [265]. Trombositlerin, yara iyileşme evrelerinde kilit görevlere sahip olması, vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ve dönüştürücü büyüme faktörü beta (TGF-B) gibi maddeleri serbest bırakması [266], biyolojik olarak aktif maddeleri depolama ve salgılaması, enfeksiyonla mücadele etme [267] gibi özelliklerinden dolayı trombositten zengin plazma (TZP) ve trombositten zengin fibrin (TZF) gibi otolog trombosit konsantreleri, sadece rejeneratif tıpta değil rejeneratif endodontide de büyük potansiyel göstermiş ve yaygın ilgi görmüştür [268]. Literatürde bir dizi çalışma, TZP ve TZF gibi trombosit konsantrelerinin rejeneratif endodontik tedavilerde iskele olarak kullanımının, geleneksel indüklenmiş kan pıhtısı kullanımına kıyasla biyolojik rejeneratif sonuçları iyileştirdiğini bildirmiştir [152, 269, 270].

TZP elde etme protokolü, antikoagülan kullanımını gerektirmekte, yüksek G-kuvveti altında çoklu santrifüj adımlarını içermektedir [27, 50, 51]. Alternatif olarak Choukron'un geliştirdiği TZF ise, büyüme faktörlerinin çoğunun fibrin ağı içinde kapsüllendiği, sıvı bir protein konsantresinden yoksun bir formülasyona sahip yapı iskelesidir [44]. TZF iskelelerinin, hazırlandıktan çok kısa bir süre sonra dehidrasyona uğrayarak parçalanmaları nedeniyle yapısal bütünlükleri ve biyolojik özellikleri olumsuz yönde etkilenmektedir. Bu nedenle hazırlandıktan hemen sonra kullanılmaları gerekmektedir [163]. Ayrıca TZF'in sahip olduğu katı yapısı uygulamalarını sınırlandırmaktadır [271]. Literatürde farklı klinik ihtiyaçları karşılamak amacıyla TZP, TZF ürünlerine alternatif olabilecek, protokolü optimize etmeye yönelik yapılmış araştırmalar mevcuttur [267, 272]. Bu amaçla geliştirilen otolog ürünlerden biri de TZP'daki gibi herhangi bir antikoagülan veya TZF'deki gibi fibrin matriksi içermeyen, TZF'nin sıvı bir formülasyonu olan enjekte edilebilir trombosit zengin fibrindir [19].

Literatürde trombosit konsantrelerinin RET'lerde değerlendirildiği birçok çalışma yapılmış olmasına rağmen, I-PRF'in rejeneratif etkinliğinin değerlendirildiği çalışma sayısı oldukça sınırlıdır [186, 273]. Nageh ve ark. internal kök rezorpsiyonuna sahip periapikal lezyonlu veya lezyonsuz daimi ön dişlerin rejeneratif tedavisinde I-PRF biyoiskele türünün potansiyelini değerlendirildikleri çalışmalarında, tüm olgularda takip süresi boyunca belirti ve semptomların düzeldiğini, internal rezorpsiyon lezyonlarında ve periapikal lezyonlarda konik ışınli bilgisayarlı tomografi (CBCT) görüntülemeye tedavi öncesine göre iyileşme olduğunu göstermişlerdir [273].

Rejeneratif endodontik tedavide kök kanal dezenfeksiyonu için üçlü antibiyotik patı içeren I-PRF'in kullanımını araştıran bir çalışmada üçlü antibiyotik patı içeren I-PRF'in, yalnız üçlü antibiyotik patına göre yüksek oranda antimikrobiyal etki gösterdiği kanıtlanmıştır. Bu üretilen iskelenin sadece bakteri sayısını azaltmadığı, aynı zamanda rejenerasyonu destekleyen büyüme faktörlerini de içermesi sebebiyle rejeneratif endodontik tedavilerde umut verici potansiyeli olduğu düşünülmüştür [274]. Bildiğimiz kadarıyla, geliştirilmiş bir trombosit ürünü olarak I-PRF'nin RET prosedüründe ideal bir iskele görevi görüp göremeyeceğine dair bir kesin kanıt yoktur.

Chai ve ark. DP-MKH'nin hücrel rejeneratif aktivitesini I-PRF veya geleneksel TZF kültür ortamında karşılaştırmak amacıyla yaptıkları çalışmalarında

yirmi yaş dişlerinden elde ettikleri pulpa kök hücrelerinin göçünü, çoğalma ve odontoblastik farklılaşma kapasitesini değerlendirmişlerdir. Çalışma sonuçlarında hem TZF hem de I-PRF, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında DP-MKH'in migrasyon ve proliferasyonunu arttırmıştır. I-PRF, TZF ile karşılaştırıldığında migrasyonda kayda değer bir artış göstermiş ve kollajen tip 1 alfa 1, dentin sialofosfoprotein ve dentin matris protein 1'i kodlayan genlerin m-RNA ekspresyonunu indüklemiştir. Bu çalışmadan elde edilen bulgular, I-PRF'in geleneksel TZP ile karşılaştırıldığında DP-MKH'nin rejenerasyon potansiyelini daha iyi desteklediğini göstermektedir. Ayrıca Alizarin red boyaması ile I-PRF grubunda daha yüksek oranda olmak üzere her iki trombosit konsantrisinde, kontrol grubuna göre daha fazla mineralize nodül olduğu gösterilmiştir [21].

I-PRF'in, kanal içine kolayca enjekte edilebilen ve düzensiz boşlukları doldurabilen sıvı formüle sahip olması, hem zengin bir büyüme faktörü kaynağı olması hem de iskele görevi görebilmesi gibi çeşitli avantajları mevcuttur. Ayrıca, sıvı TZF formunun, çeşitli uygulamalar için bu tez çalışmasında kullanılan bor gibi biyoaktif materyaller ile kombine olarak kolaylıkla kullanılabilmesi, rejeneratif potansiyeli indükleyici özellikleri ve konak türevli bir biyolojik iskele olması gibi sebeplerle bu tez çalışmasında DP-MKH canlılığı ve farklılaşması üzerine etkilerini değerlendirmek üzere I-PRF tercih edilmiştir [184].

Bu tez çalışmasında I-PRF, daha yüksek santrifüj hızlarında hazırlanan diğer TZF formülasyonları ile karşılaştırıldığında rejeneratif hücre, lökosit ve trombosit sayılarının yanı sıra büyüme faktörleri konsantrasyonunda önemli bir artışa neden olduğu gösterilen düşük hızlı santrifüj konsepti ile hazırlanmıştır [181].

İnsan gingival mezenkimal hücreleri [19, 275] osteoblastları [276, 277] ve periodontal ligament kök hücreleri [278] üzerinde %5 ve %100 arasında değişen I-PRF konsantrasyonları ile şartlandırılmış ortam kullanarak yapılan çalışmalarda geniş bir biyouyumluluk aralığı bulunmuştur. Literatürde DP-MKH'nin rejeneratif potansiyelini, I-PRF ve TZP konsantreleri içeren kültür ortamında değerlendiren tek bir çalışma mevcuttur [21]. Bu çalışmada proliferasyon, odontojenik farklılaşma ve migrasyon değerlendirme deneyleri uygulanan DP-MKH, içeriğinin %20'si I-PRF olan şartlandırılmış ortamda kültür edilmiştir. Bu sebeple bu tez çalışmasında I-PRF'nin bulunduğu gruplarda kültür ortamındaki I-PRF oranı %20 olarak tercih edilmiştir.

L-PRF'in (Lökosit ve Trombosit Zengin Fibrin) DP-MKH farklılaşması üzerindeki potansiyel etkilerini analiz etmeyi amaçlayan ve mineralizasyon potansiyelini araştırmak için Alizarin-Red (ALR) boyama yöntemini tercih eden bir çalışmanın sonuçları, osteojenik ortamda kültür edilen hücrelerde mineral birikiminin kontrol grubuna göre L-PRF gruplarında belirgin şekilde artış gösterdiğini kanıtlamıştır [279]. Bizim çalışmamızda da ALR boyama ile değerlendirmede odontojenik farklılaşmanın bir kanıtı olan kalsifiye nodül içeriğinin I-PRF grubunda kontrol grubuna göre daha fazla olduğu gösterilmiştir.

Dünyada %72'lik bir pay ile rezervinin en büyüğü ülkemizde olan bor başta endüstriyel alan olmak üzere yüzyıllardır birçok alanda kullanım imkanı bulmaktadır. Hayvan ve insan vücudu için önemi henüz tam olarak aydınlatılamamış olan borun yüksek yapıli organizmalarda bazı metabolizmalar için esansiyel olabileceği teorize edilmiştir [280-282]. Borun memeli metabolizması üzerindeki en belirgin ve iyi bilinen etkilerinden biri muhtemelen kemik ve diş gelişimine katkısıdır. Borun kemik ve diş gelişimi üzerindeki kesin mekanizması hala belirsizliğini korumakla birlikte, bazı çalışmalar, borun progenitör hücre farklılaşması ve olgunlaşma süreçlerinde rolü olduğunu öne sürmüştür [23, 26, 204, 283].

Rejeneratif doku mühendisliğinde bor türevleri kullanılmasının güvenli olduğu bazı çalışmalar ile kanıtlamıştır. Bunlardan biri Demirci ve ark [284] tarafından bor içerikli kompozitlerin antibakteriyel etkinliği ve odontojenik, osteojenik farklılaşma üzerine etkisinin değerlendirildiği bir çalışmadır. Bu çalışmada bor içeren kompozitlerin *S. mutans*' a karşı dikkate değer bir antibakteriyel etki gösterdiği, aynı zamanda DP-MKH'nin osteojenik ve odontojenik farklılaşma kapasitelerini de arttırdığı dikkat çekici bir sonuç olarak gösterilmiştir.

Yapılan diğer bir çalışma, insan dişi germ kök hücrelerinin bor ile tedavi edildikten sonra osteojenik ve odontojenik farklılaşma kapasitelerinde artış meydana geldiğini göstermiştir [25].

Kemik doku mühendisliği için yapı iskelelerinde borun kullanılabilirliğini araştırmak amacıyla yapılan başka bir araştırmada, kitosan nanoparçacıkları içinde kapsüllenmiş bor ile hazırlanan iskelenin kitosan iskeleye göre, preosteoblastların proliferasyonunu ve osteojenik farklılaşmasını önemli ölçüde artırdığı gösterilmiştir. Bor ile yüklenmiş polimerik iskelelerin, *in vitro* ve *in vivo* kemik rejenerasyonu için umut verici bir araç olduğu düşünülmüştür [213].

Yapılan literatür taramasında borun kemik doku mühendisliği başta olmak üzere çeşitli kök hücre türlerinin canlılığı ve farklılaşması üzerine etkinliği çalışmalarla kanıtlandığı için, bu tez çalışmasında I-PRF ile birlikte borik asit materyali değerlendirilmiştir [25, 285].

Materyalin etkisiyle biyolojik yapıda değişiklik meydana gelip gelmediğinin belirlenmesi amacıyla kullanacak test yöntemleri, materyalin uygulama yöntemine ve beklenen toksik etkilere göre değişiklik gösterebildiği için en uygun test yönteminin seçilmesi önemlidir [286]. Biyouyumluluğun belirlenmesinde dental materyallerin kültürdeki hücreler üzerine doğrudan uygulanması ve elde edilen doz-cevap eğrisi sayesinde potansiyel sitotoksitenin belirlenmesi ilkesine dayanan hücre kültür testleri sıklıkla kullanılmaktadır. Bu testler, materyal etkilerinin direkt gözlenebilmesi, uygulamaların tekrarlanabilmesi ve materyaller arasında karşılaştırmalara izin vermeleri avantajlarına sahiptir [225]. Bu tez çalışmasında *in vitro* direkt hücre materyal temas yönteminin seçilmesinde kullanılan I-PRF'nin sıvı olması ve bor materyalinin hücre kültür besisi yerinde çözünebilmesi etkili olmuştur.

Rejeneratif endodontide kullanılacak iskele ürünleri ve rejeneratif potansiyeli indükleyici materyallerin biyouyumluluklarının değerlendirildiği çalışmalarda farklı inkübasyon sürelerindeki hücresel canlılık düzeylerinin incelenmesi önemlidir. Zamana bağlı olarak hücresel canlılık değişim göstermektedir. Parmar ve ark. çalışmalarında iskele olarak kullandıkları fibrin yapıştırıcısının dental pulpa kök hücreler üzerindeki hücresel canlılığını 1. ve 3. gün değerlendirirken [287], Wang ve ark. I-PRF'in osteoblastlar üzerindeki hücresel canlılığını 24. saat için değerlendirmişlerdir. Taşlı ve ark. bir bor türevi olan sodyum pentaborat penhidrat'ın (NaB) diş germi kök hücrelerinin canlılığı üzerine etkilerini 24. 48. ve 72 saatte değerlendirmişlerdir [25]. Bor materyal çeşitlerinin DP-MKH üzerindeki etkilerinin incelendiği bir tez çalışmasında da biyouyumluluk 24., 48. ve 72. saatlerde değerlendirilmiştir [247]. Bu nedenle tez çalışmasında I-PRF ve bor materyallerinin DP-MKH üzerindeki sitotoksik etkisi incelenirken bu zaman aralıkları tercih edilmiştir.

Bu tez çalışmasında borik asit materyalinin değerlendirildiği üç zaman aralığı incelendiğinde zamanla canlı hücre değerinde düşüş görülmüştür. Ancak kontrol grubuna göre canlılık değeri karşılaştırmasında 24. saat için %18 azalma, 48. saat için %10 artış ve 72. saat için %11 artış gözlemlenmiştir. Her üç zaman aralığında da kontrol grubu ile arasında canlı hücre oranı bakımından istatistiksel fark görülmemiştir

( $p>0,05$ ). Başka bir çalışmada ise DP-MKH üzerine 1 $\mu$ M borik asit uygulandığında, kontrol grubuna göre 24. ve 72. saatlerde sırasıyla %57 ve %18'lik bir proliferasyon artışı gözlemlenmiştir [247].

Bildiğimiz kadarıyla, literatürde odontojenik ve osteojenik farklılaşmayı artırdığı kanıtlanmış olan I-PRF ve bor materyalinin birlikte kullanımını ve etkisini değerlendiren bir araştırma yoktur. Çalışmamızda I-PRF içerisine borik asit eklendiğinde, yalnız I-PRF uygulanan gruba göre ortalama hücre canlılığında %7 azalma görülürken, yalnız borik asit uygulanan gruba göre hücre canlılığında %11 artış görülmüştür. I-PRF'nin otolog kaynaklardan türetilen bir büyüme faktörü konsantresi olarak kök hücre canlılığını olumlu yönde etkilemede borik asitten daha başarılı olması beklenen bir sonuç olmuştur.

Odontojenik hücre analizi ve alizarin red boyaması sonrası mineralizasyon incelemesi sonucunda en yoğun mineralize nodül sayısı gösteren DP-MKH grubunun, I-PRF ile birlikte borik asidin uygulandığı grup olduğu görülmüştür. Yalnız borik asidin uygulandığı grupta ise DP-MKH daha büyük nodüller oluşturmuştur. Bu sonuçlar bize borik asidin odontojenik-osteojenik farklılaşmayı indüklediğini göstermiştir. Odontojenik farklılaşmanın borik asit ve I-PRF + borik asit grubunda en fazla olduğu göz önünde bulundurulduğunda hücre canlılığının minimum seviyede etkilenmesi ancak odontojenik farklılaşmanın maksimum olabilmesi açısından bu çalışmanın sonuçları I-PRF ve borik asitin kombine şeklini daha uygun bulmaktadır.

Taşlı ve ark. tarafından yürütülen bir çalışmada, 5 ve 700  $\mu$ g/ml arasında çeşitli derişimlerde sodyum pentaborat penhidrat'ın (NaB), insan diş germ hücresi osteojenik ve odontojenik farklılaşmasına olan etkisi incelenmiştir. 20  $\mu$ g/ml derişimdeki bor türevinin hücrelerin canlılığını artırdığı ve odonto-osteojenik farklılaşmayı kontrol grubuna göre daha iyi indüklediği gösterilmiştir [25]. Bu sonuçlar bu tez çalışmasının ulaştığı sonuçlar ile örtüşmektedir. Ancak borik asidin farklı konsantrasyonlarının tek başına ve I-PRF ile birlikte dental pulpa kök hücre canlılığına etkisi ve odonto-osteojenik farklılaşmasına olan katkısının değerlendirilmesi için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

Ying ve arkadaşları [26], doku mühendisliği uygulamalarında borun kemik iliği kök hücrelerinin proliferasyon ve farklılaşması üzerine etkisini 4, 7 ve 14 günlük sürelerde inceledikleri çalışmalarında, 1, 10, 100 ve 1.000 ng/ml borik asit konsantrasyonlarını karşılaştırmışlardır. Araştırmalarında sadece 1000 ng/ml'lik derişimde sitotoksik etki tespit etmişlerdir. Ayrıca kontrol grubuna göre 10 ve 100

ng/ml'lik derişimde anlamlı düzeyde fazla kalsifik nodül oluşumu meydana geldiği gösterilmiştir. Bizim çalışmamızda ise borik asitin yüksek derişimi (yaklaşık 1000 ng/ml) kullanılmasına rağmen DP-MKH'nde kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir sitotoksik etki görülmemesi kemik iliği kök hücrelerine kıyasla DP-MKH'nin borik asite karşı daha az duyarlı olduğunu düşündürmektir. Ancak bizim çalışmamızda bor asit ve I-PRF'in 24., 48. ve 72. saatlerde etkisi gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar kısa dönem sonuçları ifade ettiği için materyallerin daha uzun dönem biyouyumluluk etkilerinin değerlendirildiği daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

Bizim çalışmamız sonucunda DP-MKH üzerinde bor materyalinin ve I-PRF'nin genel olarak proliferatif ve odontojenik farklılaşma etkisinin tespit edilmesinin, bu ürünlerin rejeneratif endodonti alanında kullanım kazanabilmesi için yapılması gereken daha kapsamlı çalışmalara ışık tutacağını düşünmekteyiz.

## SONUÇ VE ÖNERİLER

Borik asit ve I-PRF'nin, DP-MKH canlılığı ve odontojenik farklılaşması üzerine etkinliğinin incelendiği bu tez çalışmasının sınırları dahilinde;

- 24., 48. ve 72. saat ortalamaları dikkate alındığında, en yüksek DP-MKH canlılığı sergileyen grup I-PRF grubu olmuştur. Hücresel canlılık değeri sırasıyla I-PRF >I-PRF + borik asit >Kontrol >Borik asit olarak sıralanmaktadır.

- Materyal grupları arasında erken apoptoz ve nekroz bulguları açısından anlamlı bir farklılık yoktur.

- Geç apoptotik bulguları açısından en yüksek değer borik asit grubuna aittir.

- En yüksek ölü hücre değeri borik asit grubuna aittir.

- En yoğun mineralize kalsiyum birikimleri DMEM, I-PRF ve borik asit içeren ortamda bulunan DP-MKH grubunda görülmüştür.

- Bor ve I-PRF'nin rejeneratif endodonti klinik uygulamalarında kullanımına yönelik girişimlerin ön planda olduğu, daha uzun süreli ve kapsamlı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

## KAYNAKÇA

1. Cortes, M. I., Marcenes, W. ve Sheiham, A. (2001). Prevalence and correlates of traumatic injuries to the permanent teeth of schoolchildren aged 9-14 years in Belo Horizonte, Brazil. *Dent Traumatol*, 17(1), 22-26.
2. Chae, Y., Yang, M. ve Kim, J. (2018). Release of TGF- $\beta$ 1 into root canals with various final irrigants in regenerative endodontics: an in vitro analysis. *Int Endod J*, 51(12), 1389-1397.
3. Fuks, A. B. (2000). Pulp therapy for the primary and young permanent dentitions. *Dent Clin North Am*, 44(3), 571-596, vii.
4. Rafter, M. (2005). Apexification: a review. *Dent Traumatol*, 21(1), 1-8.
5. Heithersay, G. S. (1975). Calcium hydroxide in the treatment of pulpless teeth with associated pathology. *J Br Endod Soc*, 8(2), 74-93.
6. Hermann, B. W. (1952). [On the reaction of the dental pulp to vital amputation and calxyl capping]. *Dtsch Zahnarztl Z*, 7(24), 1446-1447.
7. Liu, H., Lu, J., Jiang, Q., Haapasalo, M., Qian, J., Tay, F. R., ve ark. (2021). Biomaterial scaffolds for clinical procedures in endodontic regeneration. *Bioactive Materials*.
8. Murray, P. E., Garcia-Godoy, F. ve Hargreaves, K. M. (2007). Regenerative endodontics: a review of current status and a call for action. *J Endod*, 33(4), 377-390.
9. Discher, D. E., Mooney, D. J. ve Zandstra, P. W. (2009). Growth factors, matrices, and forces combine and control stem cells. *Science*, 324(5935), 1673-1677.
10. Langer, R. ve Vacanti, J. P. (1993). Tissue engineering. *Science*, 260(5110), 920-926.
11. Gathani, K. ve Raghavendra, S. (2016). Scaffolds in regenerative endodontics: A review. *Dental Research Journal*, 13(5), 379-386.
12. Huang, G. T. (2009). Pulp and dentin tissue engineering and regeneration: current progress. *Regenerative Medicine*, 4(5), 697-707.
13. Şenel, F. (2002). Kök hücreler. *Bilim ve Teknik Dergisi Şubat*, 1-15.
14. Kingsley, C. S. (1954). Blood coagulation; evidence of an antagonist to factor VI in platelet-rich human plasma. *Nature*, 173(4407), 723-724.
15. Ehrenfest, D., Corso, M., Diss, A., Mouhyi, J. ve Charrier, J. B. (2010). Three-Dimensional Architecture and Cell Composition of a Choukroun's Platelet-Rich Fibrin Clot and Membrane. *Journal of periodontology*, 81, 546-555.
16. Özsağır, Z. ve Tunali, M. (2020). Injectable platelet-rich fibrin: a new material in medicine and dentistry. *Mucosa*, 27-33.
17. Wend, S., Kubesch, A., Orlowska, A., Al-Maawi, S., Zender, N., Dias, A., ve ark. (2017). Reduction of the relative centrifugal force influences cell number and growth factor release within injectable PRF-based matrices. *J Mater Sci Mater Med*, 28(12), 188.
18. Choukroun, J. ve Ghanaati, S. (2017). Reduction of relative centrifugation force within injectable platelet-rich-fibrin (PRF) concentrates advances patient's own inflammatory cells, platelets and growth factors: the first introduction to the low speed centrifugation concept. *European Journal of Trauma and Emergency Surgery*, 44, 87 - 95.

19. Miron, R. J., Fujioka-Kobayashi, M., Hernandez, M., Kandalam, U., Zhang, Y., Ghanaati, S., ve ark. (2017). Injectable platelet rich fibrin (i-PRF): opportunities in regenerative dentistry? *Clin Oral Investig*, 21(8), 2619-2627.
20. Yeom, K. H., Ariyoshi, W., Okinaga, T., Washio, A., Morotomi, T., Kitamura, C., ve ark. (2016). Platelet-rich plasma enhances the differentiation of dental pulp progenitor cells into odontoblasts. *Int Endod J*, 49(3), 271-278.
21. Chai, J., Jin, R., Yuan, G., Kanter, V., Miron, R. J. ve Zhang, Y. (2019). Effect of Liquid Platelet-rich Fibrin and Platelet-rich Plasma on the Regenerative Potential of Dental Pulp Cells Cultured under Inflammatory Conditions: A Comparative Analysis. *J Endod*, 45(8), 1000-1008.
22. Ehrenfest, D., Doglioli, P., de Peppo, G. M., Corso, M. ve Charrier, J. B. (2010). Choukroun's Platelet-Rich Fibrin (PRF) stimulates in vitro proliferation and differentiation of human oral bone mesenchymal stem cell in a dose-dependent way. *Archives of oral biology*, 55, 185-194.
23. Gorustovich, A. A., Steimetz, T., Nielsen, F. H. ve Guglielmotti, M. B. (2008). A histomorphometric study of alveolar bone modelling and remodelling in mice fed a boron-deficient diet. *Arch Oral Biol*, 53(7), 677-682.
24. Kuru, R. ve Yarat, A. (2017). Bor ve Sagligimiza Olan Etkilerine Guncel Bir Bakis/Boron and a Current Overview of its Effects on Health. *Clinical and Experimental Health Sciences*, 7, 107+.
25. Tasli, P. N., Dogan, A., Demirci, S. ve Sahin, F. (2013). Boron enhances odontogenic and osteogenic differentiation of human tooth germ stem cells (hTGSCs) in vitro. *Biol Trace Elem Res*, 153(1-3), 419-427.
26. Ying, X., Cheng, S., Wang, W., Lin, Z., Chen, Q., Zhang, W., ve ark. (2011). Effect of boron on osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells. *Biol Trace Elem Res*, 144(1-3), 306-315.
27. Demirci, S., Doğan, A., Şişli, B. ve Sahin, F. (2014). Boron increases the cell viability of mesenchymal stem cells after long-term cryopreservation. *Cryobiology*, 68(1), 139-146.
28. Wu, C., Miron, R., Sculean, A., Kaskel, S., Doert, T., Schulze, R., ve ark. (2011). Proliferation, differentiation and gene expression of osteoblasts in boron-containing associated with dexamethasone deliver from mesoporous bioactive glass scaffolds. *Biomaterials*, 32(29), 7068-7078.
29. Yang, J., Yuan, G. ve Chen, Z. (2016). Pulp Regeneration: Current Approaches and Future Challenges. *Front Physiol*, 7, 58.
30. Ajay Sharma, L., Sharma, A. ve Dias, G. J. (2015). Advances in regeneration of dental pulp--a literature review. *J Investig Clin Dent*, 6(2), 85-98.
31. Miran, S., Mitsiadis, T. A. ve Pagella, P. (2016). Innovative Dental Stem Cell-Based Research Approaches: The Future of Dentistry. *Stem Cells Int*, 2016, 7231038.
32. Schmalz, G., Widbiller, M. ve Galler, K. M. (2020). Clinical Perspectives of Pulp Regeneration. *J Endod*, 46(9s), S161-s174.
33. Paryani, K. ve Kim, S. G. (2013). Regenerative endodontic treatment of permanent teeth after completion of root development: a report of 2 cases. *J Endod*, 39(7), 929-934.
34. Kim, S. G., Malek, M., Sigurdsson, A., Lin, L. M. ve Kahler, B. (2018). Regenerative endodontics: a comprehensive review. *Int Endod J*, 51(12), 1367-1388.

35. Andreasen, J. O., Farik, B. ve Munksgaard, E. C. (2002). Long-term calcium hydroxide as a root canal dressing may increase risk of root fracture. *Dent Traumatol*, 18(3), 134-137.
36. Ribeiro, F. C., Souza-Gabriel, A. E., Marchesan, M. A., Alfredo, E., Silva-Sousa, Y. T. ve Sousa-Neto, M. D. (2008). Influence of different endodontic filling materials on root fracture susceptibility. *J Dent*, 36(1), 69-73.
37. Banchs, F. ve Trope, M. (2004). Revascularization of immature permanent teeth with apical periodontitis: new treatment protocol? *J Endod*, 30(4), 196-200.
38. Saoud, T. M., Martin, G., Chen, Y. H., Chen, K. L., Chen, C. A., Songtrakul, K., ve ark. (2016). Treatment of Mature Permanent Teeth with Necrotic Pulp and Apical Periodontitis Using Regenerative Endodontic Procedures: A Case Series. *J Endod*, 42(1), 57-65.
39. Ostby, B. N. (1961). The role of the blood clot in endodontic therapy. An experimental histologic study. *Acta Odontol Scand*, 19, 324-353.
40. Nygaard-Ostby, B. ve Hjortdal, O. (1971). Tissue formation in the root canal following pulp removal. *Scand J Dent Res*, 79(5), 333-349.
41. Iwaya, S. I., Ikawa, M. ve Kubota, M. (2001). Revascularization of an immature permanent tooth with apical periodontitis and sinus tract. *Dent Traumatol*, 17(4), 185-187.
42. Galler, K. M., Krastl, G., Simon, S., Van Gorp, G., Meschi, N., Vahedi, B., ve ark. (2016). European Society of Endodontology position statement: Revitalization procedures. *Int Endod J*, 49(8), 717-723.
43. Canoglu E. , C. Z. (2008). Rejeneratif Pulpa Tedavilerinde Bir Güncelleme. *Hacettepe Diş Hekimliği Dergisi*, 32(2), 21-27.
44. Adnan, S. ve Ullah, R. (2018). Top-cited Articles in Regenerative Endodontics: A Bibliometric Analysis. *J Endod*, 44(11), 1650-1664.
45. Howard, D., Buttery, L. D., Shakesheff, K. M. ve Roberts, S. J. (2008). Tissue engineering: strategies, stem cells and scaffolds. *J Anat*, 213(1), 66-72.
46. Lin, L. M., Huang, G. T., Sigurdsson, A. ve Kahler, B. (2021). Clinical cell-based versus cell-free regenerative endodontics: clarification of concept and term. *Int Endod J*, 54(6), 887-901.
47. Kim, S. G., Zhou, J., Solomon, C., Zheng, Y., Suzuki, T., Chen, M., ve ark. (2012). Effects of growth factors on dental stem/progenitor cells. *Dent Clin North Am*, 56(3), 563-575.
48. Nakashima, M., Iohara, K., Murakami, M., Nakamura, H., Sato, Y., Aiji, Y., ve ark. (2017). Pulp regeneration by transplantation of dental pulp stem cells in pulpitis: a pilot clinical study. *Stem Cell Research & Therapy*, 8(1), 1-13.
49. Xuan, K., Li, B., Guo, H., Sun, W., Kou, X., He, X., ve ark. (2018). Deciduous autologous tooth stem cells regenerate dental pulp after implantation into injured teeth. *Sci Transl Med*, 10(455).
50. Brizuela, C., Meza, G., Urrejola, D., Quezada, M. A., Concha, G., Ramírez, V., ve ark. (2020). Cell-Based Regenerative Endodontics for Treatment of Periapical Lesions: A Randomized, Controlled Phase I/II Clinical Trial. *Journal of Dental Research*, 99, 002203452091324.
51. Hargreaves, K. M., Geisler, T., Henry, M. ve Wang, Y. (2008). Regeneration potential of the young permanent tooth: what does the future hold? *Pediatr Dent*, 30(3), 253-260.
52. Rao, M. S. (2004). Stem sense: a proposal for the classification of stem cells. *Stem Cells Dev*, 13(5), 452-455.

53. **Can, A.** (2014). *Kök Hücre - Biyolojisi, Türleri ve Tedavide Kullanımları*. Ankara: Akademisyen Kitabevi. 39-47 s.
54. Fortier, L. A. (2005). Stem cells: classifications, controversies, and clinical applications. *Vet Surg*, 34(5), 415-423.
55. Gronthos, S., Brahimi, J., Li, W., Fisher, L. W., Cherman, N., Boyde, A., ve ark. (2002). Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res*, 81(8), 531-535.
56. McKay, R. (2000). Stem cells--hype and hope. *Nature*, 406(6794), 361-364.
57. Scadden, D. T. (2006). The stem-cell niche as an entity of action. *Nature*, 441(7097), 1075-1079.
58. Morsczeck, C., Schmalz, G., Reichert, T. E., Vollner, F., Galler, K. ve Driemel, O. (2008). Somatic stem cells for regenerative dentistry. *Clin Oral Investig*, 12(2), 113-118.
59. Rodríguez-Lozano, F. J., Bueno, C., Insausti, C. L., Meseguer, L., Ramírez, M. C., Blanquer, M., ve ark. (2011). Mesenchymal stem cells derived from dental tissues. *Int Endod J*, 44(9), 800-806.
60. Gardner, R. L. (2002). Stem cells: potency, plasticity and public perception. *J Anat*, 200(Pt 3), 277-282.
61. Tekeli S , A. N. E., Gökçe B , Sır G , Yiğittürk G , Çavuşoğlu T , Uyanıkgil Y . (2016). Kök hücreler; mezenkimal kök hücreler ve güncel klinik uygulamaları *FNG & Bilim Tıp Transplantasyon Dergisi*, 1(2), 72-83.
62. Sanchez-Lara, P. A., Zhao, H., Bajpai, R., Abdelhamid, A. I. ve Warburton, D. (2012). Impact of stem cells in craniofacial regenerative medicine. *Front Physiol*, 3, 188.
63. Ledesma-Martínez, E., Mendoza-Núñez, V. M. ve Santiago-Osorio, E. (2016). Mesenchymal Stem Cells Derived from Dental Pulp: A Review. *Stem Cells International*, 2016, 4709572.
64. Friedenstein, A. J., Chailakhjan, R. K. ve Lalykina, K. S. (1970). The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet*, 3(4), 393-403.
65. Bensinger, W., DiPersio, J. F. ve McCarty, J. M. (2009). Improving stem cell mobilization strategies: future directions. *Bone Marrow Transplant*, 43(3), 181-195.
66. Bakopoulou, A., Leyhausen, G., Volk, J., Tsiftoglou, A., Garefis, P., Koidis, P., ve ark. (2011). Comparative analysis of in vitro osteo/odontogenic differentiation potential of human dental pulp stem cells (DPSCs) and stem cells from the apical papilla (SCAP). *Arch Oral Biol*, 56(7), 709-721.
67. Suzergoz, F., Erdem, D. A., Sepet, E., Bektaş, M., Yalman, N. ve Gürol, A. (2009). A pilot study on the isolation of dental pulp stem cells, potential of forming colonies and defining the content of stem cells. *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*, 29, 128-133.
68. Minguell, J. J., Erices, A. ve Conget, P. (2001). Mesenchymal stem cells. *Exp Biol Med (Maywood)*, 226(6), 507-520.
69. Potdar, P. D. ve Jethmalani, Y. D. (2015). Human dental pulp stem cells: Applications in future regenerative medicine. *World J Stem Cells*, 7(5), 839-851.
70. Li, Z. Y., Chen, L., Liu, L., Lin, Y. F., Li, S. W. ve Tian, W. D. (2007). Odontogenic potential of bone marrow mesenchymal stem cells. *J Oral Maxillofac Surg*, 65(3), 494-500.

71. Mareschi, K., Biasin, E., Piacibello, W., Aglietta, M., Madon, E. ve Fagioli, F. (2001). Isolation of human mesenchymal stem cells: bone marrow versus umbilical cord blood. *Haematologica*, 86(10), 1099-1100.
72. Jing, W., Wu, L., Lin, Y., Liu, L., Tang, W. ve Tian, W. (2008). Odontogenic differentiation of adipose-derived stem cells for tooth regeneration: necessity, possibility, and strategy. *Med Hypotheses*, 70(3), 540-542.
73. Huang, G. T., 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.
74. Young, C. S., Terada, S., Vacanti, J. P., Honda, M., Bartlett, J. D. ve Yelick, P. C. (2002). Tissue engineering of complex tooth structures on biodegradable polymer scaffolds. *J Dent Res*, 81(10), 695-700.
75. Gronthos, S., Mankani, M., Brahimi, J., Robey, P. G. ve Shi, S. (2000). Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(25), 13625-13630.
76. Sonoyama, W., Liu, Y., Fang, D., Yamaza, T., Seo, B. M., Zhang, C., ve ark. (2006). Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in swine. *PLoS One*, 1, e79.
77. Miura, M., Gronthos, S., Zhao, M., Lu, B., Fisher, L. W., Robey, P. G., ve ark. (2003). SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(10), 5807-5812.
78. Seo, B. M., Miura, M., Gronthos, S., Bartold, P. M., Batouli, S., Brahimi, J., ve ark. (2004). Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet*, 364(9429), 149-155.
79. Sonoyama, W., Liu, Y., Yamaza, T., Tuan, R. S., Wang, S., Shi, S., ve ark. (2008). Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: a pilot study. *J Endod*, 34(2), 166-171.
80. Brar, G. ve Toor, R. (2012). Dental stem cells: Dentinogenic, osteogenic, and neurogenic differentiation and its clinical cell based therapies. *Indian Journal of Dental Research*, 23(3), 393-397.
81. Estrela, C., Alencar, A. H., Kitten, G. T., Vencio, E. F. ve Gava, E. (2011). Mesenchymal stem cells in the dental tissues: perspectives for tissue regeneration. *Braz Dent J*, 22(2), 91-98.
82. Jung, I. Y., Lee, S. J. ve Hargreaves, K. M. (2008). Biologically based treatment of immature permanent teeth with pulpal necrosis: a case series. *J Endod*, 34(7), 876-887.
83. Cotti, E., Mereu, M. ve Lusso, D. (2008). Regenerative treatment of an immature, traumatized tooth with apical periodontitis: report of a case. *J Endod*, 34(5), 611-616.
84. Thibodeau, B. ve Trope, M. (2007). Pulp revascularization of a necrotic infected immature permanent tooth: case report and review of the literature. *Pediatr Dent*, 29(1), 47-50.
85. Bose, R., Nummikoski, P. ve Hargreaves, K. (2009). A retrospective evaluation of radiographic outcomes in immature teeth with necrotic root canal systems treated with regenerative endodontic procedures. *J Endod*, 35(10), 1343-1349.
86. Lovelace, T. W., Henry, M. A., Hargreaves, K. M. ve Diogenes, A. (2011). Evaluation of the delivery of mesenchymal stem cells into the root canal space of necrotic immature teeth after clinical regenerative endodontic procedure. *J Endod*, 37(2), 133-138.

87. Abe, S., Hamada, K., Miura, M. ve Yamaguchi, S. (2012). Neural crest stem cell property of apical pulp cells derived from human developing tooth. *Cell Biol Int*, 36(10), 927-936.
88. **Langman, J.** (2006). *Langman's medical embryology*. 10 ed. T. Sadler, editör. Philadelphia Lippincott Williams & Wilkins.
89. Sedgley, C. M. ve Botero, T. M. (2012). Dental Stem Cells and Their Sources. *Dental Clinics of North America*, 56(3), 549-561.
90. Nuti, N., Corallo, C., Chan, B. M. F., Ferrari, M. ve Gerami-Naini, B. (2016). Multipotent Differentiation of Human Dental Pulp Stem Cells: a Literature Review. *Stem Cell Reviews and Reports*, 12(5), 511-523.
91. Shi, S. ve Gronthos, S. (2003). Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. *J Bone Miner Res*, 18(4), 696-704.
92. Shiba, H., Fujita, T., Doi, N., Nakamura, S., Nakanishi, K., Takemoto, T., ve ark. (1998). Differential effects of various growth factors and cytokines on the syntheses of DNA, type I collagen, laminin, fibronectin, osteonectin/secreted protein, acidic and rich in cysteine (SPARC), and alkaline phosphatase by human pulp cells in culture. *J Cell Physiol*, 174(2), 194-205.
93. Nakashima, M., Nagasawa, H., Yamada, Y. ve Reddi, A. H. (1994). Regulatory role of transforming growth factor-beta, bone morphogenetic protein-2, and protein-4 on gene expression of extracellular matrix proteins and differentiation of dental pulp cells. *Dev Biol*, 162(1), 18-28.
94. Morsczeck, C., Reichert, T. E., Völlner, F., Gerlach, T. ve Driemel, O. (2007). [The state of the art in human dental stem cell research]. *Mund Kiefer Gesichtschir*, 11(5), 259-266.
95. Krebsbach, P. H. ve Robey, P. G. (2002). Dental and skeletal stem cells: potential cellular therapeutics for craniofacial regeneration. *J Dent Educ*, 66(6), 766-773.
96. Kunimatsu, R., Nakajima, K., Awada, T., Tsuka, Y., Abe, T., Ando, K., ve ark. (2018). Comparative characterization of stem cells from human exfoliated deciduous teeth, dental pulp, and bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 501(1), 193-198.
97. Tsutsui, T. W. (2020). Dental Pulp Stem Cells: Advances to Applications. *Stem Cells Cloning*, 13, 33-42.
98. Zhang, W., Walboomers, X. F., Shi, S., Fan, M. ve Jansen, J. A. (2006). Multilineage differentiation potential of stem cells derived from human dental pulp after cryopreservation. *Tissue Eng*, 12(10), 2813-2823.
99. Zhang, W., Walboomers, X. F., Van Kuppevelt, T. H., Daamen, W. F., Van Damme, P. A., Bian, Z., ve ark. (2008). In vivo evaluation of human dental pulp stem cells differentiated towards multiple lineages. *J Tissue Eng Regen Med*, 2(2-3), 117-125.
100. Papaccio, G., Graziano, A., d'Aquino, R., Graziano, M. F., Pirozzi, G., Menditti, D., ve ark. (2006). Long-term cryopreservation of dental pulp stem cells (SBP-DPSCs) and their differentiated osteoblasts: a cell source for tissue repair. *J Cell Physiol*, 208(2), 319-325.
101. Arthur, A., Rychkov, G., Shi, S., Koblar, S. A. ve Gronthos, S. (2008). Adult human dental pulp stem cells differentiate toward functionally active neurons under appropriate environmental cues. *Stem Cells*, 26(7), 1787-1795.

102. Laino, G., Carinci, F., Graziano, A., d'Aquino, R., Lanza, V., De Rosa, A., ve ark. (2006). In vitro bone production using stem cells derived from human dental pulp. *J Craniofac Surg*, 17(3), 511-515.
103. Laino, G., Graziano, A., d'Aquino, R., Pirozzi, G., Lanza, V., Valiante, S., ve ark. (2006). An approachable human adult stem cell source for hard-tissue engineering. *J Cell Physiol*, 206(3), 693-701.
104. Laino, G., d'Aquino, R., Graziano, A., Lanza, V., Carinci, F., Naro, F., ve ark. (2005). A new population of human adult dental pulp stem cells: a useful source of living autologous fibrous bone tissue (LAB). *J Bone Miner Res*, 20(8), 1394-1402.
105. d'Aquino, R., Graziano, A., Sampaolesi, M., Laino, G., Pirozzi, G., De Rosa, A., ve ark. (2007). Human postnatal dental pulp cells co-differentiate into osteoblasts and endotheliocytes: a pivotal synergy leading to adult bone tissue formation. *Cell Death Differ*, 14(6), 1162-1171.
106. Nakashima, M., Iohara, K. ve Murakami, M. (2013). Dental pulp stem cells and regeneration. *Endodontic Topics*, 28(1), 38-50.
107. Graziano, A., d'Aquino, R., Laino, G. ve Papaccio, G. (2008). Dental pulp stem cells: a promising tool for bone regeneration. *Stem Cell Rev*, 4(1), 21-26.
108. Marković, D., Milošević-Jovčić, N., Petakov, M., Balint, B., Čolić, M., Vukovic, A., ve ark. (2008). Dental pulp stem cells: Potential significance in regenerative medicine. *Stomatološki Glasnik Srbije*, 55.
109. Sun, H. H., Jin, T., Yu, Q. ve Chen, F. M. (2011). Biological approaches toward dental pulp regeneration by tissue engineering. *J Tissue Eng Regen Med*, 5(4), e1-16.
110. Bakhtiar, H., Mazidi, S. A., Mohammadi Asl, S., Ellini, M. R., Moshiri, A., Nekooofar, M. H., ve ark. (2018). The role of stem cell therapy in regeneration of dentine-pulp complex: a systematic review. *Prog Biomater*, 7(4), 249-268.
111. Tirino, V., Paino, F., De Rosa, A. ve Papaccio, G. (2012). Identification, isolation, characterization, and banking of human dental pulp stem cells. *Methods Mol Biol*, 879, 443-463.
112. Raoof, M., Yaghoobi, M. M., Derakhshani, A., Kamal-Abadi, A. M., Ebrahimi, B., Abbasnejad, M., ve ark. (2014). A modified efficient method for dental pulp stem cell isolation. *Dental research journal*, 11(2), 244-250.
113. Hilkens, P., Gervois, P., Fanton, Y., Vanormelingen, J., Martens, W., Struys, T., ve ark. (2013). Effect of isolation methodology on stem cell properties and multilineage differentiation potential of human dental pulp stem cells. *Cell Tissue Res*, 353(1), 65-78.
114. Huang, G. T., Sonoyama, W., Chen, J. ve Park, S. H. (2006). In vitro characterization of human dental pulp cells: various isolation methods and culturing environments. *Cell Tissue Res*, 324(2), 225-236.
115. Karamzadeh, R., Eslaminejad, M. B. ve Aflatoonian, R. (2012). Isolation, characterization and comparative differentiation of human dental pulp stem cells derived from permanent teeth by using two different methods. *J Vis Exp*, (69), 4372.
116. Tomlinson, M. J., Tomlinson, S., Yang, X. B. ve Kirkham, J. (2013). Cell separation: Terminology and practical considerations. *J Tissue Eng*, 4, 2041731412472690.
117. Atari, M., Gil-Recio, C., Fabregat, M., García-Fernández, D., Barajas, M., Carrasco, M. A., ve ark. (2012). Dental pulp of the third molar: a new source of pluripotent-like stem cells. *J Cell Sci*, 125(Pt 14), 3343-3356.

118. Akpınar, G., Kasap, M., Aksoy, A., Duruksu, G., Gacar, G. ve Karaoz, E. (2014). Phenotypic and proteomic characteristics of human dental pulp derived mesenchymal stem cells from a natal, an exfoliated deciduous, and an impacted third molar tooth. *Stem Cells Int*, 2014, 457059.
119. Prescott, R. S., Alsanea, R., Fayad, M. I., Johnson, B. R., Wenckus, C. S., Hao, J., ve ark. (2008). In vivo generation of dental pulp-like tissue by using dental pulp stem cells, a collagen scaffold, and dentin matrix protein 1 after subcutaneous transplantation in mice. *J Endod*, 34(4), 421-426.
120. Langer, R. ve Tirrell, D. A. (2004). Designing materials for biology and medicine. *Nature*, 428(6982), 487-492.
121. **Hargreaves, K. M. ve Berman, L. H.** (2015). *Cohen's pathways of the pulp expert consult*. Elsevier Health Sciences.
122. Muschler, G. F., Nakamoto, C. ve Griffith, L. G. (2004). Engineering principles of clinical cell-based tissue engineering. *J Bone Joint Surg Am*, 86(7), 1541-1558.
123. Chandra, A., Yadav, R. ve Yadav, S. (2016). Scaffold based Regenerative Endodontics: Present & future. *Saudi Journal of Oral and Dental Research*, 1, 2518-1297.
124. Raddall, G., Mello, I. ve Leung, B. M. (2019). Biomaterials and Scaffold Design Strategies for Regenerative Endodontic Therapy. *Front Bioeng Biotechnol*, 7, 317-317.
125. Pastor, A. ve Pilar, M., Year editör^editörler. New scaffolding materials for the regeneration of infarcted myocardium2015 Published.
126. Sureshchandra B, R. M.-. (2013). Regeneration of dental pulp: A myth or hype. *. Endodontology*, 13, 139-154.
127. Abou Neel EA, C. W., Salih VM, Kim HW, Knowles JC. . ( 2014). Tissue engineering in dentistry. *. J Dent*, 915-928.
128. **Hargreaves KM, L. A. R. e. I. H. K., Cohen S, editors. Cohen's Pathways of the Pulp. 10th ed. St. Louis, Mo.: Mosby Elsevier; 2011. p. 602-19.**
129. Kim, B. S. ve Mooney, D. J. (1998). Development of biocompatible synthetic extracellular matrices for tissue engineering. *Trends Biotechnol*, 16(5), 224-230.
130. Laurencin, C. T., Jiang, T., Kumbar, S. G. ve Nair, L. S. (2008). Biologically active chitosan systems for tissue engineering and regenerative medicine. *Current topics in medicinal chemistry*, 8(4), 354-364.
131. **American Association of Endodontics. Clinical considerations for a regenerative procedure. Available at: [www.aae.org](http://www.aae.org). Accessed May 4, 2014.**
132. Cehreli, Z. C., Isbitiren, B., Sara, S. ve Erbas, G. (2011). Regenerative endodontic treatment (revascularization) of immature necrotic molars medicated with calcium hydroxide: a case series. *J Endod*, 37(9), 1327-1330.
133. Thomson, A. ve Kahler, B. (2010). Regenerative endodontics--biologically-based treatment for immature permanent teeth: a case report and review of the literature. *Aust Dent J*, 55(4), 446-452.
134. Skoglund, A., Tronstad, L. ve Wallenius, K. (1978). A microangiographic study of vascular changes in replanted and autotransplanted teeth of young dogs. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 45(1), 17-28.
135. Dissanayaka, W. L. ve Zhang, C. (2020). Scaffold-based and Scaffold-free Strategies in Dental Pulp Regeneration. *Journal of Endodontics*, 46(9, Supplement), S81-S89.

136. Bezgin, T., Yilmaz, A. D., Celik, B. N., Kolsuz, M. E. ve Sonmez, H. (2015). Efficacy of platelet-rich plasma as a scaffold in regenerative endodontic treatment. *J Endod*, 41(1), 36-44.
137. Lv, H., Chen, Y., Cai, Z., Lei, L., Zhang, M., Zhou, R., ve ark. (2018). The efficacy of platelet-rich fibrin as a scaffold in regenerative endodontic treatment: a retrospective controlled cohort study. *BMC Oral Health*, 18(1), 139.
138. Philips, J. L., Weller, R. N. ve Kulild, J. C. (1992). The mental foramen: Part II. Radiographic position in relation to the mandibular second premolar. *Journal of Endodontics*, 18(6), 271-274.
139. Denio, D., Torabinejad, M. ve Bakland, L. K. (1992). Anatomical relationship of the mandibular canal to its surrounding structures in mature mandibles. *J Endod*, 18(4), 161-165.
140. Ding, R. Y., Cheung, G. S., Chen, J., Yin, X. Z., Wang, Q. Q. ve Zhang, C. F. (2009). Pulp revascularization of immature teeth with apical periodontitis: a clinical study. *J Endod*, 35(5), 745-749.
141. Thibodeau, B., Teixeira, F., Yamauchi, M., Caplan, D. J. ve Trope, M. (2007). Pulp revascularization of immature dog teeth with apical periodontitis. *J Endod*, 33(6), 680-689.
142. Gawaz, M. ve Vogel, S. (2013). Platelets in tissue repair: control of apoptosis and interactions with regenerative cells. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 122(15), 2550-2554.
143. Ehrenfest, D. M. D., Rasmusson, L. ve Albrektsson, T. (2009). Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Trends in biotechnology*, 27(3), 158-167.
144. Anitua, E., Nurden, P., Prado, R., Nurden, A. T. ve Padilla, S. (2019). Autologous fibrin scaffolds: When platelet- and plasma-derived biomolecules meet fibrin. *Biomaterials*, 192, 440-460.
145. Qiao, J., An, N. ve Ouyang, X. (2017). Quantification of growth factors in different platelet concentrates. *Platelets*, 28(8), 774-778.
146. Marx, R. E., Carlson, E. R., Eichstaedt, R. M., Schimmele, S. R., Strauss, J. E. ve Georgeff, K. R. (1998). Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 85(6), 638-646.
147. Freymiller, E. G. ve Aghaloo, T. L. (2004). Platelet-rich plasma: ready or not? *J Oral Maxillofac Surg*, 62(4), 484-488.
148. **Nikolidakis D, J. J.** (2008). The Biology of Platelet-Rich Plasma and Its Application in Oral Surgery: Literature Review. *Tissue Engineering Part B: Reviews* Cilt 14, ss. 249-258).
149. Osathanon, T., Nowwarote, N. ve Pavasant, P. (2011). Basic fibroblast growth factor inhibits mineralization but induces neuronal differentiation by human dental pulp stem cells through a FGFR and PLC $\gamma$  signaling pathway. *J Cell Biochem*, 112(7), 1807-1816.
150. Alsousou, J., Ali, A., Willett, K. ve Harrison, P. (2013). The role of platelet-rich plasma in tissue regeneration. *Platelets*, 24(3), 173-182.
151. Hargreaves, K. M., Giesler, T., Henry, M. ve Wang, Y. (2008). Regeneration potential of the young permanent tooth: what does the future hold? *J Endod*, 34(7 Suppl), S51-56.

152. Torabinejad, M. ve Turman, M. (2011). Revitalization of tooth with necrotic pulp and open apex by using platelet-rich plasma: a case report. *J Endod*, 37(2), 265-268.
153. Bezgin, T., Yılmaz, A. D., Çelik, B. N. ve Sönmez, H. (2014). Concentrated platelet-rich plasma used in root canal revascularization: 2 case reports. *International Endodontic Journal*, 47(1), 41-49.
154. Lee, U.-L., Jeon, S. H., Park, J.-Y. ve Choung, P.-H. (2011). Effect of platelet-rich plasma on dental stem cells derived from human impacted third molars. *Regenerative Medicine*, 6(1), 67-79.
155. Fijnheer, R., Pietersz, R. N., de Korte, D., Gouwerok, C. W., Dekker, W. J., Reesink, H. W., ve ark. (1990). Platelet activation during preparation of platelet concentrates: a comparison of the platelet-rich plasma and the buffy coat methods. *Transfusion*, 30(7), 634-638.
156. Marx, R. E. (2004). Platelet-rich plasma: evidence to support its use. *J Oral Maxillofac Surg*, 62(4), 489-496.
157. Marx, R. E., Carlson, E. R., Eichstaedt, R. M., Schimmele, S. R., Strauss, J. E. ve Georgeff, K. R. (1998). Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics*, 85(6), 638-646.
158. Meheux, C. J., McCulloch, P. C., Lintner, D. M., Varner, K. E. ve Harris, J. D. (2016). Efficacy of Intra-articular Platelet-Rich Plasma Injections in Knee Osteoarthritis: A Systematic Review. *Arthroscopy*, 32(3), 495-505.
159. Raghoobar, G. M., Schortinghuis, J., Liem, R. S. B., Ruben, J. L., Van Der Wal, J. E. ve Vissink, A. (2005). Does platelet-rich plasma promote remodeling of autologous bone grafts used for augmentation of the maxillary sinus floor? *Clinical Oral Implants Research*, 16(3), 349-356.
160. Choukroun, J., Adda, F., Schoeffler, C. ve Vervelle, A. (2001). Une opportunité en paro-implantologie: le PRF.
161. Choukroun, J., Adda, F., Schoeffler, C. ve Vervelle, A., Year editör^editörler. Une opportunité en paro-implantologie: Le PRF2001 Published.
162. Kobayashi, E., Flückiger, L., Fujioka-Kobayashi, M., Sawada, K., Sculean, A., Schaller, B., ve ark. (2016). Comparative release of growth factors from PRP, PRF, and advanced-PRF. *Clin Oral Investig*, 20(9), 2353-2360.
163. Dohan Ehrenfest, D. M., de Peppo, G. M., Doglioli, P. ve Sammartino, G. (2009). Slow release of growth factors and thrombospondin-1 in Choukroun's platelet-rich fibrin (PRF): a gold standard to achieve for all surgical platelet concentrates technologies. *Growth Factors*, 27(1), 63-69.
164. He, L., Lin, Y., Hu, X., Zhang, Y. ve Wu, H. (2009). A comparative study of platelet-rich fibrin (PRF) and platelet-rich plasma (PRP) on the effect of proliferation and differentiation of rat osteoblasts in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 108(5), 707-713.
165. Dohan, D. M., Choukroun, J., Diss, A., Dohan, S. L., Dohan, A. J., Mouhyi, J., ve ark. (2006). Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part III: leucocyte activation: a new feature for platelet concentrates? *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 101(3), e51-55.
166. Dohan, D. M., Choukroun, J., Diss, A., Dohan, S. L., Dohan, A. J., Mouhyi, J., ve ark. (2006). Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part I: technological concepts and evolution. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 101(3), e37-44.

167. Shah, R., M, G. T., Thomas, R. ve Mehta, D. S. (2017). An Update on the Protocols and Biologic Actions of Platelet Rich Fibrin in Dentistry. *Eur J Prosthodont Restor Dent*, 25(2), 64-72.
168. **García-Alonso A, S. Y.** (2011). *Platelet Proteomics: Principles, Analysis, and Applications*. New Jersey: John Wiley & Sons
169. Keswani, D. ve Pandey, R. K. (2013). Revascularization of an immature tooth with a necrotic pulp using platelet-rich fibrin: a case report. *Int Endod J*, 46(11), 1096-1104.
170. Bakhtiar, H., Esmaeili, S., Fakhr Tabatabayi, S., Ellini, M. R., Nekoofar, M. H. ve Dummer, P. M. (2017). Second-generation Platelet Concentrate (Platelet-rich Fibrin) as a Scaffold in Regenerative Endodontics: A Case Series. *J Endod*, 43(3), 401-408.
171. Chen, Y. J., Zhao, Y. H., Zhao, Y. J., Liu, N. X., Lv, X., Li, Q., ve ark. (2015). Potential dental pulp revascularization and odonto-/osteogenic capacity of a novel transplant combined with dental pulp stem cells and platelet-rich fibrin. *Cell Tissue Res*, 361(2), 439-455.
172. Hong, S., Chen, W. ve Jiang, B. (2018). A Comparative Evaluation of Concentrated Growth Factor and Platelet-rich Fibrin on the Proliferation, Migration, and Differentiation of Human Stem Cells of the Apical Papilla. *Journal of Endodontics*, 44(6), 977-983.
173. Huang, F. M., Yang, S. F., Zhao, J. H. ve Chang, Y. C. (2010). Platelet-rich fibrin increases proliferation and differentiation of human dental pulp cells. *J Endod*, 36(10), 1628-1632.
174. Dohan Ehrenfest, D. M., Doglioli, P., de Peppo, G. M., Del Corso, M. ve Charrier, J.-B. (2010). Choukroun's platelet-rich fibrin (PRF) stimulates in vitro proliferation and differentiation of human oral bone mesenchymal stem cell in a dose-dependent way. *Archives of Oral Biology*, 55(3), 185-194.
175. Zhao, Y.-H., Zhang, M., Liu, N.-X., Lv, X., Zhang, J., Chen, F.-M., ve ark. (2013). The combined use of cell sheet fragments of periodontal ligament stem cells and platelet-rich fibrin granules for avulsed tooth reimplantation. *Biomaterials*, 34(22), 5506-5520.
176. Fujioka-Kobayashi, M., Miron, R. J., Hernandez, M., Kandalam, U., Zhang, Y. ve Choukroun, J. (2017). Optimized Platelet-Rich Fibrin With the Low-Speed Concept: Growth Factor Release, Biocompatibility, and Cellular Response. *J Periodontol*, 88(1), 112-121.
177. Ghanaati, S., Booms, P., Orlowska, A., Kubesch, A., Lorenz, J., Rutkowski, J., ve ark. (2014). Advanced Platelet-Rich Fibrin: A New Concept for Cell-Based Tissue Engineering by Means of Inflammatory Cells. *Journal of Oral Implantology*, 40(6), 679-689.
178. Kim, T. H., Kim, S. H., Sándor, G. K. ve Kim, Y. D. (2014). Comparison of platelet-rich plasma (PRP), platelet-rich fibrin (PRF), and concentrated growth factor (CGF) in rabbit-skull defect healing. *Arch Oral Biol*, 59(5), 550-558.
179. Wang, X., Zhang, Y., Choukroun, J., Ghanaati, S. ve Miron, R. J. (2017). Behavior of Gingival Fibroblasts on Titanium Implant Surfaces in Combination with either Injectable-PRF or PRP. *Int J Mol Sci*, 18(2).
180. Gasparro, R., Adamo, D., Masucci, M., Sammartino, G. ve Mignogna, M. D. (2019). Use of injectable platelet-rich fibrin in the treatment of plasma cell mucositis of the oral cavity refractory to corticosteroid therapy: A case report. *Dermatol Ther*, 32(5), e13062.

181. Choukroun, J. ve Ghanaati, S. (2018). Reduction of relative centrifugation force within injectable platelet-rich-fibrin (PRF) concentrates advances patients' own inflammatory cells, platelets and growth factors: the first introduction to the low speed centrifugation concept. *Eur J Trauma Emerg Surg*, 44(1), 87-95.
182. Albilia J Dmd, M., Herrera-Vizcaino, C. D., Weisleder, H. B., Choukroun, J. M. ve Ghanaati S Md, D. M. D. P. (2020). Liquid platelet-rich fibrin injections as a treatment adjunct for painful temporomandibular joints: preliminary results. *Cranio*, 38(5), 292-304.
183. Varela, H. A., Souza, J. C. M., Nascimento, R. M., Araujo, R. F., Jr., Vasconcelos, R. C., Cavalcante, R. S., ve ark. (2019). Injectable platelet rich fibrin: cell content, morphological, and protein characterization. *Clin Oral Investig*, 23(3), 1309-1318.
184. Abd El Raouf, M., Wang, X., Miusi, S., Chai, J., Mohamed AbdEl-Aal, A. B., Nefissa Helmy, M. M., ve ark. (2019). Injectable-platelet rich fibrin using the low speed centrifugation concept improves cartilage regeneration when compared to platelet-rich plasma. *Platelets*, 30(2), 213-221.
185. Bielecki, T., Dohan Ehrenfest, D. M., Everts, P. A. ve Wiczowski, A. (2012). The role of leukocytes from L-PRP/L-PRF in wound healing and immune defense: new perspectives. *Curr Pharm Biotechnol*, 13(7), 1153-1162.
186. Liang, Y., Ma, R., Chen, L., Dai, X., Zuo, S., Jiang, W., ve ark. (2021). Efficacy of i-PRF in regenerative endodontics therapy for mature permanent teeth with pulp necrosis: study protocol for a multicentre randomised controlled trial. *Trials*, 22(1), 436.
187. Franz, S., Rammelt, S., Scharnweber, D. ve Simon, J. C. (2011). Immune responses to implants - a review of the implications for the design of immunomodulatory biomaterials. *Biomaterials*, 32(28), 6692-6709.
188. Zhang, J., Yin, C., Zhao, Q., Zhao, Z., Wang, J., Miron, R. J., ve ark. (2020). Anti-inflammation effects of injectable platelet-rich fibrin via macrophages and dendritic cells. *J Biomed Mater Res A*, 108(1), 61-68.
189. Wang, X., Zhang, Y., Choukroun, J., Ghanaati, S. ve Miron, R. J. (2018). Effects of an injectable platelet-rich fibrin on osteoblast behavior and bone tissue formation in comparison to platelet-rich plasma. *Platelets*, 29(1), 48-55.
190. Amaral Valladão, C. A., Jr., Freitas Monteiro, M. ve Joly, J. C. (2020). Guided bone regeneration in staged vertical and horizontal bone augmentation using platelet-rich fibrin associated with bone grafts: a retrospective clinical study. *Int J Implant Dent*, 6(1), 72.
191. Mourao, C. F., Valiense, H., Melo, E. R., Mourao, N. B. ve Maia, M. D. (2015). Obtention of injectable platelets rich-fibrin (i-PRF) and its polymerization with bone graft: technical note. *Rev Col Bras Cir*, 42(6), 421-423.
192. Ucak Turer, O., Ozcan, M., Alkaya, B., Surmeli, S., Seydaoglu, G. ve Haytac, M. C. (2020). Clinical evaluation of injectable platelet-rich fibrin with connective tissue graft for the treatment of deep gingival recession defects: A controlled randomized clinical trial. *J Clin Periodontol*, 47(1), 72-80.
193. Borel, J. P. ve Maquart, F. X. (1998). [Molecular mechanisms of wound scarring]. *Ann Biol Clin (Paris)*, 56(1), 11-19.
194. **Briggs, M.** Boron Oxides, Boric Acid, and Borates. *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*:
195. Kuru, R. ve Yarat, A. (2017). Boron and a Current Overview of its Effects On Health. *Clinical and Experimental Health Sciences*, 7.

196. Kabu, M. ve Akosman, M. S. (2013). Biological effects of boron. *Rev Environ Contam Toxicol*, 225, 57-75.
197. Demirtaş, A. (2010). Borun İnsan Beslenmesi ve Sağlığına Önemi / Significance of Boron For Human Nutrition and Health. *Journal of the Faculty of Agriculture*, 41.
198. Woods, W. G. (1994). An introduction to boron: history, sources, uses, and chemistry. *Environ Health Perspect*, 102 Suppl 7(Suppl 7), 5-11.
199. **Organization, W. H.** (1996). *Trace elements in human nutrition and health*. World Health Organization.
200. Khaliq, H., Juming, Z. ve Ke-Mei, P. (2018). The Physiological Role of Boron on Health. *Biol Trace Elem Res*, 186(1), 31-51.
201. Hunt, C. ve Nielsen, F. (1981). Interaction Between Boron and Cholecalciferol in the Chick. *Trace Element Metabolism in Man and Animals*.
202. Hunt, C. D. (2012). Dietary boron: progress in establishing essential roles in human physiology. *J Trace Elem Med Biol*, 26(2-3), 157-160.
203. Ricardo, A., Carrigan, M. A., Olcott, A. N. ve Benner, S. A. (2004). Borate minerals stabilize ribose. *Science*, 303(5655), 196.
204. Hakki, S. S., Bozkurt, B. S. ve Hakki, E. E. (2010). Boron regulates mineralized tissue-associated proteins in osteoblasts (MC3T3-E1). *J Trace Elem Med Biol*, 24(4), 243-250.
205. Gallardo-Williams, M. T., Maronpot, R. R., Turner, C. H., Johnson, C. S., Harris, M. W., Jayo, M. J., ve ark. (2003). Effects of boric acid supplementation on bone histomorphometry, metabolism, and biomechanical properties in aged female F-344 rats. *Biol Trace Elem Res*, 93(1-3), 155-170.
206. Nielsen, F. H. (2000). The emergence of boron as nutritionally important throughout the life cycle. *Nutrition*, 16(7-8), 512-514.
207. Benderdour, M., Van Bui, T., Hess, K., Dicko, A., Belleville, F. ve Dousset, B. (2000). Effects of boron derivatives on extracellular matrix formation. *J Trace Elem Med Biol*, 14(3), 168-173.
208. Devirian, T. A. ve Volpe, S. L. (2003). The physiological effects of dietary boron. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 43(2), 219-231.
209. Nielsen, F. H. (2004). Dietary fat composition modifies the effect of boron on bone characteristics and plasma lipids in rats. *Biofactors*, 20(3), 161-171.
210. Doğan, A., Demirci, S., Bayir, Y., Halici, Z., Karakus, E., Aydin, A., ve ark. (2014). Boron containing poly-(lactide-co-glycolide) (PLGA) scaffolds for bone tissue engineering. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 44, 246-253.
211. Nielsen, F. H., Hunt, C. D., Mullen, L. M. ve Hunt, J. R. (1987). Effect of dietary boron on mineral, estrogen, and testosterone metabolism in postmenopausal women. *Faseb j*, 1(5), 394-397.
212. Nielsen, F. H. ve Stoecker, B. J. (2009). Boron and fish oil have different beneficial effects on strength and trabecular microarchitecture of bone. *J Trace Elem Med Biol*, 23(3), 195-203.
213. Gümüşderelioğlu, M., Tunçay, E., Kaynak, G., Demirtaş, T. T., Aydın, S. T. ve Hakki, S. S. (2015). Encapsulated boron as an osteoinductive agent for bone scaffolds. *J Trace Elem Med Biol*, 31, 120-128.
214. **Tunçay, E.** (2013) *Biyomimetik yöntemle bor katkılı doku iskelelerinin geliştirilmesi ve kemik doku mühendisliğindeki etkinliklerinin araştırılması* (Yüksek Lisans). Hacettepe Üniversitesi, Biyomühendislik Anabilim Dalı.
215. Shashikiran, N. D., Subba Reddy, V. V. ve Hiremath, M. C. (2007). Estimation of trace elements in sound and carious enamel of primary and permanent teeth

- by atomic absorption spectrophotometry: an in vitro study. *Indian J Dent Res*, 18(4), 157-162.
216. Haro Durand, L. A., Mesones, R. V., Nielsen, F. H. ve Gorustovich, A. A. (2010). Histomorphometric and microchemical characterization of maturing dental enamel in rats fed a boron-deficient diet. *Biol Trace Elem Res*, 135(1-3), 242-252.
  217. Hakki, S. S., Dundar, N., Kayis, S. A., Hakki, E. E., Hamurcu, M., Kerimoglu, U., ve ark. (2013). Boron enhances strength and alters mineral composition of bone in rabbits fed a high energy diet. *J Trace Elem Med Biol*, 27(2), 148-153.
  218. Hakki, S. S., Malkoc, S., Dundar, N., Kayis, S. A., Hakki, E. E., Hamurcu, M., ve ark. (2015). Dietary boron does not affect tooth strength, micro-hardness, and density, but affects tooth mineral composition and alveolar bone mineral density in rabbits fed a high-energy diet. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 29, 208-215.
  219. Demirer, S., Kara, M. I., Erciyas, K., Ozdemir, H., Ozer, H. ve Ay, S. (2012). Effects of boric acid on experimental periodontitis and alveolar bone loss in rats. *Arch Oral Biol*, 57(1), 60-65.
  220. Ishiyama, M., Tominaga, H., Shiga, M., Sasamoto, K., Ohkura, Y. ve Ueno, K. (1996). A combined assay of cell viability and in vitro cytotoxicity with a highly water-soluble tetrazolium salt, neutral red and crystal violet. *Biol Pharm Bull*, 19(11), 1518-1520.
  221. Galluzzi, L., Aaronson, S. A., Abrams, J., Alnemri, E. S., Andrews, D. W., Baehrecke, E. H., ve ark. (2009). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes. *Cell Death Differ*, 16(8), 1093-1107.
  222. Riss, T. ve Moravec, R. (2006). Cell Proliferation Assays: Improved Homogeneous Methods Used to Measure the Number of Cells in Culture. *Cell Biology, Four-Volume Set*, 1.
  223. Tuncer, S., Demirci, M. (2011). Dental materyallerde biyoyumluluk değerlendirmeleri. *Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi*, 21(2), 141-149.
  224. Schmalz, G. (1997). Concepts in biocompatibility testing of dental restorative materials. *Clin Oral Investig*, 1(4), 154-162.
  225. Yıldırım, Z., Bakır, EP., Bakır, Ş., Aydın, MS. (2017). Diş hekimliğinde biyoyumluluk ve değerlendirme yöntemleri. *Selcuk Dental Journal*, 4, 162-169.
  226. Stoddart, M. J. (2011). Cell viability assays: introduction. *Methods Mol Biol*, 740, 1-6.
  227. **Thangaraj, P.** (2016). Determination of Cytotoxicity. *Pharmacological Assays of Plant-Based Natural Products* ss. 159-161). Cham: Springer International Publishing.
  228. **Craig, R. P., JM.; Sakaguchi, RL.** (2006). *Craig's restorative dental materials*. St. Louis, Mo. : Mosby Elsevier.
  229. Moharamzadeh, K., Brook, I. M. ve Van Noort, R. (2009). Biocompatibility of Resin-based Dental Materials. *Materials (Basel)*, 2(2), 514-548.
  230. Assunção Guimarães, C. ve Linden, R. (2004). Programmed cell deaths. Apoptosis and alternative deathstyles. *Eur J Biochem*, 271(9), 1638-1650.
  231. Cawthon, R. M. (2002). Telomere measurement by quantitative PCR. *Nucleic Acids Res*, 30(10), e47.

232. Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*, 35(4), 495-516.
233. Galluzzi, L., Aaronson, S. A., Abrams, J., Alnemri, E. S., Andrews, D. W., Baehrecke, E. H., ve ark. (2009). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes. *Cell Death Differ*, 16(8), 1093-1107.
234. Tandoğan B, U. N. (2006). Kalsiyum Bağlayıcı Proteinler. *Türk Biyokimya Dergisi*, 31(1), 36-40.
235. Bratton, D. L., Fadok, V. A., Richter, D. A., Kailey, J. M., Guthrie, L. A. ve Henson, P. M. (1997). Appearance of phosphatidylserine on apoptotic cells requires calcium-mediated nonspecific flip-flop and is enhanced by loss of the aminophospholipid translocase. *J Biol Chem*, 272(42), 26159-26165.
236. Gatti, R., Belletti, S., Orlandini, G., Bussolati, O., Dall'Asta, V. ve Gazzola, G. C. (1998). Comparison of annexin V and calcein-AM as early vital markers of apoptosis in adherent cells by confocal laser microscopy. *J Histochem Cytochem*, 46(8), 895-900.
237. Zhang, G., Gurtu, V., Kain, S. R. ve Yan, G. (1997). Early detection of apoptosis using a fluorescent conjugate of annexin V. *Biotechniques*, 23(3), 525-531.
238. Dinçel GÇ, O. K. (2016). Patolojik Apoptozis Ve Tani Yöntemleri. *Gümüşhane Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 5(1), 86-108.
239. Koopman, G., Reutelingsperger, C. P., Kuijten, G. A., Keehnen, R. M., Pals, S. T. ve van Oers, M. H. (1994). Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood*, 84(5), 1415-1420.
240. Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H. ve Reutelingsperger, C. (1995). A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods*, 184(1), 39-51.
241. Martin, S. J., Reutelingsperger, C. P., McGahon, A. J., Rader, J. A., van Schie, R. C., LaFace, D. M., ve ark. (1995). Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J Exp Med*, 182(5), 1545-1556.
242. **Apoptosis Assays.** Aralık 15 2021, <https://mbioscience.com/apoptosis-assays/>
243. Givan, A. L. (2011). Flow cytometry: an introduction. *Methods Mol Biol*, 699, 1-29.
244. Macey, M. G. (1988). Flow cytometry: principles and clinical applications. *Med Lab Sci*, 45(2), 165-173.
245. Ay, C., Cantürk, Z. (2015). Flow sitometrinin mikrobiyoloji alanında kullanımı. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 31(3), 145-151.
246. Kamiloglu, S., Sari, G., Ozdal, T. ve Capanoglu, E. (2020). Guidelines for cell viability assays. *Food Frontiers*, 1(3), 332-349.
247. **Dursun, E.** (2019) *Farklı Bor Çeşitlerinin İnsan Dental Pulpa Kök Hücresi Üzerindeki Sitotoksik Etkisi*  
(Uzmanlık Tezi). Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi.
248. Linde, A. (1985). The extracellular matrix of the dental pulp and dentin. *J Dent Res*, 64 Spec No, 523-529.

249. Nagaveni, N. B., Kumari, K. N., Poornima, P. ve Reddy, V. (2015). Management of an endo-perio lesion in an immature tooth using autologous platelet-rich fibrin: a case report. *J Indian Soc Pedod Prev Dent*, 33(1), 69-73.
250. Aksel, H. ve Serper, A. (2014). Recent considerations in regenerative endodontic treatment approaches. *Journal of Dental Sciences*, 9(3), 207-213.
251. Demarco, F. F., Conde, M. C., Cavalcanti, B. N., Casagrande, L., Sakai, V. T. ve Nör, J. E. (2011). Dental pulp tissue engineering. *Braz Dent J*, 22(1), 3-13.
252. Ballini, A., Boccaccio, A., Saini, R., Van Pham, P. ve Tatullo, M. (2017). Dental-Derived Stem Cells and Their Secretome and Interactions with Bioscaffolds/Biomaterials in Regenerative Medicine: From the In Vitro Research to Translational Applications. *Stem Cells International*, 2017, 6975251.
253. Chamieh, F., Collignon, A.-M., Coyac, B., Lesieur, J., Ribes, S., Sadoine, J., ve ark. (2016). Accelerated craniofacial bone regeneration through dense collagen gel scaffolds seeded with dental pulp stem cells. *Scientific Reports*, 6, 38814.
254. Atalayin, C., Tezel, H., Dagci, T., Yavasoglu, N., Oktem, G. ve Kose, T. (2016). In vivo performance of different scaffolds for dental pulp stem cells induced for odontogenic differentiation. *Brazilian Oral Research*, 30.
255. Zhang, W., Frank Walboomers, X., van Kuppevelt, T. H., Daamen, W. F., Bian, Z. ve Jansen, J. A. (2006). The performance of human dental pulp stem cells on different three-dimensional scaffold materials. *Biomaterials*, 27(33), 5658-5668.
256. Huang, G. T., Yamaza, T., Shea, L. D., Djouad, F., Kuhn, N. Z., Tuan, R. S., ve ark. (2010). Stem/progenitor cell-mediated de novo regeneration of dental pulp with newly deposited continuous layer of dentin in an in vivo model. *Tissue Eng Part A*, 16(2), 605-615.
257. El-Backly, R. M., Massoud, A. G., El-Badry, A. M., Sherif, R. A. ve Marei, M. K. (2008). Regeneration of dentine/pulp-like tissue using a dental pulp stem cell/poly (lactic-co-glycolic) acid scaffold construct in New Zealand white rabbits. *Australian Endodontic Journal*, 34(2), 52-67.
258. Rosa, V., Zhang, Z., Grande, R. ve Nör, J. (2013). Dental pulp tissue engineering in full-length human root canals. *Journal of dental research*, 92(11), 970-975.
259. Seo, M.-S., Hwang, K.-G., Kim, H. ve Baek, S.-H. (2012). Analysis of gene expression during odontogenic differentiation of cultured human dental pulp cells. *Restorative dentistry & endodontics*, 37(3), 142-148.
260. Yu, J., Deng, Z., Shi, J., Zhai, H., Nie, X., Zhuang, H., ve ark. (2006). Differentiation of dental pulp stem cells into regular-shaped dentin-pulp complex induced by tooth germ cell conditioned medium. *Tissue Eng*, 12(11), 3097-3105.
261. Eslaminejad, M. B., Bordbar, S. ve Nazarian, H. (2013). Odontogenic differentiation of dental pulp-derived stem cells on tricalcium phosphate scaffolds. *Journal of Dental Sciences*, 8(3), 306-313.
262. Zhu, X., Wang, Y., Liu, Y., Huang, G. T. ve Zhang, C. (2014). Immunohistochemical and histochemical analysis of newly formed tissues in root canal space transplanted with dental pulp stem cells plus platelet-rich plasma. *J Endod*, 40(10), 1573-1578.
263. Nakashima, M. ve Akamine, A. (2005). The application of tissue engineering to regeneration of pulp and dentin in endodontics. *J Endod*, 31(10), 711-718.

264. Cavalcanti, B. N., Zeitlin, B. D. ve Nör, J. E. (2013). A hydrogel scaffold that maintains viability and supports differentiation of dental pulp stem cells. *Dental Materials*, 29(1), 97-102.
265. Geisler, T. M. (2012). Clinical considerations for regenerative endodontic procedures. *Dent Clin North Am*, 56(3), 603-626.
266. Eppley, B. L., Woodell, J. E. ve Higgins, J. (2004). Platelet quantification and growth factor analysis from platelet-rich plasma: implications for wound healing. *Plast Reconstr Surg*, 114(6), 1502-1508.
267. Fujioka-Kobayashi, M., Katagiri, H., Kono, M., Schaller, B., Zhang, Y., Sculean, A., ve ark. (2020). Improved growth factor delivery and cellular activity using concentrated platelet-rich fibrin (C-PRF) when compared with traditional injectable (i-PRF) protocols. *Clin Oral Investig*, 24(12), 4373-4383.
268. Riaz, A. ve Shah, F. A. (2021). Regenerating the Pulp-Dentine Complex Using Autologous Platelet Concentrates: A Critical Appraisal of the Current Histological Evidence. *Tissue Eng Regen Med*, 18(1), 37-48.
269. Narang, I., Mittal, N. ve Mishra, N. (2015). A comparative evaluation of the blood clot, platelet-rich plasma, and platelet-rich fibrin in regeneration of necrotic immature permanent teeth: A clinical study. *Contemp Clin Dent*, 6(1), 63-68.
270. Ray, H. L., Jr., Marcelino, J., Braga, R., Horwat, R., Lisien, M. ve Khaliq, S. (2016). Long-term follow up of revascularization using platelet-rich fibrin. *Dent Traumatol*, 32(1), 80-84.
271. Aydinyurt, H. S., Sancak, T., Taskin, C., Basbugan, Y. ve Akinci, L. (2021). Effects of injectable platelet-rich fibrin in experimental periodontitis in rats. *Odontology*, 109(2), 422-432.
272. Miron, R. J., Chai, J., Zheng, S., Feng, M., Sculean, A. ve Zhang, Y. (2019). A novel method for evaluating and quantifying cell types in platelet rich fibrin and an introduction to horizontal centrifugation. *J Biomed Mater Res A*, 107(10), 2257-2271.
273. Nageh, M., Ibrahim, L. A., AbuNaeem, F. M. ve Salam, E. (2021). Management of internal inflammatory root resorption using injectable platelet-rich fibrin revascularization technique: a clinical study with cone-beam computed tomography evaluation. *Clin Oral Investig*.
274. Rafiee, A., Memarpour, M., Najibi, Y., Khalvati, B., Kianpour, S. ve Morowvat, M. H. (2020). Antimicrobial Efficacy of a Novel Antibiotic-Eluting Injectable Platelet-Rich Fibrin Scaffold against a Dual-Species Biofilm in an Infected Immature Root Canal Model. *BioMed Research International*, 2020.
275. Iozon, S., Caracostea, G. V., Pall, E., Soritau, O., Manaloiu, I. D., Bulboaca, A. E., ve ark. (2020). Injectable platelet-rich fibrin influences the behavior of gingival mesenchymal stem cells. *Rom J Morphol Embryol*, 61(1), 189-198.
276. Kyyak, S., Blatt, S., Pabst, A., Thiem, D., Al-Nawas, B. ve Kammerer, P. W. (2020). Combination of an allogenic and a xenogenic bone substitute material with injectable platelet-rich fibrin - A comparative in vitro study. *J Biomater Appl*, 35(1), 83-96.
277. Fernandez-Medina, T., Vaquette, C. ve Ivanovski, S. (2019). Systematic Comparison of the Effect of Four Clinical-Grade Platelet Rich Hemoderivatives on Osteoblast Behaviour. *Int J Mol Sci*, 20(24).
278. Thanasisuebwong, P., Kiattavorncharoen, S., Surarit, R., Phruksaniyom, C. ve Ruangsawasdi, N. (2020). Red and Yellow Injectable Platelet-Rich Fibrin Demonstrated Differential Effects on Periodontal Ligament Stem Cell

- Proliferation, Migration, and Osteogenic Differentiation. *International journal of molecular sciences*, 21(14), 5153.
279. Swastiningtyas, S., Margono, A., Asrianti, D., Oktayani, R. ve Yulianto, I. (2020). ANALYSIS OF LYSATE PLATELET-RICH FIBRIN EFFECTS ON HUMAN DENTAL PULP STEM CELL DIFFERENTIATION THROUGH DENTIN SIALOPHOSPHOPROTEIN EXPRESSION. *International Journal of Applied Pharmaceutics*, 34-37.
  280. Penland, J. G. (1994). Dietary Boron, Brain Function, and Cognitive Performance. *Environ Health Perspect*, 102, 65-72.
  281. Naghii, M. R., Mofid, M., Asgari, A. R., Hedayati, M. ve Daneshpour, M.-S. (2011). Comparative effects of daily and weekly boron supplementation on plasma steroid hormones and proinflammatory cytokines. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 25(1), 54-58.
  282. Rowe, R. I. ve Eckhert, C. D. (1999). Boron is required for zebrafish embryogenesis. *J Exp Biol*, 202 (Pt 12), 1649-1654.
  283. Gorustovich, A. A., Steimetz, T., Nielsen, F. H. ve Guglielmotti, M. B. (2008). Histomorphometric Study of Alveolar Bone Healing in Rats Fed a Boron-Deficient Diet. *The Anatomical Record*, 291(4), 441-447.
  284. Demirci, S., Kaya, S., Doğan, A., Kalay, Ş., Altın, N., Yarat, A., ve ark. (2015). Antibacterial and cytotoxic properties of boron-containing dental composite. *TURKISH JOURNAL OF BIOLOGY*, 39, 417-426.
  285. Pham, T. A. V. (2020). In vitro characteristics of human periodontal ligament stem cells incubated with boric acid. *Journal of oral biosciences*, 62(2), 155-161.
  286. Hanks, C. T., Wataha, J. C. ve Sun, Z. (1996). In vitro models of biocompatibility: a review. *Dent Mater*, 12(3), 186-193.
  287. Parmar, A., Ansari, N. A., Parmar, G. ve Krishnakumar, A. (2020). Evaluation of cell viability of Human Dental Pulp Stem Cells in Two dimensional and Three dimensional Fibrin Glue Scaffold. *J Conserv Dent*, 23(5), 479-483.

## EK A

Evrak Tarih ve Sayısı: 27.08.2020-9953



T.C.  
BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ  
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu



Sayı : 71306642-050.05.04-  
Konu : Etik Kurul Kararı

Sayın Uzm. Diş Hekimi Betül Aycan ALİM  
Endodonti Anabilim Dalı Başkanlığı - Uzman Diş Hekimi

19.08.2020 tarihinde yapılan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu toplantısında  
"Trombositten Zengin Fibrin İle Kombine Edilmiş Farklı Doku İskelelerinin Dental Pulpa Kök  
Hücrelerinin Farklılaşması ve Canlılığı Üzerine Etkisinin İncelenmesi" başlıklı başvurunuz  
değerlendirilmiş olup karar yazısı ektedir.  
Bilgilerinize.

**e-imzalıdır**  
Prof.Dr. Özcan KARAMAN  
Başkan

Ek:  
-Karar yazısı (3 sayfa)

27/08/2020 Memur

Merve INCE

Adres: Bezmialem Vakıf Üniversitesi Adnan Menderes Bulvarı (Vatan Caddesi) Fatih / İstanbul  
Telefon: 0 (212) 523 22 88 Faks: 0 (212) 533 23 26  
e-Posta: info@bezmialem.edu.tr Elektronik Ağ: www.bezmialem.edu.tr

Bilgi için: Merve INCE  
Unvanı: Memur

Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

Evrak Tarih ve Sayısı: 22.02.2022-51934



T.C.  
BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ  
Teknoloji Transfer Ofisi  
Etik Kurullar Birimi

Sayı : E-54022451-050.05.04-51934  
Konu : Etik Kurul Kararı - Betül Aycan Uysal

22.02.2022

Sayın Dr. Öğr. Üyesi Betül Aycan UYSAL  
Endodonti Anabilim Dalı Başkanlığı - Doktor Öğretim Üyesi

27.08.2020 - 9953 evrak tarih ve numarasıyla etik kurul onayı alınmış "Trombositten Zengin Fibrin İle Kombine Edilmiş Borik Asidin Dental Pulpa Kök Hücrelerinin Farklılaşması ve Canlılığı Üzerine Etkisinin İncelenmesi" başlıklı projede 01.02.2022 tarihli dilekçeyle çalışmada "Başlık Değişikliği" ve "Çalışma Grubu Değişikliği" talepleri Üniversitemiz Etik Kurullar Birimi'nin 09.02.2022 tarihli, 03 sayılı Klinik Araştırmalar Etik Kurulu toplantısında değerlendirilmiş olup, mevcudun oybirliğiyle onaylanmasına karar verilmiştir.

Gereğini ve bilgilerinizi arz/rica ederim.

Prof.Dr. Özcan KARAMAN  
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başkanı

Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

Doğrulama Kodu :BSN4NVR782 Pin Kodu :21252 Belge Takip Adresi : <https://turkiye.gov.tr/ebd?eK=5394&eD=BSN4NVR782&eS=51934>  
Bezmialem Vakıf Üniversitesi Adnan Menderes Bulvarı (Vatan Caddesi) Bilgi için: Alperen TAĞMAN  
Fatih/İstanbul Unvan: Sekreter  
Telefon No:0 (212) 523 22 88 Faks No:0 (212) 533 23 36  
e-Posta:info@bezmialem.edu.tr İnternet Adresi:www.bezmialem.edu.tr



Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

## EK B

|                                                                                                                                     |                                            |                          |                 |                             |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------|--------------------------|-----------------|-----------------------------|
| <br><b>BEZMİALEM</b><br>VAKIF ÜNİVERSİTESİ<br>1845 | <b>BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU</b> |                          |                 |                             |
|                                                                                                                                     | Doküman Kodu: ÜNV-GOAEK-FRM-002            | Yayın Tarihi: 17.09.2019 | Revizyon No: 01 | Revizyon Tarihi: 19.02.2020 |

### **ÇALIŞMANIN ADI:**

Trombositten zengin fibrin ile kombine edilmiş farklı doku iskelelerinin dental pulpa kök hücrelerinin farklılaşması ve canlılığı üzerine etkisinin incelenmesi.

Aşağıda bilgileri yer almakta olan bir araştırma çalışmasına katılmanız istenmektedir. Çalışmaya katılıp katılmama kararı tamamen size aittir. Katılmak isteyip istemediğinize karar vermeden önce araştırmanın neden yapıldığını, bilgilerinizin nasıl kullanılacağını, çalışmanın neleri içerdiğini, olası yararları ve risklerini ya da rahatsızlık verebilecek yönlerini anlamanız önemlidir. Lütfen aşağıdaki bilgileri dikkatlice okumak için zaman ayırınız. Eğer çalışmaya katılma kararı vererseniz, **Çalışmaya Katılma Onayı Formu'nu** imzalayınız. Çalışmadan herhangi bir zamanda ayrılmakta özgürsünüz. Çalışmaya katıldığınız için size herhangi bir ödeme yapılmayacak ya da sizden herhangi bir maddi katkı/malzeme katkısı istenmeyecektir. Araştırmada kullanılacak tüm malzemeler ve yapılabilecek tüm harcamalar araştırmacı tarafından karşılanacaktır.

### **ÇALIŞMANIN KONUSU VE AMACI**

- Gönüllü katılımcılardan alınan kanın işlenmesi sonrası elde edilen özel yapıdaki bir materyalin kök hücre üzerine etkisini değerlendirmek amaçtır,
- Çalışmaya 2 kişinin alınması planlanmaktadır ve çalışma Bezmialem Vakıf Üniversitesi Endodonti Anabilim Dalında gerçekleştirilecektir.

### **ÇALIŞMA İŞLEMLERİ**

Çalışmamızın basamaklarında araştırmamıza yönelik olarak kullanılması gereken bir kan ürünü eldesi için siz gönüllü katılımcımızdan kan örneği alma işlemi yapılacaktır. Kan alma işlemi rutin prosedürlerde olduğu gibi ilgili hemşire tarafından gerçekleştirilecektir.

### **ÇALIŞMADA YER ALMAMIN YARARLARI NELERDİR?**

Çalışmada yer alarak kan vermeyi kabul etmeniz halinde kanal tedavisine alternatif bir yöntem geliştirmeye yönelik bilimsel bir araştırmaya katkı sağlayacaksınız.

### **BU ÇALIŞMAYA KATILMAMIN MALİYETİ NEDİR?**

Çalışmaya katılmakla parasal yük altına girmeyeceksiniz ve size de herhangi bir ödeme yapılmayacaktır.

### **ÇALIŞMAYA KATILMALI MIYIM?**

Bu çalışmada yer alıp almamak tamamen size bağlıdır. Şu anda bu formu imzalarsanız bile istediğiniz herhangi bir zamanda bir neden göstermeksizin çalışmayı bırakmakta özgürsünüz. Eğer katılmak istemezseniz veya

|                                                                                                                                     |                                            |                          |                 |                             |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------|--------------------------|-----------------|-----------------------------|
| <br><b>BEZMÎÂLEM</b><br>VAKIF ÜNİVERSİTESİ<br>1895 | <b>BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU</b> |                          |                 |                             |
|                                                                                                                                     | Doküman Kodu: ÜNV-GOAEK-FRM-002            | Yayın Tarihi: 17.09.2019 | Revizyon No: 01 | Revizyon Tarihi: 19.02.2020 |

çalışmadan ayrılırsanız, araştırmacı tarafından sizin için en uygun tedavi planı uygulanacaktır. Aynı şekilde çalışmayı yürüten araştırmacı çalışmaya devam etmeniz sizin için yararlı olmayacağına karar verebilir ve sizi çalışma dışı bırakabilir, bu durumda da sizin için en uygun tedavi seçilecektir.

**KİŞİSEL BİLGİLERİM NASIL KULLANILACAK?**

Çalışma araştırmacımız kişisel bilgilerinizi, araştırmayı ve istatistiksel analizleri yürütmek için kullanacaktır ancak kimlik bilgileriniz gizli tutulacaktır. Yalnızca gereği halinde, sizinle ilgili bilgileri etik kurullar ya da resmi makamlar inceleyebilir. Çalışmanın sonunda, kendi sonuçlarınızla ilgili bilgi istemeye hakkınız vardır. Çalışma sonuçları çalışma bitiminde tıbbi literatürde yayınlanabilecektir ancak kimliğiniz açıklanmayacaktır.

**SORU VE PROBLEMLER İÇİN BAŞVURULACAK KİŞİLER:**

ADI : Gözde Kotan

GÖREVİ : Diş hekimi

TELEFON :

**ÇALIŞMAYA KATILMA ONAYI**

Yukarıdaki bilgileri ilgili araştırmacı ile ayrıntılı olarak tartıştım ve kendisi bütün sorularımı cevapladı. Bu bilgilendirilmiş olur belgesini okudum ve anladım. Bu araştırmaya katılmayı kabul ediyorum ve bu onay belgesini kendi hür irademle imzalıyorum. Bu onay, ilgili hiçbir kanun ve yönetmeliği geçersiz kılmaz. Araştırmacı, saklamam için bu belgenin bir kopyasını bana teslim etmiştir.

|                           |  |                      |  |
|---------------------------|--|----------------------|--|
| <b>Gönüllü Adı Soyadı</b> |  | <b>Tarih ve İmza</b> |  |
| <b>Telefon</b>            |  |                      |  |

|                                  |  |                      |  |
|----------------------------------|--|----------------------|--|
| <b>Vasi (var ise) Adı Soyadı</b> |  | <b>Tarih ve İmza</b> |  |
| <b>Telefon</b>                   |  |                      |  |

|                                  |  |                      |  |
|----------------------------------|--|----------------------|--|
| <b>Görüşme Tanığı Adı Soyadı</b> |  | <b>Tarih ve İmza</b> |  |
| <b>Telefon</b>                   |  |                      |  |

|                               |  |                      |  |
|-------------------------------|--|----------------------|--|
| <b>Araştırmacı Adı Soyadı</b> |  | <b>Tarih ve İmza</b> |  |
| <b>Telefon</b>                |  |                      |  |

|                                                                                                                                     |                                            |                          |                 |                             |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------|--------------------------|-----------------|-----------------------------|
| <br><b>BEZMİALEM</b><br>VAKIF ÜNİVERSİTESİ<br>1845 | <b>BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU</b> |                          |                 |                             |
|                                                                                                                                     | Doküman Kodu: ÜNV-GOAEK-FRM-002            | Yayın Tarihi: 17.09.2019 | Revizyon No: 01 | Revizyon Tarihi: 19.02.2020 |

#### **ÇALIŞMANIN ADI:**

Trombositten zengin fibrin ile kombine edilmiş borik asidin dental pulpa kök hücrelerinin farklılaşması ve canlılığı üzerine etkisinin incelenmesi.

Aşağıda bilgileri yer almakta olan bir araştırma çalışmasına katılmanız istenmektedir. Çalışmaya katılıp katılmama kararı tamamen size aittir. Katılmak isteyip istemediğinize karar vermeden önce araştırmanın neden yapıldığını, bilgilerinizin nasıl kullanılacağını, çalışmanın neleri içerdiğini, olası yararları ve risklerini ya da rahatsızlık verebilecek yönlerini anlamanız önemlidir. Lütfen aşağıdaki bilgileri dikkatlice okumak için zaman ayırınız. Eğer çalışmaya katılma kararı vererseniz, **Çalışmaya Katılma Onayı Formu'nu** imzalayınız. Çalışmadan herhangi bir zamanda ayrılmakta özgürsünüz. Çalışmaya katıldığınız için size herhangi bir ödeme yapılmayacak ya da sizden herhangi bir maddi katkı/malzeme katkısı istenmeyecektir. Araştırmada kullanılacak tüm malzemeler ve yapılabilecek tüm harcamalar araştırmacı tarafından karşılanacaktır.

#### **ÇALIŞMANIN KONUSU VE AMACI**

Dişlerin canlılığını kaybedip gelişiminin aksaması durumunda kök kanalı içerisine çeşitli materyaller yerleştirilerek, kök hücreler aracılığı ile yeniden gelişimine devam edebilmesi beklenmektedir. Bu materyallerin geliştirebilmesi için öncelikle laboratuvar çalışmalarında çekilmiş dişler üzerinde test edilmesi gerekmektedir.

Bu çalışmada sizin (18 yaş altında olanlar için, sorumluluğunuz altında olan hastanın) çekilmiş diş kullanılacaktır. Bu dişlerin çekimi sizin rutin tedavinizde planlanmış olup çekim işleminden sonra herhangi bir işleme ihtiyaç olmayacaktır.

- Çalışmaya 4 kişinin alınması planlanmaktadır ve çalışma Bezmialem Vakıf Üniversitesi Endodonti Anabilim Dalı ve Marmara Üniversitesi Çocuk İmmunoloji Laboratuvarında gerçekleştirilecektir.

#### **ÇALIŞMA İŞLEMLERİ**

Diş çekim işlemi rutin prosedürlerde olduğu gibi ilgili diş hekimi tarafından gerçekleştirilecektir ve araştırmamıza yönelik olarak kullanılacaktır.

#### **ÇALIŞMADA YER ALMAMIN YARARLARI NELERDİR?**

Çalışmada yer alarak kan vermeyi kabul etmeniz halinde kanal tedavisine alternatif bir yöntem geliştirmeye yönelik bilimsel bir araştırmaya katkı sağlayacaksınız.

#### **BU ÇALIŞMAYA KATILMAMIN MALİYETİ NEDİR?**

Çalışmaya katılmakla parasal yük altına girmeyeceksiniz ve size de herhangi bir ödeme yapılmayacaktır.

|                                                                                                                                     |                                            |                          |                 |                             |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------|--------------------------|-----------------|-----------------------------|
| <br><b>BEZMİÂLEM</b><br>VAKIF ÜNİVERSİTESİ<br>1845 | <b>BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU</b> |                          |                 |                             |
|                                                                                                                                     | Doküman Kodu: ÜNV-GOAEK-FRM-002            | Yayın Tarihi: 17.09.2019 | Revizyon No: 01 | Revizyon Tarihi: 19.02.2020 |

#### **ÇALIŞMAYA KATILMALI MIYIM?**

Bu çalışmada yer alıp almamak tamamen size bağlıdır. Şu anda bu formu imzalarsanız bile istediğiniz herhangi bir zamanda bir neden göstermeksizin çalışmayı bırakmakta özgürsünüz. Eğer katılmak istemezseniz veya çalışmadan ayrılırsanız, araştırmacı tarafından sizin için en uygun tedavi planı uygulanacaktır. Aynı şekilde çalışmayı yürüten araştırmacı çalışmaya devam etmeniz için yararlı olmayacağına karar verebilir ve sizi çalışma dışı bırakabilir, bu durumda da sizin için en uygun tedavi seçilecektir.

#### **KİŞİSEL BİLGİLERİM NASIL KULLANILACAK?**

Çalışma araştırmacınız kişisel bilgilerinizi, araştırmayı ve istatistiksel analizleri yürütmek için kullanacaktır ancak kimlik bilgileriniz gizli tutulacaktır. Yalnızca gereği halinde, sizinle ilgili bilgileri etik kurullar ya da resmi makamlar inceleyebilir. Çalışmanın sonunda, kendi sonuçlarınızla ilgili bilgi istemeye hakkınız vardır. Çalışma sonuçları çalışma bitiminde tıbbi literatürde yayınlanabilecektir ancak kimliğiniz açıklanmayacaktır.

#### **SORU VE PROBLEMLER İÇİN BAŞVURULACAK KİŞİLER:**

ADI : Gözde Kotan

GÖREVİ : Diş hekimi

TELEFON :

#### **ÇALIŞMAYA KATILMA ONAYI**

Yukarıdaki bilgileri ilgili araştırmacı ile ayrıntılı olarak tartıştım ve kendisi bütün sorularımı cevapladı. Bu bilgilendirilmiş olur belgesini okudum ve anladım. Bu araştırmaya katılmayı kabul ediyorum ve bu onay belgesini kendi hür irademle imzalıyorum. Bu onay, ilgili hiçbir kanun ve yönetmeliği geçersiz kılmaz. Araştırmacı, saklamam için bu belgenin bir kopyasını bana teslim etmiştir.

|                           |  |                      |  |
|---------------------------|--|----------------------|--|
| <b>Gönüllü Adı Soyadı</b> |  | <b>Tarih ve İmza</b> |  |
| <b>Telefon</b>            |  |                      |  |

|                                  |  |                      |  |
|----------------------------------|--|----------------------|--|
| <b>Vasi (var ise) Adı Soyadı</b> |  | <b>Tarih ve İmza</b> |  |
| <b>Telefon</b>                   |  |                      |  |