

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ
PEDODONTİ ANABİLİM DALI
(Ankara Üni. Ortak Doktora Programı)

**ANTİBİYOTİKLİ KANAL PATLARININ APİKAL PAPİLLA
MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİNDE MEYDANA GETİRDİĞİ
DEĞİŞİKLİKLERİN VE ANTİMİKROBİYAL ETKİNLİKLERİNİN
İNCELENMESİ**

Hazırlayan
Seçil ÇALIŞKAN

Danışman
Yrd.Doç.Dr. Mustafa AYDINBELGE
Prof. Dr. Leyla DURUTÜRK

Doktora Tezi

Haziran 2017
KAYSERİ

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ
PEDODONTİ ANABİLİM DALI
(Ankara Üni. Ortak Doktora Programı)

**ANTİBİYOTİKLİ KANAL PATLARININ APİKAL PAPİLLA
MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİNDE MEYDANA GETİRDİĞİ
DEĞİŞİKLİKLERİN VE ANTİMİKROBİYAL ETKİNLİKLERİNİN
İNCELENMESİ**

Hazırlayan
Seçil ÇALIŞKAN

Danışman
Yrd. Doç.Dr. Mustafa AYDINBELGE
Prof. Dr. Leyla DURUTÜRK

Doktora Tezi

Haziran 2017
KAYSERİ

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Adı-Soyadı: Seçil ÇALIŞKAN

İmza:

YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI

“Antibiyotikli Kanal Patlarının Apikal Papilla Mezenkimal Kök Hücrelerinde Meydana Getirdiği Değişikliklerin Ve Antimikrobiyal Etkinliklerinin İncelenmesi” adlı **Doktora Tezi**, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan**Seçil ÇALIŞKAN****Danışman****Yrd. Doç. Dr. Mustafa AYDINBELGE****Pedodonti AD Başkanı****Yrd. Doç. Dr.Salih DOĞAN**

Yrd. Doç. Dr. Mustafa AYDINBELGE danışmanlığında **Seçil ÇALIŞKAN** tarafından hazırlanan “**Antibiyotikli Kanal Patlarının Apikal Papilla Mezenkimal Kök Hücrelerinde Meydana Getirdiği Değişikliklerin Ve Antimikrobiyal Etkinliklerinin İncelenmesi**” adlı bu çalışma, jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimler Enstitüsü **Pedodonti** Anabilim Dalı’ nda **Doktora** tezi olarak kabul edilmiştir.

..... / /

JÜRİ:

Danışman : Yrd. Doç. Dr. Mustafa AYDINBELGE
(Erciyes Üniversitesi Diş Hekimliği Fak. Pedodonti Ad.)

Üye : Doç. Dr. Yakup ÜTÜN
(Erciyes Üniversitesi Diş Hekimliği Fak. Endodonti Ad.)

Üye : Doç. Dr. Mehmet SERTAÇ PEKER
(Marmara Ün. Diş Hekimliği Fak. Pedodonti Ad.)

Üye :Doç. Dr. Ebru KÜÇÜKYILMAZ
(İzmir Katip Çelebi Diş Hekimliği Fak. Pedodonti Ad.)

Üye :Yrd. Doç. Dr. Salih DOĞAN
(Erciyes Üniversitesi Diş Hekimliği Fak. Pedodonti Ad.)

ONAY

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun tarih ve sayılı kararı ile onaylanmıştır.

..... / /

.....

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Doktora tez çalışmam süresince bilgi ve deneyimleri ile bana her konuda destek olan ve yol gösteren, anlayışını ve iyi niyetini hiçbir zaman esirgemeyen, eğitimimin her aşamasında titizlikle ve sabırla bana yardımcı olan, saygıdeğer ve çok değerli abim, hocam ve danışmanım Yrd. Doç. Dr. Mustafa AYDINBELGE ve doktora eğitimimde önemli katkıları olan ikinci danışmanım sayın Prof. Dr. Leyla DURUTÜRK'e en içten duygularımla teşekkürlerimi sunarım.

Doktora eğitimim boyunca birikimlerinden çok şey öğrendiğim, desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen ve yardımcı olan değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Kenan CANTEKİN'e

Çok ideal şartlarda sağladığı düzenli çalışma ortamı ile mesleki eğitimime destek veren ve yol gösteren, sistemli ve disiplinli çalışmanın önemini yaşayarak öğrenmemi sağlayan değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Salih DOĞAN'a

Zorlu doktora eğitimim boyunca tanıştığım andan itibaren desteğini her zaman hissettiğim, bilgi ve tecrübesinden çok şey öğrendiğim ablam ve arkadaşım Mersin Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Pedodonti Anabilim Dalı öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Ebru DELİKAN'a

Tez çalışmamın yönlendirilmesinde fikirlerini ve emeğini esirgemeyen Ağız Diş ve Çene Cerrahisi öğretim üyesi değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Z. Burçin GÖNEN'e

Değerli zamanını ayırarak sınavıma katılma nezaketini gösteren değerli hocalarım Doç. Dr. Yakup ÜSTÜN, Doç. Dr. Ebru KÜÇÜKYILMAZ ve Doç. Dr. Mehmet Sertaç PEKER'e Bölümümüzün değerli ve yardımsever hocaları Yrd. Doç. Dr. Zeynep Aslı GÜÇLÜ ve Yrd. Doç. Dr. Hüsniye GÜMÜŞ'e

Tez çalışmalarımda emeğini ve zamanını esirgemedi benimle beraber çalışan arkadaşım başta Hasan SALKIN olmak üzere, Büşra KURT, Huriye AKSU ve Buket Banu ÖZKAN'a

Eğitim sürecini beraber paylaştığım başta Dt. Ayşe Derya BAYAT, Dt. Zeynep IŞIK ve Dt. Zekiye HİDAYET olmak üzere Erciyes Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Pedodonti Anabilim Dalı'ndaki bütün çalışma arkadaşlarıma

Her zaman yanımda olan ve desteğini esirgemeyen sevgili eşim, biricik kızım ve canım aileme Sonsuz teşekkürlerimle...

Seçil ÇALIŞKAN

Kayseri, Haziran 2017

ANTİBİYOTİKLİ KANAL PATLARININ APİKAL PAPİLLA MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİNDE MEYDANA GETİRDİĞİ DEĞİŞİKLİKLERİN VE ANTİMİKROBİYAL ETKİNLİKLERİNİN İNCELENMESİ

Seçil ÇALIŞKAN

Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Pedodonti Anabilim Dalı

Doktora Tezi, Haziran 2017

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Mustafa AYDINBELGE

Prof. Dr. Leyla DURUTÜRK

ÖZET

Rejeneratif tedaviler, travma, kanser, hastalık ya da konjenital nedenlerle hasara uğramış doku ve organların tekrar oluşumunu hedeflemektedir. Rejeneratif tıp ve doku mühendisliğinin hızlı gelişimi, diş hekimliği alanında da bu uygulamaların sıkça gündeme gelmesini sağlamıştır. Doku mühendisliğinin diş hekimliği alanındaki en önemli hedeflerinden biri de, rejeneratif endodontik prosedürler ile pulpa-dentin kompleksindeki hücrelere ek olarak, dentin ve özellikle apikal olmak üzere tüm kök yapısını içeren zarar görmüş yapıların yenisi ile yer değiştirmesini sağlayan biyolojik temelli yapıların oluşturulmasıdır. Rejeneratif endodontide geliştirilmekte olan yöntemler; kök kanalının revaskülarizasyonu, kök hücre tedavisi, pulpa implantı, iskelet, çatı (scaffold) implantı, enjekte edilebilir scaffold uygulamaları, üç boyutlu hücre yazılımı ve gen terapisi şeklinde sıralanabilir.

Çalışmamızda rejeneratif endodontik prosedürler uygulanırken kök kanalının dezenfeksiyonunda kullanılan üçlü, ikili ve modifiye üçlü antibiyotik patların (TAP, DAP, m TAP) apikal papilla kök hücrelerinde meydana getirdiği değişikliklerin hücre, RNA düzeyinde incelenmesi, antimikrobiyal etkinlikleri ve klinik uygulamalarda kullanımları ile ilgili verilerin elde edilmesi hedeflenmiştir. Hücre düzeyinde değerlendirme yapabilmek amacı ile canlılık, apoptoz ve proliferasyon testleri yapılmıştır. RNA bazında ise osteokalsin, dentin sialo fosfoprotein (DSPP) ve alkalen fosfataz (ALPP) seviyeleri değerlendirilmiştir. Ayrıca antimikrobiyal değerlendirme amacıyla agar difüzyon testi yapılmıştır.

Grupların karşılaştırılmasında bağımsız gruplarda tek yönlü varyans analizi, çoklu karşılaştırma testlerinde ise Tukey testi kullanıldı ($p<0,05$).

Elde edilen veriler ışığında; bu çalışmada, her bir materyal için 14 ve 28 günlük gruplar değerlendirildiğinde hücre canlılık, proliferasyon, erken apoptoz, geç apoptoz ve total apoptoz oranlarındaki değişimlerde anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. Gen ekspresyon düzeyleri değerlendirildiğinde; 14 gün ilaç uygulaması yapılan DAP grubunda, osteokalsin ve DSPP genlerinin ekspresyon düzeylerinde anlamlı yükseliş tespit edilmiştir. Bununla birlikte, 28 gün mTAP uygulaması yapılan grupta yine DSPP geni ekspresyon düzeyinde anlamlı yükseliş tespit edilmiştir. Ayrıca *Enterococcus Faecalis* dışındaki bakterilere karşı olan antimikrobiyal etkinlikte medikamanlar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edilememiştir.

Sonuç olarak, çalışmada kullandığımız medikamanların hiçbiri SCAP (apikal papilla kaynaklı mezenkimal kök hücre) üzerine olumsuz etki göstermemekle birlikte, 0,1 mg/ml konsantrasyonda kullanıldığında osteojenik ve odontojenik farklılaşmaya olumlu katkı sağlamışlardır. Rejeneratif tedavilerde, bahsi geçen antibiyotiklerin belirtilen doz ve uygulama sürelerine dikkat edilerek kullanımı uygun bulunmuştur.

Çalışmamızda ulaştığımız veriler, günümüzde rejeneratif endodontik uygulamalarda kullanılan çeşitli antibiyotik kombinasyonlarının sitotoksikite ve antimikrobiyal etkilerinin incelenmesine önemli katkılar sağlamakla birlikte, çalışmamızdan önce hiçbir çalışmada gen ekspresyon analizlerinin yapılmadığı gerçeği göz önünde bulundurularak, bu alanda *ex-vivo* ve *in-vivo* koşullarda yapılacak iyi planlanmış, kapsamlı çalışmalara ihtiyaç olduğu düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: Antibiyotikli pat, antimikrobiyal etki, apikal papilla mezenkimal kök hücresi, gen ekspresyonu, rejeneratif endodontik tedavi

**EVALUATION OF THE ANTIMICROBIAL EFFICIENCY AND EFFECTS OF
ANTIBIOTIC INCLUDED ROOT CANAL PASTES ON THE MESENCHYMAL
STEM CELLS FROM APICAL PAPILLA**

Seçil ÇALIŞKAN

Erciyes University, Institute of Health Sciences

Department of Pediatric Dentistry

PHD Thesis, June 2017

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Mustafa AYDINBELGE

Prof. Dr. Leyla DURUTÜRK

ABSTRACT

Regenerative therapies aim at recreating the tissues and organs that have been damaged by trauma, cancer disease or congenital causes. The incredible development of the regenerative medicine and tissue engineering have been brought bring on the areaa in dentistry. One of the most important goal of tissue engineering in dentistry is the creation of biologically based structures that allow replacement of the damaged tissues with dentin and whole root structure, especially in apical region. Recently developing methods for regenerative endodontics are root canal revascularization, stem cell therapy, pulp implants, scaffold implants, injectable scaffold applications, three dimensional cell software and gene therapy.

In this study, the aim was to evaluate the antimicrobial effects, use of clinical applications and the changes on apical papilla stem cells viability, apoptosis, proliferation and gene expression at RNA level with the application of triple double and modified triple antibiotic pastes(TAP, DAP, mTAP) during regenerative endodontic procedures are applied. To be able to evaluate at cellular level viability, proliferation, and apoptosis tests were applied. Osteocalcin, dentin sialo phosphoprotein (DSPP) and alkaline phosphatase (ALPP) levels were evaluated on the RNA side. In addition, agar diffusion test was performed for antimicrobial evaluation.

One-way analysis of variance was used for independent groups in the comparison of the groups, and Tukey test was used in multiple comparison tests ($p < 0.05$).

According to the obtained data in this study; no significant difference was observed about changes in cell viability, proliferation, early apoptosis, late apoptosis and total apoptosis rates for each material at 14 and 28 day groups. Evaluation of gene expression

levels showed a significant increase in the expression levels of osteocalcin and DSPP genes in the DAP group at 14 days of drug administration. However, a significant increase in the DSPP gene expression level was also observed in the 28 day mTAP administration group. Furthermore, no statistically significant difference found between medicaments in antimicrobial efficacy against bacteria except *Enterococcus faecalis*.

In conclusion, none of the medicaments in our study have a negative effect on SCAP, however all groups have positive contribution on osteogenic and odontogenic differentiation when used at a concentration of 0.1 mg / ml. It has been identified that, in regenerative therapies, the mentioned antibiotics are suitable for use within the range of the stated doses and application times.

The data that we received in our study provide important contributions to the examination of the cytotoxicity and antimicrobial effects of various antibiotic combinations which are still using in regenerative endodontic applications,

Considering the fact that no gene expression analyzes have been performed before our study, there is a requirement for well-planned, *ex-vivo* and *in-vivo* comprehensive studies on this field.

Key Words: Antibiotic Pat, Antimicrobial Effect, Stem Cells From Apical Papilla, Gene Expression, Regenerative Endodontic

İÇİNDEKİLER

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK	i
YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI.....	ii
ONAY	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
ÖZET	v
ABSTRACT.....	vii
İÇİNDEKİLER	ix
KISALTMALAR ve SİMGELER	xiii
TABLolar LİSTESİ.....	xv
ŞEKİLLER LİSTESİ	xvi
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. KÖK HÜCRE.....	3
2.2. KÖK HÜCRE TİPLERİ-KAYNAKLARI.....	8
2.2.1. Embriyonik Kök Hücreler	8
2.2.2. Embriyonik Olmayan Hücreler	8
2.2.2.1. Erişkin (somatik) kök hücreler;	8
2.2.2.2. Hematopoetik kök hücreler;	8
2.2.2.3. Kordon kanı kök hücreleri;	9
2.2.2.4. Mezenkimal kök hücreler (MKH);	9
2.2.3. Organlardaki Kök Hücreler	10
2.2.3.1. Adiposit kök hücresi;	10
2.2.3.2. Kalp kası kök hücresi	10
2.2.3.3. Nöronal kök hücre.....	11

2.2.3.4. Epidermal kök hücre;	11
2.2.3.5. Sindirim sistemi epitel kök hücresi;.....	11
2.2.4. Dental Kaynaklı Kök Hücreler	11
2.2.4.1. Daimi dişlerin pulpasından elde edilen kök hücreler ...	14
2.2.4.2. Süt dişlerinden elde edilen kök hücreler.....	15
2.2.4.3. Dental folikül kaynaklı kök hücreler	16
2.2.4.4. Periodontal ligament kaynaklı kök hücreler	16
2.2.4.5. Apikal papilla kaynaklı kök hücreler.....	17
2.2.4.6. Maksiller tüber bölgesinde periost kaynaklı kök hücreler.....	18
2.2.5. Dental Pulpa Kök Hücre İzolasyonu ve Karakterizasyonu	19
2.2.6. Dental Pulpa Kök Hücrelerinin Farklılaşması ve Sinyal Molekülleri.....	21
2.3. KÖK HÜCRELERİN ELDESİ	22
2.4. KÖK HÜCRELERİN KULLANIM ALANLARI	23
2.5. KÖK HÜCRENİN DİŞ HEKİMLİĞİ UYGULAMA ALANLARI VE GELECEKTEN BEKLENTİLERİ	24
2.6. REJENERATİF ENDODONTİK UYGULAMALAR	26
2.6.1. Kök Kanalının Revaskülarizasyonu	26
2.6.2. Revaskülarizasyon Uygulama Yöntemi	29
2.6.3. Kök Kanallarının Revaskülarizasyonunda Kullanılan Kanal İçi Medikamanlar	31
2.6.3.1. Antibiyotik Karışımı	31
2.6.3.2. Kalsiyum Hidroksit.....	32
2.6.3.3. Mineral Trioksit Agregat	33
2.6.3.3.1. MTA'nın Klinik Uygulama Tekniği ve Uygulama Alanları	35
2.6.3.4. Portland Siman.....	38

2.6.3.5. Klorheksidin Glukonat.....	38
2.6.4. Erişkin (Postnatal) Kök Hücre Tedavisi.....	39
2.6.5. Pulpa İmplantasyonu	39
2.6.6. Scaffold İmplantasyonu.....	39
2.6.7. Enjekte Edilebilen Scaffold	40
2.6.8. Üç Boyutlu Hücre Yazılımı.....	40
2.6.9. Gen Tedavisi.....	40
3.GEREÇ VE YÖNTEM	43
3.1.HÜCRELERİN ELDESİ VE PRİMER HÜCRE KÜLTÜRÜ	43
3.2.İNSAN APİKAL PAPİLLA MKH KARAKTERİZASYONU	44
3.2.1.Akım Sitometri	44
3.3.DENTİN KESİTLERİNİN HAZIRLANMASI	45
3.4.ÇALIŞMA GRUPLARI.....	46
3.5.İRRİGASYON PROTOKOLÜ VE MEDİKAMAN UYGULAMASI	46
3.6.1.Apikal Papilla Mezenkimal Kök Hücre Sisteminin Oluşturulması.....	49
3.6.2.Yapılan Analizler Listesi	50
3.7.HÜCRE CANLILIK ANALİZİ	50
3.8.HÜCRE APOPTOZ ANALİZİ	51
3.9.HÜCRE PROLİFERASYON ANALİZİ	51
3.10.HÜCRE FARKLILAŞMA ANALİZLERİ	52
3.10.1.RNA İzolasyonu:	52
3.10.3.Ekspresyon aşaması.....	56
3.11.ANTİMİKROBİYAL ANALİZ	59
3.11.1.Çalışmada Kullanılan Mikroorganizmalar	59
3.11.2.Liyofilize Haldeki Standart Mikroorganizmaların Üretilmesi ...	59
3.11.3.Deney Materyallerinin Hazırlanması	60

3.12.İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME	64
4.BULGULAR.....	65
4.1. İNSAN APİKAL PAPİLLA KAYNAKLI MEZENKİMAL KÖK HÜCRE İZOLASYONU VE KARAKTERİZASYONU	65
4.2. AKIM SİTOMETRİ.....	66
4.3.CANLILIK, APOPTOZ VE MTT TESTİ BULGULARI	71
4.4.GEN EKSPRESYON BULGULARI.....	75
4.5.ANTİMİKROBİYAL ETKİNLİK BULGULARI	78
5.TARTIŞMA ve SONUÇ	79
6. KAYNAKLAR	90
EKLER	
ÖZ GEÇMİŞ	

KISALTMALAR ve SİMGELER

PRP	: Platelet Rich Plasma (Trombositten Zengin Plazma)
rhBMP	: Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein (Rekombinant İnsan Kemik Morfogenik Proteini)
IPS	: Induced Pluripotent Stem Cells (Uyarılmış Progenitör Kök Hücre)
BMP	: Human Bone Morphogenetic Protein (Kemik Morfogenetik Protein)
MKH	: Mezenkimal Kök Hücreler
DPSCs	: Dental Pulp Stem Cells (Daimi Dişlerin Pulpasından Elde Edilen Kök Hücreler)
SHED	: Süt Dişlerinden Elde Edilen Kök Hücreler (Stem Cells From Human Exfoliated Deciduous Teeth)
PDLSCs	: Periodontal Ligament (PDL) Kaynaklı Kök Hücreler (Periodontal Ligament Stem Cells)
SCAP	: Apikal Papilla Kaynaklı Kök Hücreler (Stem Cell From Apical Papilla)
Runx2	: Runt-İlişkili Transkripsiyon Faktörü-2
MEPE	: Ekstrasellüler fosfoglikoprotein
BSP	: Bone sialoprotein (Kemik Sialoprotein)
DSPP	: Dentin Siyalofosfoprotein
FACS	: Floresan Aktif Hücre Ayrılması
TGF-B	: Transforming Growth Factor Beta
VEGF	: Vascular Endothelial Growth Factor (Vaskular Endotelyal Büyüme Faktörü)
PBS	: Phosphate-buffered Saline (Fosfat Tamponlu Serum)
FBS	: Fetal Bovine Serum (Fetal Sığır Serum)
CO ₂	: Karbondioksit

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle's Medium

MTA : Mineral Trioksit Agregat

BSA : Bovine Serum Albumin

EDTA : Etilendiamin Tetraasetik Asit

NaOCl : Sodyum Hipoklorit

BGLAP : Osteokalsin

DMP : Dentin Matrix Protein

ALPP : Alkalen Fosfataz

TAP : Üçlü Antibiyotik Patı

DAP : İkili Antibiyotik Patı

MTAP : Modifiye Üçlü Antibiyotik Patı

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 1. Kök Hücrelerin Farklılaşma Etkinlikleri Ve Yönleri	5
Tablo 2. MKH Kaynağı Dokular ve MKH'lerin Farklılaştıkları Doku Tipleri	10
Tablo 3. Kök Hücrelerin Farklılaşma Kapasiteleri ve Rejeneratif Medikal Tedavilerde Kullanılma Potansiyelleri	24
Tablo 4. Dental Pulpa Kaynaklı MKH ve Kemik İliği Kaynaklı MKH'lerin hücre marker ekspresyonlarının karşılaştırılması.....	26
Tablo 5. Rejeneratif Endodontik Teknikler İçin Güncel Yaklaşımlar.....	41
Tablo 6. cDNA sentez kit hacimleri	55
Tablo 7. Master mix hacimleri.....	56
Tablo 8. PCR cihaz program protokolü	56
Tablo 9. LigtCycler 480 probes master için PCR master mix hazırlanışı	57
Tablo 10. PCR programı	58
Tablo 11. Real-Time PCR primer dizileri	58
Tablo 12. Grupların canlılık, apoptoz ve MTT değerler tablosu.....	72
Tablo 13. Grupların osteokalsin, DSPP ve alkalen fosfataz gen ekspresyonları değerler tablosu.....	77
Tablo 14. Grupların antimikrobiyal etkinlik değerler tablosu	78

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.	Kök hücre çeşitleri ve farklılaşma potensileri	6
Şekil 2.	Yeniden programlama ve indüklenmiş pluripotent hücrelerin kullanım alanları	7
Şeki 3.	Diş formasyon şeması.....	12
Şeki 4.	Dental kök hücrelerin elde ediliş kronolojisi ve lokalizasyonları	19
Şekil 5.	Dental pulpa kaynaklı mezenkimal kök hücre izolasyon yöntemleri.....	21
Şekil 6.	Apikal doku ekstraksiyonundan kök hücre eldesi	44
Şekil 7.	Dentin disklerinin hazırlanması (a), Disk lümen boşluklarının preperasyonu (b), Lümen boşlukları oluşturulmuş diskler (c), Disklerin sterilizasyonu (d)	45
Şekil 8.	İrrigasyon Protokolü ve Medikaman Uygulaması.....	46
Şekil 9.	Dentin disklerinin medikaman uygulaması sonrası gruplama şeması.....	47
Şekil 10.	Uygulama öncesi medikamanların hazırlanması	47
Şekil 11.	Medikaman uygulaması yapılan disklerin kültür kabına alınması	48
Şekil 12.	Medikaman uygulaması sonrası dentin disklerinin görüntüsü (sırasıyla; mTAP, TAP, DAP,).....	48
Şekil 13.	İnkübasyon periyodu sonrası yıkama prosedürü	49
Şekil 14.	Hücrelerin tripsinizasyon ile kaldırılması	50
Şekil 15.	Muse Cell Analyzer (Millipore) ile canlılık ve apoptoz ölçümü.....	51
Şekil 16.	MultiDetection System Plate Reader (a) Promega Glomax, 96 kuyucuklu kültür kaplarına hücrelerin ekilmesi (b)	52
Şekil 17.	Hücre pelletlerinin çözülmesi için vorteks yapılması ve RNA sentez kiti...54	
Şekil 18.	Nanodropla ölçüm öncesi RNA'ların buz üzerine alınması.....	54
Şekil 19.	Nanodrop (Bio-Spec Nano Spectrophotometer).....	55
Şekil 20.	Real-Time PCR cihazı	59
Şekil 21.	Agar difüzyon testi 24. Saat (Streptococcus mutans).....	61
Şekil 22.	Agar difüzyon testi 24. saat (Candida albicans)	62

Şekil 23. Agar difüzyon testi 24. saat (<i>Enterococcus faecalis</i>).....	62
Şekil 24. Agar difüzyon testi 24. saat (<i>Escherichia coli</i>).....	63
Şekil 25. Agar difüzyon testi 24. saat (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)	63
Şekil 26. Agar difüzyon testi 24. saat (<i>Staphylococcus aureus</i>)	64
Şekil 27. Apikal papilla mezenkimal kök hücrenin ilk ekim sonrası 10x büyütmede mikroskop görüntüsü	65
Şekil 28. Apikal papilla mezenkimal kök hücrenin ilk ekim sonrası dentin diski ile birlikte 4x büyütmeye mikroskop görüntüsü (x; dentin diski)	66
Şekil 29. CD90+, CD44+, CD105+ ve CD70+ mezenkimal kök hücre belirteçlerini eksprese eden apikal papilla kök hücrelerinin akım sitometri ile tanımlanması.	67
Şekil 30. CD34-, CD45-, CD11b- ve HLA-DR mezenkimal kök hücre belirteçlerini eksprese eden apikal papilla kök hücrelerinin akım sitometri ile tanımlanması.	68
Şekil 31. İnkübasyon Sonrası 14 günlük grup mikroskop görüntüleri (a: lümen dışı görüntü, b- lümen içi görüntü, X-dentin diski).....	69
Şekil 32. İnkübasyon Sonrası 28 günlük grup mikroskop görüntüleri (a: lümen dışı görüntü, b- lümen içi görüntü, X- dentin diski).....	70
Şekil 33. Canlılık ve apoptoz değerlerinin 14 ve 28 günlük karşılaştırmaları.....	71
Şekil 34. MTT değerlerinin 14 ve 28 günlük karşılaştırmaları	72
Şekil 35. On dört günlük gruplar için apoptoz grafikleri (A:1.tekrar B:2. Tekrar C:3.Tekrar)	73
Şekil 36. Yirmi sekiz günlük gruplar için apoptoz grafikleri (A:1.tekrar B:2. Tekrar C:3.Tekrar).....	74
Şekil 37. Osteokalsin gen ekspresyon değerlerinin 14 ve 28 günlük karşılaştırmaları	75
Şekil 38. Dentin sialo fosfoprotein gen ekspresyon değerlerinin 14 ve 28 günlük karşılaştırmaları	76
Şekil 39. Alkalen fosfataz gen ekspresyon değerlerinin 14 ve 28 günlük karşılaştırmaları	77

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Geçmişten bu yana insanlığın en büyük hedeflerinden biri, hastalıklara çare bulmak ve insan ömrünü uzatmak olmuştur. İnsanoğlunun bilinçaltındaki bu ölümsüzlüğe ulaşma isteği, tıp bilimine itici güç oluşturmıştır. Yaşamın sırlarını içinde barındıran genlerin şifresi, gün geçtikçe daha fazla çözüme kavuşturulmakta ve hastalıkların tedavisinde yeni bir aşamalar kaydedilmektedir. Buna paralel olarak da, rejeneratif tıp ve doku mühendisliği gibi bilim dallarının önemi giderek artmaktadır.

Rejeneratif tıp, travma, kanser, hastalık ya da konjenital nedenlerle hasara uğramış doku ve organların tekrar oluşumunu hedeflemektedir. Doku mühendisliği ise organ ve dokuların hastalara nakledilmek üzere laboratuvar koşullarında oluşturulmasıyla uğraşan bir bilim dalıdır (1).

Rejeneratif tıp ve doku mühendisliğinin hızlı gelişimi, diş hekimliği alanında da bu uygulamaların sıkça gündeme gelmesine neden olmuştur. Rejenerasyonun kelime anlamı, bir doku kaybından sonra ortadan kalkan hücrelerin yerini aynı cinsten ve aynı değerde hücrelerin çoğalarak doldurmasıdır. Diş hekimliğinde rejeneratif tedavi kavramının ilk olarak 1952 yılında Hermann tarafından kalsiyum hidroksit materyali kullanarak uyguladığı vital amputasyon tedavisi ile ortaya çıktığı kabul edilmektedir (1). Bunu takiben periodontal doku rejenerasyonu için emdogain ve fibroblast growth factor (FGF) uygulamaları, distraksiyon osteogenezi, yönlendirilmiş kemik ve doku rejenerasyonları, kemik ogmentasyonu için platelet rich plasma (PRP), recombinant human bone morphogenetic protein (rhBMP) uygulamaları gibi farklı alanlarda rejenerasyon tedavileri gerçekleştirilmiştir (2).

Diş hekimliği alanında, rejeneratif endodontik prosedürler ile amaçlanan; pulpa-dentin kompleksindeki hücrelere ek olarak dentin ve özellikle apikal olmak üzere tüm kök yapısını içeren zarar görmüş yapıların yenisi ile yer değiştirmesini sağlayan biyolojik temelli yapıların oluşturulmasıdır. Rejeneratif endodontide geliştirilmekte olan yöntemler; kök kanalının revaskülarizasyonu, kök hücre tedavisi, pulpa implantı,

scaffold (iskelet, çatı) implantı, enjekte edilebilir scaffold uygulamaları, üç boyutlu hücre yazılımı ve gen terapisi şeklinde sıralanabilir.

Çalışmamızın amacı, rejeneratif endodontik prosedürler uygulanırken kök kanalının dezenfeksiyonunda kullanılan çeşitli kanal içi medikamanlar ve kombinasyonlarının apikal papilla kök hücrelerinde meydana getirdiği değişikliklerin hücre, RNA ve mikroorganizma düzeyinde incelenmesi ve klinik uygulamalarda kullanımlarına katkı sağlayacak verilerin elde edilmesidir.



2. GENEL BİLGİLER

Son yıllarda biyomimetik temelli rejeneratif endodontik tedavilere ilgide büyük oranda artış gözlemlenmiştir. Bu tedavilerde amaç; pulpa-dentin kompleksinin, çürük veya diğer nedenlerle açığa çıkmış olan koronal dentin dokusunun, rezorbe olmuş apikal kök dentininin ya da servikal dentinin yenilenmesidir.

Endodonti alanında doku mühendisliği uygulamaları, sadece kaybedilen pulpa dokusuna ait boşluğun doldurulmasını hedefleyen klasik endodontik tedaviden farklı olarak, hastalıklı veya nekrotik pulpa dokusunun, hasar görmüş dentin ve kök yapısının sağlıklı dokularla yer değiştirilmesine olanak sağlayan rejeneratif yaklaşımları içermektedir. Bu hücresel tedavi ve indüklenmiş rejenerasyon yaklaşımının ana elemanları şunlardır; hedef dokuyu oluşturabilme potansiyeline sahip progenitör/kök hücreler, hücre farklılaşması ve doku oluşumunu yönlendiren sinyal molekülleri ve oluşturulması hedeflenen dokunun üç boyutlu yapısını belirleyen doku iskelesi. Henüz deneme aşamasında olan rejeneratif pulpa tedavilerinde ise somatik kök hücreler, pulpal implantlar, iskele implantlar, hidrojel, üç boyutlu hücre yazılımları ve gen tedavileri kullanılmaktadır (2).

2.1. KÖK HÜCRE

Vücuttaki dokuların tamamının kökeni kök hücrelerdir. Kök hücre; kendi kendine devamlı bölünme yeteneğine sahip, çeşitli doku hücrelerine dönüşebilen özelleşmemiş hücre olarak tanımlanmaktadır. Kök hücreler elde edildikleri yerlere ve gelişim gösterdikleri germ yapraklığına göre 2 sınıflandırılabilir. Erişkin kök hücrelerinin kaynağı; göbek kordonu, kemik iliği, periferik kan, hemen hemen tüm vücut dokuları ve diş pulpasıdır (3-7).

Kök hücreler, yenilenme yeteneklerini hayat boyu sürdürebilmektedirler ve in vitro koşullarda çoğalabilmelerinin yanı sıra spesifik biyolojik sinyallerin etkisiyle, köken aldıkları öncül hücrelerden başka özelleşmiş hücelere de farklılaşabilmektedirler (8). Bir hücreyi, kök hücre olarak tanımlamak için birtakım özelliklerin bilinmesi gerekmektedir (9). Kök hücrelerin özellikleri şunlardır;

1. Kök hücreler, uzun zaman dilimleri boyunca bölünebilme ve kendilerini yenileyebilme yeteneğine sahip özelleşmiş hücrelerdir. Aynı zamanda bu hücreler, herhangi bir dokuya özgün yapıya sahip değildir.

Kök hücrelerin özelleşmiş hücelere kaynaklık etme yetenekleri, 'plastisite (farklılaşma)' olarak adlandırılmaktadır.

2. Kök hücreler, somatik üç germ yaprağına doğru gösterdikleri farklılaşma yetenekleri açısından totipotent, pluripotent ve multipotent olarak sınıflandırılmaktadır.

Totipotent hücreler embriyo ve embriyonun dış membranlarının kaynağını oluşturan ve 8 hücrelik blastomer evresinde bulunan sınırsız farklılaşma yeteneğine sahip hücrelerdir. Bu hücreler tüm organizmayı oluşturabilecek kapasitededir ve embriyonun ilk 3 gününde izole edilirler.

Pluripotent hücreler, kemik, kas, kıkırdak gibi mezodermal, ektodermal (nöron, deri, saç vb) ve endodermal (hepatositler, pankreatik beta hücreleri, sindirim sistemi hücreleri) hücelere farklılaşma göstermektedir ve 5-14 günlük embriyolardan elde edilebilir. Pluripotent kök hücrelerin organizmadaki farklılaşmış tüm hücre tiplerini oluşturabilme potansiyeline sahip kök hücre grunu olduğu belirtilmektedir (10).

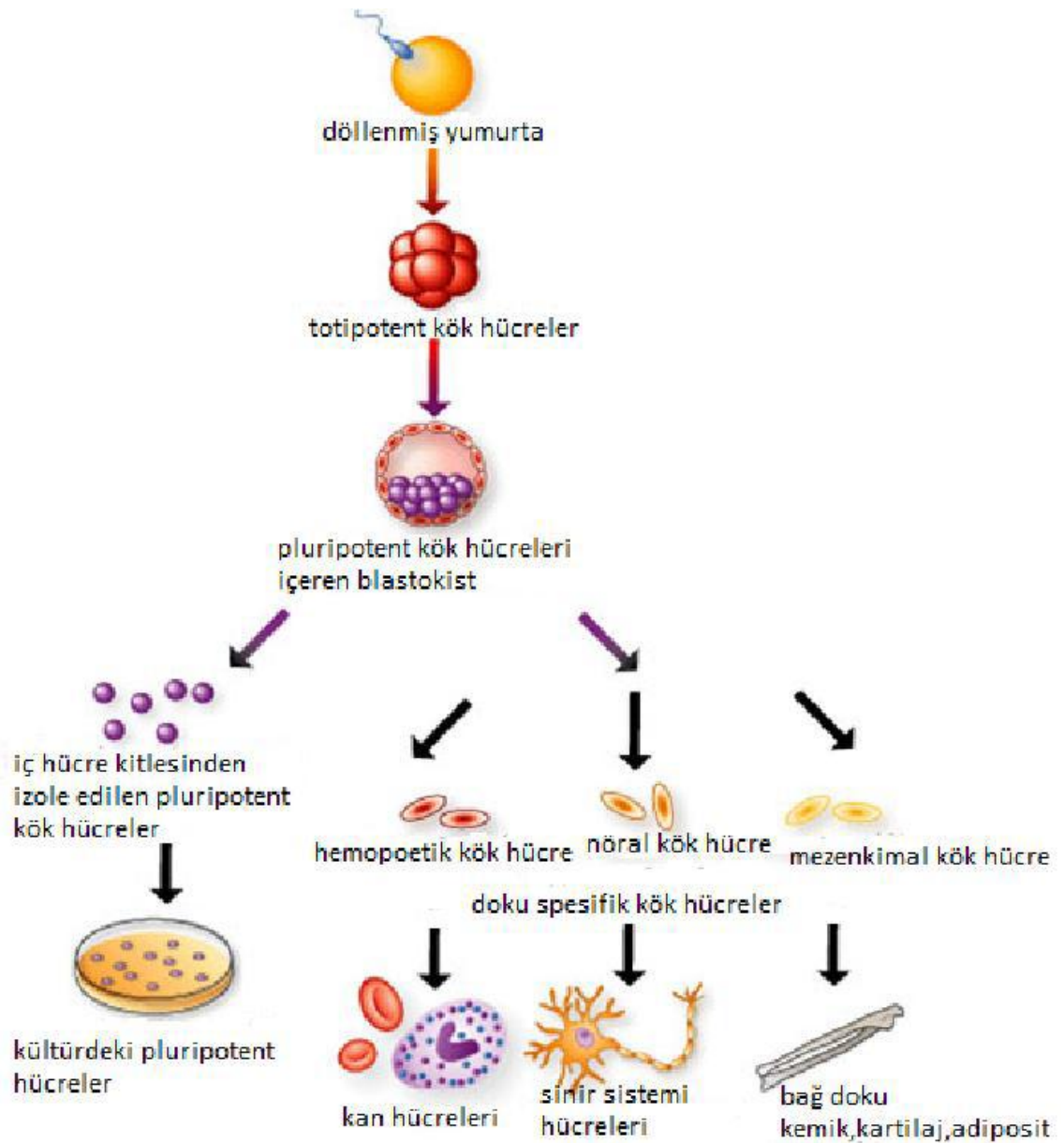
Multipotent kök hücreler aynı germ yaprağından en az 2 farklı hücre tipine farklılaşabilmektedirler. Erişkin mezankimal hücreler ve kemik iliği hücreleri örnek olarak verilebilir. Bu hücreler 14 gün ve daha büyük embriyolardan izole edilmektedir ve farklılaşma yetenekleri sınırlıdır. Ondört günden sonra embriyonik hücreler, farklılaşmaya başladıklarından önceki pluripotent özelliklerine geri dönemezler (10).

Multipotent hücreler kültür koşullarında çok miktarda çoğalabilmektedirler. Ayrıca bu hücreler, doku ve organ hasarlarında ilgili yapıların hücrelerine dönüşerek tamirin gerçekleşmesini sağlamaktadırlar.

3. Organ hasarı durumunda gerçekleştirilen nakillerde, kök hücreler kaynak dokunun işlevsel olarak tekrar çoğalabilmesine olanak tanımaktadırlar (11).
4. *İn vivo* koşullarda doku hasarının gerçekleşmediği durumlarda bile, farklılaşmış diğer hücrelere katkı sağlamaktadırlar (11).

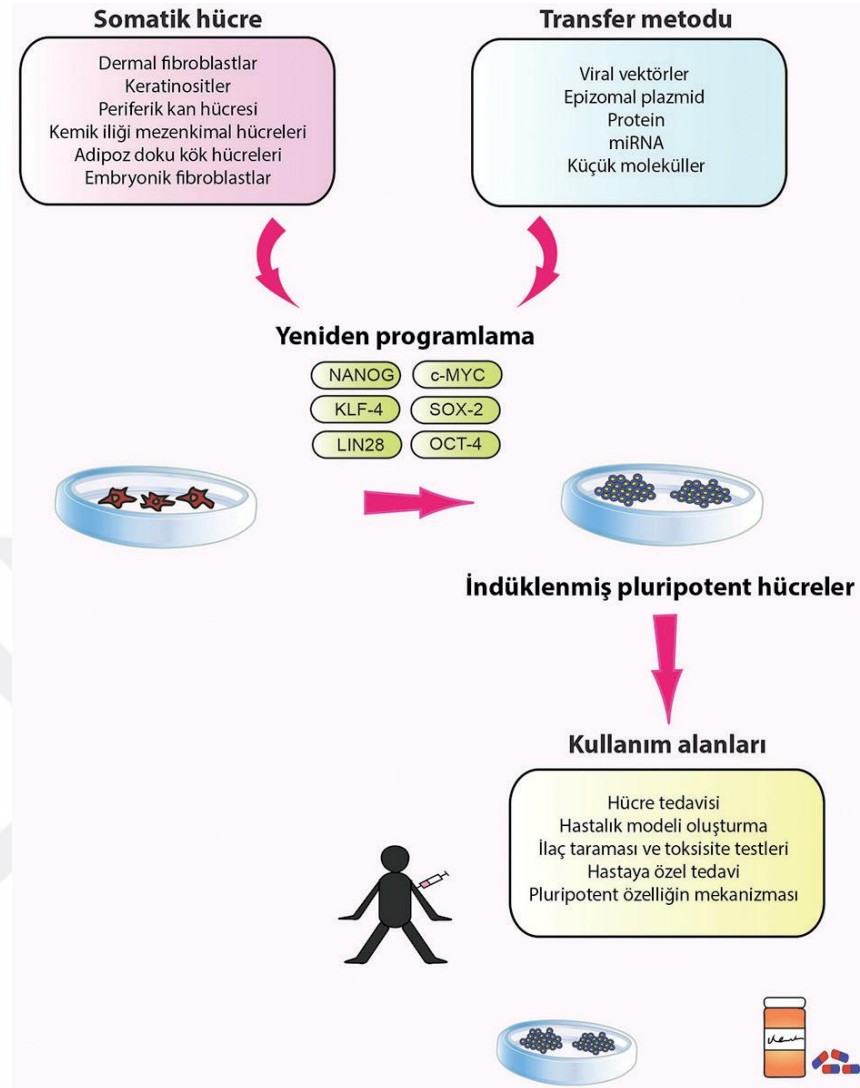
Tablo 1. Kök Hücrelerin Farklılaşma Etkinlikleri Ve Yönleri

HÜCRE TİPİ	HÜCRE YERLEŞİMİ	FARKLI LAŞMA ETKİNLİĞİ	FARKLI LAŞMA YÖNÜ
Embriyonik Kök Hücreler	Morula evresindeki hücreler	Totipotent	Embriyo ve embriyo dışı dokular
Embriyonik Kök Hücreler	Blastokist evresindeki hücreler	Pluripotent	Embriyo gövdesi
Embriyonik Kök Hücreler	Gastrula epiblast hücreleri	Pluripotent	Endoderm, mezoderm ve ektoderm hücreleri
Embriyonik Kök Hücreler	Ektoderm, endoderm ve mezoderm hücreleri	Pluripotent	Somatik hücreler
Yetişkin Kök Hücreler	Özgün doku hücreleri	Multipotent	Dokuya göre bir yada daha fazla hücre
Yetişkin Kök Hücreler	Dokulardaki yerleşik hücreler	Unipotent	Tek hücre tipi



Şekil 1. Kök hücre çeşitleri ve farklılaşma potensileri (12)

Uyarılmış Projenitör Kök Hücre (IPS): Bu hücre grubu ise yetişkin somatik hücrelerin tekrar programlanarak pluripotent şekillerine getirilmesi sonucu oluşturulan hücreler grubudur. İlk kez somatik fare hücreleri kullanılarak 2006 yılında elde edilmiştir. 2007 yılında da insandan elde edilerek tanımlanması gerçekleştirilmiştir (13, 14).



Şekil 2. Yeniden programlama ve indüklenmiş pluripotent hücrelerin kullanım alanları (15).

Hayatın farklı dönemlerindeki birçok dokunun bu tanımlara uyan kök hücresi bulunmaktadır. Hematopoietik kök hücreler indüklenmiş pluripotent kök hücrelerin tedavilerde en çok kullanılanı ve en çok bilinenidir. Hematopoietik kök hücreler, en fazla kemik iliği ve daha az olarak kordon kanı, fetal karaciğer ve dalak gibi dokularda bulunmaktadır.

2.2. KÖK HÜCRE TİPLERİ ve KAYNAKLARI

2.2.1. Embriyonik Kök Hücreler

Preimplantasyon (rahim öncesi dönem) embriyoda bulunan ve her üç germ tabakasını (farklılaşarak değişik hücre ve doku gruplarını oluşturan embriyo tabakası) oluşturabilen totipotent kök hücreleri içermektedirler. Bunlar aynı zamanda, immün sistemi baskılanmış farelerde teratom ismi verilen ve tüm embriyonik dokuları kapsayan tümörlerin oluşmasına sebebiyet verebilirler (16, 17). Embriyonik germ hücreleri ve embriyonal karsinoma hücreleri bu gruba dâhil edilen hücre tiplerine örnek olarak verilebilir.

2.2.2. Embriyonik Olmayan Hücreler

2.2.2.1. Erişkin-somatik kök hücreler; Yaşayan organizmada tek bir doku veya organda bulunan, birçok özel hücre şekline farklılaşabilen özelleşmemiş hücre grubudur. Erişkin kök hücrelerin birincil görevleri içerisinde bulundukları dokuyu tamir ederek idamesini sağlamaktır. Erişkin kök hücrelerin beyin, kemik iliği, diş, deri, kalp, karaciğer, periferik kan, iskelet kası, over epiteli gibi çok sayıda dokuda ve organda ‘kök hücre nişi’ olarak isimlendirilen üç-boyutlu özel anatomik bölgelerde bulundukları düşünülmektedir (18). Embriyonik kök hücreden farklı olarak, bir takım olgunlaşmış dokulardaki erişkin kök hücrelerin temeli hala araştırma konusu olmaya devam etmektedir. Normal şartlarda her dokuda çok az sayıda bulunmaktadırlar. Bu sebeple terapötik nedenlerle kullanılmaları amacıyla laboratuvar koşullarında üretilmeleri gereklidir (19).

2.2.2.2. Hematopoetik kök hücreler; Erişkin kök hücrelerin üzerinde en fazla çalışılan ve tedavide en fazla kullanılanıdır ve ayrıca kendi kendini yenileyebilme ve olgun kan hücrelerinin tamamına farklılaşabilme özellikleri bulunmaktadır. Kemik iliği, periferik kan, kordon kanı ve fetal karaciğer gibi doku ve organlardan elde edilebilirler. Son yıllarda yapılan araştırmalarda Wnt, Notch, bone morphogenetic protein (BMP) ve FGF’nin hematopoetik kök hücre farklılaşmasını kontrol ettiği bildirilmiştir (20). Hematopoetik kök hücrenin çoğalma, farklılaşma, mobilizasyon ve homing gibi özelliklerinin düzenlenmesinde, osteoblastik ve kan damarlarından oluşan mikro çevrenin oldukça önemli rol oynadığı bilinmektedir (20).

2.2.2.3. Kordon kanı kök hücreleri; Bebeğin doğduktan sonra ilk yarım saatlik süre içerisinde alınan plasenta ve göbek kordon kanı somatik kök hücreler için önemli kaynak oluşturmaktadır. Bu hücre grubunun avantajları: genç olmaları; hayatta kalabilme yeteneklerinin yüksek olması, çok sayıda elde edilebilmeleri ve alıcı dokuya kolay uyum sağlayabilme özellikleridir. Göbek kordonundan alınan kan 1988 yılından bu yana çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır (21).

2.2.2.4. Mezenkimal kök hücreler (MKH); Kemik iliğinin stroması içinde yer alan uzantılı fibroblast benzeri multipotent hücrelerdir. Birçok spesifik belirteçleri (CD73, CD54, CD105, CD39 gibi) eksprese etmektedirler ve uygun koşullar sağlanması halinde, osteojenik, kondrojenik, adipojenik ve odontojenik yönde farklılaşma özellikleri bulunmaktadır. Bununla birlikte mezodermal hücreler (fibroblast, iskelet kası hücreleri gibi) ile endotel ve nöroektoderm dahil mezoderm kökeni olmayan birçok çeşitli hücre tiplerine farklılaştıkları gösterilmiştir (21, 22).

Mezenkimal kök hücreler, güçlü immünmodulator özelliklerinin olması nedeniyle hücresel tedavilerde öne çıkan erişkin kök hücre kaynaklarındandır. 1990'lı yıllarda beyindeki MKH'lerin nöronal olmayan hücrelere (astrosit, oligodendrosit gibi) ve nöronlara farklılaşabildikleri bildirilmiştir (23). Son dönemlerdeki araştırmalarda, pulpa, periodontal ligament, dental folikül, periost gibi dental dokular ve adipoz doku gibi çok sayıda farklı organdan da MKH elde edilmiş ve MKH'lerin farklılaşabilme özellikleri altın standart olarak kabul edilen kemik iliği MKH'leri ile karşılaştırılmıştır (24, 25).

Somatik kök hücreler ve embriyonik kök hücrelerin, rejeneratif hücresel tedavilerde kullanılabilme potansiyellerine bakıldığında, iki hücre grubunda avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır. Aralarındaki en başta gelen farklılık, embriyonik kök hücrelerin pluripotent özellikleri ve herhangi bir farklılaşma göstermeden sınırsız çoğalabilme yeteneklerinin olmasıdır. Erişkin kök hücreler ise tekrar programlanmadıkları sürece multipotent karakterlerini devam ettirmektedirler. Embriyonik kök hücreler in vitro şartlarda kolaylıkla proliferate olabilirken, erişkin hücreler matür dokuda sınırlı sayıda olmaları sebebiyle, izolasyonları ve hücresel tedaviler için gerekli miktarda çoğaltılmaları daha zordur. Diğer taraftan erişkin kök hücrelerin, transplante edilmeleri sonrasında immünrejeksiyonlarının daha az olduğu düşünülmektedir. Böylelikle immünsüpresif ilaç kullanımına bağlı yan etkiler

minimumuna inmektedir. Bu hücrelerin elde edilmelerinde karşılaşılan etik problemler en büyük dezavantajlarıdır (19).

Tablo 2. MKH Kaynağı Dokular ve MKH'lerin Farklılaştıkları Doku Tipleri

MKH'nin Elde Edildiği Başlıca Yetişkin Doku Tipleri	MKH'nin Farklılaşabildiği Başlıca Hücre / Doku Tipleri
Kemik iliği	Kemik, kıkırdak, tendon, kas, adipoz, sinir
Adipoz doku	Kemik, kıkırdak, tendon, kas, sinir
Plasenta	Kemik, kıkırdak, kemik iliği, kas, sinir
İskelet kası	Kemik, kıkırdak, tendon, düz ve çizgili kas, sinir
Beyin	Kas, sinir
Saç folikülü	Deri, düz kas, adipoz, beyin
Kornea, retina, pankreas, karaciğer, amniyotik sıvı	Kemik, kıkırdak, tendon, sinir

2.2.3. Organlardaki Kök Hücreler

2.2.3.1. Adiposit kök hücreleri; Yağ dokusundan elde edilmektedirler. Bu pluripotent kök hücreler, kemik iliği kaynaklı kök hücreler kadar farklılaşma yeteneğine sahiptirler ve ayrıca uygun koşullarda elde edildikleri takdirde in vitro şartlarda adipojenik, kondrojenik, myojenik ve osteojenik birçok hücre tipine dönüşebilecekleri bildirilmiştir. Ayrıca, doku mühendisliğinde farklı biyomateryaller üzerinde adiposit kök hücreleri farklılaştırılarak rejeneratif tedavide kullanımları üzerinde çalışılmaktadır (22). Bu şekilde MKH'a alternatif olacağı da düşünülmektedir (22).

2.2.3.2. Kalp kası kök hücreleri;

Kalp kası kök hücrelerinin hasarlı myokard dokusunun rejenerasyonu için önemli kardiyak progenitor hücreler oldukları bildirilmiştir (26).

2.2.3.3. Nöronal kök hücreler;

Nöronal hücreler sinir sisteminin en az bulunan, en primordial farklılaşmamış hücreleridir (26).

2.2.3.4. Epidermal kök hücreler;

Erişkin derisinde herbir kıl folikülü, kök hücre içermektedir ve bu hücreler her kıl siklusunda, folikül rejenerasyonu ve yara iyileşmesi için reepitelizasyonda önemlidirler. Kolay elde edilebilmeleri nedeniyle önemli kök hücre kaynağı olarak görülmektedirler (11).

2.2.3.5. Sindirim sistemi epitel kök hücresi;

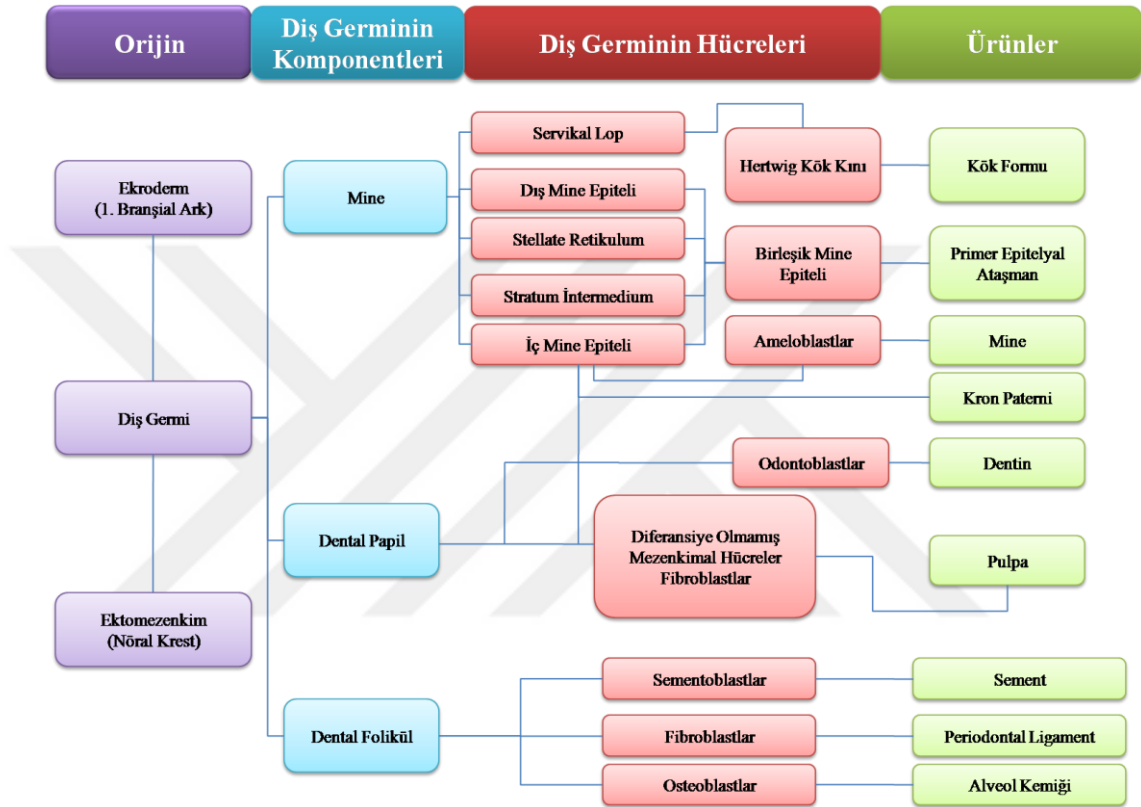
Farkılaşmamış epitel hücreleri, organizmanın hayatı süresince kök hücrelerden köken alırlar ve sindirim sistemindeki hızlı hücre yenilenmesini sağlamaktadırlar. Kök hücre etrafındaki mikro çevrenin sindirim sistemindeki çok sayıda hastalık ve kanserin gelişiminde önemli rol oynadığı bilinmektedir (21).

2.2.4. Dental Kaynaklı Kök Hücreler

Dental kaynaklı kök hücrelerin karakteristik özelliklerinin anlaşılması için, odontogenez ve odontogenezi düzenleyen biyolojik mekanizmaların bilinmesi önemlidir. Diş gelişimi embriyonik hayatta başlayan biyolojik bir süreçtir ve bu gelişim süreci boyunca epitelyal ve mezenkimal dokular arasında karmaşık bir etkileşim bulunmaktadır. Dişler, oral ektoderm ve nöral-krest kaynaklı mezenkimden köken almaktadırlar ve yaklaşık olarak embriyonik hayatın 5. haftasında başlayan gelişim beş safhada meydana gelmektedir (27):

1. Kalınlaşma safhası: Dişin oluşacağı alanda epitelin kalınlaşması ve tomurcuk etrafında nöral-krest kökenli ektomezenkimal hücre kümelenmesinin ardından dental lamina yapısı oluşur (27).
2. Tomurcuk safhası: Periferik bazal tabakadaki hücreler ve stellat retikulum hücreleri dental epitelden ayrılırlar. Gelişen dişte kök hücre nişi oluşturmak amacıyla iki doku tabakası sağlarlar (27).
3. Kep safhası: Dental papillanın iç yüzeyinden iç mine epiteli, dış mine epiteli yüzeyinde de dental folikül oluşmaktadır. Dental folikül; sement, periodontal ligament ve alveoler kemik oluşumuna katkı sağlayan hücreleri içermektedir (27).

4. Çan safhası: Epitel ve mezenkim doku bileşkesinin iç yüzeyinde bulunan hücreler ameloblastlara ve odontoblastlara farklılaşmaktadır. Bu hücreler mine ve dentinin mineralize matriksini sentezlerken; dental papilladan pulpa gelişir (27).
5. Sekretuar safha: Gelişimin son aşamasında diş erupsiyonu gerçekleşmektedir.(27).



Şekil 3. Diş formasyon şeması (27).

Bütün dişler dental kök hücre içermektedir (28). Yamazaki et al. (28) gelişen dişte bildirdikleri nöral-krest kaynaklı dental mezenkim hücrelerinin odontoblastlara, kondrosit ve osteoblast benzeri hücrelere farklılaşabildiklerini rapor edilmişlerdir.

Diş hekimliği yapılan araştırmalar, dental kaynaklı multipotent kök hücre kaynaklarının izolasyonuna yönelmiştir(29). Günümüzde dental dokulardan köken alan kök hücreler elde edilmiş yerleri baz alınarak aşağıdaki şekilde sıralanmaktadır.

1. Daimi dişlerin pulpasından elde edilen kök hücreler (Dental Pulp Stem Cells-DPSCs),

2. Süt dişlerinin pulpasından elde edilen kök hücreler (Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous Teeth- SHED),
3. Periodontal ligament kaynaklı kök hücreler (Periodontal Ligament Stem Cells-PDLSCs),
4. Apikal papilla kaynaklı kök hücreler(Stem Cell from Apical Papilla(SCAP),
5. Dental folikül kaynaklı kök hücreler (Dental Follicular PCs),
6. Maksiler tüber bölgesinde periost kaynaklı kök hücreler (Oral Periosteum Stem Cells).

Doku mühendisliği uygulamalarında temel prensip, uygun taşıyıcılar kullanılarak kök hücre süspansiyonlarının (kollajen, kalsiyumfosfat, glikolik asit, rezorbe olabilen polimerler gibi) immünsüpresif konağa transplante edilmesi ve uygun vaskülarizasyon sağlanarak doku rejenerasyonun sağlanmasıdır (30). Sonuçta elde edilen dokunun çevre yapı ile bütünüyle entegre olması, tüm yapısal ve biyolojik işlevleri yerine getirmesi gereklidir. Biyomateryallerin kullanımıyla gerçekleştirilmeye çalışılan kemik rejenerasyonu ve periodontal rejenerasyon, limitli biyofonksiyonel kapasiteye sahiptir ve tam anlamıyla bir rejenerasyondan çok tamir dokusunu da içeren yeni doku formasyonu şeklindedir (30).

Nakao et al. (31) 2007 yılında yaptıkları araştırmada, epitel ve mezenkim kaynaklı kök hücreleri kollajen taşıyıcılar aracılığıyla yetişkin farelerin soketlerine implante etmiş; odontoblast, ameloblast, pulpa, kan damarları, periodontal ligament, kök ve alveoler kemik gibi bütün dental yapıların organize olarak oluştuğunu göstermişlerdir. Diş yapıları ile ilişkili kök hücrelerin potansiyellerinin belirlenebilmesi için yürütülen çalışmaların büyük bir kısmında, *in vitro* şartlarda osteo-odontojenik, adipojenik ve nörojenik olmak üzere en az üç farklı dokuya diferansiye olabilen multipotent mezenkimal kök hücreler izole edilmiş ve altın standart olarak kabul belirtilen kemik iliği kökenli hücrelerle kıyaslamalar yapılmıştır (24, 25, 32, 33).

Kemik iliği stroma hücreleri, fibroblast, osteoblast, adiposit progenitörleri ve % 0.1 kök hücrelerden oluşan miks bir hücre popülasyonudur (34). Kemik iliği stroma kök hücrelerinin, *in vivo* koşullarda alveoler kemik, periodontal ligament ve sement

formasyonunu sağladığı, diğer taraftan ameloblast benzeri hücrelere de farklılaşabildiği gösterilmiştir (34).

2.2.4.1. Daimi dişlerin pulpasından elde edilen kök hücreler

Diş pulpasının damarları çevresinde yer alan hücre popülasyonunun MKH oldukları düşünülmektedir. Daimi dişlerin pulpasından elde edilen kök hücreler, yüksek proliferasyon gösterebilen, klonlanabilen ve yüksek plastisite yeteneğine sahip multipotent hücrelerdir.

Diş pulpası kaynaklı öncül hücrelerin 90'lı yıllarda elde edildiği bildirilmektedir. Akabinden ise MKH eldesi için 20 yaş diş pulpası kullanılmıştır (35).

Yetişkin pulpa kaynaklı kök hücreler 2000 yılında Gronthos et al tarafından tanımlanmıştır. Aynı araştırmacılar odontoblastlarla çevrili mineralize tübüler matriks ve kan damarlarıyla karakterize dentin-pulpa kompleksine ve in vivo koşullarda adipositlere ve nöral hücrelere farklılaşabildiklerini bildirilmişlerdir (36). Ayrıca bu hücrelerin 2 yıl sonra bile preodontoblastlara farklılaşabilme özelliklerini korudukları ve hücresel bütünlüğü sağlayan yüzey antiijenlerini eksprese ettikleri izlenmiştir (37, 38).

Daimi dişlerin pulpasından elde edilen kök hücrelerin, kemik iliği kökenli MKH'ler ile karşılaştırıldığında, hücre döngüsü ile ilişkili genleri eksprese etmeleri sayesinde yüksek proliferasyon hızına sahip olmaları ve izolasyon yöntemlerinin daha kolay ve daha az invaziv olmasının üstün tarafları olduğu bildirilmiştir. (35).

Daimi dişlerin pulpasından elde edilen kök hücrelerin başlıca farklılaşma potansiyeli, dentin ya da kökün etrafındaki bağ doku ile ilişkili hücrelerin oluşumunda etkilidir ve bu hücreler pulpa, diş çevreleyen bağ doku ya da folikülden köken almaktadır. Dental kaynaklı kök hücrelerin; diş epiteli, dental papilla, çevre bağ doku ve diş folikülü gibi farklı kaynaklardan elde edilebilmesi mümkündür. Diş epiteli dışında diğer kaynaklardan elde edilen kök hücrelerin tamamı nöral krest kaynaklı ektomezenkimal hücrelerdir ve bu hücreler dentin ve diş dokularının oluşumuna, gelişim ve hücresel farklılaşma süreçlerine etki ederek katkı sağlamaktadırlar (21).

Daimi dişlerin pulpasından elde edilen kök hücrelerin gen ekspresyonlarının belirlenmesi, bu hücrelerin alkalen fosfataz, dentin matriks proteini-1, dentin siyalo fosfoprotein (DSPP) ekspresyonları olduğunu gösterilmiştir. Ayrıca eksprese edilen

genlerin çoğunun ekstraselüler matriks bileşenleri, büyüme faktörleri ve hücre adezyon moleküllerini kodladığı bildirilmiştir. Gen ekspresyon düzeyleri, hücre sinyalleri, hücresel etkileşimler ve hücre metabolizmasını düzenleyici etki göstermektedir (21).

Daimi dişlerin pulpasından elde edilen kök hücrelerin ve kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin gen ekspresyonları karşılaştırıldığında, çok az farklılık olduğu gözlenmektedir. Daimi dişlerin pulpasından elde edilen kök hücreler, hücre siklusu aktivatörü siklin bağımlı kinaz-6 yı yüksek oranda eksprese edilmekte ve bu yüksek ekspresyon sayesinde DPKH'ler daha yüksek bir proliferasyona sahip olmaktadır (39).

2.2.4.2. Süt dişlerinden elde edilen kök hücreler

Süt dişi pulpasından izole edilen kök hücrelerin kemik iliği kaynaklı MKH'lere göre, daha iyi proliferasyon gösterdiklerini ve in vitro koşullarda daha kolay çoğaltılabildikleri bildirilmiştir (40). olması Ex vivo olarak, pulpal kan damarları çevresinde STRO-1 ve CD146 gibi kök hücre yüzey belirteçlerinin lokalize ekspresyonu, bu hücrelerin perivasküler mikro çevreden köken alabileceklerini düşündürmüştür (40). Ayrıca, labratuar koşullarında bu kök hücrelerin odontoblast benzeri hücrelere farklılaştıkları ve dentin reaktif antikör eksprese etme yeteneklerinin olduğu gösterilmiştir (41). Ek olarak bu hücrelerin çeşitli nöral hücre belirteçlerini eksprese ettikleri ve adipositlere farklılaşabildikleri bildirilmiştir. Aynı araştırmada osteoblastik farklılaşma gösterilememesine rağmen, transplante edilen kök hücrelerin konağın osteojenik hücrelerini indükleyerek, yeni kemik formasyonunu artırdığı ve konağın vasküler yapılarıyla anastomozlaşabilen kan damarlarına farklılaşabildiği gözlemlenmiştir (42). Bu hücrelerden aynı zamanda runt-ilişkili transkripsiyon faktörü-2 (Runx2), alkalin fosfataz, matriks ekstrasellüler fosfoglikoprotein (MEPE), bone sialoprotein (BSP) ve DSPP gibi osteoblastik/odontoblastik markerlar eksprese edilmektedir (42). Miura et al. (40) SHED'lerin in vivo transplantasyonundan sonra yeni kemik ve dentin oluşturduğunu ve fare beyinde nöral belirteçlerin ekspresyonu süresince hayatta kaldıklarını tespit etmişlerdir (40).

Süt dişlerinden elde edilen kök hücrelerin odontoblastik farklılaşma kanıtlamak amacıyla bu hücreler immün kompromize farelere transplante edildiklerinde hücrelerin bir bölümünün insana özgü odontoblastlara farklılaştığı ve bu hücreler tarafından sentezlenen rejenere dentinin DSPP'ye immunoreaktif olduğu saptanmıştır (24, 36).

Süt dişlerinden elde edilen kök hücrelerin yüksek proliferasyon göstermesi, hücre kümesi oluşturma yeteneklerinin olması ve in vivo koşullarda osteojeniteyi uyarabilmesi ile daimi diş pulpası kök hücrelerinden üstün olduğu bildirilmiştir. Ancak SHED kusursuz bir dentin pulpa-dentin kompleksi oluşturmada diş pulpası kök hücreleri kadar başarılı değildir (40).

Diş pulpası hücrelerinin nörojenik faktörleri üretebildiği ve spinal kord yaralanmaları nedeniyle hasar görmüş motor nöronları tamirini gerçekleştirebildiği bilinmektedir (43). 2009 yılında Nakamura et al. kemik iliği stromal hücrelerini, SHED ve DPSCs ile karşılaştırdıkları çalışmalarında, SHED'in, daha yüksek düzeyde FGF-2 ve TGF-beta eksprese ettiklerini ve proliferatif kapasitelerinin daha yüksek olduğunu belirtmişlerdir (44). Bu özellikler rejeneratif tedavi ve doku mühendisliğinde SHED'lerin öne çıkmasına neden olmuştur. Parkinson hastalığının tedavisi için kullanılan SHED uygulamasının ümit verici olduğu, 2010 yılında yapılan bir çalışmada belirtilmiştir (45).

2.2.4.3. Dental folikül kaynaklı kök hücreler

Dental folikül, diş germi etrafını çevreleyen mezenkimden köken alan bir dokudur. Diş gelişimi boyunca kök yapısının formasyonu ve sement, periodonal ligament, alveoler kemik gibi periodontal dokular, dental folikül progenitörleri tarafından oluşturulmaktadır (46). Dental folikül kaynaklı kök hücrelerin, Notch-1, STRO-1, CD133, OK14 ve nestin gibi spesifik kök hücre yüzey antijenlerini farklı düzeyde eksprese ettikleri bildirilmiştir. Ayrıca yapılan araştırmalarda, bu hücrelerin osteoblast, adiposit, hepatosit sementoblast, ve nöronlara diferansiye olabildikleri ve in vitro şartlarda EMD, BMP-2, ve BMP-7 ile stimüle edildiklerinde sementoblastlara farklılaşabildikleri bildirilmiştir (47).

Dental folikül hücrelerinin sahip olduğu heterojenik yapının rejeneratif endodontik tedavilerde önemli bir avantaj oluşturabileceği düşünülmektedir (46, 47).

2.2.4.4. Periodontal ligament kaynaklı kök hücreler

Periodontal ligament, dental folikül ve nöral krest hücrelerinden köken alan özelleşmiş bir bağ dokudur. Periodontal ligamentten kaynaklı MKH'leri, kemik iliği ve pulpa kaynaklı kök hücreleri gibi multipotent hücreler olduğu bilinmektedir. Bu hücrelerin otojen kaynak olarak kemik rejenerasyonunda kullanılabilecekleri gösteriştir (49). Gay et al.(50) PDLSCs ve kemik iliği kaynaklı MKH'lerin osteojenik farklılaşma kapasitelerini değerlendirdikleri araştırmalarında, iki hücre grubunda da osteojenik

kültür medyumunda aynı oranda alkalen fosfataz ve BSP ekspresyonu gözlemledikleri bildirilmiştir. Ayrıca yine benzer şekilde iki hücre grubunda da yüzey antijen ekspresyonu, kondrojenik ve adipojenik farklılaşma kapasitelerinin benzer olduğu gösterilmiştir. Bir diğer araştırma, bu bulgulara paralel olarak,, periodontal ligament kaynaklı kök hücrelerin kemik iliği stromal hücreleri ile karşılaştırıldıklarında alkalen fosfataz, Runx2, Tip-I kollajen, osteokalsin ve steopontin yüzey antijen ekspresyonları açısından farklı olmadığını göstermiştir (51). Başka bir çalışmada da, periodontal defektlerdeki granülasyon dokusundan izole edilen MKH'lerin, STRO-1, CD146 ve MUC18 gibi yüzey antijeni ekspresyonu, adipojenik ve osteojenik farklılaşma yeteneklerinin sağlıklı periodontal ligament kök hücreleri ile benzer olduğu ayrıca, inflamasyonlu periodontal ligament kök hücrelerin migrasyon yeteneklerinin daha üstün olduğu bildirilmiştir (52).

Periodontal ligament kaynaklı kök hücrelerin nöral krest kaynaklı olmalarından dolayı, adiposit ve nöral diferensiyasyon özellik kazandıkları ortaya konmuştur, bunun sonucu olarak, periodontal rejenerasyon dışındaki diğer hücresel tedaviler için alternatif olabilecekleri öngörülmektedir (52).

2.2.4.5. Apikal papilla kaynaklı kök hücreler

Apikal papilla, gelişmekte olan daimi dişlerin apeksinde bulunan dental papillanın fiziksel ve histolojik özelliklerine sahip doku olarak tanımlanmaktadır. Apikal papilladokusu gelişmekte olan kök ucuna zayıf bir şekilde bağlı olduğu için kolaylıkla uzaklaştırılabilmektedir ve bu dokudan elde edilen kök hücreler SCAP olarak isimlendirilmektedirler. Apikal papilla ile dental pulpa arasında bulunan apikal hücrelerden zengin alan hem dental pulpa hem de apikal papilladan kök hücreler ve progenitör hücreler içermektedir, ancak iki kök hücre grubu da farklı özellikler sergilemektedir (53, 54).

İnsan dişlerinin açık apeksli köklerinden izole edilen SCAP, odontoblast ve adipositlere diferansiyasyon gösterebilmektedir ve periodontal ligament kök hücrelerine kıyasla daha yüksek ve etkili proliferasyon özellikleri bulunmaktadır (24). Dental pulpa kök hücreleri ile kıyaslandığında daha yüksek proliferasyon değeri olması nedeniyle SCAP esaslı doku rejenerasyonu, kök oluşumu için umut vericidir (55). İnsan 3. büyük azı dişlerinden elde edilebilmesi nedeniyle bu hücrelere kolay ulaşılabilir (24). Apikal papilla kaynaklı kök hücreler, kök formasyonunda dentin yapımından sorumlu primer

odontoblastların oluşumu için önemli bir kaynaktır ve izolasyonu 2006 yılında yapılmıştır. Bununla biriktodontoblast benzeri hücelere diferansiyasyon yeteneklerinin olduğu ve STRO-1, CD24 ve CD29 gibi birçok kök hücre yüzey antijenlerini eksprese ettikleri gösterilmiştir. Bu hücrelerin fenotipik özellikleri, pulpa kaynaklı kök hücrelerle kıyaslandıklarında benzerlik göstermektedir, ancak adipojenik farklılaşma potansiyelleri daha düşüktür (55, 56).

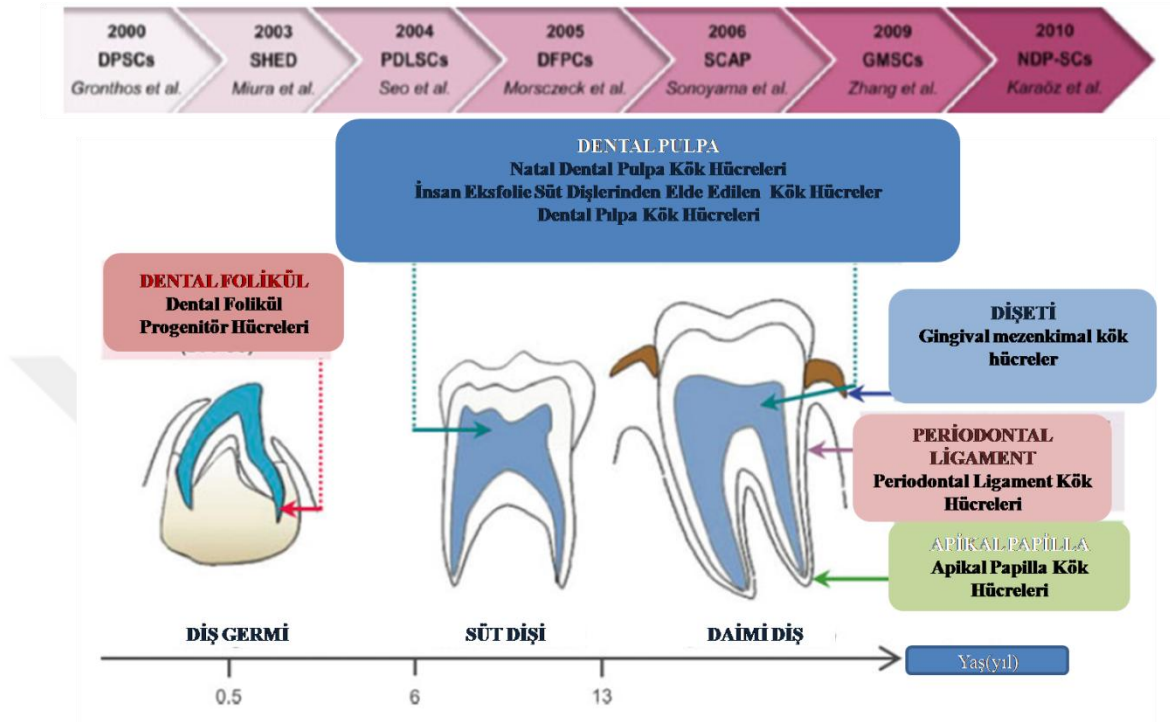
Ayrıca yavru domuzlarda yapılan bir pilot çalışmada diş gelişimin ilk dönemlerinde apikal papilladokusu cerrahi olarak alındığında kök gelişiminin devam etmediği, fakat pulpa dokusunun bozulmadan kaldığı ve dişin apikal papillası uzaklaştırılmamış diğer köklerinin normal büyüme ve gelişimi devam ettirdiği izlenmiştir (57).

Apikal papilla kök hücreleri in vitro şartlarda odontoblastik/osteoblastik, adipojenik, kondrojenik ve nöral farklılaşma yeteneklerine sahiptirler. Apikal papilla kök hücrelerinin odontoblastik/osteoblastik farklılaşmaları osteojenik farklılaştırma medyumunda 4 hafta indüksiyona bırakılarak değerlendirilebilir. İlginç bir biçimde apikal papilla kök hücrelerinin spesifik belirteci olan CD24 osteojenik stimülasyona cevap olarak azalarak regule olmuştur. Fakat bu bulgunun biyolojik açıdan önemi henüz net değildir. Pulpa ve süt dişlerinden elde edilen kök hücelere benzer şekilde apikal papilla kök hücreleride in vitro odontojenik potansiyel göstermektedir. Buna rapmen apikal papilla kök hücrelerinden dental pulpa kaynaklı kök hücelere kıyasla, MEPE (matriks ekstrasellüler fosfoglikoprotein, GF-B reseptör 2, VEGF reseptör 1, FGFR 1, FGFR 3 ve melanoma ilişkili protein daha düşük seviyelerde eksprese olmaktadır. İn vivo immunkompromise farelere transplante edildiklerinde dental pulpa kaynaklı kök hücelere benzer şekilde odontoblastik farklılaşma, dentin ve pulpa benzeri doku rejenerasyonu ve bağ doku oluşumu görülmüştür. Apikal papilla kök hücreleri dental pulpa kaynaklı kök hücelere kıyasla oldukça yüksek progenitör kök hücre kaynağı olarak rol oynamaktadırlar. Apikal papilla kök hücreleri, kök dentininin oluşumundan sorumlu primer odontoblastların oluşumu için de önemli bir kaynaktır

2.2.4.6. Maksiller tüber bölgesinde periost kaynaklı kök hücreler

Periost kaynaklı kök hücreler, ilk kez Zhu ve et al. tarafından, kemik iliği ve alveoler kemik kaynaklı osteojenik kök hücrelerin özelliklerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada on iki haftada en yüksek mineralizasyon kapasitesini göstermesiyle gündeme gelmiştir. Başka bir araştırmada 2007 yılında yapılmış ve bu hücrelerin maksiller tüber

bölgesinden izole edilerek çoğaltılabildiği gösterilmiş olsa da olumlu sonuçlara rağmen ilgili araştırmalar ilerleme gösterememiştir(59).



Şekil 4. Dental kök hücrelerin elde edilmiş kronolojisi ve lokalizasyonları (59).

2.2.5. Dental Pulpa Kök Hücre İzolasyonu ve Karakterizasyonu

Diş minesini içerisinde yumuşak bir bağ doku olan dental pulpa diğer yetişkin doku kaynakları ile kıyaslandığında izolasyon yöntemlerinin invaziv olmaması ve geniş ölçekte hücre sunmasından dolayı yetişkin kök hücreler için önemli bir kaynaktır (60, 61). Dental pulpa kaynaklı mezenkimal kök hücreler Gronthos et al. ve Miura et al. tarafından 2000 ve 2003 yıllarında insan süt ve daimi dişlerinden izole edilmiştir (24, 40). Yine Sonoyama et al. 2008 yılında yaptıkları bir pilot çalışmada apikal papilladan kök hücrelerin karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir (62). Ek olarak dental pulpa kaynaklı mezenkimal kök hücreler genellikle çekilen üst orta kesici dişlerden izole edilirken ayrıca fare, rat, koyun, şempanze ve domuz gibi farklı organizmalardan da elde edilmiştir (63-65). Dental pulpa kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin farklı türde hücrelere farklılaşmaları ve multipotensileri proliferasyon, elde edilme kolaylığı ve hücre sayısı açısından kemik iliği kök hücrelerinden daha etkili olduğu gösterilmektedir (66).

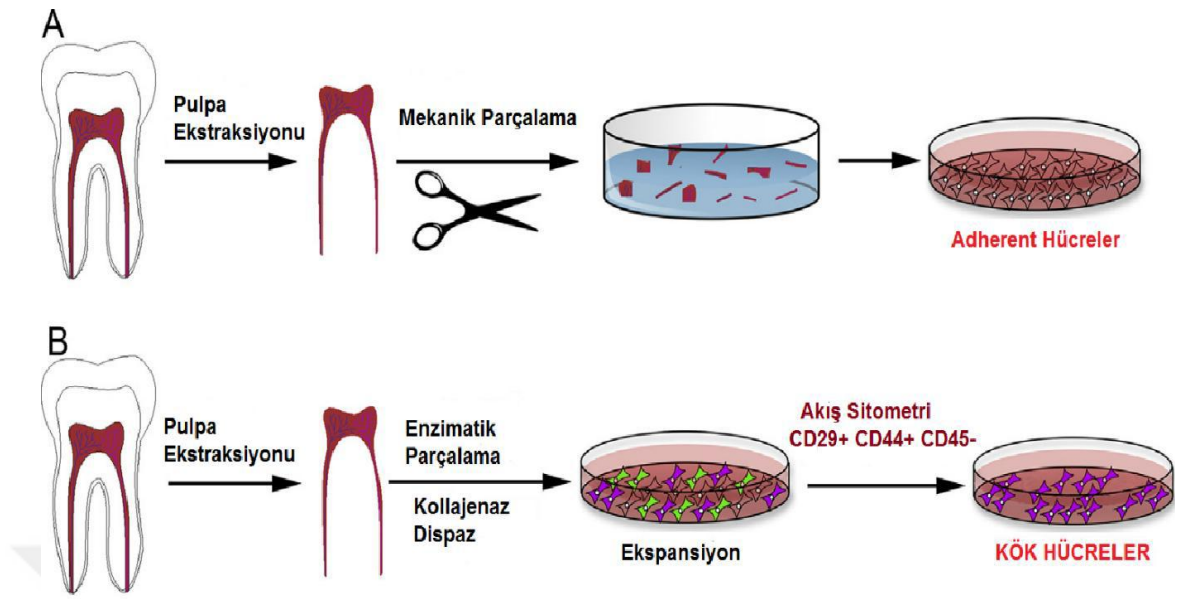
Dental pulpa kök hücrelerinin izolasyonu için yaygın bir şekilde kullanılan iki yöntem vardır:

Bunlar; eksplant metod ve pulpa dokusunu enzimatik parçalama metodudur (Şekil 3) (67). Eksplant yöntem; doku fragmentlerinden hücrelerin, dokudan bulunduğu kültür kabına doğru büyümesi ve daha sonra plastik bir yüzeye tutunması esasına dayanır (68, 69). İkinci teknik olan enzimatik parçalama; dental pulpanın steril bir şekilde cerrahi yöntemle çıkarılması ve kollajenaz / dispaz ile parçalanmasından ibarettir ve spesifik markırların kullanımı ve görüntülenmesi ile karakterizasyonu esasına dayanır (70).

Yapılan bir çalışmada eksplant yöntemde dental pulpa kaynaklı mezenkimal kök hücrelerinin iskelet kas fiberlerine farklılaşmaya izin verdiği gösterilmiştir (71). Enzimatik parçalanma ile izolasyon hem morfolojik hem de antijenik karakteristikler kullanılarak izole edilen dental pulpa kök hücrelerinin Floresan Aktif Hücre Ayrılması (FACS) ile akım sitometrisinin kullanımına dayanır (72).

Farklı MKH markırları, çeşitli biyolojik davranış sergileyen dental pulpa kaynaklı mezenkimal kök hücrelerinin farklı alt popülasyonlarını seçmek için kullanılmaktadır (72).

Yang et al. (73) odontojenik ve osteojenik özelliklere sahip olan dental pulpa kaynaklı mezenkimal kök hücreleri bir alt grubunu STRO1 ile tanımladıklarını göstermişlerdir. Bir diğer çalışmada ise dental pulpa kaynaklı mezenkimal kök hücre popülasyonunun CD34 ve CD117 için pozitif, CD45 için negatif olduğu bildirilmiştir (70). Bu popülasyonun yüksek derecede kendini yenileyen ve osteojenik farklılaşma yeteneğinde olan ve in vitro otolog fibröz kemik doku içerisinde farelere implante edildiğinde kemik dokunun onarımını sağlayan hücreleri içerdiği, aynı zamanda 80 pasaj kadar canlılığını sürdürebildiği ve plastisite ve kemik çöküntüleri ile nodüller oluşturabilme yeteneğine sahip olduğu bildirilmiştir (70, 74). Bu yetenekleri hücre-hücre etkileşimleri kaybolmadığı sürece devam etmektedir ve bu özellik ekstraselüler matriks oluşturmak için temeldir (71). Dental pulpa kaynaklı mezenkimal kök hücreler tarafından eksprese edilen diğer belirteçler CD29, CD44, CD73, CD105 ve mezenkimal kök hücrelere dair bütün belirteçleridir. Bu belirteçler dental pulpa kaynaklı mezenkimal kök hücre izolasyonu için değil sadece onların karakterizasyonu için kullanılırlar. Dental pulpa kaynaklı mezenkimal kök hücrelerinin, aynı zamanda pluri/multipotensi'nin devamında rol oynayan OCT4 ve Nanog gibi transkripsiyonel faktörleri eksprese ettikleri bildirilmiştir (75).



Şekil 5. Dental pulpa kaynaklı mezenkimal kök hücre izolasyon yöntemleri (67).

- A) Eksplant metod. Dental pulpa dokusu mekanik olarak küçük fragmentlere ayrıldıktan sonra medyum içerisinde kültür edilir.
- B) Enzimatik parçalanma metodu. Dental pulpa dokusu kollajenaz/dispaz ile parçalanır ve daha sonra elde edilen hücre süspansiyonu akım sitometrisi ile kök hücre belirteçleri ekspresyonları için ölçümleri yapılır

2.2.6. Dental Pulpa Kök Hücrelerinin Farklaşması ve Sinyal Molekülleri

Büyüme faktörleri ve morfogenetik faktörler spesifik membran reseptörlerine bağlanan proteinlerdir ve hücre fonksiyonlarının tümünü koordine eden bir seri sinyal yollarını tetiklerler. Bu moleküller embriyo gelişiminde tüm doku ve organların üretilmesini düzenlerler ve kök hücrelerin akıbetini belirleyen rehber bir süreç olarak gelişim esnasında kritik bir rol oynarlar. Embriyogenez ve fizyolojik doku rejenerasyonuna rehberlik eden bu büyüme faktörleri doku mühendisliği aracılığıyla yeni bir doku ya da organ üretmede teröpatik olarak kullanılabilir (76). Daha spesifik bir şekilde dentinogenezi düzenleyen morfogenetik faktörler ve dentinogenez onarımını düzenleyen faktörler arasında birçok benzerlik vardır (77). Dental doku mühendisliğindeki sonuçlar, odontogenezin hücresel ve moleküler mekanizmaları üzerine çalışmalara odaklanmıştır. Büyüme faktörleri dentin ve pulpada onarım süreçlerindeki sinyallerde önemli bir role sahiptir (77, 78). Aslında TGF-Beta, BMP, platelet kaynaklı büyüme faktörleri, FGF ve VEGF dentinogenez sırasında dentin matriksi ile işbirliği içindedir (79, 80). İlginç bir şekilde dentinden salınan bu faktörler

dental pulpa ve tersiyer dentin üretimine yol açan hücrel yanıtı indüklemeye potansiyeline sahip biyoaktif moleküllerdir (78, 81). Bu gibi olaylar dental pulpa kök hücrelerinin odontoblastlara farklılaşabilmeleri ve mineralize matriks sekresyonu için gereklidir (82, 83).

Dentinden salınan büyüme faktörleri yaralanmalara karşı dental dokuları rejenere ederek önemli bir savunma mekanizması oluşturmaktadır (76). 1990'ların başlarında çalışmalar BMP'lerin (BMP2, BMP4, BMP7) hayvan modellerinde dentin rejenerasyonunu indükleyen sinyalleri tetiklediklerini göstermektedir (84, 85). Fakat BMP'lerin dentin oluşumunu indüklemeye yetenekleri sınırsız değildir. Aynı zamanda BSP pulpa odak noktalarında mineralize matriks sekresyon yeteneğinde olan hücrelere doğru dental pulpa kök hücrelerinin farklılaşmasını uyarabilmektedir (86, 87). Bariz bir şekilde tüm bu morfogenetik faktörler dentin matriksinde bulunmaktadır ve dental pulpa kök hücrelerinin odontoblast benzeri hücrelere farklılaşmasını indüklediği bildirilmektedir (86, 88, 89). Dental pulpa kök hücrelerinin multipotensisini gösteren birçok çalışma vardır. Çeşitli çalışmalar dental pulpa kök hücrelerinin dexametazon, beta gliserofosfat ve askorbik asit ile takviye edilmiş osteojenik medyumda kültür edildiğinde osteoblastlara farklılaştıklarını göstermektedir (90). Laino et al. yaptığı bir çalışmada ise CD34+ CD117+ dental pulpa kök hücrelerinin osteojenik indükleyiciler olmadan % 20 Fetal Bovine Serum (FBS) ile takviye edilen standart medyum ile osteoblastlara farklılaşabildiklerini göstermişlerdir (71). Son zamanlarda RNA interferans tarafından belirli histon deasetilazların spesifik baskılanması ile osteoblast farklılaşması artırılabilir (61). Osteoblastlara farklılaşmalarının yanı sıra dental pulpa kök hücreleri uygun uyarıları aldıklarında kondrojenik, adipojenik, miyogenik, nörojenik ve melanositlere farklılaştırıldıkları da yapılan çalışmalarda rapor edilmiştir (91).

2.3. KÖK HÜCRELERİN ELDESİ

Mezenkimal kök hücre insanlarda çoğunlukla superior iliak kanaldan alınan kemik iliği aspiratından izole edilmektedir. Ancak femoral ve tibial medullar kısımlarından ve toraksik ve lomber vertebralardan da elde edilebilirler. Büyük hayvanlarda benzer bölgelerden alınırken, kemirgenlerde genellikle tibia ve femur diafizinden alınmaktadır (92).

Kemik iliğinden elde edilen çekirdekli hücrelerin genç erişkin dönemde 1/10.000'i, erişkinde 1/250.000'i ve 80 yaşından sonra 1/2.000.000'i ancak MKH'dır. Kök hücreler

elde edilirken heparinize edilmiş enjektöre alınan kemik iliği aspiratı serum fizyolojik ya da PBS (Phosphate-buffered saline-fosfat tamponlu serum) ile seyreltilerek fikoldan sitegradiyent yöntemi ile mononükleer hücre ayrımı yapılır. Fikol süpernatından ayrılan hücre çökeltisi %20-30 FBS (Fetal Bovine Serum-Fetal sığır serum) içeren DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) besiyerinde süspanse edilir. Hücre kültür flasklarından 48-72 saat 37 derece sıcaklıkta, %5 karbondioksit (CO₂) içeren inkübatörlere bırakılır. Bu süre sonunda süpernatant ve plastiğe yapışmayan hücreler kültürü sürdürülür. Hücreler flask tabanının %70-80 ini kapladıklarında tripsinasyon işlemi yapılarak yapışan hücreler aspire edilerek uzaklaştırılır. Sonrasında hücreler bölünerek taze besiyeri yerine nakledilir. Ortalama 2-6 pasaj sonra istenilen hücre sayısına ulaşılmış olur. Kullanıma hazır hale gelen hücreler daha sonra çalışılmak üzere dondurularak -80 ile -196 derece de muhafaza edilir (92).

2.4. KÖK HÜCRELERİN KULLANIM ALANLARI

Kök hücre araştırmaları, temel ve klinik bilimlerin yer aldığı çok sayıda alanda devam etmektedir. Kök hücreler kullanılarak insana özgü hastalık modellerinin oluşturulmasında faydalanmak hedef kullanım alanlarından bir tanesidir. Embriyonik hücre araştırmaları ile ilgili verilere in elde edildiği fare embriyosu kaynaklı kök hücrelerinde, mutasyona uğramış insan genleri kullanılarak gen aktarımı ile sinir sistemi hastalıklarının modellenmesi için kullanılmaktadır (93, 94).

Kök hücre çalışmalarının klinik bilimler açısından en fazla dikkat çeken alanı, uyarılmış pluripotent veya multipotent kök hücrelerin hasarlı ya da hastalıklı dokuların yedeklenmesinde değerlendirilmesini içeren hücre tedavileridir. Günümüzde bu amaçla özellikle organ transplantasyonu yapılmaktadır.

Araştırmacılar, uzun yıllardır hasarlı hücre ve dokuları yedekleyebilmek amacıyla kullanmanın yolları üzerine çalışmaktadırlar (95).

Kök hücreler genel olarak; lösemi, spinal kord yaralanmaları, parkinson hastalığı, felç, yanıklar gibi birçok hastalıkla birlikte özellikle ağız bölgesinde tümör rezeksiyonu ardından hasara uğrayan dokuların rejeneratif tedavisi için gerekli yapıların yerine konabileceği devamlı kaynak sağlayabilmektedir (96).

Tablo 3. Kök Hücrelerin Farklılaşma Kapasiteleri ve Rejeneratif Medikal Tedavilerde Kullanılma Potansiyelleri

Tedavilerin Yapılabileceği Durumlar	Kök Hücre Tipleri	Farklılaştıkları Hücreler
Lösemi	MKH	Hematopetik progenitör hücreler
Spina kord yaralanmaları	Embriyonik kök hücreler	Myelin kılıfı üreten oligodendrosit
Parkinson hastalığı	Embriyonik kök hücreler	Dopamin üreten hücre
Diabet	Embriyonik kök hücreler, MKH	İnsülin üreten beta hücre
Myokard yenilenmesi	Embriyonik kök hücreler, MKH, Kardiak kök hücre	Kardiomyosit Yeni kapiller
Anti-aging	MKH	Adiposit
Kemik, kıkırdak, tendon rejenerasyonu	MKH	Osteogenezis Adipogenezis Kondrogenezis

2.5. KÖK HÜCRENİN DIŞ HEKİMLİĞİ UYGULAMA ALANLARI VE GELECEKTEN BEKLENTİLERİ

Erişkin insan diş pulpasından izole edilen mezenkimal kök hücrelerin karakterizasyon araştırmaları ile in vitro epitelyal ve fibroblastik farklılaşma kapasiteleri değerlendirilmektedir. Bu hücrelerin literatürde belirlenmiş özellikleri kıyaslandığında çoğunlukla kemik iliği kaynaklı MKH'lere benzer immunofenotipik özellikler gösterdikleri belirlenmiştir. Farklılaşmayı indükleyen büyüme faktörlerinin varlığında epitelyum ve fibroblast benzeri morfolojik ve immuno histokimyasal değişim gösterdikleri tespit edilmiştir. Fakat kesin bir sonuca varılabilmesi için, elde edilen verilerin mRNA düzeyinde gerçekleştirilecek araştırmalarla da desteklenmesi gerekmektedir (94). Farklılaşma potansiyelleri ile pulpa kaynaklı MKH'ler, deri başta olmak üzere mide iç yüzeyi, ürogenital sistem ve göğüs kanalları gibi organ kavitetlerinde meydana gelen epitelyum hücre hasarlarının klinik tedavileri, bağ doku ve

ekstrasellüler matriksin yeniden yapılandırılmasını içeren klinik uygulamalar ve doku mühendisliği araştırmalarında kullanılabilecek önemli bir alternatif kaynak olacaktır.

Diş kaynaklı kök hücreler, tedavi uygulamaları için özelliklerin tamamına sahiptirler (94). Ayrıca pek çok avantaj sağlamaktadır. Bunlar;

1. Elde edilmesi kolaydır.
2. Hücre ekstraksiyonunun etkinliği daha yüksektir.
3. Farklılaşma yetenekleri yüksektir.
4. Biyomateriyallerin kullanıldığı çalışmalarda dokuların yeniden yapılandırılması için etkin kullanım alanları vardır.
5. Hayatta kalma süreleri uzundur.
6. Güvenli bir şekilde kriyo prezervasyonları yapılabilir (97).

Sağlıklı insan dişlerinden izole edilen kök hücrelerin dondurularak saklanması sonrasında çözülmesi ile elde edilen yüksek hücre canlılık oranları, bu hücrelerin ihtiyaç halinde kullanılmak üzere saklanabileceğini ortaya koymuştur (94). Bu kök hücreler, anti-inflamatuar ve immunmodülatör özelliktedirler. Pulpa ve diş destek doku kaynaklı enfeksiyonlarda, immun cevabın oluşumunda proinflamatuar transkripiyon faktörü NF-B aracılığıyla rol oynamaktadırlar. Allojenik dokulara transplante edildiklerinde ise immunolojik tolerans gelişimini indüklemektedirler. Pulpa kaynaklı MKH'ler bağışıklık sisteminin baskılayıcı etkilerini T lenfositlerin proliferasyonunu inhibe ederek göstermektedirler (94).

Üçüncü molar dişlerden elde edilen MKH'lerin dentin yapıcı odontoblastlar, osteoblastlar, yağ hücreleri, iskelet/düz kas hücreleri, endotel hücreleri ve sinir hücrelerine diferansiye olabildiği literatürde bildirilmiştir (94). Bununla birlikte Graziano, A. et al. (94) 2008 yılında yaptıkları çalışmada, diş pulpası kaynaklı kök hücrelerin mezenkimal ve mezenkimal olmayan dokuların hücrelerine farklılaşabildiğini göstermektedir. Yapılan son çalışmalar ise bu hücrelerin multipotent nöral krest kök hücreleri olabileceğine dair kanıtlar içermektedir. Ayrıca immun sistemi baskılanmış farelerde yapılan araştırmalar, pulpa kaynaklı MKH'lerin, kafatasında oluşturulmuş geniş defektlerin onarılmasında kullanılabilecek önemli bir hücre kaynağı oluşturduğunu göstermiştir (92). Pulpa kaynaklı MKH'ler bu özellikleri sayesinde dentin, pulpa, periodontal doku ve kırık dokuların onarımında, immun sistem ve kassal hastalıklarının tedavisinde klinik uygulamalarda kayda değer kullanım potansiyelleri bulunmaktadır (92).

Tablo 4. Dental Pulpa Kaynaklı MKH ve Kemik İliği Kaynaklı MKH'lerin hücre marker ekspresyonlarının karşılaştırılması

Yüzey Antijeni	DPSCs	SHED	Kemik iliği MKH
CD 14	-	-	-
CD 34	-	-	-
CD 44	++	++	++
CD 45	-	-	-
CD 106	+	+/-	++
CD 146	++/+/-	++/+/-	++/+/-
Stro-1	++/+/-	++/+/-	++/+/-
Tip-I kollagen	++	++	++
Tip-III kollagen	++/+	++/+/-	++/+
Osteokalsin	++/+	++/+/-	++/-
Osteonektin	++/+	++/+	++/+
Osteopontin	++/-	++/-	++/-

2.6. REJENERATİF ENDODONTİK UYGULAMALAR

2.6.1. Kök Kanalının Revaskülarizasyonu

Dişlerin yapısal bütünlüğünü geri dönüşümsüz olarak bozan problemlerin başında diş çürüğü bulunmaktadır. Çürük dişlerin restorasyonu sırasında kullanılan birçok dental materyal pulpa hücrelerinin hasarına ve ölümüne sebep olmakta, aşırı kron harabiyeti olan dişlerde ise endodontik tedavilerin yerine dişin çekimi planlanarak; diş kaybı protez veya implant tedavileri ile telafi edilmeye çalışılmaktadır (2, 98). Bu şekildeki kayıpların önlenmesi için; pulpa-dentin kompleksinin rejenerasyonu operatif dişhekimliğinin ve endodontinin ana hedeflerinden biri olmuştur (98) Tablo 5.

Endodontik tedavi, diğer bir deyişle kök kanal tedavisi diş hekimleri tarafından en çok uygulanan tedavi işlemlerinden biridir. Endodontik tedavilerde temel amaç enfekte veya hasarlı pulpa dokusunun uzaklaştırılmasıyla oluşan boşluğun enfeksiyon riskine karşı biyouyumlu materyallerle doldurulmasıdır. Son zamanlardaki yeni dental materyaller ve tedavi uygulamaları ile endodontik tedavilerin başarısı önemli ölçüde artmıştır. Pulpası

uzaklaştırılmış bu dişlerin başarılı bir endodontik tedavi neticesinde uzun süre ağızda kalabilmelerine rağmen, diş pulpasının canlılığını korumanın pek çok avantajı bulunmaktadır. Vital pulpada yapımı devam eden reperatif dentin oluşumu, apikal gelişim ve dentin duvarlarının gelişimi sebebiyle özellikle immatür daimi dişler için önemlidir. Pulpa canlılığını devam ettirmenin bir diğer avantajı ise sınırlı da olsa dentin rejenerasyonuna devam edebilmesidir. Ayrıca özellikle endodontik tedavili dişlerde, uygulanan dolgu materyallerine veya kanal patlarının özelliklerine bağlı olarak renk değişikliği olabilmekte; bu da estetik olumsuzluklarla sonuçlanabilmektedir (99).

Rutin uygulamalarda apikal periodontitisli, immatür daimi dişlerde apeksifikasyon tedavileri yapılmaktadır. Apeksifikasyon tedavisi açık apekte kalsifiye bariyer oluşturma yöntemi olarak tanımlanmaktadır. Bu tedavi şeklinde çok sayıda farklı materyal uygulanabilmektedir ancak aralarında en sık kullanılanları kalsiyum hidroksit ve mineral trioksit agregat (MTA)dır. Bu materyallerin içinde kalsiyum hidroksit, günümüzde sıklıkla hem başlangıç ve hem de ara seanslarda sıklıkla kullanılmaktadır. Apikalde kalsifiye bariyerin olduğu görüldüğünde ise kök genellikle kanal patı ve gutta perka ile doldurularak apeksifikasyon tedavisi bitirilmektedir. Apeksifikasyon tedavisi yapıldıktan sonra birtakım olumlu sonuçlara ulaşılsa da uzun süreli takip gerektiren tedavinin, pöröz bariyer oluşumu ve apikal kapanmadaki yetersizlik gibi kısıtlı tarafları bulunmaktadır. Bunun dışında birtakım araştırmalarda uzun dönem kalsiyum hidroksit uygulanmasının dentin duvarlarının ince kalmasına sebep olduğu ve bununla birlikte kırılmaya yatkınlığın arttığı bildirilmiştir (100-101).

Apeksifikasyon tedavilerinde kullanılabilecek materyallerden bir diğeri olan MTA ile tek seansta apeksifikasyon yapılan vakalarda oldukça başarılı sonuçlara ulaşılmıştır (102, 103). Ancak bu tedavi şeklinde de uygulanan MTA'nın kökü güçlendirmedeği gibi kalsiyum hidroksitin kökün kırılmalara olan dayanımını azalttığı bildirilmiştir (102). Bütün alternatif tedavi uygulamaları değerlendirildiğinde en iyi olduğu düşünülen MTA'nın bile az da olsa dezavantajlarının olduğu görülmesi sebebiyle yerine tüm olası komplikasyonları ortadan kaldırmaj amacıyla değişik tedavi protokolleri geliştirilmeye çalışılmıştır.

Son zamanlarda nekrotik pulpalı immatür dişlerin tedavisinde revaskülarizasyon tedavilerinin kullanılması önerilmektedir (104). Bu tedavide; sert doku birikimi ile kök kanal duvarlarında kalınlaşma sağlamakta ve kök gelişiminin devam etmesini desteklemektedir (105-107).

Pulpa-dentin kompleksinin rejenerasyonu ile ilgili çalışmaların tarihi çok eskilere uzanmaktadır. 1962'de Ostby, 1966'da Rule ve Winter çocuklarda pulpa nekrozu durumlarında kök gelişimi ve apikal tıkanmayla ilgili, 1971'de Nygaard-Ostby ve Hjortdal pulpal rejenerasyonla ilgili çalışmışlardır (108,109,110). Bu çalışmalardan elde edilen sonuçlara bakıldığında; o yıllarda kullanılan materyal ve enstrümanlar yeterli ve güvenli olmadığından sonuçları farklı çıkmıştır. Bu çelişkili sonuçlar bir süre daha diğer geleneksel tekniklerin kullanımına sebep olsa da günümüzde şu an için rejeneratif tedavide kullanılan materyaller, enstrüman ve metotlar ile doku mühendisliği gibi alanların katkılarıyla tekniğin kullanımı oldukça gelişmiştir.

Rejeneratif endodontik prosedürler, pulpa-dentin kompleksindeki hücreler ve ek olarak dentin ve kökü içeren hasar görmüş bütün yapıların yenisi ile yer değiştirmesi temeline dayanan biyolojik temelli işlemler olarak tanımlanmaktadır(2). Bu şekilde dişin fonksiyonel özellikleri tekrar kazandırılır, immatür dişler kök gelişimini devam ettirebilir ve apikal periodontitisin oluşumu engellenir, oluşmuş periodontitis ortadan kaldırılır. Sonuçta apekte oluşturulmuş sert doku, kemik ve sement benzeri bir doku olarak tanımlanmakta ve devam eden kök gelişimi apikal sement depolanması ile açıklanmaktadır (111, 112).

Apekte ve kanal boşluğunda yeni oluşan dokuların kaynağı ve doğasını açıklayan değişik mekanizmalar bulunmaktadır (113). Kök kanalının apikal ucunda bulunan canlı ve az sayıdaki pulpa hücrelerinin yeni matriks oluşturarak kökün gelişmesini ve sağlamlaşmasını sağlayacak odontoblastlara farklılaşması olasılığı bunlardan bir tanesidir (105). Ayrıca kök gelişimini açıklayan olası mekanizmalarda apikal papilladaki kök hücreler ve kemik iliğinin de etkili olabileceği bildirilmiştir. Apikal papilla dokusu içeriğindeki spesifik kök hücreler ile pulpa dokusunu yenileme ve kök gelişimini sürdürme potansiyeline sahiptir (106). Muhtemel bir diğer hipotez ise proliferasyon olarak kök kanal içine büyüyen ve dentinin iç yüzeyinde sement ve kemik gibi sert dokuları depolayan, periodontal ligamentteki kök hücrelerdir. Kök gelişiminin devamını sağlayan bir diğer olası mekanizma da olgunlaşmamış diş içinde bolca bulunan çok yönlü etkili pulpal kök hücreleridir (113). Kan pıhtısı ise içerisindeki büyüme faktörleri sayesinde farklılaşmayı ve büyümeyi; odontoblastların, fibroblastların ve sementoblastların gelişimini indükleyerek rejenerasyonun sağlanmasına önemli bir katkıda bulunmaktadır (36).

Tedaviler sonrasında oluşturulan yeni yapının ise pulpa veya pulpa benzeri bir doku olup olmadığı sorun teşkil etmemektedir. En önemlisi kök kanallarında ve apekte gelişimin sürdürülebilmesidir. Bu sayede dişin kırılmalara karşı direnci artmaktadır. Travmatik avulsiyon ve replantasyondan sonra nadir vakalarda görülen apikal dokuların rejenerasyonu, nekrotik ve enfekte dişlerde de pulpa dokusunun tamamen rejenere olabileceğine dair çalışmalara öncülük etmiştir (114). Böylece yeni doku ve pulpanın enfeksiyonu arasındaki mücadele yeni dokunun lehine sonuçlanmaktadır. Bu bilgilerden yola çıkıldığında travmaya uğramış dişin kanal enfeksiyonu kontrol altına alındığında, nekrotik ama steril pulpa boşluğuna sahip avulse diş durumuna dönüşmektedir. Sonuç olarak, revaskülarizasyonun temelinde, steril doku matriksi varsa buralarda yeni hücreler gelişebilmekte ve pulpa vitalitesi tekrar sağlanabilmektedir.

Enfekte pulpalı ve apikal periodontitisli dişlerde revaskülarizasyon tedavilerine beş farklı tipte yanıt alınabileceği gözlemlenmiştir (115).

- Tip1- Kanal duvarlarında kalınlaşma ve kök gelişiminin devam etmesi
- Tip2- Kök ucunun künt ve kapanmış olmasıyla beraber kök gelişiminin durmuş olması
- Tip3- Kök gelişiminin devam etmesi fakat apeksin açık kalması
- Tip4- Kanal boşluğunda yaygın kalsifikasyon
- Tip5- Kök apeksi ve koronal MTA arasında sert doku bariyeri oluşumu

Ayrıca iyileşmeye dair hiçbir bulgu yoksa fistül kaybolmuyorsa, ağrı ve şişlik devam ediyorsa; diğer tedavi protokolleri denenmesi önerilmektedir (115).

2.6.2. Revaskülarizasyon Uygulama Yöntemi

Tedavi yapılması planlanan dişe lokal anestezi ve izolasyon sağlandıktan sonra endodontik giriş kavitesi açılır. Bir enjektör apekten 1 mm yukarıya yerleştirilir ve kanal yavaşça sodyum hipoklorit veya klorheksidin glukonat ile yıkanır. Kök kanallarında irrigasyon materyali kullanılırken, enstrumantasyon yapılmaz. Kök kanallarının minimum irritasyonu ve preparasyonu ile kanallarda daha fazla canlı pulpa dokusunun kalması amaçlanır. Nekrotik pulpalı dişlerin revaskülarizasyonunda enfeksiyonun kontrolü en önemli basamaktır. Bu dişlerde mekanik preparasyon yapılmadığı için, enfeksiyon kontrolü sadece irrigasyon maddeleri ve kanal içi patlarla sağlanır.

Kanalda bakterinin varlığı başarılı bir revaskülarizasyon tedavisi için kritiktir; çünkü yeni dokunun gelişimi kanal boşluğunda bakteri ile karşılaştığında duracaktır (116, 117).

En etkili kanal dezenfeksiyon yöntemi mekanik debridman ve kimyasal irrigasyona ilaveten uygulanan kanal içi ilaçlarla sağlanmaktadır. Bu tür dişlerde mekanik preperasyon sadece pulpanın ekstirpasyonunu içerecek şekilde minimal düzeyde tutulmalıdır. Dezenfeksiyon aşaması sadece irriganlar ve kanal içi ilaçlarla sağlanacağından revaskülarizasyonun en önemli aşamasını oluşturmaktadır (118). Ancak açık apeksli dişlerde iyi bir preparasyon ve sitotoksik antiseptiklerin kullanımı apikal bölgede iyi beslenen ve canlılığını sürdüren pulpa hücrelerini uzaklaştırabilmektedir (119, 120). Bu dokuların uzaklaştırılması pulpaya ve dentine dönüşme potansiyeline sahip hücrelerin uzaklaştırılması anlamına gelmektedir.

Tam bir irrigasyondan sonra kanal kurulum kâğıdı ile kurulanır ve antimikrobiyal pat kanala yerleştirilir (121). Amaç, kanal dezenfeksiyonunu ve vital dokuların canlılıklarının devamını sağlamaktır. Giriş kavitesinin MTA ve cam iyonomer siman ile kapatılması gerektiğini ileri süren araştırmacılar olduğu gibi geçici dolgu maddesi veya cam iyonomer siman ile kapatılmasını önerenler araştırmacılar bulunmaktadır.

İki hafta sonra hasta değerlendirme için çağrılır. Diş asemptomatik ise ve klinik bulgulara gerileme varsa diş tekrar açılır ve kanama oluşuncaya kadar steril paslanmaz çelik endodontik K-tipi el eğesi ile irrite edilir. Murray et al. (2) kapalı apekse sahip nekrotik pulpalı dişlerde revaskülarizasyon sağlanması için apikalın 1-2 mm genişliğinde enstrumante edilmesi gerektiğini göstermişlerdir. Amaç, bölgesel kanamayı kök kanalına yönlendirmektir. Kanamanın kanalın içini doldurması beklenir. Böylece yeni dokular kök kanal sistemine kolaylıkla girebilecek ve göreceli olarak uzak olan pulpa boynuzuna ulaşacaktır. Kan pıhtısı oluşumu protein iskeleti oluşmasına hizmet etmekte; bu da dokunun pulpa odasında 3 boyutlu gelişimine izin vermektedir. Başarılı bir tedavi için bir diğer şart; revaskülarizasyondan önce pulpa odasına bakteri invazyonunu engellemek için bakteri geçirmez bir örtü ile kapatılmasıdır.

Rezin kullanarak uygulanan koronal örtü yerine çift kat MTA'nın mine-sement sınırının altına kadar kullanılması tercih edilir. MTA'nın biyoyumluluğunun ve mikrosızıntıyı önleyici özelliğinin çok iyi olması tercih edilme nedenidir. Ayrıca cam iyonomer rezin ile birlikte uygulanması örtücü özelliğini ve sağlamlığını artırmaktadır. Islak pamuk pelet MTA'nın üzerine yerleştirilir, 2-3 gün sonra MTA kontrol edilir ve giriş kavitesi

cam ionomer veya kompozit rezin ile restore edilir. Daha sonra hasta kök oluşumunu takibi için klinik ve radyografik olarak 3-6 aylık aralarla takip edilir.

Bu teknik ile birlikte oluşturulan rejenere doku yapısının pulpa ile benzerliği tam olarak açıklanamamıştır. Fakat bu tekniği içeren ve yayın haline getirilmiş vaka raporları, kök formasyonunun devam ettiği ve termal pulpa testleri sonucunda pozitif cevap veren bir iyileşmenin olduğunu bildirmişlerdir (105). Tekniğin doku mühendisliği prensipleri açısından güvenilir olup olmadığı ise halen tartışma konusudur (2).

2.6.3. Kök Kanallarının Revaskülarizasyonunda Kullanılan Kanal İçi Medikamanlar

2.6.3.1. Antibiyotik Karışımı

Üçlü antibiyotik patı (TAP): Siprofloksasin, metronidazol ve minosiklin karışımının endodontik patojenler üzerine etkinliği in vivo ve in vitro olarak gösterilmiştir (122). Hoshino et al. (121) ilaçların yalnız kullanılmalarına kıyasla, kombine edildiklerinde etkinliklerinin arttığını ve ilaçların hiçbirinin bakterileri bütünüyle ortadan kaldıramadıklarını bildirmişlerdir. Ek olarak, Sato et al. (122) araştırmalarında; siprofloksasin, metronidazol ve minosiklin kombinasyonun kök kanalındaki dentinin derin tabakalarındaki bakterilere karşı da etkin olduğunu göstermişlerdir. Windley et al. (123) apikal periodontitisli immatür köpek dişlerinde yaptıkları çalışmalarında üçlü antibiyotik patının dezenfeksiyon etkisi olduğunu bildirmişlerdir. Bu konuda yapılmış çalışmalar, üçlü antibiyotik patı kalsiyum hidroksit yerine kullanıldığında kanal içerisindeki boşluklara pulpa dokusunun daha iyi rejenere olabileceği bildirmişlerdir (104, 111).

Üçlü antibiyotik patı, içeriğindeki bakteriyostatik (minosiklin) ve bakterisidal (metronidazol, siprofloksasin) kombinasyonlar ile rejenerasyona ve doğal kök kanal yapısının tamamlanmasına izin vermektedir.

Geniş spektrumlu bakterisit olan metronidazolün enfekte nekrotik pulpalı dişten izole edilen anaeroblar üzerine etkinliği gösterilmiştir (124). Uygun irrigasyon solusyonları ve medikamanlar seçilirken antimikrobiyal etkinliklerinin yanı sıra, rejeneratif potansiyellerine de dikkat edilmelidir (2). Örneğin, tetrasiklinin dentindeki konak hücrelerin gelişimini, antimikrobiyal etkinliği ile değil kollojen fibrilleri ve büyüme faktörlerini açığa çıkararak gerçekleştirdiği bilinmektedir.

Topikal doksisisiklin ve minosiklinin avülse olmuş immatür daimi dişlerde radyografik ve histolojik olarak revaskularizasyon sağladığı gösterilmiştir (117, 125).

Diğer antibiyotik karışımları penisilin-basitrasin veya kloramfenikol-streptomisin karışımı veya neomisin, polimiksin ve nistatin karışımı daha önceki çalışmalarda değerlendirilmiştir. Bu patların her ikisinin de kanal içi medikaman olarak sınırlı etkilerinin olduğu bildirilmiştir. Molander et al. (126) yaptıkları çalışmada klindamisin kalsiyum hidroksit ve diğer geleneksel kanal patlarına kıyasla avantajı olmadığını göstermişlerdir.

Bir antibiyotik veya antibiyotik kombinasyonunun kanal içinde kullanımı çeşitli endişeler oluşturmaktadır. İlk olarak, minosiklin kullanımına bağlı renk değişikliği materyalin kuvvetli antimikrobiyal etkinliği olmasına rağmen özellikle anterior dişlerde dezavantaj oluşturmaktadır (121, 127). Diğer riskler ise, endodontik enfeksiyonlardaki bakterilerin direnç kazanabilmesi ve alerjik reaksiyon veya duyarlılık görülmeyen bir hastada duyarlılığı tetikleyebilmesidir (128, 129). Bu sebeplerden, tedavi süresinde antimikrobiyal ajanın verilme şekline bakılmaksızın hastanın tam ve kapsamlı sistemik ve dental hikâyesini öğrenme gerekliliği bulunmaktadır (130).

Bu sebeplerden dezavantajları ortadan kaldırılabilmek amacı ile çeşitli antibiyotik kombinasyonları literatürde yer almaya başlamıştır. Bunlardan bazıları ikili antibiyotik patı (metronidazol-siprofloksasin, DAP) ve modifiye üçlü antibiyotik patı (metronidazol- siprofloksasin-sefaklor, MTAP) dır (89).

2.6.3.2. Kalsiyum Hidroksit

Kalsiyum hidroksitin diş hekimliğinde kullanımı 1930 yılında Hermann tarafından önerilmiştir.

Kalsiyum hidroksit beyaz, kokusuz bir tozdur ve molekül ağırlığı 74,08'dir. Suda çözünürlüğü azdır ve sıcaklığın artması ile azalır, alkolde çözünmez. Düşük çözünürlük iyi bir özelliktir çünkü vital dokularla temas halinde iken doku sıvılarında çözünmeden uzun bir periyoda ihtiyacı vardır. Esas etkisi kalsiyum ve hidroksil iyonlarına ayrılması ile oluşur ve bu iyonlar, canlı dokular ve bakteriler üzerindeki sert doku depozisyonu ve anti bakteriyel etkisini indükler. Fakat kalsiyum iyonu dokuda karbondioksit veya karbonat iyonları ile karşılaştığında kalsiyum karbonat oluşur ki bu mineralizasyon işlemini tüm kalsiyum iyonunu tüketerek yok eder. Kalsiyum karbonatın ise biyolojik ya da anti bakteriyel etkinliği bulunmamaktadır (131, 132).

Günümüzde ideal bir kök kanal ilacı bulunmamakla birlikte, en sık kullanılan intrakanal medikaman kalsiyum hidroksittir (131, 132). Kalsiyum hidroksit yüksek pH'ya bağlı anti bakteriyel özelliğinin olması, doku çözücü özelliğinin olması, kök rezorpsiyonunu durdurması, tamir işlemini hızlandırması ve sert doku oluşumunu uyarması nedenleri ile çalışmacılar tarafından kullanımı uygun bulunmaktadır (133).

Kalsiyum hidroksitin pH'sı yaklaşık 12,5 olduğundan enfekte kök kanallarında sıkça rastlanan bakteri türlerinin çoğu bu madde ile doğrudan temasa geçtikten kısa süre sonra etkisiz hale gelirler. Kalsiyum hidroksitin anti bakteriyel etkinliği sulu ortamda hidroksil iyonları salması ile ilişkilidir. Hidroksil iyonları, bakterilerde sitoplazmik membranda hasar, protein denatürasyonu ve DNA hasarı meydana getirerek etki eder. Kalsiyum hidroksit, ayrıca hem vital hem de devital pulpa dokusu üzerine ayrı ayrı etkilerde bulunabilmektedir. Buna neden olan olay dokuların içerdikleri (CO₂) miktarıdır.

Kalsiyum hidroksit çeşitli amaçlar için kullanım alanı bulmuştur. Bunlar arasında direkt ve indirekt pulpa kuafajı, kök kanallarının pansumanı, kök rezorpsiyonunun engellenmesi, iatrojenik perforasyonların tamiri, horizontal kök kırıklarının tedavisi ve kök kanal patı olarak kullanımı vardır.

Ancak kanal içerisinde derin dentin kanalları ve yan kanallar, darlıklar, düzensizlikler gibi ulaşılması güç karmaşık kanal yapısı bulunan dişlerde bakteriler alkalik pH'yı nötralize etmekte ve kalsiyum hidroksitin etkisinden korunarak boş kalan bu aralara zamanla çoğalmaktadırlar (134). Bu sebeple son zamanlarda dentin kanallarına ve semente difüze olabilen, periodontal dokulara ve periapikal bölgeye ulaşabilen, analjezik ve antienflamatuar özelliği nedeni ile glukokortikosteroid-antibiyotik bileşiği kanal tedavilerinde kullanılmaya başlanmıştır (129, 135).

2.6.3.3. Mineral Trioksit Agregat

İlk kez 1993 yılında diş hekimliğine tanıtılan MTA, 1998 yılında Amerikan Gıda ve İlaç Yönetimi (FDA) tarafından onay verilmesi ile deneysel ve klinik olarak büyük çapta kullanım alanı bulmuştur (136) (137). Günümüze kadar;

1. Cerrahi ve cerrahi olmayan yaklaşımlarla kök ucu dolgusunda (138-140),
2. Kök ve furkasyon perforasyonlarının tamirinde (137, 141, 142),
3. Süt ve sürekli dişlerin direkt pulpa kuafajında (143, 144),

4. Süt dişi pulpatomi tedavilerinde (145, 146),
5. Cvek pulpatomisinde (147, 148)
6. Dens invajinatusun profilaktik parsiyel pulpatomi tedavisinde (147),
7. Apeksifikasyonlarda (149, 150),
8. Kanal patı olarak daimi dişlerin kök kanal tedavisinde (151),
9. Retine süt dişlerinin kök kanal tedavisinde (152)
10. Rezorptif defektlerin tamirinde (153, 154),
11. Devital dişlerin kanal içi beyazlatma işlemlerinde bariyer olarak (155)
12. Füzyon gözlenen ve endodontik tedavi ihtiyacı olan dişlerin iletişim bölgesini kapamada kullanıldığı görülmektedir (156).

İçerik özellikleri; Ağırlıkça %75 portland çimentosu, %5 alçı ve %20 bizmut oksit den oluşmaktadır. Materyalin sertleşme zamanı içeriğindeki alçı ile (157), opasitesi ise ilave edilen bizmutoksit ile sağlanmaktadır (158, 159).

Beyaz ve gri MTA'nın içerik olarak özellikleri benzerlik göstermektedir (159). Fakat, renk özellikleri geliştirilerek 2002 yılında piyasaya sürülen beyaz MTA'da olası renkleşme problemlerini ortadan kaldırmak amacı ile yapıdan tetrakalsiyum alumina ferrit çıkarılmıştır. Gri ve beyaz MTA'nın içerik özelliklerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada, beyaz MTA'da demir oksit (%100), alüminyum oksit (%122) ve magnezyum oksit (%130) konsantrasyonlarının gri MTA'ya göre önemli oranlarda azaltıldığı bildirilmiştir (160).

Fizik ve Mekanik Özellikleri; MTA tozu su ile karıştırıldığında, yaklaşık 3 saat içerisinde sertleşen kolleidal jel formuna dönüşmektedir (158). Fakat , beyaz MTA'da sertleşme sürecinin daha uzun olduğunu görüş bildiren araştırmalar bulunmkatadır (161, 162).

Sertleşme reaksiyonu 24 saatten uzun sürmekle birlikte, MTA'nın sertleşmesi su veya kan varlığından etkilenmemektedir (138, 163).

MTA karışımının özellikleri; parçacık büyüklüğüne, toz/sıvı oranına, uygulama sahasının ısisına, alandaki nem varlığına ve karışım içindeki hava kabarcıklarına bağlı olarak değişebilmektedir (164). Sertleşme reaksiyonunun başlangıcında pH 10,2 iken, sertleşme reaksiyonu tamamlandıktan sonra, kalsiyum hidroksit gibi yaklaşık 12,5 değerine yükselmektedir (158). MTA, dentinden ve de IRM ve Super- EBA gibi kök ucu dolgu materyallerinden daha radyoopaktır (158, 165).

Örtücülük Özellikleri; MTA, öncelikle kök ucu dolgu ve perforasyon tamir materyali olarak kullanılmak amacıyla geliştirildiği için örtücülük ve sızıntı değerlerinin bu amaçla kullanılan diğer materyallerle kıyaslandığında çalışmaların tamamında diğer materyallerine benzer yada çok daha iyi olduğu gösterilmiştir (158, 165).

Örtücülük özellikleri bakımından elde edilen başarılı sonuçlar; materyalin doğasına, sertleşme sırasındaki genişlemeye ve antimikrobiyal özelliklerine dayanmaktadır. Materyalin dezavantajı olarak bilinen uzun sertleşme süresi, büzülmenin azalmasına ve dolayısı ile simanın örtücülüğünün gelişimine katkıda bulunduğu gösterilmiştir (144, 158). Ayrıca doku sıvıları ile reaksiyona giren materyalin zamanla çözünmesine bağlı dentin ve apatit tabakası arasındaki geliştiği bildirilen kimyasal reaksiyonun, örtücülüğü geliştirdiği ve başlangıçtaki mekanik tutunmaya ek olarak gelişen bu kimyasal bağlanmanın, örtücülük özelliklerinde etkili olduğu öne sürülmektedir (166).

Etki Mekanizması; MTA'nın etki mekanizmasının yaklaşık olarak kalsiyum hidroksit ile benzerlik sergilediği örtücülük, biyouyum, alkalinite ve özgü diğer özelliklerin mevcut etkilerin ortaya çıkmasında rol oynadığı bildirilmiştir (167-169).

Materyalin ana yapı olarak kalsiyum hidroksit içermediği, yapıdaki kalsiyum oksitin doku sıvılarıyla temasının kalsiyum hidroksit formuna dönüşeceği şeklinde görüşler bulunmaktadır (168). Fakat, MTA'nın biyolojik özelliklerinin fizikokimyasal temelini inceleyen bir araştırmada bu görüşten farklı olarak, sentetik doku sıvılarında bekletilmesi halinde salınan temel iyonun kalsiyum olduğu ve kalsiyumun doku sıvılarındaki fosfatlarla reaksiyona girerek hidroksiapatit oluşumu gözlemlendiği bildirilmektedir. Materyalin örtücülük yeteneği, biyouyumluluğu ve dentinojenik aktivitesinde bu fizikokimyasal reaksiyon sonucunda oluşan hidroksiapatitin rol oynadığı öne sürülmektedir (166).

2.6.3.3.1. MTA'nın Klinik Uygulama Tekniği ve Uygulama Alanları

Başlangıçta kök ucu dolgu maddesi ve perforasyon tamir materyali olarak geliştirilen MTA zaman içerisinde çeşitli klinik uygulamalarda kullanılmaya başlamıştır. Materyalin kullanım kılavuzunda ve ürünü geliştiren araştırmacıların klinik uygulamalarla ilgili yayınlarında, kullanım şekli ayrıntılı bir şekilde sunulmuştur. Bu bilgilere göre; kullanımdan hemen önce hazırlanması ve toz yapının nem temasından kaçınılması gerekmektedir. Toz ve steril su, 3:1 oranında cam veya kağıt üzerinde, plastik ya da metal taşıyıcılar yardımıyla karıştırılabilir. Kullanım sırasında materyal karışımının

kuruması halinde, gerekli kıvamı elde etmek amacı ile karışıma tekrar su ilavesi yapılmasında sakınca yoktur (170).

MTA karışımı kullanım sahasına plastik veya metal bir taşıyıcı ile taşınabileceği gibi, bu amaçla şırınga tipi araçlardan da yararlanılabilir (170). Ayrıca, özellikle cerrahi kullanımları sonrası materyalin sertleşme süresinin uzunluğundan kaynaklanan problemleri aşabilmek amacı ile önceden şekillendirilmiş materyal peletleri kullanılabilir. Materyalin adaptasyonunun sağlanması amacı ile kağıt konlar, el aletleri veya özel tepiciler kullanılabilir (171). Materyalin sertleşmesini teşvik edebilmek amacı ile, üzerine nemli bir pamuk pelet ile IRM yerleştirilmesi ve yeterli sertleşme sağlanıncaya kadar yaklaşık 1-3 gün bekletildikten sonra kalıcı restorasyonun yapılması önerilmektedir (163, 172).

MTA'nın basınç dayancı düşük olduğu için daimi dolgu maddesi olarak kullanımı uygun görülmemektedir. Bu sebeple, materyalin ve tamir edilen bölgenin korunması amacıyla, MTA'nın üzerine hızlı sertleşme özelliğinde geçici dolgu maddesi ile kullanışması önerilmiştir (163). Fakat, uyumsuz hastaların vital pulpa tedavilerinde kavitenin tamamen bu materyalle kapatılabileceği, bu durumda tedavi edilen diş ile karşıt diş arasına ıslak bir tampon konularak, materyalin sertleşmesinin sağlanabileceği bildirilmiştir (172). Koronal giriş kavitelerinin MTA ile kapatılması durumunda, sonraki randevularda ayrı bir kaide ihtiyacı olmaksızın, kaide haline getirilen MTA üzerine direkt kompozit restorasyonlar yapılabilir (156).

MTA'nın vital pulpa tedavilerinde ve perforasyon tamirleri ya da kök ucu dolgusu amacıyla kullanımında, uygulamalar öncesinde yüzeyin sodyum hipoklorit gibi bir dezenfektan ile steril edilmesi tavsiye edilmektedir (173).

Nekrotik pulpalı açık apeksli dişlerde MTA kullanımında, kök kanal boşluğunun dezenfeksiyonu amacı ile bir hafta süre ile kalsiyum hidroksit uygulaması tavsiye edilmektedir.

Bu sürenin sonunda, kalsiyum hidroksitin kanaldan uzaklaştırılmasının ardından, kök apeksinde 3-4 mm'lik bir MTA tıkacının yeterli olacağı, eğer tıkaç oluşturmada başarısız olunması halinde kanalın steril su ile yıkanıp, işlemin tekrarlanabileceği bildirilmiştir (170). MTA, apeksifikasyon tedavilerinde tek ya da bariyer materyal ile beraber kullanılabilir (174). Tıkaç olarak uygulanan MTA'nın sertleşmesini takiben, kavitenin kalan bölümün guta perka ile doldurulabileceği bildirilmiştir (170,

174). Ancak, son yıllarda kök kanalının tamamının MTA ile doldurulabileceğini bildiren çalışmalarda da vardır (149, 151).

MTA'nın perforasyon tamir ajanı olarak kullanımında, uygulama sahasından taşma eğilimi göstermediği, taşsa bile materyal üzerinde sement depolanması meydana geldiği gösterilmiştir (139, 141). Ayrıca, MTA, nem varlığında sertleştiği ve örtücülük özellikleri kan varlığından etkilenmediği için, materyalin perforasyon üzerine uygulamalarında kuru bir yüzey hazırlanmasına veya bir bariyer yerleştirilmesine gerek olmadığı bildirilmiştir (138, 172). Fakat, bu görüşün aksine, materyalin işlenmesi ve yerleştirilmesindeki problemleri aşabilmek amacı ile kuru yüzey sağlanması ve bir bariyer yerleştirilmesi gerektiğini gösteren çalışmalar da mevcuttur (163, 174).

MTA'nın kök ucu dolgu materyali olarak kullanımında, apeksifikasyon uygulamalarına benzer şekilde kök ucunda yaklaşık 4 mm'lik bir MTA tıkaçının oluşturulması tavsiye edilmektedir (175). Bu uygulamalarda, retrograt olarak apikal kavileri açılıp materyal yerleştirilebileceği gibi, kök kanalının MTA ile doldurulmasının ardından kök kanalının enfekte apikal kısmının rezeke edilebileceği bildirilmiştir (176).

Son yıllarda, materyalin kök kanal tedavilerinde kanal dolgu patı amacıyla kullanımına yönelik araştırmalar yapıldığı görülmektedir (151, 177). Fakat, geç rezorbe olması sebebiyle, kök kanal dolgusunda kullanılmasının, yalnız daimi dişler ve persiste süt dişleri ile sınırlı tutulması gerektiğini öne sürülmektedir (177).

Dezavantajları; diş hekimliğinde üzerinde en fazla çalışılan materyallerden biri olmasına rağmen MTA ile ilgili mevcut verilerin çoğu *in vitro* çalışmalar ve hayvan çalışmalarından derlenmiştir. Az sayıda *in vivo* çalışma bulunmaktadır (156, 168).

Materyalin maliyet, karıştırma güçlüğü, uzun sertleşme süresi, uygulama alanında dağılması gibi dezavantajlarının, klinik kullanımını sınırlandırdığı bildirilmektedir (136, 159, 171).

Ayrıca, materyalin gri renkli olan ilk çeşidinin pulpatomi ve pulpa kuafajı tedavilerinde kullanımı sonrası renkleşmeye sebep olabileceği de bildirilmektedir (174). Kullanımdaki bu güçlüklerin dışında, materyalin sahip olduğu yüksek alkalinitenin kök dentininin sertliğini etkilediğinin gösteribildirilmesi de bir başka dezavantajdır (178).

2.6.3.4. Portland Siman

MTA ve portland siman pek çok yönden fiziksel, kimyasal ve biyolojik özellik göstermektedir (179). Yapılan çeşitli çalışmalarda, mikroskopik, makroskopik ve X ışını analizlerinde de benzer sonuçlar kayda geçmiştir. Biyolojik özelliklerinin kıyaslandığı çalışmalarda dokuya olan etkileri yönünden anlamlı farklılık bulunamamıştır(180). Fakat iki materyal tamamı ile aynı değildir. MTA, portland simandan farklı olarak radyoopasitesini sağlayan bizmut oksit içermektedir ve daha küçük parçacıklıdır (157) .

İn vitro ve in vivo çalışmalarda, endodontik materyal olarak portland siman kullanımının umut vaat edici olduğu bildirilmiştir (157). Bununla birlikte güvenilir sonuçlar için daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

2.6.3.5. Klorheksidin Glukonat

Klorheksidin glukonat antiplak özelliğine bağlı olarak çürük önleyici etkisi olan aynı zamanda antimikrobiyal özelliği ile endodontik ve periodontal tedavide rutin kullanımı olan bir ajandır. Mikroorganizmaları hücre duvarlarına absorbe olarak sitoplazmik membranının yapısal bütünlüğünü bozarak ve intrasellüler komponentlerin sızmasına sebep olarak etki etmektedir(181). Saldığı pozitif yüklü iyonlar ile dentine tutunmakta ve dentin yüzeyinde mikrobiyal kolonizasyona engel olmaktadır (131). %0.2'lik düşük konsantrasyonlarda bakteriyostatik, %2'lik yüksek konsantrasyonlarda ise bakteriyosidal etki etmektedir (181). Klorheksidin glukonatın likid ve jel formunun %0,2'lik, %1'lik, %2'lik bütün konsantrasyonlarının test edildiği bir araştırmada inatçı periapikal enfeksiyonlarda sıklıkla izole edilen *E.faecalis*'e karşı %5,2'lik sodyum hipoklorit kadar etkili olduğu bildirilmiştir (182). Ancak Estrela et al. iki irrigasyon solüsyonunun da *E.faecalis*'e karşı düşük etkili olduğunu bildirmiştir (183).

Klorheksidin glukonatın düşük toksisiteye sahip etkin bir antimikrobiyal ajan olmakla birlikte, en önemli dezavantajı doku artıklarını çözme özelliğinin bulunmayışıdır. Klorheksidin glukonatın ve sodyum hipokloritin beraber kullanılması ile bu dezavantaj gidermeye çalışılmıştır. Yapılan araştırmalarda bu kombinasyonun antimikrobiyal ve doku çözücü özelliğinin iyi olmakla birlikte, smear tabakasını uzaklaştırmada yetersiz olduğu bildirilmiştir(184). Klorheksidin ve NaOCl'in kombine kullanımının dişlerde renklenmelere sebep olduğu ve çökelti oluşturduğu saptanmıştır (185). Yapılan bir diğer in vitro çalışmada ise klorheksidin ve NaOCl'nin kombine kullanımının *E.faecalis*'e

karşı klorheksidin glukonatın tek başına uygulanmasından daha etkili olmadığı gösterilmiştir (186).

2.6.4. Erişkin (Postnatal) Kök Hücre Tedavisi

Erişkin kök hücreleri çeşitli (deri, yanak mukozası, yağ, pulpa ve kemik dokusu gibi) dokulardan elde edilebilirler. Çalışmalarda belirtilen asıl zorluk, yetişkin pulpada bulunan fibroblast ve odontoblast gibi bazı hücrelere farklılaşma özelliğine sahip erişkin kök hücre kaynağını belirlemek ve bu hücrelerin elde edilmesinde kullanılan tekniklerin geliştirilmesi gerekliliği olmuştur (187).

Erişkin kök hücre tedavisinin avantajları; otojen kök hücrelerin üretiminin ve uygulanmasının kolay olması ve bu hücrelerin yeni pulpa rejenerasyonunu uyarıcı potansiyele sahip olması şeklinde sıralanabilir (2).

Bu tedavi yönteminin dezavantajları, hücrelerin canlılık süresinin ve oranının düşük olması, vücudun farklı alanlarına göç etme ve anormal mineralizasyona neden olabilme riskleridir. Ancak durumun, hücrelerin fibrin pıhtı ya da scaffold kullanılarak uygulanmasıyla çözümlenebileceği belirtilmiştir (188).

2.6.5. Pulpa İmplantasyonu

Bazı araştırmalarda, laboratuvar koşullarında hazırlanmış pulpa dokusu, şekillendirilerek dezenfekte edilmiş kök kanal sisteminin içine transplante edilerek pulpa implantasyonu yapılabileceğini göstermişlerdir (2).

Hücre tabaklarının büyütülmesinin kolay olması pulpa implantasyonunun avantajı olarak değerlendirilirken, bu yapının implantasyonun teknik zorluğu dezavantajını oluşturmaktadır. Hücrelerin tabakalar halinde olmasının yeterli kanlanmaya imkan vermemekte kanlanma sadece apikal bölgede sağlanabilmektedir. Ayrıca koronal alanın scaffold ile desteklenmesinin hücresel proliferasyon için faydalı olabileceği yapılan araştırmalarda bildirilmiştir (2).

2.6.6. Scaffold İmplantasyonu

Pulpa kaynaklı kök hücreleri, hücrelerin organizasyonunu ve kanlanmasını destekleyecek, pulpa kök hücrelerinin gömülebileceği, poröz polimer yapıda bir scaffold gerektiğini savunan araştırmacılar bulunmaktadır (88, 188).

Scaffold'un içerdiği büyüme faktörleri ile kök hücrelerin çoğalmasını, farklılaşmasını ve hızlı doku oluşumunu sağlamaktadır. Ayrıca, hücrelerin hayatta kalmasını ve büyümesini sağlayan besin maddeleri ve kök kanalı içinde bakterilerin gelişimini engelleyen antibiyotik karışımları içermektedir (2).

Uygulanacak scaffold, ikinci cerrahi gerektirmeden kolaylıkla rezorbe edilebilmeli ve vücuttaki yapım ve yıkım oranlarıyla uyumlu olmalıdır. Ayrıca, hücrelerin beslenmesine ve difüzyonuna izin verecek şekilde poroz ve gözenekli yapıya sahip olmalıdır (88)

2.6.7. Enjekte Edilebilen Scaffold Uygulamaları

Hidrojeller; şırınga yardımı ile kök kanal sistemine uygulanabilen, enjekte edilebilir scaffold yapısında non invaziv materyallerdir (189). Teorikte, hidrojellerin pulpa rejenerasyonunu arttırarak ve organize dokuya farklılaşmayı kolaylaştırdığı bildirilmiştir (190). Ancak bu alanda araştırmalar yeni olmakla beraber henüz etkinliği kanıtlanmamıştır (191).

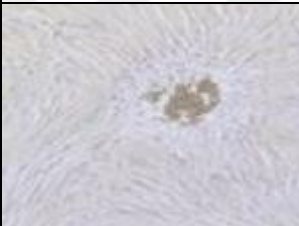
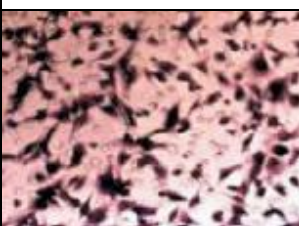
2.6.8. Üç Boyutlu Hücre Yazılımı

Bu tedavi tekniğinde hem pulpa dokusunun tekrar oluşturulması hem de hücre tabakalarının hidrojel içine dağıtılması için özel bir cihaz kullanılmakta ve akabinde oluşturulan yapı cerrahi olarak implante edilmektedir (192). Bu tekniğin avantajı, farklı hücrelerin tam olarak yerinde konumlandırılması olsa da etkinliği in vivo olarak henüz kanıtlanamıştır (191).

2.6.9. Gen Tedavisi

Gen tedavilerinde amaç, gerekli kimyasal maddelerin vücudun dışından verilmesindense, ihtiyaç duyulan maddenin sağlıklı bir biçimde şekilde vücut tarafından üretmesini sağlamaktır (193). Pulpal rejenerasyon amacıyla kullanılan gen tedavilerinden biri, pulpa dokusunun mineralizasyonunu arttıran genin aktarılmasıdır; Fakat bu araştırmalarda henüz başarı sağlanamamıştır. Sağlık açısından risklerinin yüksek olması nedeni ile bu tedavilerinin rejeneratif endodontik tedavilerde kullanımının yakın gelecekte mümkün olmadığı bildirilmiştir (2).

Tablo 5. Rejeneratif Endodontik Teknikler İçin Güncel Yaklaşımlar

REJENERATİF ENDODONTİK TEKNİKLER İÇİN GÜNCEL YAKLAŞIMLAR			
TEKNİK	RESİM	AVANTAJLAR	DEZAVANTAJLAR
Kök kanal revaskülarizasyonu: Açık apekten 1 mm taşılarak kök kanalı içerisine kanama sağlanır.		1. İmmun cevap riski düşük 2. Patojen geçiş riski düşük	3. Yayınlanmış az sayıda çalışma mevcuttur 4. Dokunun enfekte olması sonucu potansiyel enfeksiyon riski
Kök hücre tedavisi: Ototolog yada allogenik kök hücreler enjekte edilebilir bir matris yolu ile uygulanır		1. Hızlı 2. Kolay ulaşım 3. Daha az ağrılı 4. Hücrelerin eldesi kolay	5. Düşük hücre canlılığı 6. Hücreler, fonksiyon gören bir pulpa oluşturmaz 7. Yüksek komplikasyon riski
Pulpa implantasyonu: Laboratuvar ortamında üretilen pulpa dokusu cerrahi olarak implante edilir.		1. Hücre tabakasının büyümesi kolay 2. Ayırılmış hücrelerin enjeksiyonundan kolay	3. Tabakaların sadece küçük parçalarda uygulanabilmesi vaskülariteyi azaltır. 4. Kök kanalı düzgün bir şekilde olmasını gerektirir.
Scaffold implantasyonu: Pulpa hücreleri polimer yapıdaki 3 boyutlu scaffold üzerine ekilerek cerrahi olarak implante edilir.		1. Yapı, hücre organizasyonu nu sağlar 2. Bazı materyaller vaskülarizasyonu uyarır	3. İmplantasyon sonrası düşük hücre canlılığı 4. Kök kanalı düzgün bir şekilde olmasını gerektirir
3 boyutlu hücre yazılımı: yazılımsal cihaz yardımı ile hücreler hidrojel içerisine dağıtılarak cerrahi olarak implante edilir		1. Çok sayıda hücre grubu tam olarak uygulanabilir	2. Kök kanalı düzgün bir şekilde olmasını gerektirir 3. Henüz sadece başlangıç çalışmaları yapılmıştır.
Enjekte edilebilir scaffold uygulaması: polimerize olabilen hidrojelden yalnız yada hücreler ile birlikte süsoansiyon hazırlanarak enjekte edilir.		4. Kolay uygulama 5. Ekstrasellüler matris görevi görerek rejenerasyonu uyarır	6. Doku oluşumunun kontrolü limitlidir. 7. Düşük hücre canlılığı 8. Henüz sadece başlangıç çalışmaları yapılmıştır.

Gen tedavisi: Mineralize genler nekrotik ve semptomatik dişlere vital pulpa hücreleri içerisinde transfer edilirler.		1. Kök kanalının şekillendirilme ve temizlenmesi önlenebilir 2. Kök hücrelerin implante edilmesi ihtiyacına gerek kalmaz	3. Nekrotik dişlerdeki hücrelerin çoğu ölür 4. Kontrolü zor 5. Sağlığa zararlı olma riski 6. FDA tarafından onaylanmamıştır.
--	---	---	---

Bu tez çalışmasının amacı, rejeneratif endodontik prosedürler uygulanırken kök kanalının dezenfeksiyonunda kullanılan çeşitli kanal içi antibiyotik kombinasyonlarının apikal papilla mezenkimal kök hücrelerinde meydana getirdiği değişikliklerin hücre, RNA düzeyinde incelenmesi ve antimikrobiyal etkinliklerinin değerlendirilmesidir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. HÜCRELERİN ELDESİ VE PRİMER HÜCRE KÜLTÜRÜ

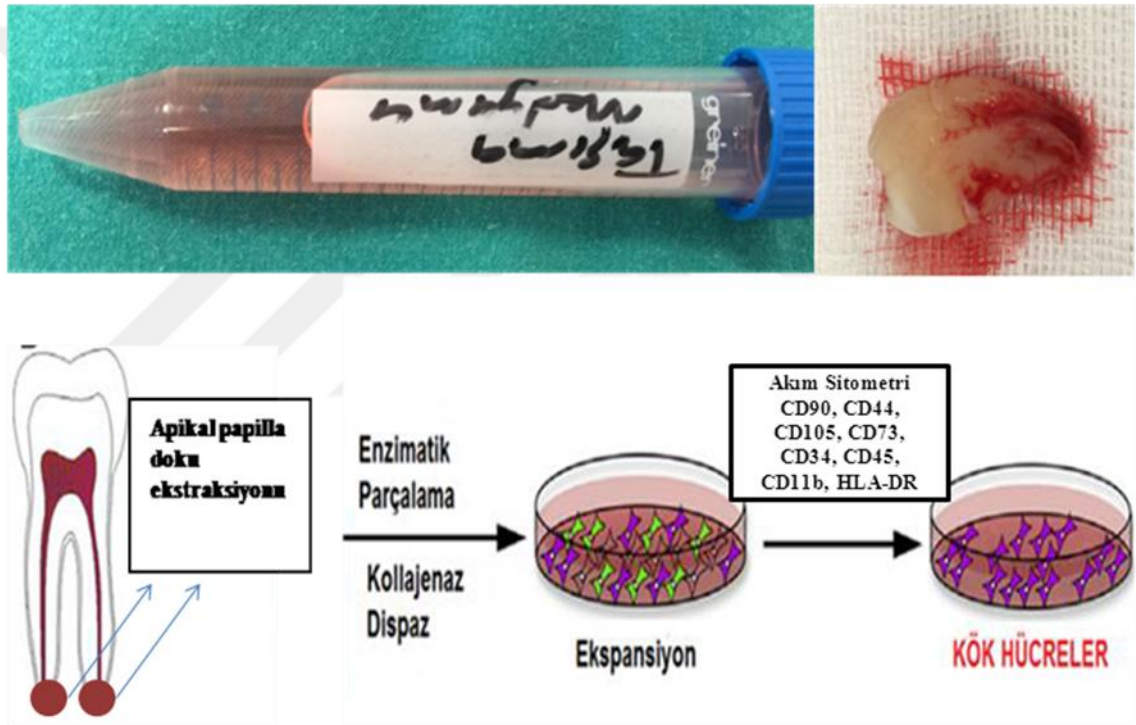
Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Pedodonti Anabilim Dalı, Ağız Çene Cerrahisi Hastanesi ve Erciyes Üniversitesi Betül Ziya Eren Genom ve Kök Hücre merkezinde Erciyes Üniversitesi Yerel Etik Kurul Başkanlığı'ndan 06.02.2015 tarihli v 2015-68 karar nolu etik kurul izni alınarak yürütülmüştür. Hücrelerin eldesinde, doku örnekleri için 16-22 yaş arası genç yetişkin hastaların kök oluşumu tamamlanmamış gömülü ve çürüksüz 3. Molar dişleri kullanıldı (n:7).

Çekilmiş dişin apikalindeki doku steril, keskin bir ekskavatör yardımı ile nazıkçe çıkartılarak amfoterisin ve antibiyotik içeren Alpha MEM (*Biochrom, America*) taşıma medyumuna içerisinde alındı ve steril şartlar altında laboratuara götürüldü. Sonrasında keskin bir bistüri yardımı ile 1x1x1 mm'lik parçalara ayrılarak kültür kabına alındı. Elde edilen pulpal doku 5mg/ml dispaz (*Stem Cell Technologies, America*) ve 2,5 mg/ml kollajenaz tip 1'e (*Serva, Germany*) maruz bırakıldı. Pulpa dokusu tek hücre süspansiyonu oluşana kadar enzimatik olarak 37°C'de hafif çalkalamalı inkübatörde 30 dk boyunca parçalandı. Hücreler üzerinden kollajenaz ve dispazı uzaklaştırmak için santrifüj edildi. Hücreler %20 FBS (*Biological Industries, Israel Beit Haemek*) ve 100 IU/ml penisilin-100 µg streptomisin içeren L-askorbat-2-fosfat ile takviye edilmiş nükleozidli Alpha MEM içerisinde kültüre alındı.

Dişlerden elde edilen hücreler havuz haline getirilerek iki adet 25 cm² plastik doku kültür flaskına ekildi ve 37°C'de nemli atmosfer içeren %5 CO₂'li inkübatörde 3 gün inkübe edildi. Üçüncü günün sonunda kültür kabına tutunmayan hücreler çıkarıldı ve büyümekte olan hücrelere taze besiyeri eklendi.

Primer kültürdeki tutunmuş hücrelerin yoğunluğu %70-80 olduğunda pasajlandı. Pasajlama için hücreler Ca²⁺ ve Mg²⁺ içermeyen fosfat tamponlu serum (PBS) ile yıkandı ve % 0,25 Trypsin- EDTA (Etilendiamin tetraasetik asit) solüsyonu ile 37°C'de

3 dk inkübe edildi. Tripsini inhibe etmek için en az iki katı kadar serumlu büyüme medyumu ilave edildi. Daha sonra hücreler 350 x g'de 5 dk santrifüj edilerek pellet oluşması sağlandı. Süpernatant atılarak hücreler medyum ile resüspanse edildi ve Thoma lamında sayıldı. Daha sonra 75 cm² doku kültür flasklarında 1x10⁶ hücre/flask yoğunlukta olacak şekilde ekildi. 10-14 günlük periyotda her üç günde bir büyüme medyumu değiştirildi ve hücreler %80 yoğunluğa ulaştıkça pasajlandı. 3. pasaja ulaşınca elde edilen hücrelerin bir kısmı karakterizasyon işlemi için ayrılırken kalan hücreler daha sonra kullanılmak üzere sıvı nitrojen tanklarına alındı.



Şekil 6. Apikal doku ekstraksiyonundan kök hücre eldesi

3.2. İNSAN APİKAL PAPİLLA MKH KARAKTERİZASYONU

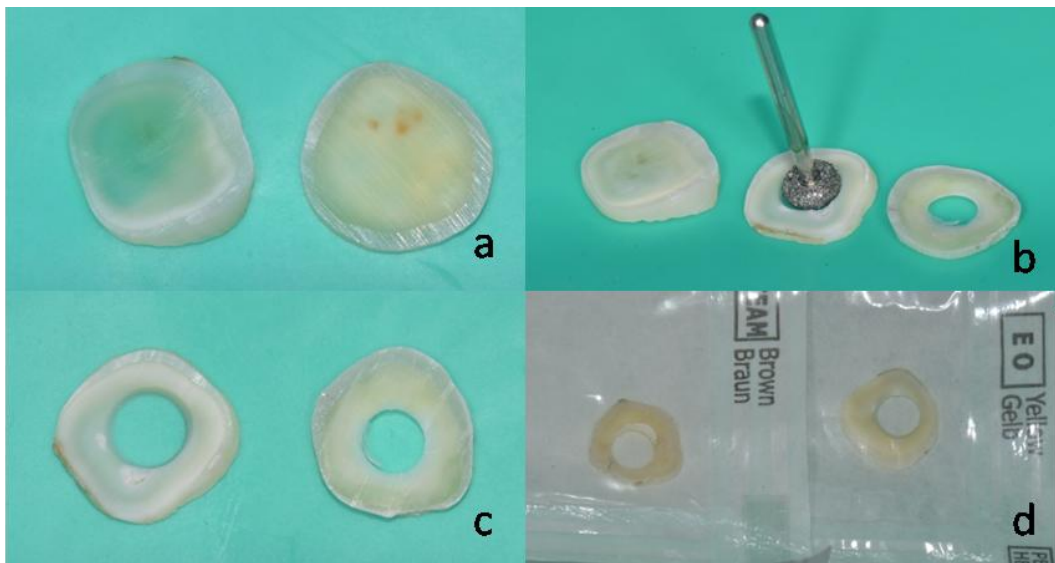
3.2.1. Akım Sitometri

Dental apikal papilla kök hücrelerinin kültürde büyüdüktan sonra fenotipik özelliklerini sürdürdüklerini doğrulamak için farklılaşmamış kök hücreler akım sitometri analizine tabi tutuldu. 3.pasaj sonrası kök hücreler bulunduğu kültür kaplarından tripsinizasyon ile kaldırıldı ve 2 defa Ca²⁺ ve Mg²⁺ içeren PBS ile yıkandı. CD90, CD44, CD105, CD73, CD34, CD45, CD11b, HLA-DR antikorlarını çalışmak için hücreler 1x10⁶

hücre/ml yoğunlukta Ca^{2+} ve Mg^{2+} içeren PBS içerisinde otoflorosan, CD pozitif ve CD negatif antikorlar olmak üzere üç tüpte toplandı. Hücreler %4 paraformaldehit ile fikse edildi ve 10 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon sonrası hücreler Ca^{2+} ve Mg^{2+} içeren PBS ile iki defa yıkandı. Yıkama işlemini takiben spesifik olmayan antikor bağlanmalarını engellemek amacıyla %1 BSA (Bovine Serum Albumin) içerisinde yarım saat oda sıcaklığında inkübe edildi. Daha sonra 30 dk boyunca primer antikorlar ile (marker flow: CD90, CD44, CD105, CD73, CD34, CD45, CD11b, HLA-DR) oda sıcaklığında inkübe edildi. İki defa Ca^{2+} ve Mg^{2+} içeren PBS ile yıkandı ve sekonder antikorlar 30 dk boyunca uygulandı. Son yıkama aşamasından sonra BD FACS CANTO II cihazı kullanılarak akım sitometri gerçekleştirildi.

3.3. DENTİN KESİTLERİNİN HAZIRLANMASI

Dentin kesitlerinin hazırlanması için periodondal doku artıkları ve pulpası uzaklaştırılmış çürüksüz insan 3. Molar dişleri kullanıldı. Koronal dentin dokusu disk şeklinde elmas separe ile steril PBS irrigasyonu altında uzaklaştırıldı. Kalan kök dentini mikrotom cihazı kullanılarak su soğutması altında 1mm kalınlığında kesilerek parçalara ayrıldı. Sonrasında dentin diskleri üzerine elmas yuvarlak aeratör frezi kullanılarak 3mm çapında standart boşluklar oluşturuldu. Lümen boşlukları oluşturulmuş dentin diskleri, etilen oksit ile sterilize edildikten sonra tek tek steril PBS içersine alınarak paketlenildi.



Şekil 7. Dentin disklerinin hazırlanması (a), Disk lümen boşluklarının preperasyonu (b), Lümen boşlukları oluşturulmuş diskler (c), Disklerin sterilizasyonu (d)

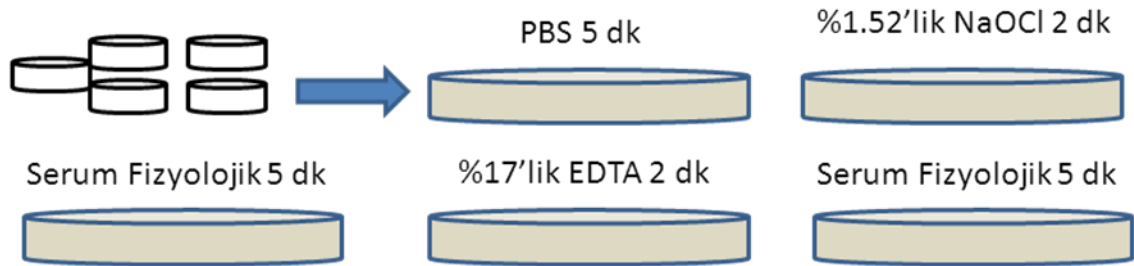
3.4. ÇALIŞMA GRUPLARI

1. Üçlü Antibiyotik Patı-(Ciprofloksasin-Metronidazol-Minosiklin Karışımı (TAP) (1:1:1 oranında)
2. İkili Antibiyotik Patı-(Ciprofloksasin-Metronidazol (DAP))(1:1 oranında)
3. Modifiye Üçlü Antibiyotik Patı -(Ciprofloksasin-Metronidazol-Cefaleksim)(1:1:1 oranında)
4. Kontrol Grubu (Hücre hattı ve dentin diski)

3.5. İRRİGASYON PROTOKOLÜ VE MEDİKAMAN UYGULAMASI

Dentin diskleri medikaman uygulaması öncesi rehidratasyon için bazı yıkama işlemlerine tabi tutuldu. Yıkama protokolü sırasıyla;

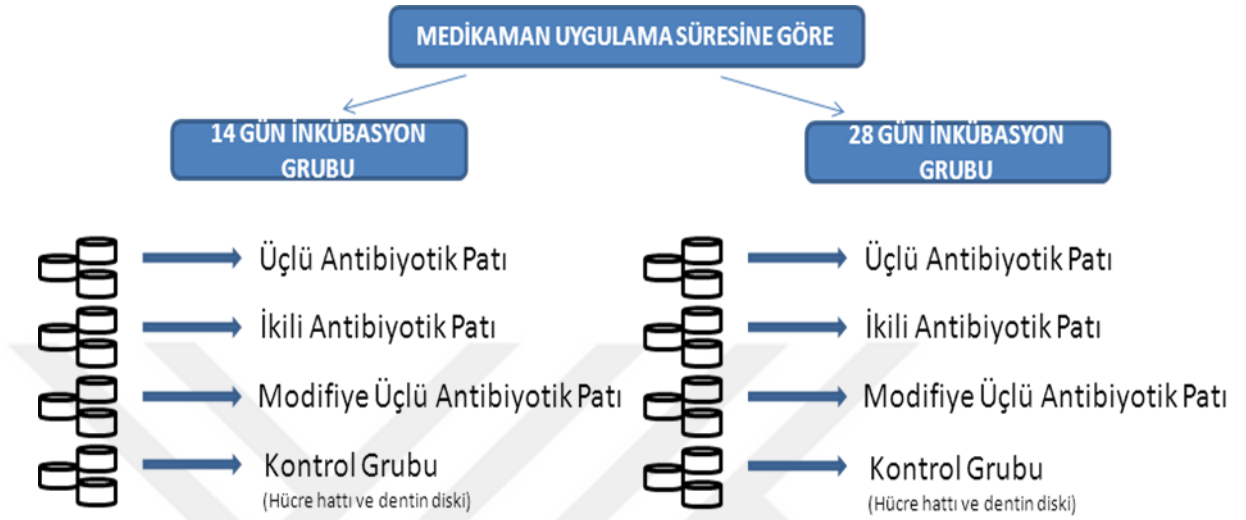
1. PBS 5 dk
2. %1.52'lik sodyum hipoklorit (NaOCl) 2 dk
3. Serum Fizyolojik 5 dk
4. %17'lik EDTA 2 dk
5. Serum Fizyolojik 5 dk şeklinde oluşturuldu.



Şekil 8.İrrigasyon Protokolü ve Medikaman Uygulaması

Yıkama işlemleri sonrası dentin disk lümenlerini dolduracak şekilde (0,01 g/ml) çalışma gruplarında belirtilen medikamanlar homojen bir şekilde karıştırılarak uygulandı. Medikaman gruplarında pat kıvamı 0,01g/ml olacak şekilde 1:1:1 oranında hassas terazi kullanılarak hazırlandı. Ayrıca kontrol grubundaki dentin diskleri sadece PBS ile muamele edildi. Diskler iki gruba ayrılarak 37°C'de nemli atmosfer içeren %5 CO₂'li inkübatörde 14 ve 28 gün olmak üzere inkübe edildi. İnkübasyon periyodunun ardından

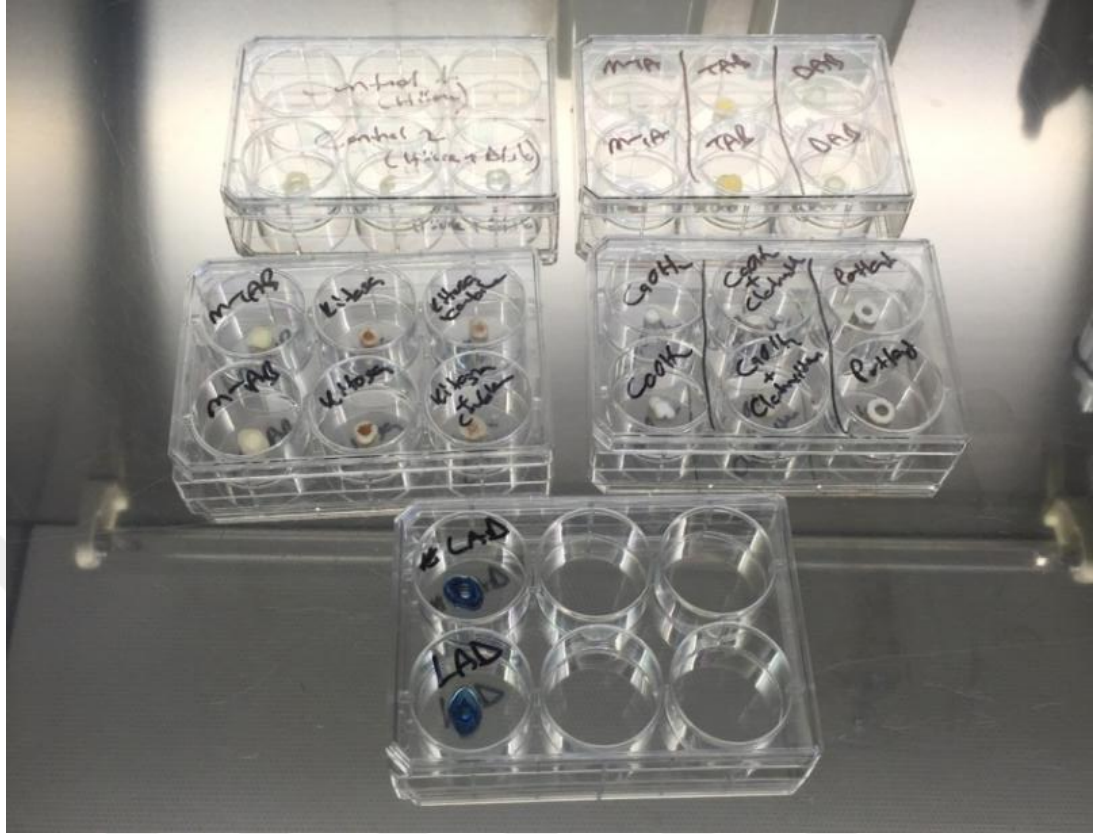
dentin diskleri ilk prosedüre uygun şekilde tekrar yıkanarak 6 kuyucuklu kültür kabına alındı ve kültüre hazır hale getirildi.



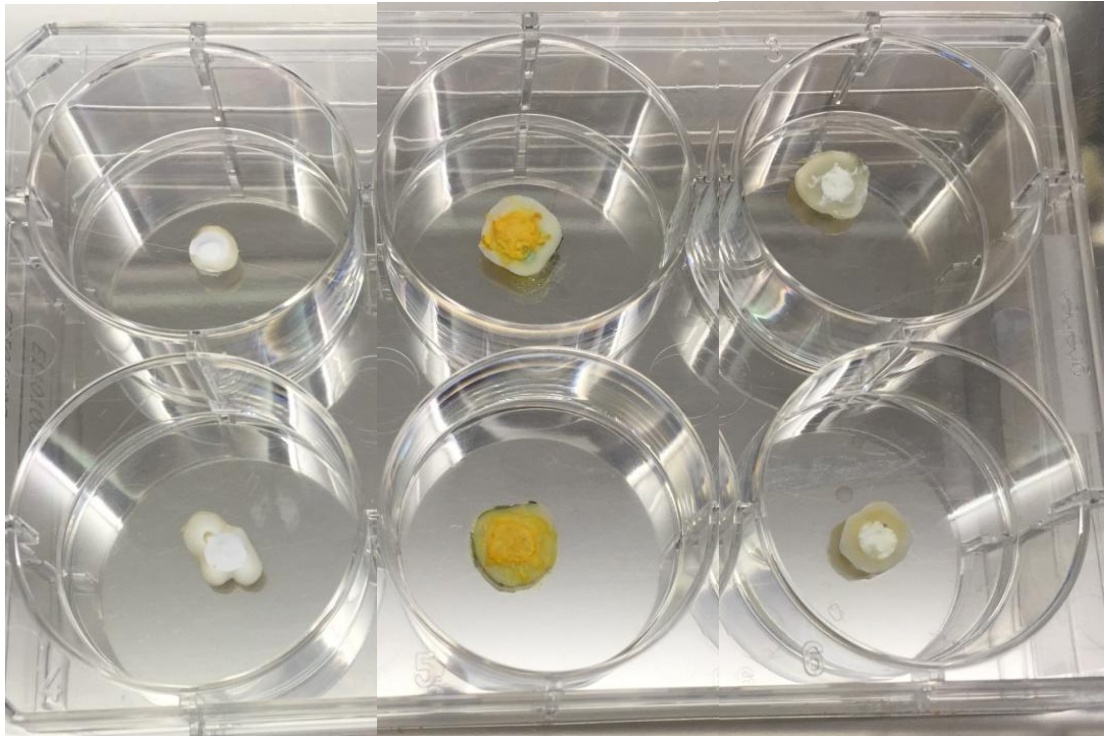
Şekil 9. Dentin disklerinin medikaman uygulaması sonrası grupta şeması



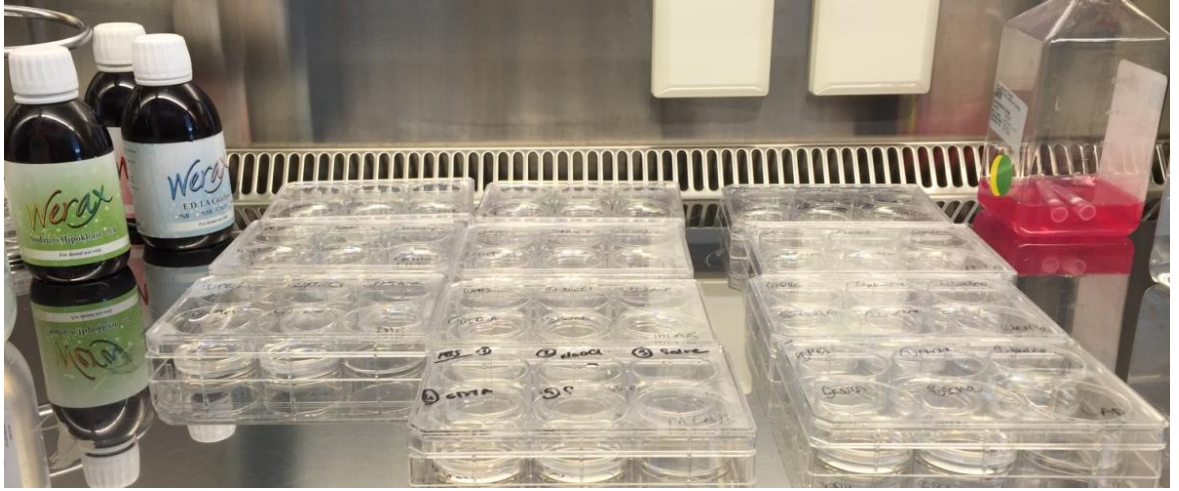
Şekil 10. Uygulama öncesi medikamanların hazırlanması



Şekil 11. Medikaman uygulaması yapılan disklerin kültür kabına alınması



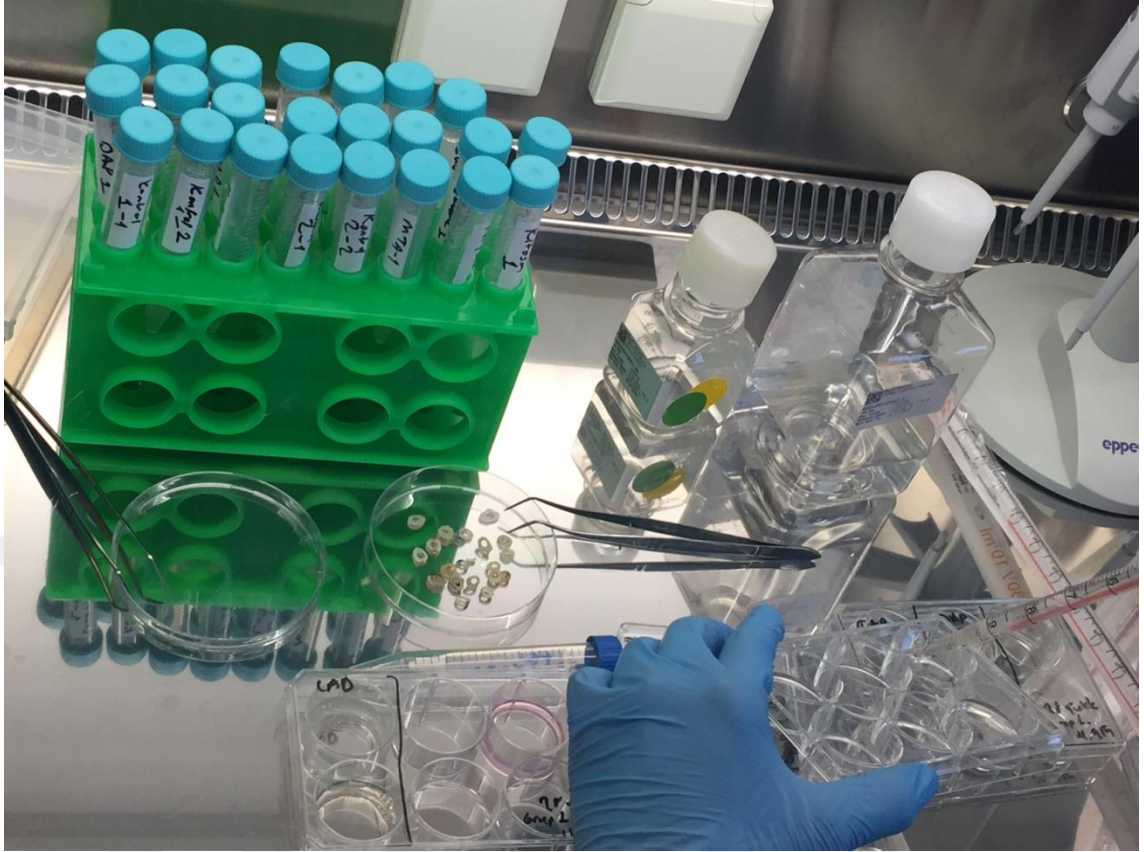
Şekil 12. Medikaman uygulaması sonrası dentin disklerinin görüntüsü(sırasıyla; mTAP, TAP, DAP,)



Şekil 13. İnkübasyon periyodu sonrası yıkama prosedürü

3.6.1. Apikal Papilla Mezenkimal Kök Hücre Sisteminin Oluşturulması

Çalışma, daha önceden üretilen karakterizasyonu yapılmış 3. pasajdaki insan apikal papilla mezenkimal kök hücreleri ile devam ettirildi. Sıvı azot tankından hücreler çıkarıldı ve 37°C su banyosunda hızlı bir şekilde çözündürüldü. İki defa tam besiyeri ile yıkandı ve deneylerde kullanılacak hücre sayısına ulaşılması için 37°C, %5 CO₂ inkübatöründe inkübasyona bırakıldı. İlaçlar ile 14 ve 28 gün boyunca muamele edilen dentin disk grupları prosedüre uygun şekilde yıkanarak daha önceden %0,17 jelâtin ile kaplanmış 6 kuyucuklu kültür kapları içerisine kuyucuk başına 1 disk olacak şekilde yerleştirildi. Üzerine her kuyucuğa Thoma lamında Tyripan blue muamelesi ile 40.000 canlı hücre sayılarak nükleozitli alfa MEM, %20 FBS, %1 Penislin-streptomisin ve 50mM L-ascorbic acid içeren besiyeri ile ekildi. Her 3 günde bir besiyeri değişimi yapılarak 28 gün boyunca 37°C, %5CO₂ içeren inkübatörde inkübe edildi. 28. gün sonunda mikroskop altında değerlendirilerek görüntüleri alınan hücreler tripsinizasyon ile kaldırıldı ve analizlere hazır hale getirildi.



Şekil 14. Hücrelerin tripsinizasyon ile kaldırılması

3.6.2. Yapılan Analizler Listesi

1. Hücre Canlılık Analizi
2. Hücre Apoptoz Analizi
3. Hücre Proliferasyon Analizi
4. Hücre Farklılaşma Analizleri
5. Antimikrobiyal Analiz

3.7. HÜCRE CANLILIK ANALİZİ

Hücrelerin kültüre edilmesinden 28 gün sonra kaldırılan hücrelerin; (kontrol grupları ve medikaman uygulaması yapılan hücrelerin) canlılık oranları MuseCell Analyser (Merck Millipore) Count & Viability kit kullanılarak ürün protokolüne göre ölçümü gerçekleştirildi ve test 3 kez tekrarlandı.

3.8. HÜCRE APOPTOZ ANALİZİ

Hücrelerin kültüre edilmesinden 28 gün sonra kaldırılan hücrelerin; (kontrol grupları ve medikaman uygulaması yapılan hücrelerin) MuseCell Analyser (Merck Millipore) apoptoz kiti Annexin V kullanılarak erken ve geç apoptoz oranları belirlendi ve test 3 kez tekrarlandı.

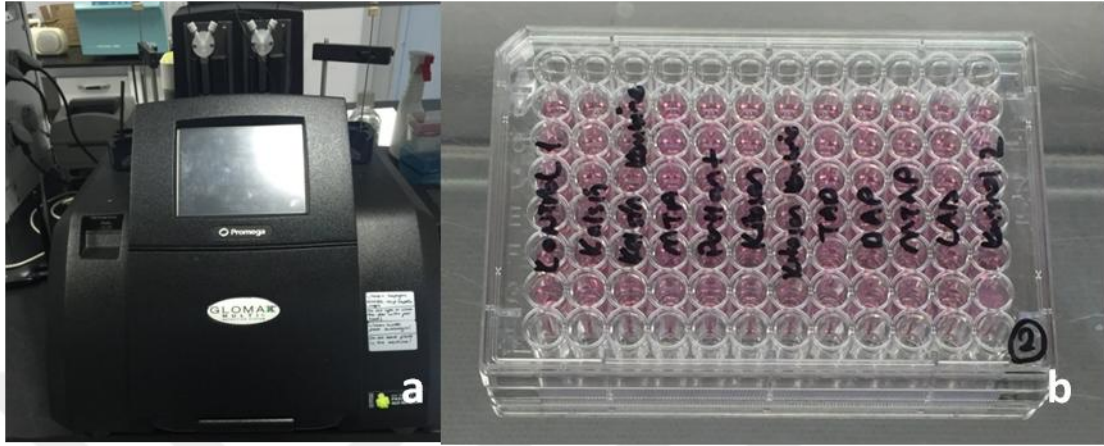


Şekil 15. Muse Cell Analyzer (Millipore) ile canlılık ve apoptoz ölçümü.

3.9. HÜCRE PROLİFERASYON ANALİZİ

Hücrelerin kültüre edilmesinden 28 gün sonra kaldırılan hücrelerden bir kısmı MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) proliferasyon testi için ayrıldı ve 96 kuyucuklu kültür kaplarına her gruptan cm^2 'ye 5000 hücre olacak şekilde ekildi. 24 saat 37°C , %5 CO_2 içeren inkübatörde inkübe edildi. İnkübasyon sonrası her kuyucuğa 0,5mg/ml olacak şekilde MTT eklendi. 4 saat 37°C , %5 CO_2 inkübatöründe inkübe edildi. Oluşan formazon kristalleri 100'er mikrolitre DMSO (Dimetilsülfoksit) ile 15 dk boyunca çözüldü ve absorbansa dayalı ölçüm 560nm salga boyunda (Promega

Glomax MultiDetection System Plate Reader) gerçekleştirildi. MTT testi kendi içerisinde 6 tekrarlı olmak üzere tüm deney işlemleri üç kez tekrarlandı.



Şekil 16. MultiDetection System Plate Reader (a) Promega Glomax, 96 kuyucuklu kültür kaplarına hücrelerin ekilmesi (b)

3.10. HÜCRE FARKLILAŞMA ANALİZLERİ

Çalışmamızın revers transkripsiyon PCR basamağı Betül-Ziya Eren Genom ve kök hücre merkezi laboratuvarında yürütüldü.

3.10.1. RNA İzolasyonu:

Pelletler Ambion PureLink RNA mini kit içerisinde parçalandıktan sonra Roche hücreden RNA izolasyon protokolü uygulanmıştır. İşlemlerin uygulanma sırası aşağıdaki gibidir.

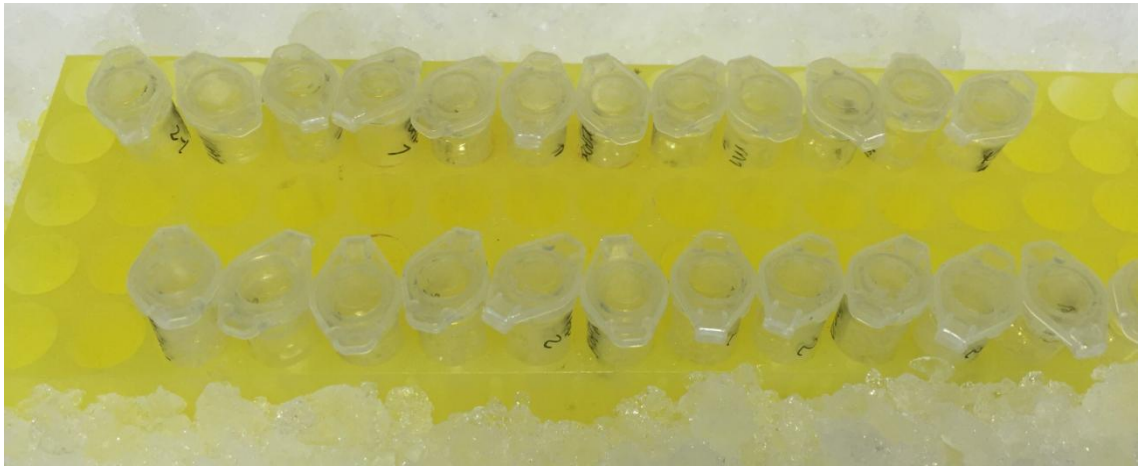
PureLink RNA mini kit için çalışmaya başlamadan önce;

1. Lizis buffer hazırlandı. 1 ml lizis buffer için 10 µl 2-merkaptoetanol eklendi.
2. Yıkama buffer II'ye 60 ml %96-100 etanol eklendi. (ilk kullanıldığında)
3. Süspanse hücreler 2000 g'de 5 dk, 4C'de santrifüj edildi. Supernatant atıldı.
4. Pellete 600 µl lizis (2-merkaptoetanol içerir) buffer eklendi.
5. Pellet çözünene kadar vorteks yapıldı.
6. Lizat 5-10 kez 18-21 gauge şırınga ile al-ver yapıldı.

7. Hücre homojenizatına hacmi kadar %70 etanol eklendi ve vorteks yapıldı.
8. Çökelti içermeyen örnekten 700 µl spin tüplere alındı.
9. 12 000 xg'de 15 sn oda sıcaklığında santrifüj yapıldı. Alt kısmı döküldü ve spinler aynı collection tüplere konuldu.
10. Örneğin tamamı bitene kadar 6 ve 7. Adımlar tekrarlandı.
11. Spinlere 700 µl wash buffer I eklendi.
12. 12 000 xg'de 15 sn oda sıcaklığında santrifüj yapıldı. Alt kısmı atıldı ve spinler yeni bir collection tüplere konuldu.
13. Spinlere 500 µl wash buffer II eklendi.
14. 12 000 xg'de 15 sn oda sıcaklığında santrifüj yapıldı. Alt kısmı döküldü ve spinler aynı collection tüplere konuldu.
15. 11 ve 12. Adımlar tekrarlandı.
16. Spin kolonlar 1-2 dk 12,000xg'de membranın bufferdan tamamen arınması için boş santrifüj yapıldı.
17. Spin kolonların alt kısmı atılarak RNA'ların saklanacağı yeni bir steril ependorfa alındı.
18. 30-100 µl RNase free su membrana gelecek şekilde eklendi.
19. 1 dk oda sıcaklığında inkübe edildi.
20. 12 000 xg'de 2 dk oda sıcaklığında santrifüj yapıldı. RNA'nın membrandan ependorf tüpe geçmesi sağlandı.
21. RNA hemen buz üzerine alınarak konsantrasyonları nanodropta ölçüldü.
22. -80 C'de saklandı.



Şekil 17. Hücre pelletlerinin çözülmesi için vorteks yapılması ve RNA sentez kiti



Şekil 18. Nanodropla ölçüm öncesi RNA'ların buz üzerine alınması



Şekil 19. Nanodrop(Bio-Spec Nano Spectrophotometer)

3.10.2. cDNA Aşaması:

Roche High Fidelity cDNA Synthesis Kit kullanılmıştır. Yapılış şekli aşağıdaki gibidir. Miktarlar deney grubundaki örnek sayısına göre hesaplanmıştır.

1. RNA konsantrasyonu 1 µg olacak şekilde kullanıldı.
2. Template primer mix (1 reaksiyon için) hazırlandı.

Tablo 6. cDNA sentez kit hacimleri

Total RNA	Değişken (x)
Random Hexamer Primer	2 µl
Su	Değişken (9,4-x)
Total hacim	11,4 µl

3. 10 dk 65 °C de inkübasyona bırakıldı. Sonrasında hemen buz üzerine alındı.
4. Master mix hazırlandı.

Tablo 7. Master mix hacimleri

Transcriptor high fidelity reverse transcriptase reaction buffer, 5x	4 µl
Protector RNase inhibitor	0,5 µl
Deoxynucleotide mix, 10mM each	2 µl
DTT	1 µl
Transcriptor high fidelity reverse transcriptase	1,1 µl

5. Hazırlanan RNA/primer karışımına 8,6 µl master mix eklendi. Total hacim her bir örnek için 20 µl olacak şekilde ayarlandı.
6. Hazırlanan karışım aşağıda belirtilen programda PCR cihazına konuldu.

Tablo 8. PCR cihaz program protokolü

10 dk	29 °C
60 dk	48 °C
5 dk	85 °C

7. Reaksiyon bitiminde cDNA'lar -20°C'de saklandı.

3.10.3. Ekspresyon aşaması

LightCycler 480 II (Roche) Real-Time PCR cihazında çalışılmıştır.

1. cDNA'sı hazırlanan örnekler (20µl) 80µl Nükleaz Free Water ile sulandırıldı. Örnekler ile çalışırken, buz üzerinde olmalarına dikkat edildi. cDNA'dan 5'er µl kullanıldı.

2. Her bir çalışılacak gen için mix hazırlandı. Beta aktin kontrol geni olarak kullanıldı.
3. Tablodaki protokol uygulanarak ekspresyon çalışması için cihaza alındı.

RealTime ready Catalog and designer assay kit protokol;

Tablo 9. LigtCycler 480 probes master için PCR master mix hazırlanışı

	1 well için kullanılan miktarlar
LigtCycler 480 probes master (2x)	10 µl
Real time ready assay-primer(20x)	1 µl
Su,PCR grade	4 µl

1. Tüm malzemeler ependorf tüpe eklenir ve pipetaj yapıldı (vorteks yapılmadı).
2. Mix hazırlandıktan sonra her bir kuyuya 15 µl eklendi.
3. Sonrasında 5 µl cDNA her bir kuyuya eklendi.
4. Optical adhesive film (plate kapatan şeffaf bir yapıştırıcı) ile dikkatli bir şekilde kapatıldı.
5. 2 dk 1500 g 'de oda sıcaklığında santrifüj edildi. Baloncuk kalmamasına özen gösterildi.
6. Cihazdan (Roche 480) program ayarlanıp başlatıldı.

PCR programı özetle tabloda gösterilmiştir:

Tablo 10. PCR programı

Pre inkübasyon	
95 °C	10 dk
Amplifikasyon	
95°C	10 sn
60°C	30 sn
72°C	1 sn

Tablo 11. Real-Time PCR primer dizileri

Primerler		Diziler 5'-3'
OSTEOKALSİN(BGLAP) (Bone gamma-carboxyglutamic acid-containing protein)	Forward	CAAGGTGCAGCCTTTGTGTC
	Reverse	TCACAGTCCGGATTGAGCTCA
DSPP (Dentin Sialophosphoprotein)	Forward	TTAAATGCCAGTGGAACCAT
	Reverse	ATTCCTTCTCCCTTGTGAC
ALPP (Alkaline phosphatase)	Forward	GGACCATTCCCACGTCTTCAC
	Reverse	CCTTG TAGCCAGGCCCAT TG
Beta Aktin (kontrol geni)	Forward	AGAGCTACGAGCTGCCTGAC
	Reverse	AGCACTGTGTTGGCGTACAG



Şekil 20. Real-Time PCR cihazı

3.11. ANTİMİKROBİYAL ANALİZ

3.11.1. Çalışmada Kullanılan Mikroorganizmalar

Çalışmada kullanılan standart suşlar, National Collection of Type Cultures, Central Public Health Laboratory kaynaklı olup Ankara Refik Saydam Hıfzısıhha Enstitüsü Kültür Koleksiyonu'ndan temin edilmiştir. Bu çalışmada *Candida albicans* (C. albicans ATCC 10231), *Enterococcus faecalis* (E. faecalis ATCC 29212), *Escherichia coli* (E. coli ATCC 25922), *Streptococcus mutans* (S. mutans ATCC 25175), *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* (P. aeruginosa ATCC 15442) standart liyofilize mikroorganizmaları kullanılmıştır

3.11.2. Liyofilize Haldeki Standart Mikroorganizmaların Üretilmesi

Ankara Refik Saydam Hıfzısıhha Enstitüsü Kültür Koleksiyonu'ndan temin edilen liyofilize suşlar, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı laboratuvarında steril şartlarda açılmış, 2 ml fosfatla tamponlanmış salin ile sulandırıldıktan sonra her bir suştan ayrı ayrı 2 ml beyin kalp infüzyon besiyerine (Brain

Heart Infusion Broth (BHIB)) (HiMedia Lab., Pvt. Ltd., India) 0,1 ml ekilmiştir. Sulandırılıp süspanse hale getirilen *C. albicans* standart suşu için RPMI agar besiyerine, *S. mutans*, *S. aerous*, standart suşlarından %5 koyun kanlı agar besiyerlerine (Blood 47 Agar Base - HiMedia Lab., Pvt. Ltd., Mumbai-India), *E. coli*, *P. aeruginosa* ve *E. faecalis* için Mueller Hinton Agar besiyerlerine ayrı ayrı ekimler yapılmış ve ekim yapılan besiyerleri 37°C’ de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresini takiben sıvı ve katı besiyerleri üreme açısından kontrol edilmiş, oluşan kolonilerden Gram boyalı preparatlar hazırlanıp mikroorganizmalar morfoloji, boyanma ve saflık açısından değerlendirilmiştir.

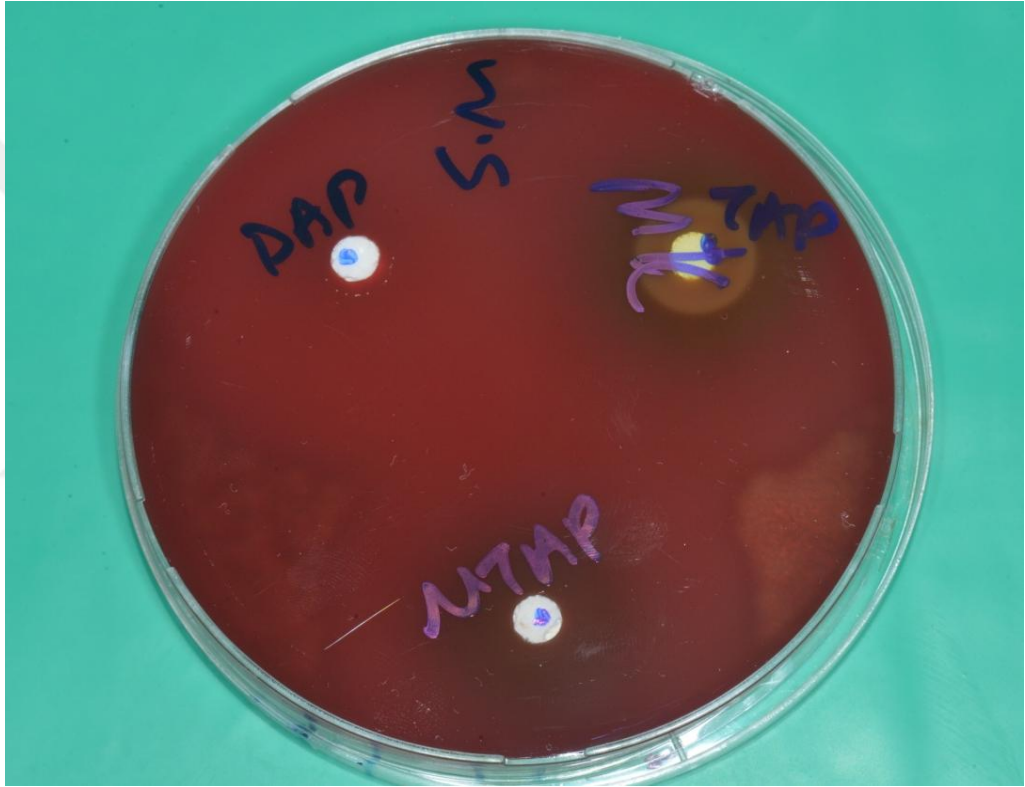
3.11.3. Deney Materyallerinin Hazırlanması

Çalışmamızda antimikrobiyal etkilerinin değerlendirilmesi amacı ile kullanılan medikamanlar üretici firmaların talimatları doğrultusunda güvenlik kabini içinde steril şartlarda karıştırılmış ve iç çapı 5 mm, kalınlığı 2 mm olan yuvarlak steril polietilen kalıplara yerleştirilmiş, disk şeklindeki medikaman grupları elde edilmiştir. Her deney periyodunda çalışmadan hemen önce kullanılan bütün mikroorganizmalar için her materyalden 3’er adet taze medikaman diski hazırlanıp kullanılmıştır.

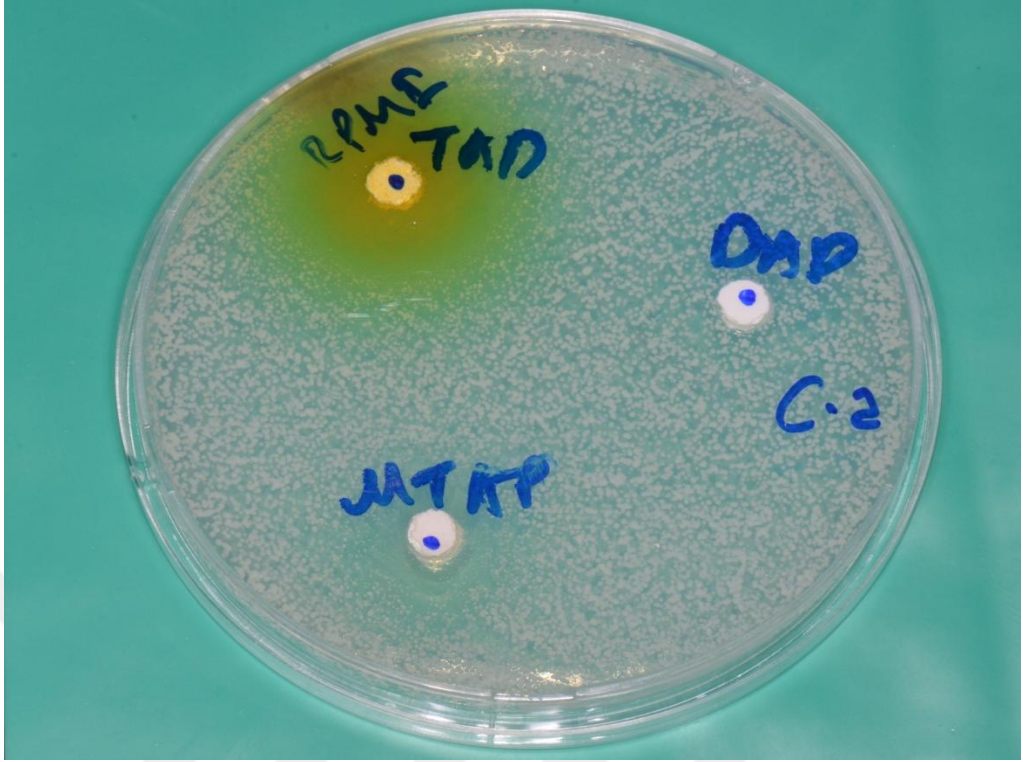
3.11.4. Medikaman uygulamalarının yapılması ve Agar Difüzyon Testi

S. mutans, *S. aureus*’dan stoktan çıkarıldıktan sonra taze pasajları yapılarak, steril %0,9’luk serum fizyolojik içinde Mcfarland 0,5 standart bulanıklığında olacak şekilde hazırlanan bakteri süspansiyonlarından alınan 20 µl’ lik örnekler, ayrı ayrı %5 koyun kanlı agar besiyerlerine, *E. faecalis*, *E. coli*, ve *P. aeruginosa*’dan hazırlanan stok bakteri süspansiyonlarından alınan 20 µl’ lik örnekler, ayrı ayrı Mueller Hinton Agar besiyerlerine aktarılmış, steril şartlarda homojen bir şekilde besiyerlerinin tüm yüzeyine çözeltileri steril bir eküvyon çubuk yardımıyla yayılmıştır. *C. albicans*’ dan stoktan çıkarıldıktan sonra taze pasajları yapılarak, steril %0,9’luk serum fizyolojik içinde Mcfarland 0,5 standart bulanıklığında olacak şekilde hazırlanan süspansiyondan alınan 20 µl örnek, RPMI agar besiyerine aktarılmış, steril şartlarda homojen bir şekilde besiyerlerinin tüm yüzeyine çözeltileri steril bir eküvyon çubuk yardımıyla yayılmıştır. Bu işlemleri takiben besiyerlerinin bulunduğu petri kutularının kapakları kapatılmış, plaklar oda sıcaklığında 15 dakika bekletildikten sonra besiyerlerinin üzerine birbirlerinden eşit uzaklıkta olacak şekilde test edilen farklı medikaman diskleri 3’lü gruplar halinde daha önceden açılan 5mm çapında ve 2 mm derinliğindeki kuyucuklara

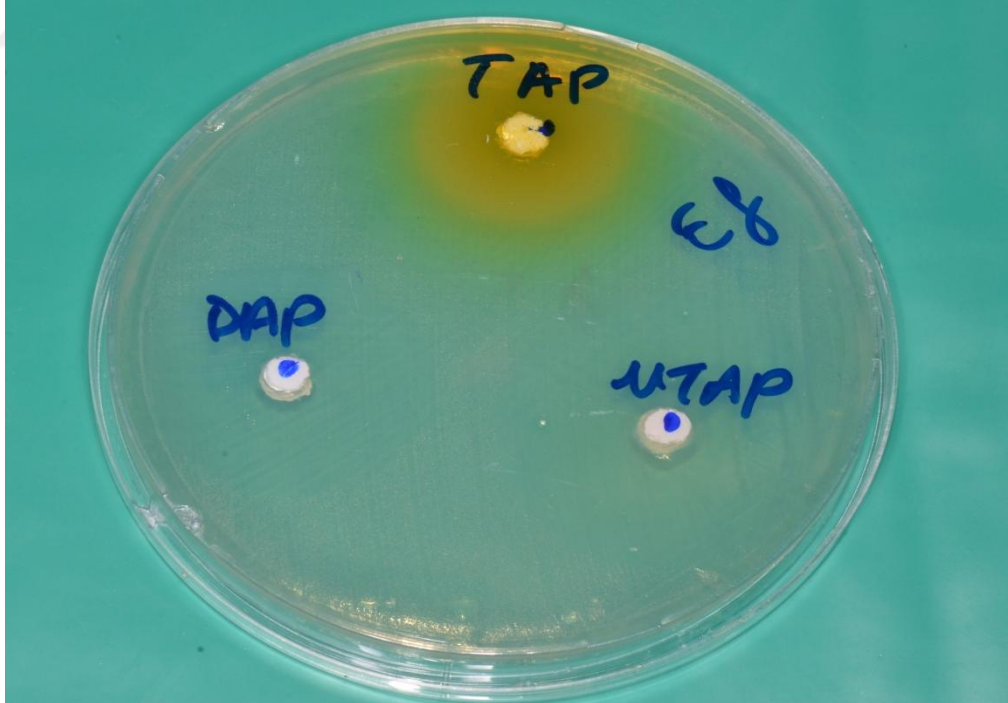
yerleştirilmiştir. Her deney periyodunda aynı mikroorganizma süspansiyonundan on farklı besiyerine ekim yapılmış, test edilen diskler yerleştirilmiş ve plaklar 37°C inkübe edilmek üzere etüve kaldırılmıştır. İnkübasyonun 24. saatlerinde plaklar etüvden çıkarılmış, şeffaf bir cetvel yardımı ile disklerin çevresindeki inhibisyon zonları milimetrik olarak ölçülerek not edilmiştir. Çalışma, her standart bakteri için her periyot da dört besiyeri kullanılmak üzere üç kez tekrarlanmıştır.



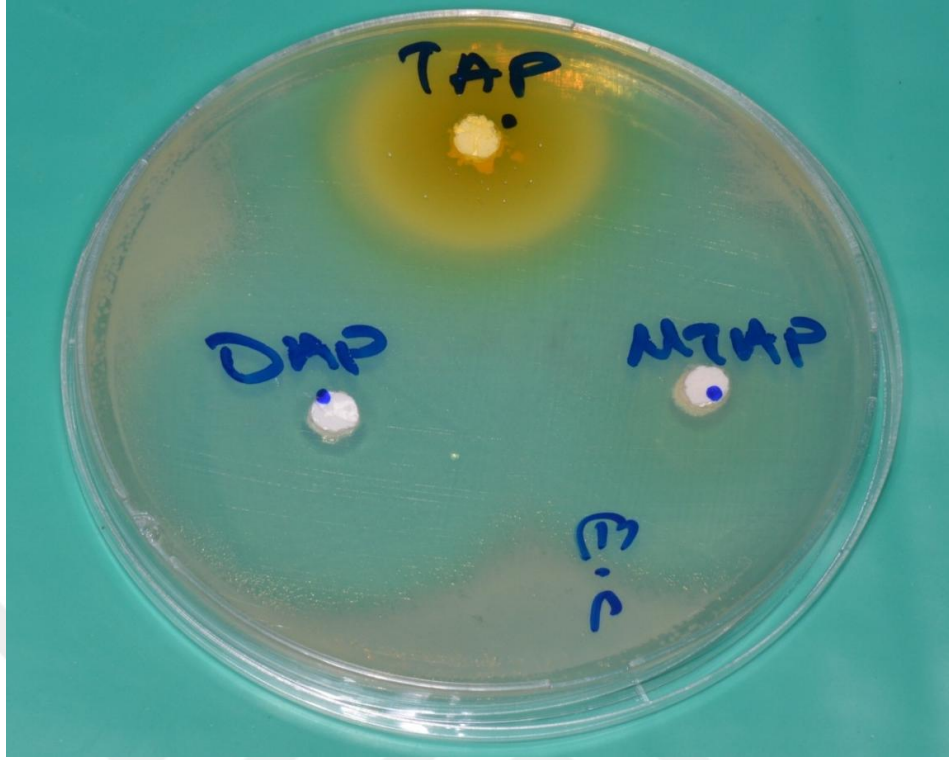
Şekil 21. Agar difüzyon testi 24. saat (*Streptococcus mutans*)



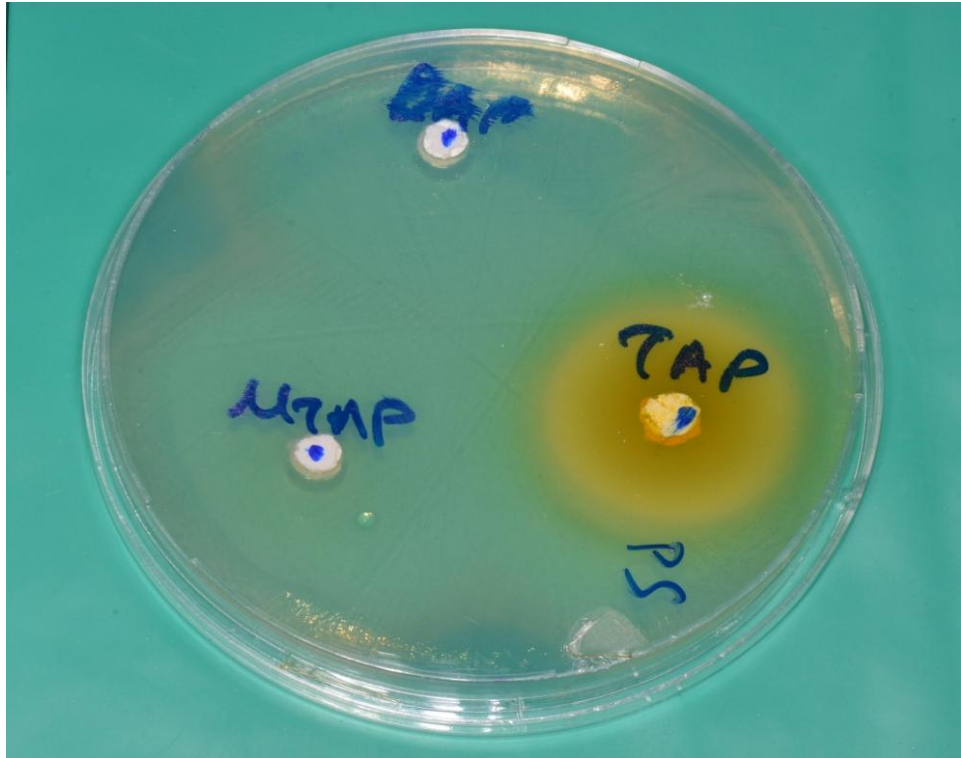
Şekil 22. Agar difüzyon testi 24. saat (*Candida albicans*)



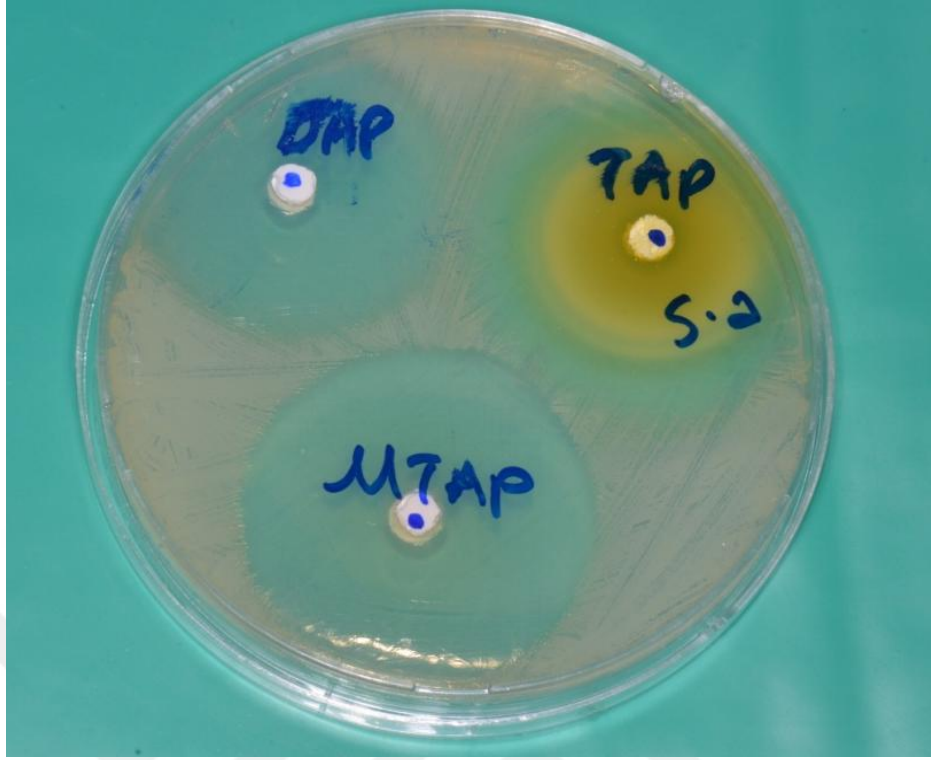
Şekil 23. Agar difüzyon testi 24. saat (*Enterococcus faecalis*)



Şekil 24. Agar difüzyon testi 24. saat (*Escherichia coli*)



Şekil 25. Agar difüzyon testi 24. saat (*Pseudomonas aeruginosa*)



Şekil 26. Agar difüzyon testi 24. saat (Staphylococcus aureus)

3.12.İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME

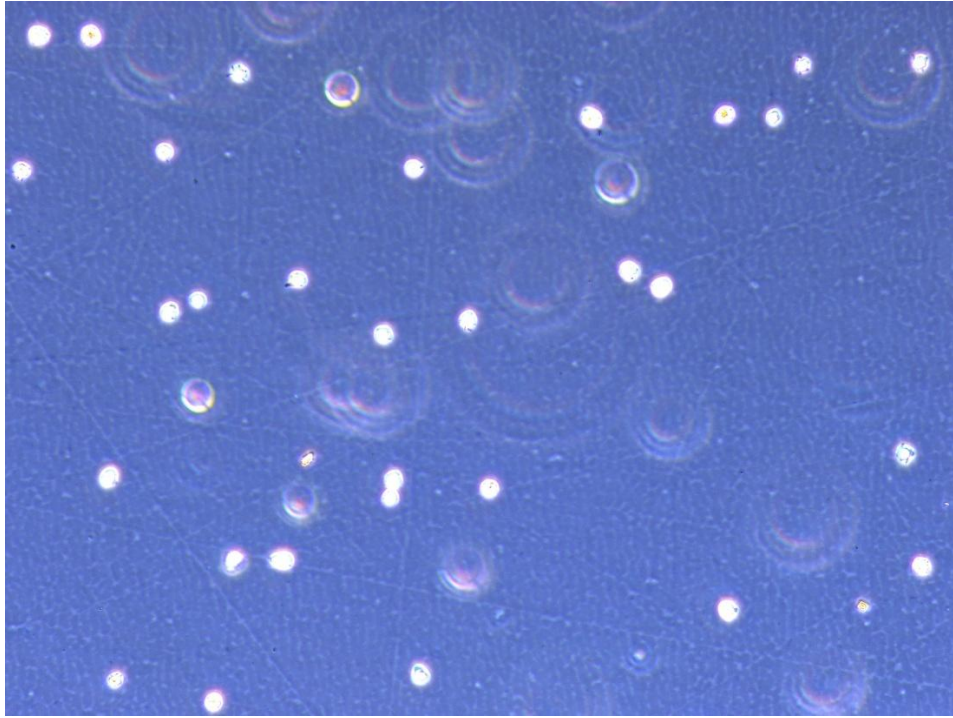
Grupların karşılaştırılmasında SPSS 20.00 sürümü kullanılarak bağımsız gruplarda tek yönlü varyans analizi yapıldı. Çoklu karşılaştırma testlerinde Tukey testi kullanıldı. $p<0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

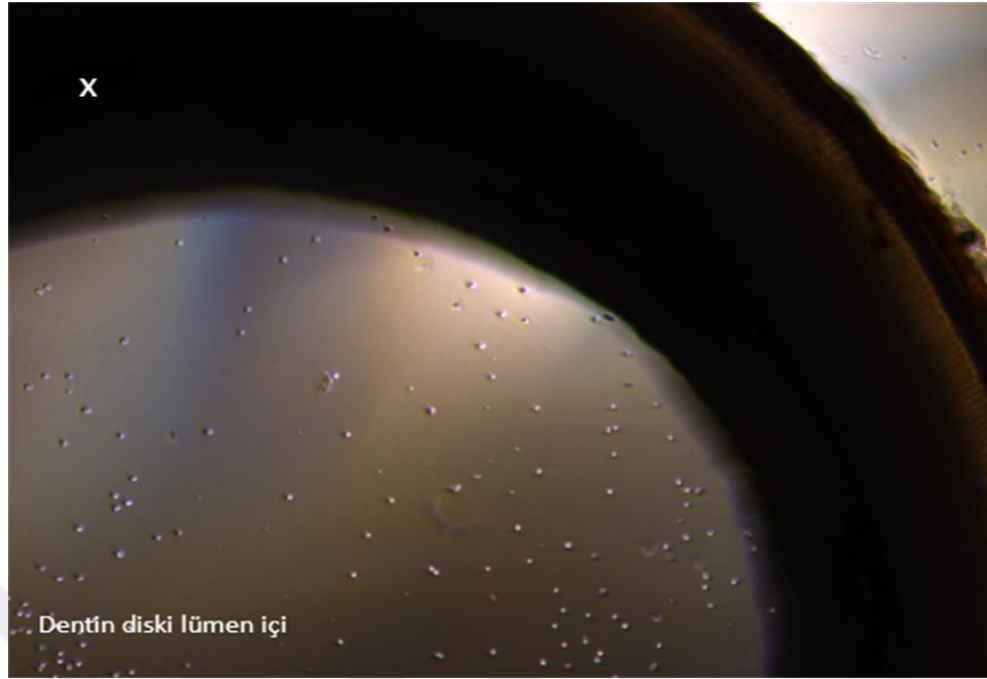
4.1. İNSAN APİKAL PAPİLLA KAYNAKLI MEZENKİMAL KÖK HÜCRE İZOLASYONU VE KARAKTERİZASYONU

İnsan apikal papilla dokusunun izolasyonundan sonra kültür flasklarına tutunan mezenkimal kök hücreleri inkübasyonun 4-5. günlerinde hücreler çoğalmaya başladı ve ‘colony forming units (cfu)’ olarak adlandırılan küçük koloniler halinde gelişme gösterdiği izlendi. Yaklaşık iki hafta sonra primer kültürdeki hücreler %80 yoğunluğa ulaştıklarında birinci pasaj işlemi gerçekleştirildi. Daha sonraki pasajlarda, hücrelerin daha büyük oranda ve hızda çoğalmaya devam ettikleri tespit edildi.

Hücrelerin bir kısmı, daha sonraki aşamalar için her pasaj sonrası donduruldu ve tekrar çözündürüldüklerinde fibroblast benzeri iğsi morfolojilerini korudukları tespit edildi.



Şekil 27. Apikal papilla mezenkimal kök hücrenin ilk ekim sonrası 10x büyütmede mikroskop görüntüsü

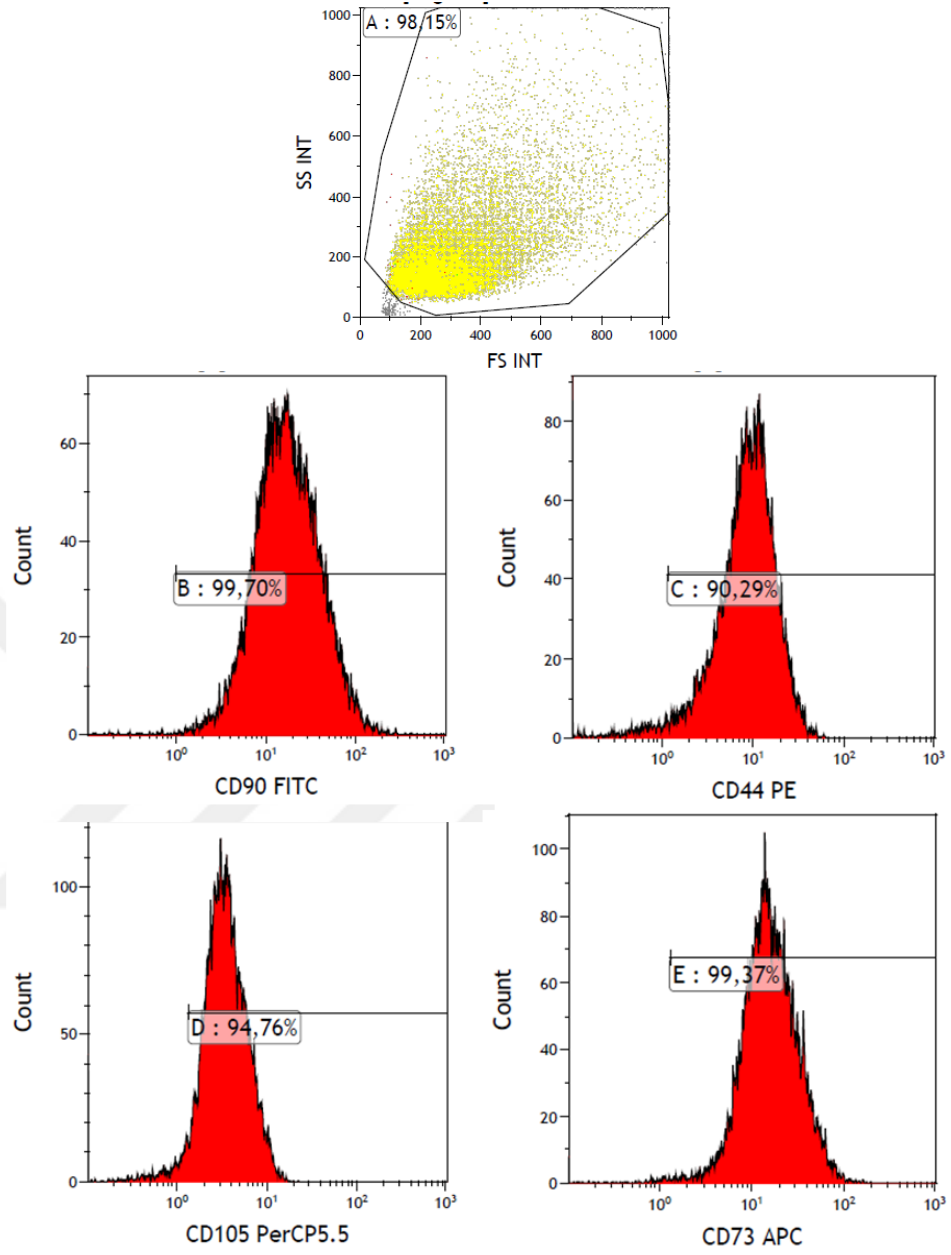


Şekil 28. Apikal papilla mezenkimal kök hücrenin ilk ekim sonrası dentin diski ile birlikte 4x büyütmede mikroskop görüntüsü (x; dentin diski)

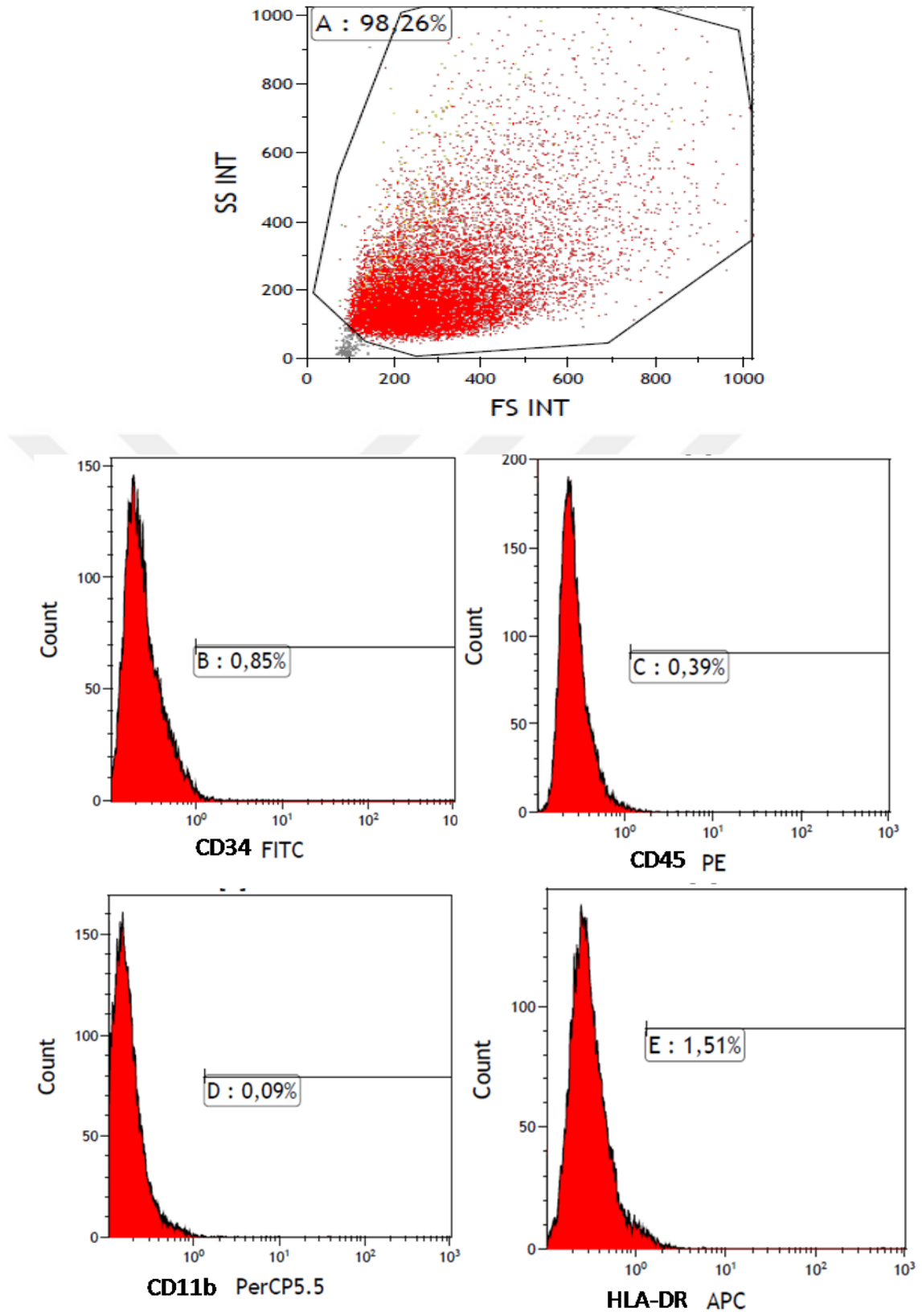
Hücrelerin karakterizasyon işlemi için akım sitometri kullanıldı.

4.2. AKIM SİTOMETRİ

Akım sitometri ile yapılan yüzey belirteçlerinin analizi sonucu apikal papilla kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin %99,70 CD90, %90,29 CD44, %94,76 CD105, %99,37 CD73 pozitif olduğu ve %0,85 CD34, %0,39 CD45, %0,09 CD11b, %1,51 HLA-DR açısından negatif olduğu tespit edildi. (Şekil 29-30)

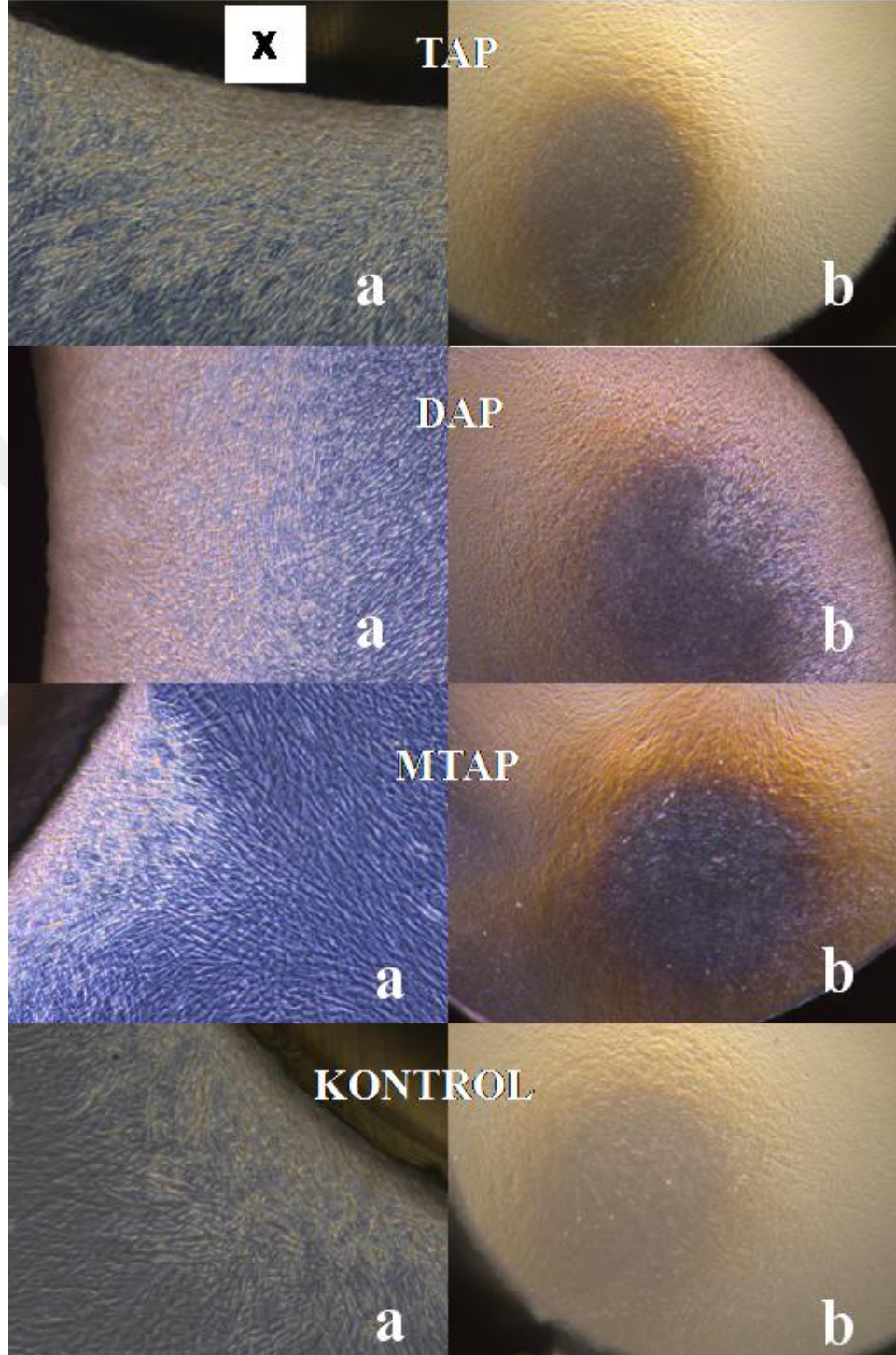


Şekil 29. CD90+, CD44+, CD105+ ve CD70+ mezenkimal kök hücre belirteçlerini eksprese eden apikal papilla kök hücrelerinin akım sitometri ile tanımlanması.

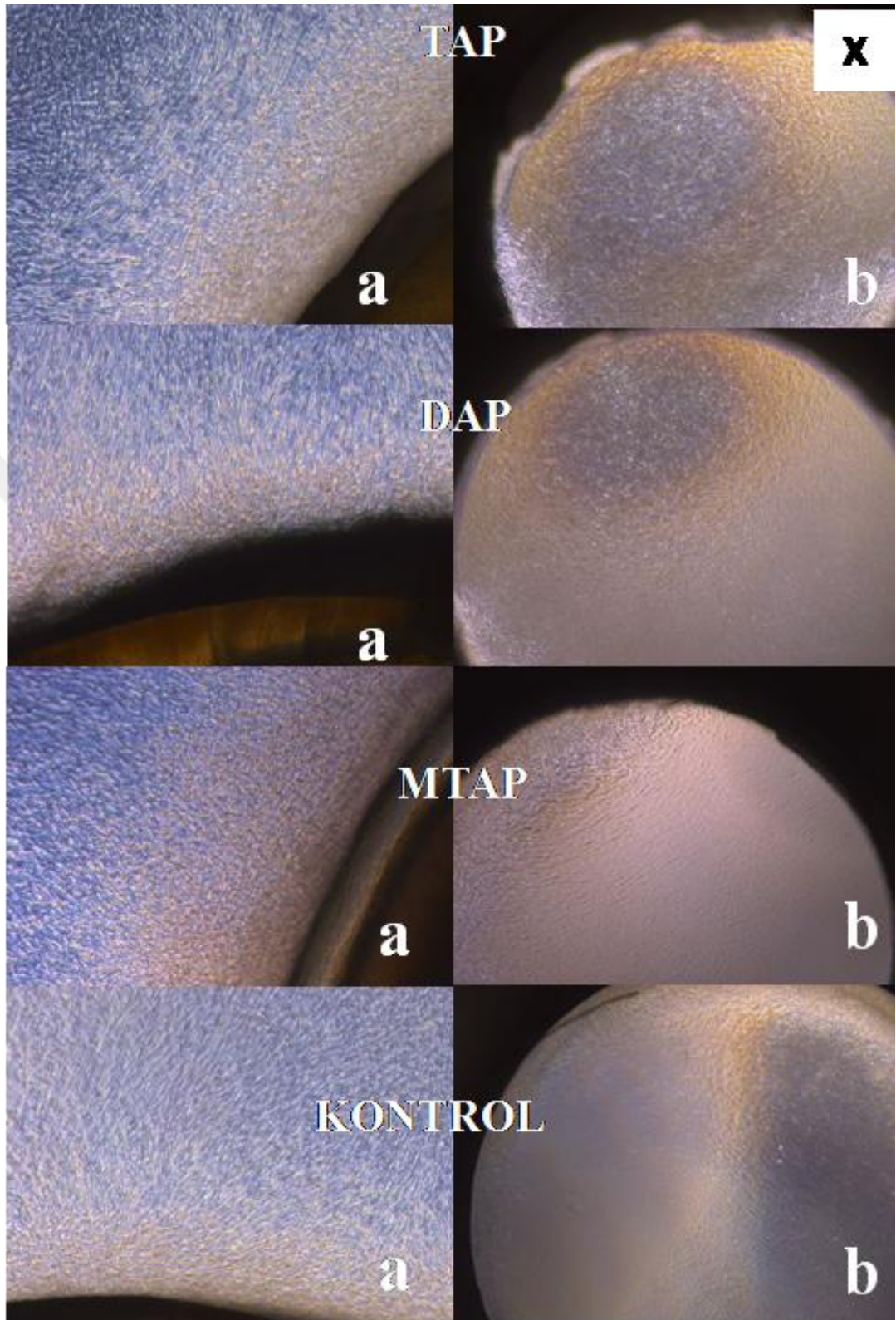


Şekil 30. CD34-, CD45-, CD11b- ve HLA-DR mezenkimal kök hücre belirteçlerini eksprese eden apikal papilla kök hücrelerinin akım sitometri ile tanımlanması.

Hücreler 28. gün sonunda mikroskop altında değerlendirilerek, analizler öncesi görüntüleri alındı.



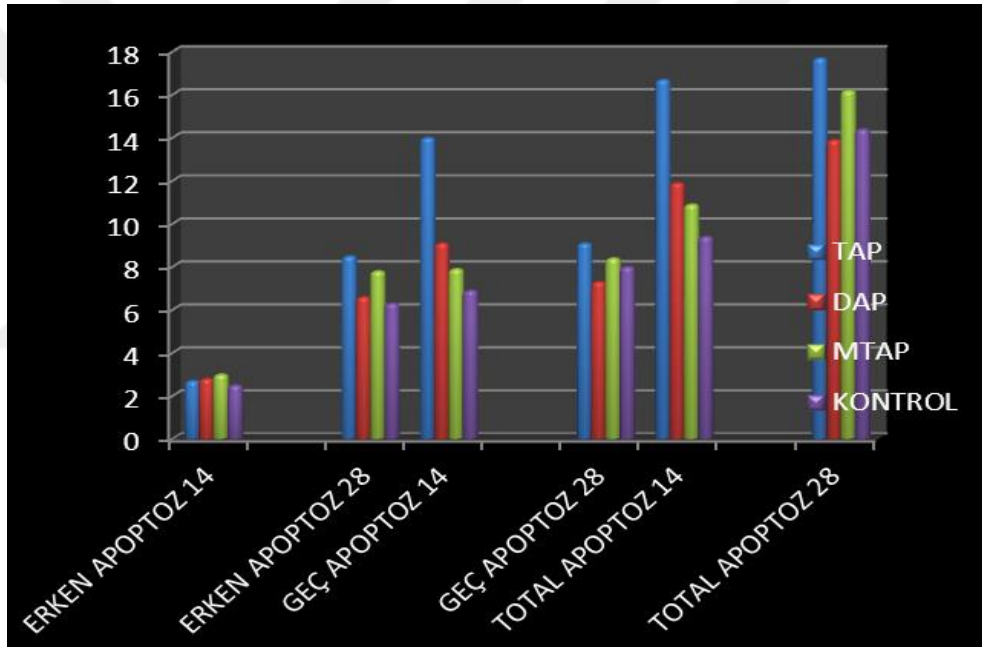
Şekil 31. İnkübasyon sonrası 14 günlük grup mikroskop görüntüleri (a: lümen dışı görüntü, b- lümen içi görüntü, X-dentin diski)



Şekil 32.İnkübasyon sonrası 28 günlük grup mikroskop görüntüleri (a: lümen dışı görüntü, b- lümen içi görüntü, X- dentin diski)

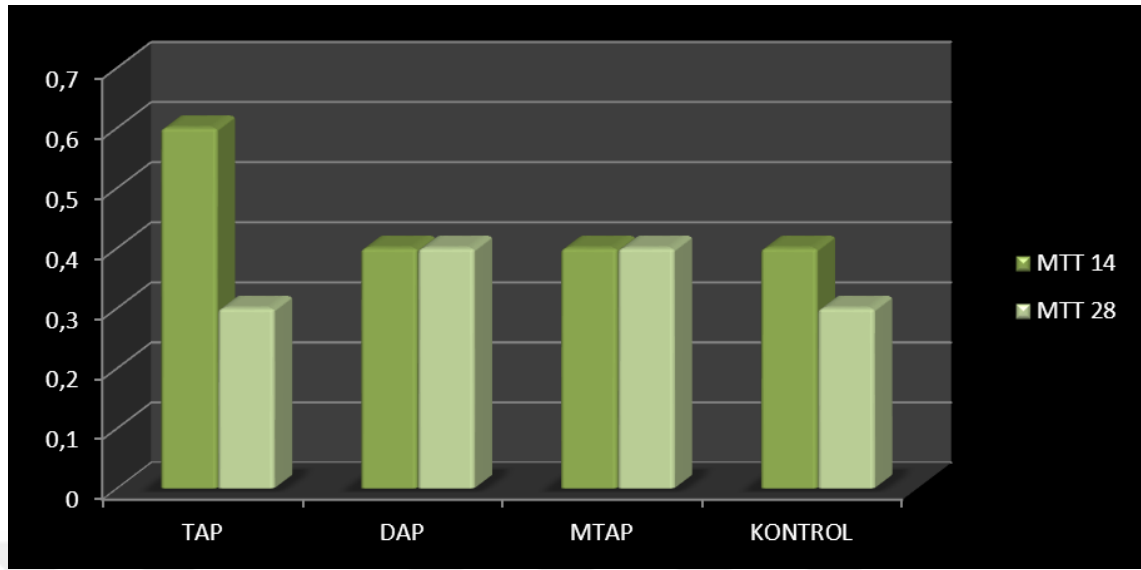
4.3. CANLILIK, APOPTOZ VE MTT TESTİ BULGULARI

1. Gruplara göre 14 günlük ve 28 günlük ilaç uygulaması sonrası canlılık değerlerinin ortalaması karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı ($P=0,922$, $P=0,528$).
2. Gruplara göre 14 günlük ve 28 günlük ilaç uygulaması sonrası erken apoptoz, geç apoptoz ve total apoptoz değerlerinin ortalaması karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı ($P=0,965$, $P=0,665$, $P=0,208$, $P=0,252$, $P=0,312$, $P=0,452$).



Şekil 33. Canlılık ve apoptoz değerlerinin 14 ve 28 günlük karşılaştırmaları

3. Gruplara göre 14 günlük ve 28 günlük ilaç uygulaması sonrası MTT değerlerinin ortalaması karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($P=0,319$, $P=0,406$).

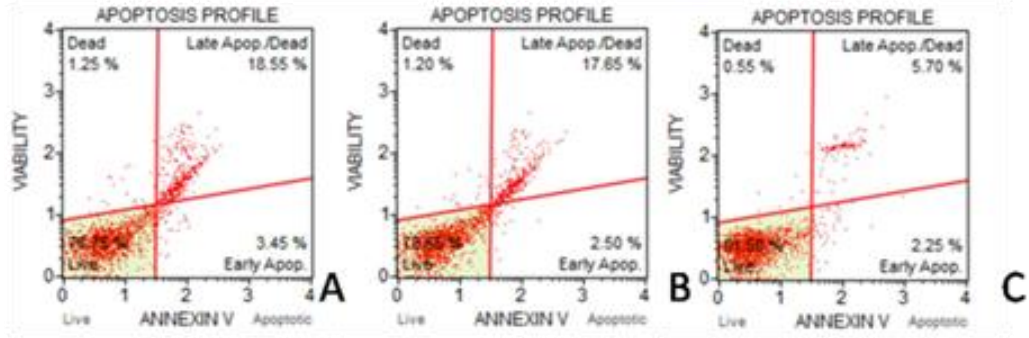
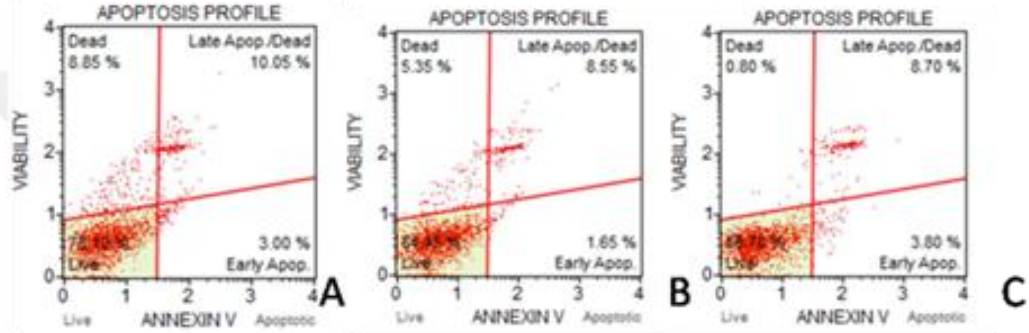
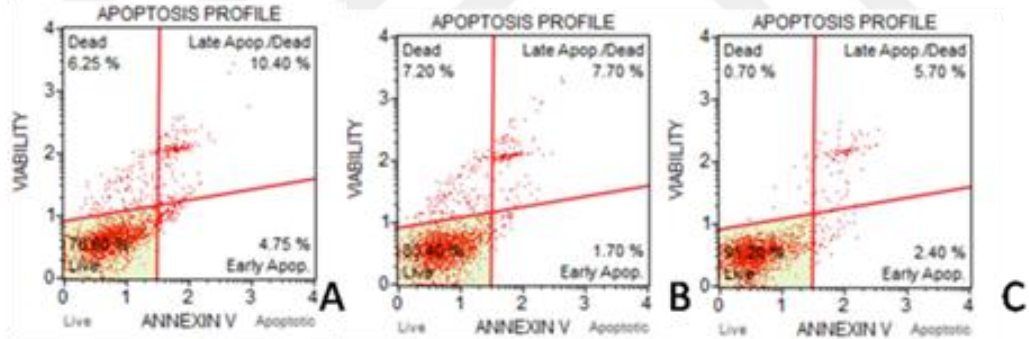
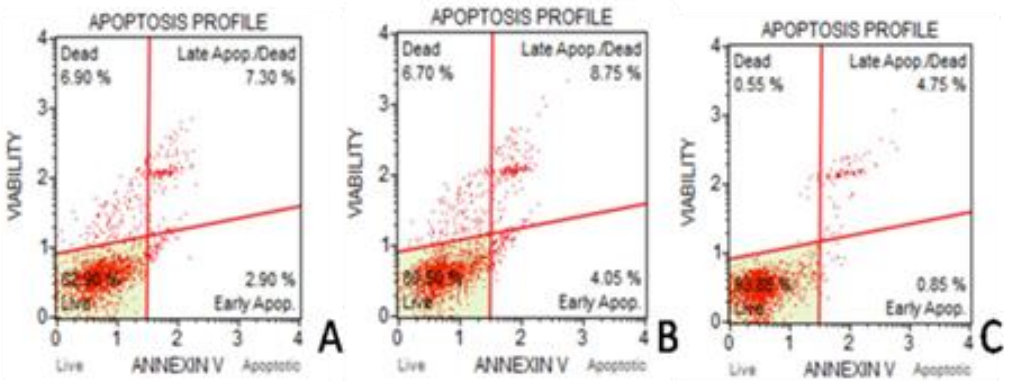


Şekil 34. MTT değerlerinin 14 ve 28 günlük karşılaştırmaları

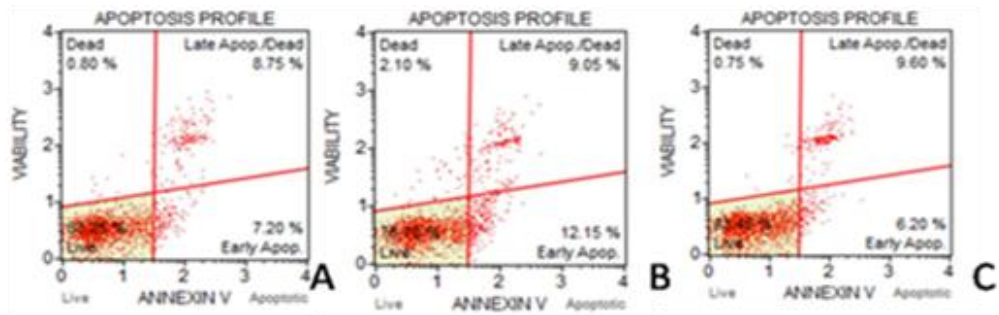
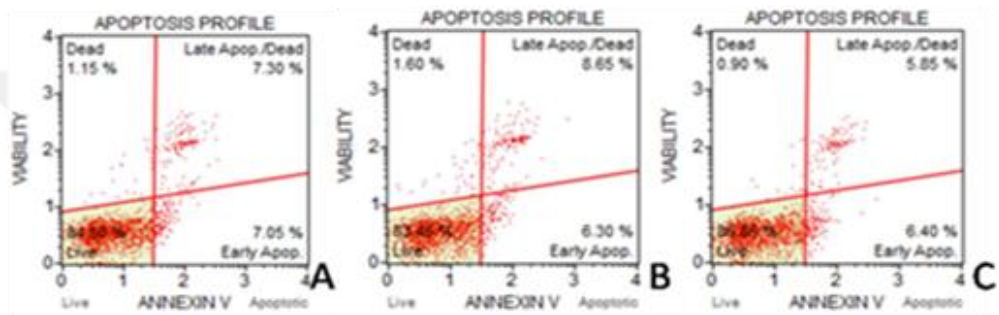
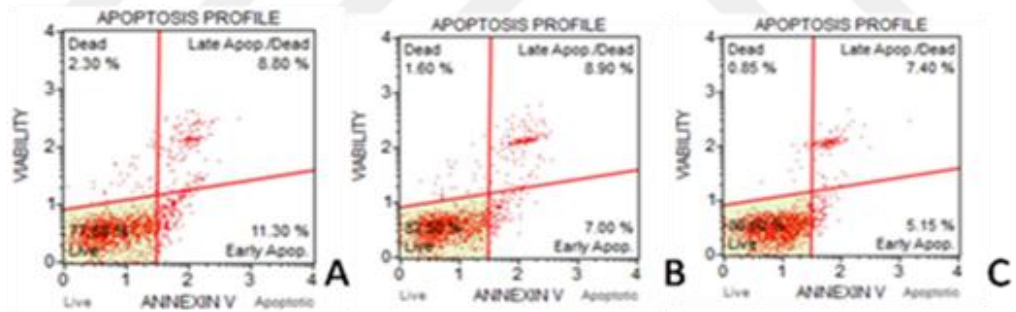
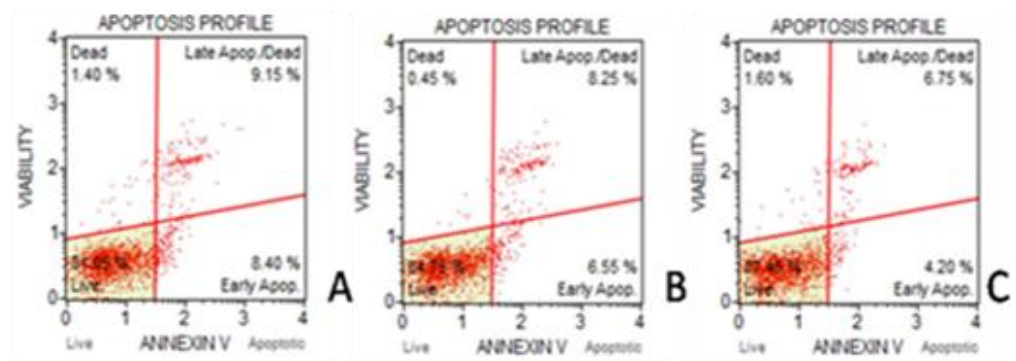
Tablo 12. Grupların canlılık, apoptoz ve MTT değerler tablosu.

(Değerler aritmetik ortalama ve standart sapma şeklinde belirtilmiştir)

DEĞİŞKENLER	GRUPLAR				P
	TAP $\bar{x} \pm ss$	DAP $\bar{x} \pm ss$	MTAP $\bar{x} \pm ss$	KONTROL $\bar{x} \pm ss$	
CANLILIK 14 GÜN	82,3±8,0	83,0±4,5	84,4±6,4	85,8±7,1	0,922
CANLILIK 28 GÜN	81,1±3,8	84,9±1,7	82,2±4,5	84,4±3,2	0,528
ERKEN APOPTOZ 14 GÜN	2,7±0,6	2,8±1,1	3±1,6	2,5±1,4	0,965
ERKEN APOPTOZ 28 GÜN	8,5±3,2	6,6±0,4	7,8±3,2	6,3±1,9	0,655
GEÇ APOPTOZ 14 GÜN	14,0±7,2	9,1±0,8	7,9±2,4	6,9±2,0	0,208
GEÇ APOPTOZ 28 GÜN	9,1±0,4	7,3±1,4	8,4±0,8	8,0±1,2	0,252
TOTAL APOPTOZ 14 GÜN	16,7±7,6	11,9±1,5	10,9±3,8	9,4±3,4	0,312
TOTAL APOPTOZ 28 GÜN	17,7±3,1	13,9±1,4	16,2±3,8	14,4±3,3	0,452
MTT 14 GÜN	0,6±0,3	0,4±0,2	0,4±0,3	0,4±0,1	0,319
MTT 28 GÜN	0,3±0,1	0,4±0,03	0,4±0,05	0,3±0,02	0,406

TAP**DAP****MTAP****KONTROL**

Şekil 35. On dört günlük gruplar için apoptoz grafikleri (A:1.Tekrar B:2. Tekrar C:3.Tekrar)

TAP**DAP****MTAP****KONTROL**

Şekil 36. Yirmi sekiz günlük gruplar için apoptoz grafikleri (A:1.Tekrar B:2. Tekrar C:3.Tekrar)

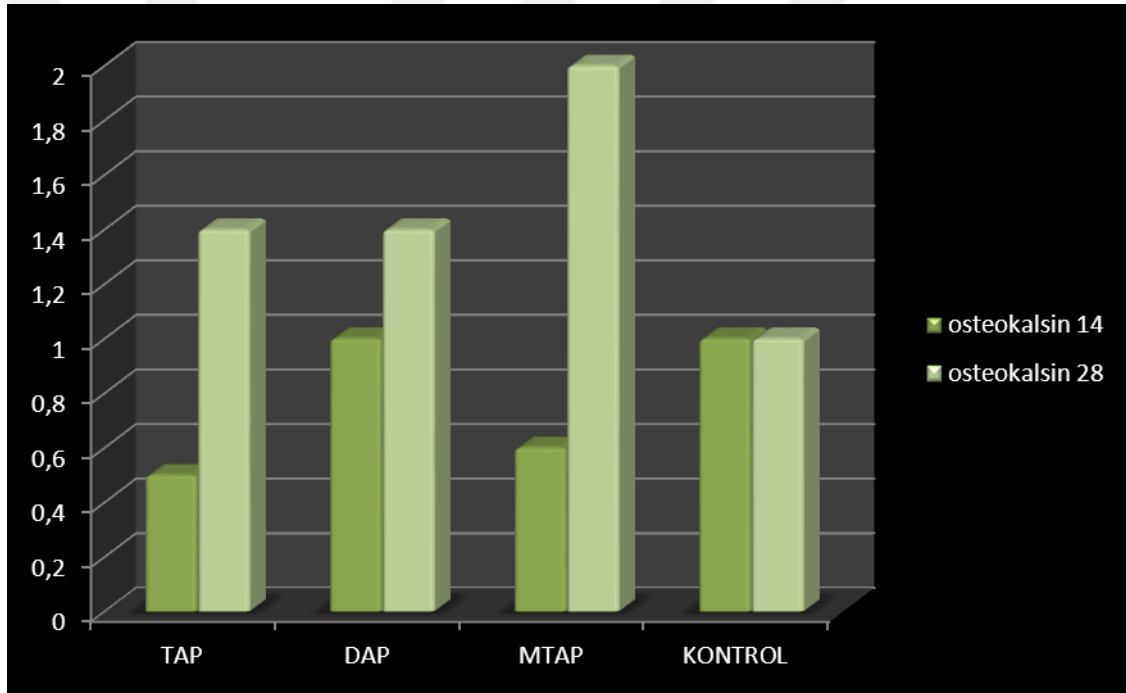
4.4. GEN EKSPRESYON BULGULARI

Osteokalsin (BGLAP) geni için sonuçlar değerlendirildiğinde;

1. On dört günlük grupta istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edildi ($P<0,001$).

En yüksek osteokalsin gen ekspresyon değerini veren DAP ile kontrol grubu arasında fark yokken DAP-TAP ve DAP-MTAP arasında anlamlı farklılık bulundu.

2. Yirmi sekiz günlük grupta istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamakla birlikte çalışma gruplarının tamamında kontrol grubuna oranla daha fazla osteokalsin gen ekspresyonu görülmüştür ($P=0,074$).



Şekil 37. Osteokalsin gen ekspresyon değerlerinin 14 ve 28 günlük karşılaştırmaları

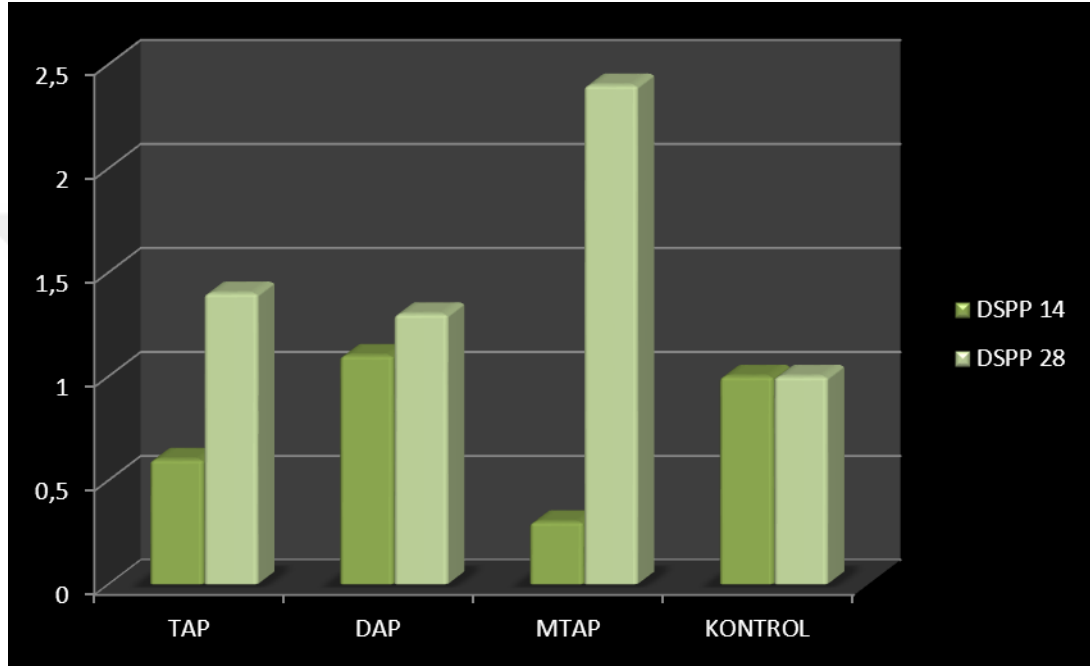
Dentin sialofosfoprotein geni için sonuçlar değerlendirildiğinde;

1. On dört günlük grupta istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edildi ($P<0,001$).

En yüksek DSPP gen ekspresyon değerini veren DAP ile kontrol grubu arasında fark yokken DAP-TAP ve DAP-MTAP arasında anlamlı farklılık bulundu.

2. Yirmi sekiz günlük grupta istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edildi ($P<0,001$).

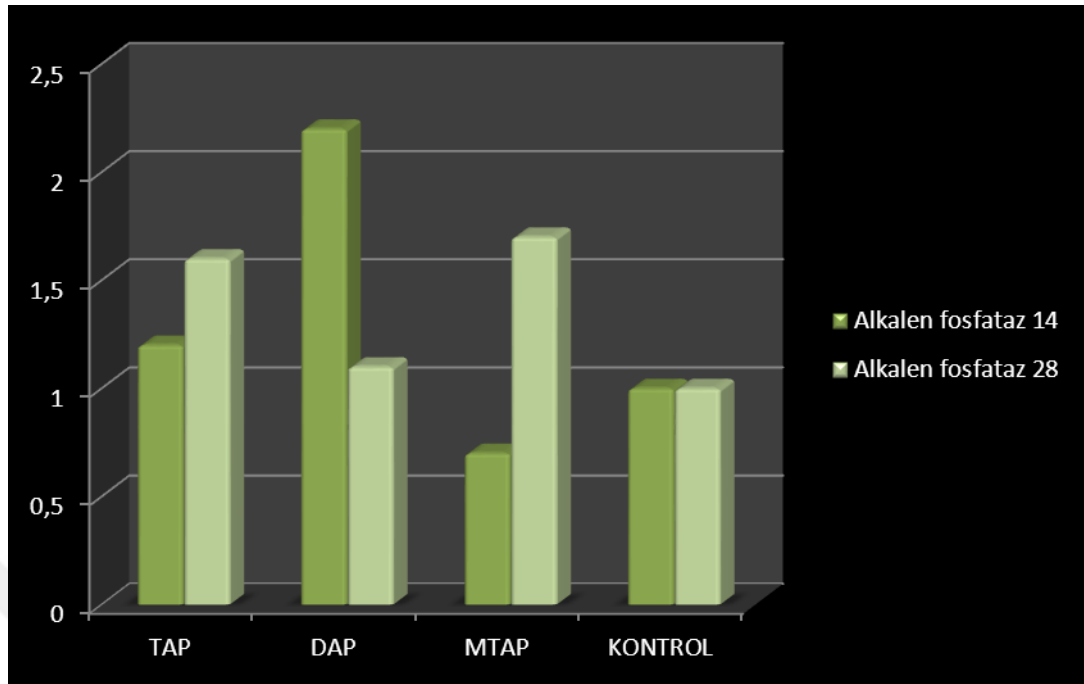
En yüksek DSPP gen ekspresyon değerini veren MTAP ile diğer bütün gruplar arasında anlamlı farklılık bulundu.



Şekil 38. Dentin sialo fosfoprotein gen ekspresyon değerlerinin 14 ve 28 günlük karşılaştırmaları

Alkalen fosfataz için sonuçlar değerlendirildiğinde;

1. On dört günlük grupta istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamakla birlikte MTAP dışındaki çalışma gruplarında kontrol grubuna oranla daha fazla ALPP gen ekspresyonu görülmüştür ($P=0,159$).
2. Yirmi sekiz günlük grupta istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamakla birlikte çalışma gruplarının tamamında kontrol grubuna oranla daha fazla ALPP gen ekspresyonu görülmüştür ($P=0,238$).



Şekil 39. Alkalen fosfataz gen ekspresyon değerlerinin 14 ve 28 günlük karşılaştırmalar

Tablo 13. Grupların osteokalsin, DSPP ve alkalen fosfataz gen ekspresyonları değerler tablosu.

(Değerler aritmetik ortalama ve standart sapma şeklinde belirtilmiştir)

GENLER	GRUPLAR				
	TAP $\bar{x} \pm ss$	DAP $\bar{x} \pm ss$	MTAP $\bar{x} \pm ss$	KONTROL $\bar{x} \pm ss$	P
Osteokalsin 14 Gün	0,5±0,1 ^a	1,0±0,1 ^b	0,6±0,1 ^a	1,0±0,0 ^b	<0,001
Osteokalsin 28 Gün	1,4±0,4	1,4±0,4	2,0±0,6	1,0±0,0	0,074
DSPP 14 Gün	0,6±0,02	1,1±0,1 ^a	0,3±0,04	1,0±0,0 ^a	<0,001
DSPP 28 Gün	1,4±0,2 ^a	1,3±0,1 ^a	2,4±0,4	1,0±0,0 ^a	<0,001
ALPP 14 Gün	1,2±0,4	2,2±1,4	0,7±0,5	1,0b±0,0	0,159
ALPP 28 Gün	1,6±0,4	1,1±0,2	1,7±0,8	1,0±0,0	0,238

4.5. ANTİMİKROBİYAL ETKİNLİK BULGULARI

Enterococcus faecalis dışındaki bakterilere karşı olan antimikrobiyal etkinlikte medikamanlar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edilmemiştir. Enterococcus faecalis'e olan etkinlik TAP>MTAP>DAP şeklindedir (P=0,004)

Tablo 14. Grupların antimikrobiyal etkinlik değerler tablosu.

(Değerler standart sapma ve aritmetik ortalama şeklinde belirtilmiştir)

BAKTERİLER	GRUPLAR			
	TAP $\bar{x} \pm ss$	DAP $\bar{x} \pm ss$	MTAP $\bar{x} \pm ss$	P
Pseudomonas aeruginosa	40,0±0,0	40,0±0,0	40±0,0	-
Escherichia coli	43,0±0,0	43,0±0,0	40±0,0	-
Staphylococcus aureus	36,0±0,0	30,0±0,0	42±0,0	-
Streptococcus mutans	46,0±0,0	48,0±0,0	46±0,0	-
Enterococcus faecalis	37,0±0,0	30,0±0,0	35,1±0,2	0,004
Candida albicans	23,0±00	0,0	10±0,0	-

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Rejeneratif endodontik prosedürler biyolojik temelli yaklaşımlardır: Ancak, bu prosedürlerin uygulaması ile ilgili standart bir yaklaşım henüz oluşturulmamıştır. Rejeneratif endodontik tedavilerin sonuçlarını etkileyen birçok faktör bulunmaktadır. Tedavi prosedürleri uygulanırken başarılı sonuçlar elde edebilmek için, bu faktörlerin anlaşılması oldukça önemlidir. Kullanılan bütün tekniklerde tedavinin ilk basamağı kök kanalının dezenfeksiyonudur. Eğer kanallar etkili bir biçimde temizlenebilir ve sızdırmaz bir restorasyon yapılabilirse, tedavinin prognozu önemli ölçüde olumlu yönde gelişmektedir (105). Bildirilen çok sayıda teknik, kanal içi medikaman ve irrigan tedavi prosedürlerinin standardizasyonunu zorlaştırmaktadır (194, 195).

Bir rejenerasyon protokolü uygulanırken, başarının sağlanabilmesi için irrigan ve medikamanların bakterisid/bakteriostatik özellikleri ve kök hücrelerin sağ kalım ve proliferatif kapasitesini teşvik etme kabiliyetleri dikkate alınarak seçim yapılmalıdır (196). Endodontik tedavide irriganların ve medikamanların rutin kullanımı ile karşılaştırıldığında kök hücrelere olan kimyasal etkilerini değerlendiren az sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu nedenle rejeneratif endodontik işlemleri daha öngörülebilir hale getirebilmek için, kullanılan kimyasallar dâhil olmak üzere önerilen prosedürlerin tüm yönleri ile ele alınması gerekmektedir (196).

Trevino et al. (196) tarafından yapılan çalışma, yaygın olarak kullanılan irrigantların apikal papilla kök hücrelerinin sağ kalımı üzerine etkilerinin uzun süre devam ettiğini göstermiştir. Bu çalışma, rejeneratif işlemlerde kullanılan kimyasal maddelerin daha iyi bilinen antimikrobiyal özelliklerinin yanı sıra, her birinin apikal papilla kök hücreleri üzerindeki etkilerini değerlendirme ihtiyacını vurgulayan ilk çalışmadır. Ayrıca bu çalışmada, apikal papilla kök hücreleri üzerinde kanal içi ilaçların etkileri ile ilgili literatür bilgileri arasında ciddi farklılıklar olduğu bildirilmiştir (196).

Apikal papilla kök hücreleri gibi, mezenkimal kök hücrelerinde sağ kalım ve farklılaşma özellikleri pulpa-dentin kompleksinin rejenerasyonu için kritik öneme sahiptir. Klinik rejeneratif endodontik teknikler ile semptomların iyileşmesi, radyografik kök gelişimi ve hatta vitalitenin tekrar kazanılması mümkündür. Fakat prosedürlerin uygulanmasını takiben dokuların doğal formunda biçimlenmesi ile ilgili tartışmalı öngörüler mevcuttur. Bu işlemler sonrası insan ve hayvan çalışmalarının histoloji sonuçları değerlendirildiğinde, dentin duvarları boyunca sement veya osteodentin benzeri, fakat bunlar tamamen aynı olmayan mineralize doku oluşumu gösterilmektedir (197-199). Bu nedenle şu anda kullanılan rejeneratif endodontik işlemlerin doğal pulpa dentin kompleksi kadar doku yenileyici olmadığı belirtilmektedir. Ayrıca radyografik kök gelişiminin oluşumu uzun yıllar takip gerektirmektedir. Bu durum 3 ay içinde apikal kapama sağlayan prelinik doku çalışmaları ile çelişkilidir (200, 201). Bu nedenle tedavi protokolünün optimize edilmesine büyük bir ihtiyaç vardır. Günümüzde standardizasyonu ve optimum düzeyde dezenfeksiyonu sağlamak amacı ile, alternatif olabileceği düşünülen çok sayıda medikaman ve irrigan kullanılmaktadır.

Bu amaçla çalışmamızda çeşitli medikaman ve kombinasyonlarının apikal papilla mezenkimal kök hücreleri üzerinde meydana getirdiği değişiklikler incelenmiştir. Apikal papilla kaynaklı kök hücreler, odontoblast benzeri hücrelere farklılaşma yeteneklerinin olması ve pulpa kaynaklı kök hücrelere kıyasla elde edilme yöntemlerinin daha az invaziv olması sebebiyle bu tez çalışmasında tercih edilmişlerdir. Kök kanallarındaki enfeksiyonun çok yönlü doğası nedeniyle tek bir irrigan, medikaman veya antibiyotik yeterli sterilizasyonu sağlamamaktadır. Irrigan veya medikamanlar kombine edilerek dirençli bakteri suşlarının önüne geçilmekle birlikte sinerjistik bir etki elde edilebilmektedir (202). Böylelikle elde edilen antimikrobiyal etki, daha uzun süreli olmakta ve medikaman salınımı devam etmektedir. Antibiyotikler, diş hekimliğinde hem sistemik hem de topikal etkilerinden faydalanmak amacı ile kullanılırlar. Sistemik uygulamalarda kullanılan antibiyotiğin cüzi bir miktarı kök kanalına ulaşırken, lokal uygulamalarda yüksek konsantrasyonlarda kullanılarak hem etkinlik arttırılmakta hem de olası sistemik sonuçlar ve komplikasyonların önüne geçilmektedir (203).

Endodontik tedavilerde sıklıkla kullanılan kalsiyum hidroksit, rejeneratif tedaviler ile ilgili birçok çalışmada medikamanların etkisinin değerlendirilmesinde karşılaştırma yapmak amacı ile kullanılmıştır.

Çeşitli antibiyotik karışımlarının rejeneratif endodontik tedaviler uygulanırken kök kanallarının dezekfeksiyonunda kullanılabilecek önemli ajanlar olduğundan ilk olarak 1996 yılında Hoshino et al. bahsetmişlerdir (121). Tipik olarak rejeneratif endodontik işlemlerde, TAP ve DAP'ın macun kıvamındaki konsantrasyonları önerilirken, SCAP ile doğrudan temaslarının ölümcül olduğu belirtilmiştir (204). Bu nedenle Riyadh et al. dentin disklerini ilaç muamelesi sonrası yıkayarak, TAP ve DAP'ın SCAP üzerinde meydana getirdiği indirekt etkisini incelemişlerdir. Çalışmanın sonuçlarına göre tutarlı 2 hipotez öne sürülmüştür. İlk olarak TAP veya DAP dentinde fiziksel yapıyı bozarak veya gömülü büyüme faktörlerini inaktive ederek, uzun dönemde geri dönüşümü zor değişiklikler meydana getirebilmektedir. Bu olasılıkla ilgili olarak, antibiyotik kombinasyonlarının dentin matrisine nüfuz ederek fraktür yatkınlığını arttırdığı bildirilmiştir (205, 206). İkinci hipotez, TAP veya DAP'ın dikkatli bir biçimde yıkanmasına rağmen dentin üzerinde kalması olasılığıdır. Bu alternatif ve makul bir hipotezdir. Çünkü medikamanların %99 oranında uzaklaştırılmasına rağmen kök hücre toksisitesine sebep olduğu bildirilmiştir (204). Ayrıca son zamanlarda kök kanalına yerleştirilen radyoaktif işaretli TAP ve çeşitli yıkama teknikleri uygulayarak uzaklaştırılmaya çalışılsa da, dentin duvarlarında muhafaza edildiği görülmüştür (207). Bu durumdan, dentinin kök hücreler için direkt toksisiteye sebep olan bir rezervuar gibi etki ettiği sonucuna varabiliriz. Rezidüel antibiyotiklerin meydana getirdiği değişikliklere örnek olarak, minosiklin renklenmesi gösterilebilir (208). Çalışmamızda direkt etkiye bağlı faktörleri elimine etmek amacıyla materyaller dentin uygulaması sonrası yıkanarak dolaylı etkileri değerlendirilmiştir.

Aynı zamanda kök hücreler üzerindeki toksik etkinin, konsantrasyona bağlı olduğunun bilinmesi önemlidir. Düşük konsantrasyonda medikaman kullanarak Althumairy et al. tarafından yapılan çalışmada, 28 günlük sonuçlar kontrol grubu ile kıyaslandığında SCAP canlılığına herhangi bir etkisi olmadığı görülmüştür (208). Bu noktada önemli bir çalışma ise, Sato et al. tarafından yayınlanmış ve, TAP ile DAP konsantrasyonlarını 1 mg/ml den daha düşük tutarak test ettiklerinde yine endodontik patojenlere karşı olan etkinliğin korunduğunu bildirmişlerdir (209). Bu sonuçlar değerlendirildiğinde, 1mg/ml

veya daha düşük konsantrasyonlarda DAP veya TAP uygulamalarında, apikal papilla kök hücrelerinin sağ kalımına zararlı etkilerinin büyük oranda engellenebileceği görülmüştür.

Ruparel ve arkadaşlarının (204) 2012 yılında TAP, DAP, mTAP ve Augmentin'in kök hücreler üzerindeki zararlı etkilerinin değerlendirildiği çalışmada, her grupta ilaç konsantrasyonu 100 mg/ml ve 10 mg/ml olarak ayarlandığında, %20 den daha az canlılık oranı tespit edilmiştir. Yine aynı çalışmada, her grupta medikaman konsantrasyonu 1mg/ml olacak şekilde uygulama yapıldığında; %33 ile %56 arasında canlılık oranı gözlemlenirken, ilaç yoğunlukları daha fazla dilue edildiğinde canlılık oranı %100'lere ulaşmıştır (204). Bu sonuçlar 0,1 mg/ml konsantrasyonda uyguladığımız TAP, DAP ve mTAP'ın, SCAP üzerine etkilerini değerlendirerek, %80'in üzerinde canlılık oranı tespit ettiğimiz çalışmamızla paralellik göstermektedir.

Birçok çalışmada koyu pat veya sulu kıvamdaki antibiyotikler hazırlanarak kanala uygulanmıştır (104, 109, 210, 211). Labban et al. (212) 2014 yılında kalsiyum hidroksit, TAP ve DAP'ın farklı konsantrasyonlarda (0.5, 1, 2.5, ve 5 mg /ml) sitotoksitelerini değerlendirdikleri çalışmalarında TAP ve kalsiyum hidroksit sadece maksimum konsantrasyonda sitotoksik etki gösterirken, DAP'ın 4 konsantrasyonda da sitotoksiteye sebep olduğu belirtilmiştir. Yine aynı çalışmada LHD analizi kullanarak TAP ve kalsiyum hidroksit için maksimum nontoksik yoğunluk 2,5 mg/ml olarak belirlenmiştir (212). Klinikte sıklıkla yaklaşık 1.000 mg/ml konsantrasyon da pat veya sulu kıvamdaki antibiyotikler kullanıldığı düşünüldüğünde rutinde uygulanan pat veya sulu kıvamdaki antibiyotik konsantrasyonlarının çok yüksek olduğunu ve kök hücreler üzerine zararlı etkilerinin bulunduğunu varsaymak mantıklı olacaktır.

Yapılan literatür taraması neticesinde TAP, DAP ve mTAP'ın, SCAP üzerine olan etkilerini apoptoz ve gen ekspresyonu yönünden değerlendiren herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Araştırmamız kendi içinde yorumlanacak olursa;

Elde edilen veriler, kontrol grupları ile kıyaslandığında TAP, DAP, mTAP'ın SCAP apoptozu üzerinde istatistiksel olarak anlamlı farklılık yaratacak etkilerinin olmadığı yönündedir. Buna bağlı olarak klinik uygulamalarda 0,1 mg/ml konsantrasyonda uygulama yapıldığında söz konusu medikamanların SCAP'ı apoptoza götürecek zararlı etkilerinin olmadığı düşünülebilir.

Gruplardaki hücrelerin farklılaşma oranları incelendiğinde, 14 gün DAP uygulaması yapılan grupta inkübasyon sonrası, osteokalsin ve DSPP gen ekspresyon düzeyleri diğer

medikamanlar ile kıyaslandığında anlamlı fark oluşturacak şekilde artmış ayrıca istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte alkale fosfatase seviyelerinde de yükseliş tespit edilmiştir. Bu nokta dikkate alındığında 0,1 mg/ml konsantrasyonda 14 gün uygulama yapıldığında DAP'ın sitotoksik etki göstermediği, dentin yapımını ve osteojenik farklılaşmayı indükleyerek etki ettiği sonucuna varılabilir.

Belirtilen konsantrasyonda 28 gün uygulama yapıldığında, antibiyotik kombinasyonlarından hiçbirisi sitotoksik etkiye neden olmadığı gibi dentin ve kemik yapımını olumlu yönde desteklemektedir. Ancak, anlamlı artış DSPP geni için mTAP grubunda görülmüştür. Aynı zamanda istatistiksel açıdan fark olmamakla birlikte, kontrol grubuna kıyasla gruptaki gen ekspresyonları tüm medikamanlar için artış göstermiştir. Anlamlı fark oluşturan mTAP grubu için artan DSPP seviyesi ise bu süre zarfında yıkama sonrası dentine nüfuz eden kalan medikaman miktarının SCAP üzerinde meydana getirdiği olumlu değişikliklerle bağdaştırılabilir.

Bu sonuçlar değerlendirildiğinde; 0,1 mg/ml konsantrasyonda antibiyotik kombinasyonları apoptoz, canlılık ve proliferasyon açısından SCAP üzerinde sitotoksik etki göstermemekle birlikte odontojenik ve osteojenik farklılaşmaya sağlamaktadır.

Bu sonuçlar klinik uygulamalar için yorumlandığında; antibiyotik kombinasyonları seçilirken, farklı uygulama süreleri sonrası dokularda kalan medikaman miktarlarının SCAP da meydana getirdiği değişikliklerin rejenerasyona olumlu ya da olumsuz katkı etkilerinin olabileceği göz ardı edilmemelidir.

Kök kanallarının karmaşık içyapısı pulpa hastalıklarında rol oynayan mikroorganizmaların üremeleri ve çoğalmaları için gerekli ortamı sağlamaktadır (213, 214). Dişlerin krun ve kök bölümlerindeki dentin kanallarının sayı ve çaplarının, mikroorganizmaların veya mikroorganizma yan ürünlerinin geçişine olanak sağlayabilecek nitelikte olması, bu dokunun periapikal patoloji ile ilişkisini ortaya koymaktadır (215). Bakteriyel enfeksiyonun periapikal dokularda oluşturduğu patojenite; organizmanın direnci ile birlikte, enfeksiyonun devamı için dentin kanalları içerisindeki mikroorganizmaların aktivasyonuna ve kök kanalları yolu ile bu dokulara taşınmasına bağlıdır (216).

Endodontik inatçı enfeksiyonların kontrolündeki zorluklar, biyomekanik preperasyonu takiben enfeksiyonun durdurulması amacıyla kanal içi medikaman uygulamasını gerektirmektedir (217).

Preperatların antimikrobiyal etkinliğini ölçmek için yapılan araştırmalarda *in vivo* ve *in vitro* çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Bu tip araştırmalarda çekilmiş insan ve hayvan dişleri kullanıldığı gibi hazırlanan standart mikroorganizma süspansiyonları kağıt konlara emdirilerek preperatların direkt teması ile de gerçekleştirilebilmektedir (133, 218). Bir diğer *in vitro* yöntem olan inhibisyon alanı çaplarının ölçümü yani agar difüzyon testi ise katı besiyerinde üreyen mikroorganizmalara preperatların uygulanarak bu preperatların çevrelerinde oluşması beklenen inhibisyon alanı çaplarının belirlenmesi esasına dayanmaktadır. Bu yöntemle inhibisyon alan çaplarının büyüme düzeyine göre preperatların antimikrobiyal etkisi belirlenmekte ve materyallerin mikroorganizmalar üzerindeki direkt etkisi değerlendirilmektedir. Yöntemin en büyük dezavantajı meydana gelen etkinin mikrobiostatik veya mikrobiosidal olup olmadığının belirlenememesidir. Çalışmamızda sadece preperatların mikroorganizmalara karşı olan antimikrobiyal gücünü araştırmak ve *in vivo* koşulların getirebildiği bazı zorlukları minimum düzeyde tutabilmek amacı ile *in vitro* koşullar tercih edilmiştir.

Bu çalışmada endodontik mikrobiyal floranın üyelerinden çeşitli bakteri türleri dahil edilmiştir. İlgili patojenler;

1. Enterococcus faecalis (E.faecalis): Gram pozitif fakültatif anaerob olan *E. faecalis* endodontik tedavi sonrasında gerçekleşen dirençli apikal periodontitisle ilişkili bir patojendir. Enterokoklar, yüksek alkali pH ve yüksek tuz konsantrasyonu gibi zorlu çevre koşullarında canlı kalabilmektedir (219).

Günümüzde bilinen 23 Enterokok türü vardır ve manitol, sorbitol ve arginin ile etkileşimlerine bağlı olarak 5 gruba ayrılırlar. *E. faecalis* ve *Enterococcus Faecium*(*E.faecium*) insanlarda en çok görülen Enterokok türleridir ve aynı grupta yer almaktadırlar(220). *E. faecalis*, oral kavite mikroflorasının bir üyesidir ve alınan tükürük örneklerinde, *E. faecalis*'in prevalansı endodontik hikayesi olmayan hastalarla karşılaştırıldığında endodontik tedaviye yeni başlayan, tedavinin ortasında olan ve kök kanal tedavisi yenilenen hastalarda giderek artış göstermektedir (221). *E. faecalis*, primer ve inatçı enfeksiyonlar gibi periradiküler hastalıkların farklı türleriyle ilişkilidir (222). Dirençli enfeksiyonlarda kültür çalışmalarıyla değerlendirildiğinde %24-%70 oranında bulunurken, polimeraz zincir reaksiyonu ile değerlendirildiğinde %67-%77 oranında bulunmuştur (222).

E. faecalis kök kanal sisteminde yaşamının zorluklarını birkaç yolla aşmaktadır. *E. faecalis*; dentine bağlanmasına yardımcı olan, serin proteaz, jelatinaz ve kollojene

bağlanma proteinlerine sahiptir ve dentin tübüllerine penetre olabilecek ve yaşayabilecek kadar küçüktür (223, 224). Aynı zamanda uzun süre besinsiz kalabilme yeteneğine sahiptir ve besine ulaşıldığı zaman uzun süre aç kalmış hücreler besin kaynağından serum gibi faydalanarak iyileşebilme özelliğine sahiptirler (225). Alveolar kemik ve periodontal ligamentten gelen serum, aynı zamanda *E. faecalis*'in tip I kollojene bağlanmasına yardımcı olmaktadır (224). *E. faecalis*, biyofilm formunda organize olabilir ki bu durum bakterinin biyofilm formunda organize olmayan organizmalara göre antikolar ve antimikrobiyaller karşısında daha dirençli olmasını sağlamaktadır(226). Kültüre edilmesi kolay olması sebebiyle de enfekte dentin modelinde sıklıkla kullanılan bir mikroorganizmadır (226).

2. Streptococcus mutans (S.mutans): Gram-pozitif, fakültatif anaerobik koklardır. Yapılan çalışmalarda streptokok türleri semptomatik apikal periodontitis vakalarında en çok görülen tür olarak bildirilmiştir(227). Oral mikrofloranın bir üyesi olan streptokoklar aynı zamanda nekrotik pulpalı dişlerde, temizleme ve şekillendirme işlemleri sırasında ve kanal içi medikament uygulamasını takiben kök kanallarında ve kanal tedavisi yenilenen hastalarda görülürler (214, 228, 229).

Pek çok oral streptokok türlerinin en önemli karakteristik özelliklerinden biri özel proteinler (adezin) açığa çıkararak diş yüzeyine tutunabilme yetenekleridir. Bu mekanizmayla streptokoklar kolonizasyonu ve dental plaktaki kominite formasyonunu başlatmaktadırlar (230).

Dentinin major organik içeriği olan Tip I kollojen, oral streptokoklar tarafından tanınmakta ve hidroksiapatit yapının üzerinde bulunduğu streptokokların adezyonu için substrat gibi hareket etmektedir (231). *S. mutans* mineralize olmamış kollojene ve kök dentinine bağlanabilmektedir (232). Streptokoklar ve aynı zamanda pek çok farklı ekstrasellüler proteinler salgılayarak elverişsiz koşullara uyum sağlayıp yaşayabilmektedirler (233). Yapılan kültür çalışmaları apikal periodontitisli dişlerde streptokoe ve laktobasiller'in, enterokoklardan daha az olmakla birlikte kök kanal tedavisi sonrasında canlılıklarını koruyabildiklerini göstermişlerdir. Güçlü bir biyofilm yapıcıdır böylelikle bakterilerin kök kanalına tutunması ve direnç göstermesine yardım eder. Anaerobik bakterilerle karşılaştırıldığında laboratuvar koşullarına uyum göstermesi bu mikroorganizmanın enfekte dentin modelinde en çok kullanılan mikroorganizmalardan biri olmasını sağlamaktadır (234) (235).

3. Staphylococcus aureus (S.aureus): Gram + fakültatif anaerob patojendir. Suşları hem hastane hem de toplumdaki bakteriyemi, pnömoni, endokardit, osteomyelit ve toksik şok sendromu gibi morbidite ve mortalitesi yüksek ciddi infeksiyonların önemli bir etkeni olarak tanımlanmışlardır (236).

4. Escherichia coli (E.coli): Gram- fakültatif anaerob patojendir. Normalde barsak florasında bulunur. E. coli bir bakteri olduğundan endospor oluşturmaz, pastörizasyon veya kaynatma ile ölür. Memeli hayvanların bağırsaklarında büyümeye adapte olmuş olduğu için en iyi vücut sıcaklığında çoğalır. Kök kanallarında ve nekrotik dişlerde tespit edilmese de bazı çalışmalarda periapikal lezyonlarda izole edilmiştir (237, 238).

5. Pseudomonas aeruginosa (P.aeruginosa): Gram – aerobik patojendir. Hastane enfeksiyonları ile ilişkilidir ve immün sistemi baskılanmış hastalarda, kistik fibrozis hastalarında, pnömoni, bakteriyemi durumlarında sıklıkla izole edilmektedir (239). P. aeruginosa yüksek genetik hassasiyeti nedeniyle farklı fenotiplere ekprese olabilmek yeteneğine sahiptir ve antibiyotiklere karşı intriksek direnç mekanizması bulunmaktadır (240).

6. Candida albicans (C.albicans): Eşeyli çoğalan, diploit, maya tipi bir mantar türüdür. İnsanlarda oral ve vajinal fırsatçı enfeksiyonların etmenidir. 1997 yılında Waltimo et al. inatçı apikal enfeksiyonlardan elde ettikleri en yaygın 967 mikroorganizma üzerinde yaptıkları çalışmada izole edilen 48 mantar suşunun % 7 sini kültür pozitif C. Albicans'ların oluşturduğu bildirilmiştir (241). C.Aalbicans invaziv dentin afinitesi deneniyle dentinofilik mikroorganizma olarak tanımlanmıştır, bu nedenle endodontik enfeksiyonlarda sıklıkla rastanmaktadır (242, 243). C.albicans oral sıvıların yokluğunda dentin yüzeyinde büyüme, hif ve blastosporlar gibi değişik büyüme modelleri sayesinde dentine penetre olma yeteneğine sahiptir (244).

Ayrıca biyofilm oluşturma yeteneği ve patojenitesinin yüksekliği sebebi ile sıklıkla kök kanal tedavilerinde görülen başarısızlıklarla ilişkilendirilmiştir (243).

Endodontik enfeksiyonların polimikrobiyal doğası nedeniyle kök kanalından mikroorganizmaların 3 boyutlu eliminasyonu için çeşitli materyaller ve kombinasyonları denenmiştir. Mozayani et al. (245) 2014 yılında kalsiyum hidroksit, klorheksidin ve TAP'ın E.faeacis' e karşı antimikrobiyal etkinliklerini değerlendirdikleri çalışmada en yüksek inhibitör etkinin TAP ile elde edildiği bildirilmiştir. TAP'ı klorheksidin glukonat ve kalsiyum hidroksit takip etmektedir. Bu

sonuç bizim çalışmamızın verileri ile paralellik göstermekle birlikte çekilmiş insan dişleri kullanılan çalışmada TAP'ın dentine kalsiyum hidroksit ve klorheksidin glukonata oranla daha iyi penetre olması ile ilişkilendirilmiştir (245). Farklı metodlar kullanılmış olsa da bizim çalışmamızda olduğu gibi agar difüzyon methodu kullanan Ald et al. (246) araştırmasında da benzer sonuçlar elde ettiklerini bildirmişlerdir.

Propolis, TAP, klorheksidin glukonat ve kalsiyum hidroksitin antifungal etkilerini enfekte dentin modeli kullanarak değerlendirdikleri bir başka çalışmada 1. Gün sonunda en yüksek etki klorheksidin glukonat ve sonrasında kalsiyum hidroksitde olmak üzere bütün medikamanlar yüksek antifungal etki bildirilmiştir (247). Propolis ve TAP arasında ise istatistiksel olarak anlamlı fark görülmemiştir. 7. günün sonunda ise en yüksek değer klorheksidin glukonata ait olmasına rağmen diğer gruplarla arasında anlamlı fark bulunmamıştır (247). Bu durumdan sürenin artması ile birlikte medikamanların benzer etkinlik gösterdiği sonucuna varılabilmektedir.

Antibiyotiklerin antifungal etkinlikleri olmaması rağmen TAP içerisindeki minoksiklin sayesinde ribozomlar üzerindeki protein sentezini inhibe ederek, metonidazol ve siprofloksasin ise fibroblastların ekstrasellüler matriks ve kollagen sentezine katkı sağlayarak antimikrobiyal etkinlik göstermektedir(123, 248). TAP'ın dentin tüpüllerine penetre olduğu ve anaerobik, gram pozitif ve gram negatif mikroorganizmlara karşı etkili olduğu kanıtlanmıştır (249). TAP aseptik ortam yaratmanın yanı sıra periapikal iyileşme ve onarıma katkı sağlayarak pulpa-dentin kompleksinin işlevsel gelişimini de hızlandırmaktadır(200).

Alizera et al.(246) E.faecalis e karşı TAP'ın kalsiyum hidroksite göre daha iyi antimikrobiyal etkinlik gösterdiğini bildirmişlerdir ki bu sonu bizim sonuçlarımızla benzerlik göstermektedir. Ayrıca çalışmamızın sonuçlarına göre her üç antibiyotikli pat grubunda da (TAP, DAP ve mTAP) E. faecalis için güçlü antimikrobiyal etkinlik gözlemlenmiştir. C.albicans için sonuçları değerlendirdiğimizde ise en iyi antifungal etkinliği TAP göstermiş olup bunu mTAP takip etmektedir. DAP grubunda ise suşlar C. albicansa karşı direnç göstermiş olup bu farka TAP içerisindeki minosiklinin sebep olduğu düşüncesindeyiz.

Çalışmamızda ayrıca diğer araştırmalardan farklı olarak TAP, DAP ve mTAP'ın P.aeruginosa, E.coli, S.aureus, S.mutans suşlarına olan antimikrobiyal etkinlikleri değerlendirilmiş olup bütün gruplarda benzer olumlu sonuçlar elde edilmiştir.

Shaik et al. (250) 2014 yılında TAP ve kalsiyum hidroksiti kitosanla kombine ederek *C.albicans* ve *E. faecalis* olan etkinliklerini değerlendirdikleri çalışmada materyallerin kitosanla kombine edildikleri gruplarda daha iyi sonuçlar elde edildiği bildirilmiştir.

Rejeneratif endodontik tedavilerde kanal içi dezenfeksiyonda kullanılan çeşitli medikaman kombinasyonlarının sitotoksite, farklılaşma ve antimikrobiyal etkinliklerini *ex-vivo* şartlarda değerlendirdiğimiz çalışmamızın sonuçlarına göre;

- 1.Canlılık oranları yönünden, grupların hiç biri istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık sergilemezken, 14 gün ilaç uygulaması yapılan grupta en yüksek canlılık oranları kontrol grubumuzda, en düşük canlılık oranları TAP grubunda tespit edilmiştir. 28 günlük grupta yine en düşük canlılık oranları TAP grubunda, en yüksek canlılık oranı ise kontrol grubundan da yüksek seviyelerde DAP grubunda gözlenmiştir.
2. Bu çalışmada her bir materyal için 14 ve 28 günlük grup değerlendirildiğinde hücre erken apoptoz, geç apoptoz ve total apoptoz oranlarındaki değişimlerde anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. Total apoptoz oranları yönünden gruplar her iki uygulama periyodu için, beklenildiği üzere canlılık oranlarıyla ilişkili sonuçlarla tamamen ters orantılı olarak sıralanmıştır.

Yukarıda verilen iki sonuç, kullanılan medikamanların klinik uygulamalarda belirtilen dozlarda sitotoksite açısından herhangi bir olumsuz etki sergilemediklerini göstermektedir.

- 3.Proliferasyon oranları konusunda, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlenmezken, ölçülen skorlar kontrol grubuyla benzerlik göstermektedirler.
4. Gen ekspresyon düzeyleri değerlendirildiğinde 14 gün ilaç uygulaması yapılan DAP grubunda osteokalsin ve DSPP genlerinin ekspresyon düzeylerinde anlamlı yükseliş tespit edilmiştir. 28 gün mTAP uygulaması yapılan grupta DSPP geni ekspresyon düzeyinde anlamlı yükseliş tespit edilmiştir. Bu bilgiler ışığında; klinikte rejenerasyon protokolleri uygulanırken seçilecek antibiyotik kombinasyonlarının, kanal içerisinde bırakılacağı sürelerin hücrelerin farklılaşmasına değişik şekillerde etki ettiği göz önünde bulundurulmalıdır.
5. Kullanılan medikamanların antimikrobiyal etkinliklerinin değerlendirildiği çalışmamızın ikinci bölümünde, 24 saatlik inkübasyon periyodu sonunda tüm gruplarda, söz konusu bakterilere karşı yeterli etkinlik tespit edilmiştir. Bununla

birlikte *C.albicans* için en yüksek antifungal etki TAP grubunda görülmüş olup, DAP grubunda herhangi bir etki izlenmemiştir.

Çalışmamızda ulaştığımız ve yukarıda sıralanan sonuçlar, günümüzde rejeneratif endodontik uygulamalarda kullanılan çeşitli antibiyotik kombinasyonlarının sitotoksisite ve antimikrobiyal etkilerinin incelenmesinde önemli katkılar sağlamakla birlikte, çalışmamız dışında hiçbir araştırmada gen ekspresyon analizlerinin yapılmadığı gerçeği göz önünde bulundurularak, bu alanda *ex-vivo* ve *in-vivo* koşullarda yapılacak iyi planlanmış, kapsamlı çalışmalarla desteklenmesi gerektiği düşünülmektedir.



6. KAYNAKLAR

1. Hermann BW. On the reaction of the dental pulp to vital amputation and calxyl capping Dtsch Zahnarztl Z, 1952. 7(24): p. 1446-7.
2. Murray PE, Garcia-Godoy F, and Hargreaves KM. Regenerative endodontics: a review of current status and a call for action. J Endod, 2007. 33(4): p. 377-90.
3. Smith AG. Embryo-derived stem cells: of mice and men. Annu Rev Cell Dev Biol, 2001. 17: p. 435-62.
4. Rao MS . Stem sense: a proposal for the classification of stem cells. Stem Cells Dev, 2004. 13(5): p. 452-5.
5. Fortier LA. Stem cells: classifications, controversies, and clinical applications. Vet Surg, 2005. 34(5): p. 415-23.
6. Gimble J and F Guilak. Adipose-derived adult stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential. Cytotherapy, 2003. 5(5): p. 362-9.
7. Tsukamoto Y. et al., Mineralized nodule formation by cultures of human dental pulp-derived fibroblasts. Arch Oral Biol, 1992. 37(12): p. 1045-55.
8. American Association For the Advancemenet of Science, 1999.
9. Bayık M. Kök Hücre: Yaşamın Kaynağı,1. Ulusal Klinik Pratikte Kök Hücre ve Gen Tedavisi Kongre Kitabı. 2004: p. 13-23.
10. Regenerative medicine glossary. RegenMed 2009. 4: p. 1-88.
11. Bayık M. Kök Hücre: Yaşamın Kaynağı,1. Ulusal Klinik Pratikte Kök Hücre ve Gen Tedavisi Kongre Kitabı. 2004.
12. Caplan AL. Bruder S.P., Mesenchymal stem cells;Building blocks for molecular medicine in the 21 sr century. Trends.Mol.Med., 2001. 7.
13. Yu J. et al., Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. Science, 2007. 318(5858): p. 1917-20.
14. Do JT and Scholer HR. Nuclei of embryonic stem cells reprogram somatic cells. Stem Cells, 2004. 22(6): p. 941-9.

15. İskender B, Canatan H. Induced pluripotent stem cells and cell therapy. *Journal of Clinical and Experimental Investigations*, 2013. 4: p. 550-561.
16. Thomson JA, Marshall VS, and Trojanowski JQ, Neural differentiation of rhesus embryonic stem cells. *APMIS*, 1998. 106(1): p. 149-56; discussion 156-7.
17. Thomson JA. et al., Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 1998. 282(5391): p. 1145-7.
18. Jones DL and Wagers AJ. No place like home: anatomy and function of the stem cell niche. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008. 9(1): p. 11-21.
19. Ho PJ et al., Current applications of human pluripotent stem cells: possibilities and challenges. *Cell Transplant*, 2012. 21(5): p. 801-14.
20. Petersen BE. et al., Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science*, 1999. 284(5417): p. 1168-70.
21. Karaöz E. Kök hücreler. *Atı Teknoloji Yayınları*, 2004.
22. Şahin FS. Kök hücre plastisitesi ve kök hücre tedavisi. 2005.
23. Palmer TD, Ray J, and Gage FH. FGF-2-responsive neuronal progenitors reside in proliferative and quiescent regions of the adult rodent brain. *Mol Cell Neurosci*, 1995. 6(5): p. 474-86.
24. Gronthos S. et al., Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. 97(25): p. 13625-30.
25. Morsczeck C. et al., Isolation of precursor cells (PCs) from human dental follicle of wisdom teeth. *Matrix Biol*, 2005. 24(2): p. 155-65.
26. American Association for the advancement of science, 1999.
27. Tucker A and Sharpe P. The cutting-edge of mammalian development; how the embryo makes teeth. *Nat Rev Genet*, 2004. 5(7): p. 499-508.
28. Yamazaki H. et al., Potential of dental mesenchymal cells in developing teeth. *Stem Cells*, 2007. 25(1): p. 78-87.
29. Peng L, Ye L and Zhou XD. Mesenchymal stem cells and tooth engineering. *Int J Oral Sci*, 2009. 1(1): p. 6-12.
30. Rosa V. et al., Tissue engineering: from research to dental clinics. *Dent Mater*, 2012. 28(4): p. 341-8.
31. Nakao K. et al., The development of a bioengineered organ germ method. *Nat Methods*, 2007. 4(3): p. 227-30.

32. Coura G.S. et al., Human periodontal ligament: a niche of neural crest stem cells. *J Periodontal Res*, 2008. 43(5): p. 531-6.
33. Liu Y. et al., Periodontal ligament stem cell-mediated treatment for periodontitis in miniature swine. *Stem Cells*, 2008. 26(4): p. 1065-73.
34. Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science*, 1997. 276(5309): p. 71-4.
35. Krebsbach PH and Robey PG. Dental and skeletal stem cells: potential cellular therapeutics for craniofacial regeneration. *J Dent Educ*, 2002. 66(6): p. 766-73.
36. Gronthos S. et al., Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res*, 2002. 81(8): p. 531-5.
37. Papaccio G. et al., Long-term cryopreservation of dental pulp stem cells (SBP-DPSCs) and their differentiated osteoblasts: a cell source for tissue repair. *J Cell Physiol*, 2006. 208(2): p. 319-25.
38. Otaki S. et al. Mesenchymal progenitor cells in adult human dental pulp and their ability to form bone when transplanted into immunocompromised mice. *Cell Biol Int*, 2007. 31(10): p. 1191-7.
39. Kim BS. et al., Growth and osteogenic differentiation of alveolar human bone marrow-derived mesenchymal stem cells on chitosan/hydroxyapatite composite fabric. *J Biomed Mater Res A*, 2013. 101(6): p. 1550-8.
40. Miura M. et al., SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. 100(10): p. 5807-12.
41. Cordeiro MM. et al. Dental pulp tissue engineering with stem cells from exfoliated deciduous teeth. *J Endod*, 2008. 34(8): p. 962-9.
42. Shi S and S Gronthos, Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. *J Bone Miner Res*, 2003. 18(4): p. 696-704.
43. Nosrat IV. et al., Dental pulp cells produce neurotrophic factors, interact with trigeminal neurons in vitro, and rescue motoneurons after spinal cord injury. *Dev Biol*, 2001. 238(1): p. 120-32.
44. Nakamura S. et al., Stem cell proliferation pathways comparison between human exfoliated deciduous teeth and dental pulp stem cells by gene expression profile from promising dental pulp. *J Endod*, 2009. 35(11): p. 1536-42.

45. Wang J. et al., Stem cells from human-exfoliated deciduous teeth can differentiate into dopaminergic neuron-like cells. *Stem Cells Dev*, 2010. 19(9): p. 1375-83.
46. Yokoi T. et al. Establishment of immortalized dental follicle cells for generating periodontal ligament in vivo. *Cell Tissue Res*, 2007. 327(2): p. 301-11.
47. Kemoun P. et al., Human dental follicle cells acquire cementoblast features under stimulation by BMP-2/-7 and enamel matrix derivatives (EMD) in vitro. *Cell Tissue Res*, 2007. 329(2): p. 283-94.
48. Yao S. et al., Differentiation of stem cells in the dental follicle. *J Dent Res*, 2008. 87(8): p. 767-71.
49. Trubiani O. et al., Regenerative potential of human periodontal ligament derived stem cells on three-dimensional biomaterials: a morphological report. *J Biomed Mater Res A*, 2008. 87(4): p. 986-93.
50. Gay IC, Chen S and MacDougall M. Isolation and characterization of multipotent human periodontal ligament stem cells. *Orthod Craniofac Res*, 2007. 10(3): p. 149-60.
51. Lindroos B. et al. Characterisation of human dental stem cells and buccal mucosa fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008. 368(2): p. 329-35.
52. Park J.C. et al. Isolation and characterization of human periodontal ligament (PDL) stem cells (PDLSCs) from the inflamed PDL tissue: in vitro and in vivo evaluations. *J Clin Periodontol*, 2011. 38(8): p. 721-31.
53. Estrela C. et al. Mesenchymal stem cells in the dental tissues: perspectives for tissue regeneration. *Braz Dent J*, 2011. 22(2): p. 91-8.
54. Sonoyama W. et al. Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: a pilot study. *J Endod*, 2008. 34(2): p. 166-71.
55. Sonoyama W. et al. Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in swine. *PLoS One*, 2006. 1: p. e79.
56. Sonoyama W. et al. Human Hertwig's epithelial root sheath cells play crucial roles in cementum formation. *J Dent Res*, 2007. 86(7): p. 594-9.

57. Huang GT. et al. The hidden treasure in apical papilla: the potential role in pulp/dentin regeneration and bioroot engineering. *J Endod*, 2008. 34(6): p. 645-51.
58. Zhu SJ. et al. A comparative histologic analysis of tissue-engineered bone using platelet-rich plasma and platelet-enriched fibrin glue. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 2006. 102(2): p. 175-9.
59. Cicconetti A. et al. Human maxillary tuberosity and jaw periosteum as sources of osteoprogenitor cells for tissue engineering. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 2007. 104(5): p. 618 e1-12.
60. Goldberg M and Smith AJ. Cells and Extracellular Matrices of Dentin and Pulp: A Biological Basis for Repair and Tissue Engineering. *Crit Rev Oral Biol Med*, 2004. 15(1): p. 13-27.
61. Tirino V. et al. Identification, isolation, characterization, and banking of human dental pulp stem cells. *Methods Mol Biol*, 2012. 879: p. 443-63.
62. Sonoyama W, Yamaza T, Tuan RS, Wang S. Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: a pilot study. *Journal of Endodontics*, 2008. 34(166): p. 71.
63. Nakatsuka R. et al., 5-Aza-2'-deoxycytidine treatment induces skeletal myogenic differentiation of mouse dental pulp stem cells. *Arch Oral Biol*, 2010. 55(5): p. 350-7.
64. Iohara K. et al., Side population cells isolated from porcine dental pulp tissue with self-renewal and multipotency for dentinogenesis, chondrogenesis, adipogenesis, and neurogenesis. *Stem Cells*, 2006. 24(11): p. 2493-503.
65. Cheng PH. et al., Postnatal stem/progenitor cells derived from the dental pulp of adult chimpanzee. *BMC Cell Biol*, 2008. 9: p. 20.
66. Alge DL. et al. Donor-matched comparison of dental pulp stem cells and bone marrow-derived mesenchymal stem cells in a rat model. *J Tissue Eng Regen Med*, 2010. 4(1): p. 73-81.
67. La Noce M. et al. Dental pulp stem cells: state of the art and suggestions for a true translation of research into therapy. *J Dent*, 2014. 42(7): p. 761-8.
68. Spath L. et al., Explant-derived human dental pulp stem cells enhance differentiation and proliferation potentials. *J Cell Mol Med*, 2010. 14(6B): p. 1635-44.

69. Hilkens P. et al. Effect of isolation methodology on stem cell properties and multilineage differentiation potential of human dental pulp stem cells. *Cell Tissue Res*, 2013. 353(1): p. 65-78.
70. Laino G. et al. A new population of human adult dental pulp stem cells: a useful source of living autologous fibrous bone tissue (LAB). *J Bone Miner Res*, 2005. 20(8): p. 1394-402.
71. d'Aquino R. et al. Human postnatal dental pulp cells co-differentiate into osteoblasts and endotheliocytes: a pivotal synergy leading to adult bone tissue formation. *Cell Death Differ*, 2007. 14(6): p. 1162-71.
72. Kawashima N. Characterisation of dental pulp stem cells: a new horizon for tissue regeneration? *Arch Oral Biol*, 2012. 57(11): p. 1439-58.
73. Yang X. et al., Mineralized tissue formation by BMP2-transfected pulp stem cells. *J Dent Res*, 2009. 88(11): p. 1020-5.
74. Laino G. et al. An approachable human adult stem cell source for hard-tissue engineering. *J Cell Physiol*, 2006. 206(3): p. 693-701.
75. Kerkis I, Kerkis A., Dozortsev D. Isolation and characterization of a population of immature dental pulp stem cells expressing OCT-4 and other embryonic stem cell markers. *Cells Tissues Organs*, 2006. 184: p. 105-116.
76. Casagrande L. et al. Dental pulp stem cells in regenerative dentistry. *Odontology*, 2011. 99(1): p. 1-7.
77. Smith AJ and Lesot H. Induction and regulation of crown dentinogenesis: embryonic events as a template for dental tissue repair? *Crit Rev Oral Biol Med*, 2001. 12(5): p. 425-37.
78. Smith AJ. et al. Trans-dentinal stimulation of tertiary dentinogenesis. *Adv Dent Res*, 2001. 15: p. 51-4.
79. Finkelman RD. et al. Quantitation of growth factors IGF-I, SGF/IGF-II, and TGF-beta in human dentin. *J Bone Miner Res*, 1990. 5(7): p. 717-23.
80. Roberts-Clark DJ. and Smith AJ. Angiogenic growth factors in human dentine matrix. *Arch Oral Biol*, 2000. 45(11): p. 1013-6.
81. Tziafas D. Basic mechanisms of cytodifferentiation and dentinogenesis during dental pulp repair. *Int J Dev Biol*, 1995. 39(1): p. 281-90.

82. Fitzgerald M, Chiego DJ, and Heys DR. Autoradiographic analysis of odontoblast replacement following pulp exposure in primate teeth. *Arch Oral Biol*, 1990. 35(9): p. 707-15.
83. Murray PE and Smith AJ. Saving pulps--a biological basis. An overview. *Prim Dent Care*, 2002. 9(1): p. 21-6.
84. Nakashima M. Induction of dentine in amputated pulp of dogs by recombinant human bone morphogenetic proteins-2 and -4 with collagen matrix. *Arch Oral Biol*, 1994. 39(12): p. 1085-9.
85. Rutherford RB. et al. Induction of reparative dentine formation in monkeys by recombinant human osteogenic protein-1. *Arch Oral Biol*, 1993. 38(7): p. 571-6.
86. Decup F. et al. Bone sialoprotein-induced reparative dentinogenesis in the pulp of rat's molar. *Clin Oral Investig*, 2000. 4(2): p. 110-9.
87. Six N. et al. Osteogenic proteins (bone sialoprotein and bone morphogenetic protein-7) and dental pulp mineralization. *J Mater Sci Mater Med*, 2002. 13(2): p. 225-32.
88. Nakashima M. Tissue engineerind in endodontics. *Endod J*, 2005. 31: p. 111-113.
89. Prescott RS. et al. 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*, 2008. 34(4): p. 421-6.
90. Liu L. et al. Stem cell regulatory gene expression in human adult dental pulp and periodontal ligament cells undergoing odontogenic/osteogenic differentiation. *J Endod*, 2009. 35(10): p. 1368-76.
91. Karaoz E. et al. Isolation and in vitro characterisation of dental pulp stem cells from natal teeth. *Histochem Cell Biol*, 2010. 133(1): p. 95-112.
92. Morsczeck C. et al. (The state of the art in human dental stem cell research). *Mund Kiefer Gesichtschir*, 2007. 11(5): p. 259-66.
93. Helmy KY. et al. Stem cells and regenerative medicine: accomplishments to date and future promise. *Ther Deliv*, 2010. 1(5): p. 693-705.
94. Graziano A. et al. Dental pulp stem cells: a promising tool for bone regeneration. *Stem Cell Rev*, 2008. 4(1): p. 21-6.
95. Baddour JA, Sousounis K, and Tsonis PA. Organ repair and regeneration: an overview. *Birth Defects Res C Embryo Today*, 2012. 96(1): p. 1-29.

96. Bai H and Wang ZZ. Directing human embryonic stem cells to generate vascular progenitor cells. *Gene Ther*, 2008. 15(2): p. 89-95.
97. Duailibi MT. et al. Cytogenetic instability of dental pulp stem cell lines. *J Mol Histol*, 2012. 43(1): p. 89-94.
98. Nakashima M. Bone morphogenetic proteins in dentin regeneration for potential use in endodontic therapy. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2005. 16(3): p. 369-76.
99. Glickman GN. and Koch KA. 21st-century endodontics. *J Am Dent Assoc*, 2000. 131 Suppl: p. 39S-46S.
100. Abou-Rass M, Frank AL, and Glick DH. The anticurvature filing method to prepare the curved root canal. *J Am Dent Assoc*, 1980. 101(5): p. 792-4.
101. Andreasen JO, Farik B and. Munksgaard EC. Long-term calcium hydroxide as a root canal dressing may increase risk of root fracture. *Dent Traumatol*, 2002. 18(3): p. 134-7.
102. Simon S. et al., The use of mineral trioxide aggregate in one-visit apexification treatment: a prospective study. *Int Endod J*, 2007. 40(3): p. 186-97.
103. Damle SG, Bhattal H, and Loomba A. Apexification of anterior teeth: a comparative evaluation of mineral trioxide aggregate and calcium hydroxide paste. *J Clin Pediatr Dent*, 2012. 36(3): p. 263-8.
104. Iwaya SI, Ikawa M, and Kubota M, Revascularization of an immature permanent tooth with apical periodontitis and sinus tract. *Dent Traumatol*, 2001. 17(4): p. 185-7.
105. Banchs F and Trope M. Revascularization of immature permanent teeth with apical periodontitis: new treatment protocol? *J Endod*, 2004. 30(4): p. 196-200.
106. Chueh L H and Huang GT. Immature teeth with periradicular periodontitis or abscess undergoing apexogenesis: a paradigm shift. *J Endod*, 2006. 32(12): p. 1205-13.
107. Cotti E, Mereu M, and Lusso D. Regenerative treatment of an immature, traumatized tooth with apical periodontitis: report of a case. *J Endod*, 2008. 34(5): p. 611-6.
108. Ostby BN. The role of the blood clot in endodontic therapy. An experimental histologic study. *Acta Odontol Scand*, 1961. 19: p. 324-53.

109. Rule DC and Winter GB. Root growth and apical repair subsequent to pulpal necrosis in children. *Br Dent J*, 1966. 120(12): p. 586-90.
110. Nygaard-Ostby B and Hjortdal O. Tissue formation in the root canal following pulp removal. *Scand J Dent Res*, 1971. 79(5): p. 333-49.
111. Thibodeau B and Trope M. Pulp revascularization of a necrotic infected immature permanent tooth: case report and review of the literature. *Pediatr Dent*, 2007. 29(1): p. 47-50.
112. Bezerra da Silva J. et al., Evaluation of the use of selective PCR amplification of LPS biosynthesis genes for molecular typing of leptospira at the serovar level. *Curr Microbiol*, 2011. 62(2): p. 518-24.
113. Shah N. et al. Efficacy of revascularization to induce apexification/apexogenesis in infected, nonvital, immature teeth: a pilot clinical study. *J Endod*, 2008. 34(8): p. 919-25; Discussion 1157.
114. Love RM. Bacterial penetration of the root canal of intact incisor teeth after a simulated traumatic injury. *Endod Dent Traumatol*, 1996. 12(6): p. 289-93.
115. Chen MY. et al. Responses of immature permanent teeth with infected necrotic pulp tissue and apical periodontitis/abscess to revascularization procedures. *Int Endod J*, 2012. 45(3): p. 294-305.
116. Myers WC and Fountain SB. Dental pulp regeneration aided by blood and blood substitutes after experimentally induced periapical infection. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 1974. 37(3): p. 441-50.
117. Yanpiset K and Trope M. Pulp revascularization of replanted immature dog teeth after different treatment methods. *Endod Dent Traumatol*, 2000. 16(5): p. 211-7.
118. Akgun OM, Altun C, and Guven G. Use of triple antibiotic paste as a disinfectant for a traumatized immature tooth with a periapical lesion: a case report. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 2009. 108(2): p. e62-5.
119. Das S, Das AK, and Murphy RA. Experimental apexigenesis in baboons. *Endod Dent Traumatol*, 1997. 13(1): p. 31-5.
120. Das S. Apexification in a nonvital tooth by control of infection. *J Am Dent Assoc*, 1980. 100(6): p. 880-1.

121. Hoshino E. et al., In-vitro antibacterial susceptibility of bacteria taken from infected root dentine to a mixture of ciprofloxacin, metronidazole and minocycline. *Int Endod J*, 1996. 29(2): p. 125-30.
122. Sato I. et al. Sterilization of infected root-canal dentine by topical application of a mixture of ciprofloxacin, metronidazole and minocycline in situ. *Int Endod J*, 1996. 29(2): p. 118-24.
123. Windley W. 3rd, et al. Disinfection of immature teeth with a triple antibiotic paste. *J Endod*, 2005. 31(6): p. 439-43.
124. Ingham HR, Selkon JB and Hale JH. The antibacterial activity of netronidazole. *J Antimicrob Chemother*, 1975. 1(4): p. 355-61.
125. Ritter AL. et al. Pulp revascularization of replanted immature dog teeth after treatment with minocycline and doxycycline assessed by laser Doppler flowmetry, radiography, and histology. *Dent Traumatol*, 2004. 20(2): p. 75-84.
126. Molander A, Reit C, andDahlen G. Microbiological evaluation of clindamycin as a root canal dressing in teeth with apical periodontitis. *Int Endod J*, 1990. 23(2): p. 113-8.
127. Reynolds K, Johnson JD, and Cohenca N. Pulp revascularization of necrotic bilateral bicuspid using a modified novel technique to eliminate potential coronal discolouration: a case report. *Int Endod J*, 2009. 42(1): p. 84-92.
128. Gomes-Filho JE. et al. Tissue reaction to a triantibiotic paste used for endodontic tissue self-regeneration of nonvital immature permanent teeth. *J Endod*, 2012. 38(1): p. 91-4.
129. Abbott PV. Medicaments: aids to success in endodontics. Part 1. A review of the literature. *Aust Dent J*, 1990. 35(5): p. 438-48.
130. Wigler R. et al. Revascularization: a treatment for permanent teeth with necrotic pulp and incomplete root development. *J Endod*, 2013. 39(3): p. 319-26.
131. Athanassiadis B, Abbott PV and Walsh LJ. The use of calcium hydroxide, antibiotics and biocides as antimicrobial medicaments in endodontics. *Aust Dent J*, 2007. 52(1 Suppl): p. S64-82.
132. Tang G, Samaranayake LP and Yip HK. Molecular evaluation of residual endodontic microorganisms after instrumentation, irrigation and medication with either calcium hydroxide or Septomixine. *Oral Dis*, 2004. 10(6): p. 389-97.

133. Fava LR and Saunders WP. Calcium hydroxide pastes: classification and clinical indications. *Int Endod J*, 1999. 32(4): p. 257-82.
134. Vianna ME. et al., In vitro evaluation of the susceptibility of endodontic pathogens to calcium hydroxide combined with different vehicles. *Braz Dent J*, 2005. 16(3): p. 175-80.
135. Negm MM. Intracanal use of a corticosteroid-antibiotic compound for the management of posttreatment endodontic pain. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 2001. 92(4): p. 435-9.
136. Schwartz RS. et al. Mineral trioxide aggregate: a new material for endodontics. *J Am Dent Assoc*, 1999. 130(7): p. 967-75.
137. Lee SJ, Monsef M and Torabinejad M. Sealing ability of a mineral trioxide aggregate for repair of lateral root perforations. *J Endod*, 1993. 19(11): p. 541-4.
138. Chong BS, Pitt Ford TR and Hudson MB. A prospective clinical study of Mineral Trioxide Aggregate and IRM when used as root-end filling materials in endodontic surgery. *Int Endod J*, 2003. 36(8): p. 520-6.
139. Torabinejad M. et al. Dye leakage of four root end filling materials: effects of blood contamination. *J Endod*, 1994. 20(4): p. 159-63.
140. Torabinejad M. et al., Investigation of mineral trioxide aggregate for root-end filling in dogs. *J Endod*, 1995. 21(12): p. 603-8.
141. Arens DE and Torabinejad M. Repair of furcal perforations with mineral trioxide aggregate: two case reports. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 1996. 82(1): p. 84-8.
142. Nakata TT, Bae K.S, and Baumgartner JC. Perforation repair comparing mineral trioxide aggregate and amalgam using an anaerobic bacterial leakage model. *J Endod*, 1998. 24(3): p. 184-6.
143. Bodem O. et al. Direct pulp capping with mineral trioxide aggregate in a primary molar: a case report. *Int J Paediatr Dent*, 2004. 14(5): p. 376-9.
144. Ford TR. et al. Using mineral trioxide aggregate as a pulp-capping material. *J Am Dent Assoc*, 1996. 127(10): p. 1491-4.
145. Agamy HA. et al. Comparison of mineral trioxide aggregate and formocresol as pulp-capping agents in pulpotomized primary teeth. *Pediatr Dent*, 2004. 26(4): p. 302-9.

146. Holan G, Eidelman E and Fuks AB. Long-term evaluation of pulpotomy in primary molars using mineral trioxide aggregate or formocresol. *Pediatr Dent*, 2005. 27(2): p. 129-36.
147. Bakland LK. Management of traumatically injured pulps in immature teeth using MTA. *J Calif Dent Assoc*, 2000. 28(11): p. 855-8.
148. Karabucak B. et al. Vital pulp therapy with mineral trioxide aggregate. *Dent Traumatol*, 2005. 21(4): p. 240-3.
149. Hachmeister DR. et al. The sealing ability and retention characteristics of mineral trioxide aggregate in a model of apexification. *J Endod*, 2002. 28(5): p. 386-90.
150. Shabahang S. et al. A comparative study of root-end induction using osteogenic protein-1, calcium hydroxide, and mineral trioxide aggregate in dogs. *J Endod*, 1999. 25(1): p. 1-5.
151. Holland R. et al. Reaction of dogs' teeth to root canal filling with mineral trioxide aggregate or a glass ionomer sealer. *J Endod*, 1999. 25(11): p. 728-30.
152. Sullivan SM. Obturation of retained primary mandibular second molar using mineral trioxide aggregate: a case report. *J Endod* 2001. 27(703): p. 5.
153. Hsien HC. et al. Repair of perforating internal resorption with mineral trioxide aggregate: a case report. *J Endod*, 2003. 29(8): p. 538-9.
154. White C Jr and Bryant N. Combined therapy of mineral trioxide aggregate and guided tissue regeneration in the treatment of external root resorption and an associated osseous defect. *J Periodontol*, 2002. 73(12): p. 1517-21.
155. Cummings GRT. Mineral trioxide aggregate (MTA) as an isolating barrier for internal bleaching. *J Endod* 1995. 228: p. 21.
156. Kim E and Jou YT. A supernumerary tooth fused to the facial surface of a maxillary permanent central incisor: case report. *J Endod*, 2000. 26(1): p. 45-8.
157. Dammaschke T. et al. Chemical and physical surface and bulk material characterization of white ProRoot MTA and two Portland cements. *Dent Mater*, 2005. 21(8): p. 731-8.
158. Torabinejad M. et al. Physical and chemical properties of a new root-end filling material. *J Endod*, 1995. 21(7): p. 349-53.

159. Camilleri J. et al. The chemical constitution and biocompatibility of accelerated Portland cement for endodontic use. *Int Endod J*, 2005. 38(11): p. 834-42.
160. Asgary S. et al. Chemical differences between white and gray mineral trioxide aggregate. *J Endod*, 2005. 31(2): p. 101-3.
161. Holland R. Accidental elective. *Pract Midwife*, 2002. 5(5): p. 46.
162. Chng HK. et al. Properties of a new root-end filling material. *J Endod*, 2005. 31(9): p. 665-8.
163. Sluyk SR, Moon PC and Hartwell GR. Evaluation of setting properties and retention characteristics of mineral trioxide aggregate when used as a furcation perforation repair material. *J Endod*, 1998. 24(11): p. 768-71.
164. Torabinejad M. et al. Comparative investigation of marginal adaptation of mineral trioxide aggregate and other commonly used root-end filling materials. *J Endod*, 1995. 21(6): p. 295-9.
165. Laghios CD. et al. Comparative radiopacity of tetracalcium phosphate and other root-end filling materials. *Int Endod J*, 2000. 33(4): p. 311-5.
166. Sarkar NK. et al. Physicochemical basis of the biologic properties of mineral trioxide aggregate. *J Endod*, 2005. 31(2): p. 97-100.
167. Holland R. et al. Reaction of rat connective tissue to implanted dentin tubes filled with mineral trioxide aggregate or calcium hydroxide. *J Endod*, 1999. 25(3): p. 161-6.
168. Moretton TR. et al. Tissue reactions after subcutaneous and intraosseous implantation of mineral trioxide aggregate and ethoxybenzoic acid cement. *J Biomed Mater Res*, 2000. 52(3): p. 528-33.
169. Holland R. et al. Reaction of rat connective tissue to implanted dentin tube filled with mineral trioxide aggregate, Portland cement or calcium hydroxide. *Braz Dent J*, 2001. 12(1): p. 3-8.
170. Torabinejad M and Chivian N. Clinical applications of mineral trioxide aggregate. *J Endod*, 1999. 25(3): p. 197-205.
171. Lee ES. A new mineral trioxide aggregate root-end filling technique. *J Endod*, 2000. 26(12): p. 764-5.

172. Torabinejad M, Watson TF and Pitt Ford TR. Sealing ability of a mineral trioxide aggregate when used as a root end filling material. *J Endod*, 1993. 19(12): p. 591-5.
173. Fischer EJ, Arens DE and Miller CH. Bacterial leakage of mineral trioxide aggregate as compared with zinc-free amalgam, intermediate restorative material, and Super-EBA as a root-end filling material. *J Endod*, 1998. 24(3): p. 176-9.
174. Kratchman SI. Perforation repair and one-step apexification procedures. *Dent Clin North Am*, 2004. 48(1): p. 291-307.
175. Valois CR and Costa ED. Jr., Influence of the thickness of mineral trioxide aggregate on sealing ability of root-end fillings in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 2004. 97(1): p. 108-11.
176. Apaydin ES, Shabahang S. and Torabinejad M. Hard-tissue healing after application of fresh or set MTA as root-end-filling material. *J Endod*, 2004. 30(1): p. 21-4.
177. O'Sullivan SM and Hartwell GR. Obturation of a retained primary mandibular second molar using mineral trioxide aggregate: a case report. *J Endod*, 2001. 27(11): p. 703-5.
178. White JD. et al. The effect of three commonly used endodontic materials on the strength and hardness of root dentin. *J Endod*, 2002. 28(12): p. 828-30.
179. Menezes R. et al. Histologic evaluation of pulpotomies in dog using two types of mineral trioxide aggregate and regular and white Portland cements as wound dressings. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 2004. 98(3): p. 376-9.
180. Saidon J. et al. Cell and tissue reactions to mineral trioxide aggregate and Portland cement. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 2003. 95(4): p. 483-9.
181. Gomes BP. et al. Effectiveness of 2% chlorhexidine gel and calcium hydroxide against *Enterococcus faecalis* in bovine root dentine in vitro. *Int Endod J*, 2003. 36(4): p. 267-75.
182. Vianna ME. et al. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of chlorhexidine and sodium hypochlorite. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 2004. 97(1): p. 79-84.

183. Estrela C. et al. Efficacy of sodium hypochlorite and chlorhexidine against *Enterococcus faecalis*--a systematic review. *J Appl Oral Sci*, 2008. 16(6): p. 364-8.
184. Kuruvilla JR and Kamath MP. Antimicrobial activity of 2.5% sodium hypochlorite and 0.2% chlorhexidine gluconate separately and combined, as endodontic irrigants. *J Endod*, 1998. 24(7): p. 472-6.
185. Basrani BR. et al. Interaction between sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate. *J Endod*, 2007. 33(8): p. 966-9.
186. Vianna ME and Gomes BP. Efficacy of sodium hypochlorite combined with chlorhexidine against *Enterococcus faecalis* in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 2009. 107(4): p. 585-9.
187. Kindler V. Postnatal stem cell survival: does the niche, a rare harbor where to resist the ebb tide of differentiation, also provide lineage-specific instructions? *J Leukoc Biol*, 2005. 78(4): p. 836-44.
188. Brazelton TR and Blau HM. Optimizing techniques for tracking transplanted stem cells in vivo. *Stem Cells*, 2005. 23(9): p. 1251-65.
189. Trojani C. et al. Three-dimensional culture and differentiation of human osteogenic cells in an injectable hydroxypropylmethylcellulose hydrogel. *Biomaterials*, 2005. 26(27): p. 5509-17.
190. Alhadlaq A and Mao JJ. Tissue-engineered osteochondral constructs in the shape of an articular condyle. *J Bone Joint Surg Am*, 2005. 87(5): p. 936-44.
191. Yılmaz A. Rejeneratif Endodonti. *İstanbul Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi*, 2012. 46(3): p. 91-98.
192. Sanjana NE and Fuller SB. A fast flexible ink-jet printing method for patterning dissociated neurons in culture. *J Neurosci Methods*, 2004. 136(2): p. 151-63.
193. Senel F. Kök Hücre. *BilimveTeknik*, 2002. 2(2): p. 1-15.
194. Jung IY, Lee SJ. and K.M. Hargreaves, Biologically based treatment of immature permanent teeth with pulpal necrosis: a case series. *J Endod*, 2008. 34(7): p. 876-87.
195. Hargreaves KM. et al. Regeneration potential of the young permanent tooth: what does the future hold? *J Endod*, 2008. 34(7 Suppl): p. S51-6.

196. Trevino EG. et al. Effect of irrigants on the survival of human stem cells of the apical papilla in a platelet-rich plasma scaffold in human root tips. *J Endod*, 2011. 37(8): p. 1109-15.
197. da Silva LA. et al. Revascularization and periapical repair after endodontic treatment using apical negative pressure irrigation versus conventional irrigation plus triantibiotic intracanal dressing in dogs' teeth with apical periodontitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 2010. 109(5): p. 779-87.
198. Martin G. et al. Histological findings of revascularized/revitalized immature permanent molar with apical periodontitis using platelet-rich plasma. *J Endod*, 2013. 39(1): p. 138-44.
199. Tawfik H. et al. Regenerative potential following revascularization of immature permanent teeth with necrotic pulps. *Int Endod J*, 2013. 46(10): p. 910-22.
200. Bose R, Nummikoski P and Hargreaves K. A retrospective evaluation of radiographic outcomes in immature teeth with necrotic root canal systems treated with regenerative endodontic procedures. *J Endod*, 2009. 35(10): p. 1343-9.
201. Iohara K. et al. Complete pulp regeneration after pulpectomy by transplantation of CD105+ stem cells with stromal cell-derived factor-1. *Tissue Eng Part A*, 2011. 17(15-16): p. 1911-20.
202. Bystrom A and Sundqvist G. The antibacterial action of sodium hypochlorite and EDTA in 60 cases of endodontic therapy. *Int Endod J*, 1985. 18(1): p. 35-40.
203. Goodson J. Pharmacokinetic principles controlling efficacy of oral therapy *J Dent Res.*, 1989. 68(1625): p. 32.
204. Ruparel NB. et al. Direct effect of intracanal medicaments on survival of stem cells of the apical papilla. *J Endod*, 2012. 38(10): p. 1372-5.
205. Yassen GH. et al. Effect of medicaments used in endodontic regeneration technique on the chemical structure of human immature radicular dentin: an in vitro study. *J Endod*, 2013. 39(2): p. 269-73.
206. Yassen GH. et al. The effect of medicaments used in endodontic regeneration on root fracture and microhardness of radicular dentine. *Int Endod J*, 2013. 46(7): p. 688-95.

207. Berkhoff J CP, Teixeira FB, Diogenes A. Effective removal of triantibiotic pasteduring regenerative endodontic treatment: an evaluation of different irrigation procedures. *J Endod*, 2013. 39(15).
208. Althumairy RI, Teixeira FB and Diogenes A. Effect of dentin conditioning with intracanal medicaments on survival of stem cells of apical papilla. *J Endod*, 2014. 40(4): p. 521-5.
209. Sato T. et al. In vitro antimicrobial susceptibility to combinations of drugs on bacteria from carious and endodontic lesions of human deciduous teeth. *Oral Microbiol Immunol*, 1993. 8(3): p. 172-6.
210. Chueh LH. et al. Regenerative endodontic treatment for necrotic immature permanent teeth. *J Endod*, 2009. 35(2): p. 160-4.
211. Torabinejad . and Turman M. Revitalization of tooth with necrotic pulp and open apex by using platelet-rich plasma: a case report. *J Endod*, 2011. 37(2): p. 265-8.
212. Labban N. et al. The direct cytotoxic effects of medicaments used in endodontic regeneration on human dental pulp cells. *Dent Traumatol*, 2014. 30(6): p. 429-34.
213. Carrigan PJ. et al. A scanning electron microscopic evaluation of human dentinal tubules according to age and location. *J Endod*, 1984. 10(8): p. 359-63.
214. Chavez De Paz LE. et al. Bacteria recovered from teeth with apical periodontitis after antimicrobial endodontic treatment. *Int Endod J*, 2003. 36(7): p. 500-8.
215. Peters LB. et al. Viable bacteria in root dentinal tubules of teeth with apical periodontitis. *J Endod*, 2001. 27(2): p. 76-81.
216. Peters LB. et al. Effects of instrumentation, irrigation and dressing with calcium hydroxide on infection in pulpless teeth with periapical bone lesions. *Int Endod J*, 2002. 35(1): p. 13-21.
217. Safavi KE, Spangberg LS and Langeland K. Root canal dentinal tubule disinfection. *J Endod*, 1990. 16(5): p. 207-10.
218. Hosoya N. et al. Calcium concentration and pH of the periapical environment after applying calcium hydroxide into root canals in vitro. *J Endod*, 2001. 27(5): p. 343-6.

219. Tendolkar PM, Baghdayan AS and Shankar N. Pathogenic enterococci: new developments in the 21st century. *Cell Mol Life Sci*, 2003. 60(12): p. 2622-36.
220. Stuart CH. et al. *Enterococcus faecalis*: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. *J Endod*, 2006. 32(2): p. 93-8.
221. Sedgley CM. S.L. Lennan, and D.B. Clewell, Prevalence, phenotype and genotype of oral enterococci. *Oral Microbiol Immunol*, 2004. 19(2): p. 95-101.
222. Rocas IN, Siqueira Jr JF and Santos KR. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. *J Endod*, 2004. 30(5): p. 315-20.
223. Hubble TS. et al. Influence of *Enterococcus faecalis* proteases and the collagen-binding protein, Ace, on adhesion to dentin. *Oral Microbiol Immunol*, 2003. 18(2): p. 121-6.
224. Love RM. *Enterococcus faecalis*--a mechanism for its role in endodontic failure. *Int Endod J*, 2001. 34(5): p. 399-405.
225. Figdor D, Davies JK and Sundqvist G. Starvation survival, growth and recovery of *Enterococcus faecalis* in human serum. *Oral Microbiol Immunol*, 2003. 18(4): p. 234-9.
226. Distel JW, Hatton JF and Gillespie MJ. Biofilm formation in medicated root canals. *J Endod*, 2002. 28(10): p. 689-93.
227. Rocas IN, Siqueira Jr JF and Debelian GJ. Analysis of symptomatic and asymptomatic primary root canal infections in adult Norwegian patients. *J Endod*, 2011. 37(9): p. 1206-12.
228. Bergenholtz G. Micro-organisms from necrotic pulp of traumatized teeth. *Odontol Revy*, 1974. 25(4): p. 347-58.
229. Sundqvist G. et al. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 1998. 85(1): p. 86-93.
230. Whiley RA and Beighton D. Current classification of the oral streptococci. *Oral Microbiol Immunol*, 1998. 13(4): p. 195-216.
231. Liu T and Gibbons RJ. Binding of streptococci of the "mutans" group to type 1 collagen associated with apatitic surfaces. *Oral Microbiol Immunol*, 1990. 5(3): p. 131-6.
232. Switalski LM. et al. Collagen mediates adhesion of *Streptococcus mutans* to human dentin. *Infect Immun*, 1993. 61(10): p. 4119-25.

233. Svensater G. et al. Acid tolerance response and survival by oral bacteria. *Oral Microbiol Immunol*, 1997. 12(5): p. 266-73.
234. Jiang LM. et al. Resazurin metabolism assay for root canal disinfectant evaluation on dual-species biofilms. *J Endod*, 2011. 37(1): p. 31-5.
235. Kreth J. et al. The Antimicrobial Effect of Silver Ion Impregnation into Endodontic Sealer against *Streptococcus mutans*. *Open Dent J*, 2008. 2: p. 18-23.
236. Lowy FD. *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med*, 1998. 339(8): p. 520-32.
237. Geibel MA. et al. Polymerase chain reaction-based simultaneous detection of selected bacterial species associated with closed periapical lesions. *Eur J Med Res*, 2005. 10(8): p. 333-8.
238. Siqueira JF Jr and de Uzeda M. Disinfection by calcium hydroxide pastes of dentinal tubules infected with two obligate and one facultative anaerobic bacteria. *J Endod*, 1996. 22(12): p. 674-6.
239. Fujitani S. et al. Pneumonia due to *Pseudomonas aeruginosa*: part I: epidemiology, clinical diagnosis, and source. *Chest*, 2011. 139(4): p. 909-19.
240. Sun HY. et al. Pneumonia due to *Pseudomonas aeruginosa*: part II: antimicrobial resistance, pharmacodynamic concepts, and antibiotic therapy. *Chest*, 2011. 139(5): p. 1172-85.
241. Waltimo TM. et al. Fungi in therapy-resistant apical periodontitis. *Int Endod J*, 1997. 30(2): p. 96-101.
242. Siqueira JF. Jr. et al. Fungal infection of the radicular dentin. *J Endod*, 2002. 28(11): p. 770-3.
243. Siqueira JF. Jr. and B.H. Sen, Fungi in endodontic infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 2004. 97(5): p. 632-41.
244. Chandra SS. et al., Antifungal efficacy of 5.25% sodium hypochlorite, 2% chlorhexidine gluconate, and 17% EDTA with and without an antifungal agent. *J Endod*, 2010. 36(4): p. 675-8.
245. Mozayeni MA. et al. Antimicrobial effects of four intracanal medicaments on *enterococcus faecalis*: an in vitro study. *Iran Endod J*, 2014. 9(3): p. 195-8.

246. Adl A, Shojae NS and Motamedifar M. A Comparison between the Antimicrobial Effects of Triple Antibiotic Paste and Calcium Hydroxide Against *Enterococcus Faecalis*. *Iran Endod J*, 2012. 7(3): p. 149-55.
247. Chua E.G. et al. Antifungal effectiveness of various intracanal medicaments against *Candida albicans*: an ex-vivo study. *BMC Oral Health*, 2014. 14: p. 53.
248. Ferreira MB. et al. Time- and concentration-dependent cytotoxicity of antibiotics used in endodontic therapy. *J Appl Oral Sci*, 2010. 18(3): p. 259-63.
249. Hoshino E KK, Iwaku M. Sterilization of carious lesions by antibacterial drugs. New attempt to conserve pulp. The basic approach. . *Dent Outlook*, 1990. 75: p. 1379–1386.
250. Shaik J. et al. Comparative evaluation of antimicrobial efficacy of triple antibiotic paste and calcium hydroxide using chitosan as carrier against *Candida albicans* and *Enterococcus faecalis*: An in vitro study. *J Conserv Dent*, 2014. 17(4): p. 335-9.

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU	
ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönermelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
ETİK KURUL BAŞKANI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof. Dr. Ruhan DÜŞÜNSEL

Unvanı / Adı Soyadı	Üzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyeti	Araştırma ile İlgili	Katılım (*)	İmza
Prof. Dr. Ruhan DÜŞÜNSEL	Çocuk Sağ ve Hast.	E.Ü. Tıp Fak.	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	<i>[Signature]</i>
Prof. Dr. Sami AYDOĞAN	Fizyoloji	E.Ü. Tıp Fak.	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	<i>[Signature]</i>
Prof. Dr. Karamehmet YILDIZ	Anest. ve Rean.	E.Ü. Tıp Fak.	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	<i>[Signature]</i>
Prof. Dr. Salih KUK	Tıbbi Parazitoloji	E.Ü. Tıp Fak.	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	<i>[Signature]</i>
Prof. Dr. Kemal DENİZ	Patoloji	E.Ü. Tıp Fak.	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	<i>[Signature]</i>
Doç. Dr. Musa KARAKÖKÇÜ	Çocuk Sağ ve Hast.	E.Ü. Tıp Fak.	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	<i>[Signature]</i>
Doç. Dr. Hüseyin ARINÇ	Kardiyoloji	Kayseri Eğitim Hast.	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	<i>[Signature]</i>
Doç. Dr. Erdem KILIÇ	Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi	E.Ü. Diş Hek. Fak.	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	<i>[Signature]</i>
Doç. Dr. Aydın ÜNAL	İç Hastalıkları	E.Ü. Tıp Fak.	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	<i>[Signature]</i>
Yard. Doç. Dr. A. Fa YILDIRIM	Radyoloji	E.Ü. Tıp Fak.	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	<i>[Signature]</i>
Yard. Doç. Dr. Z. Zafer SEZER	Farmakoloji	E.Ü. Tıp Fak.	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	<i>[Signature]</i>
Yard. Doç. Dr. Ferhan ELMALI	Biyoistatistik	E.Ü. Tıp Fak.	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	<i>[Signature]</i>
Av. Zafer Tuğrul SARIASLAN	Avukat	Hukuk Müaviri	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	<i>[Signature]</i>
Ecz. Şükran TERZİ	Eczacı	Serbest Eczacı	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	<i>[Signature]</i>
Berkan KARACA	Sivil Üye	Öğretmen	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	<i>[Signature]</i>

Not: Etik kurul başkanı, imzasının yer almadığı her sayfaya imza atmalıdır

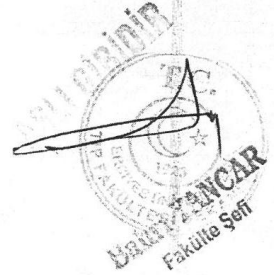
BURHANCIYANCI
Fakülte Şefi

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI		Rejeneratif endodontik tedavide kök kanallarının dezenfeksiyonunda kullanılan çeşitli materyaller, kombinasyonları ve yöntemlerin apikal papilla kök hücrelerinde meydana getirdiği değişikliklerin incelenmesi	
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU			
ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	ERCIYES ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU	
	AÇIK ADRES	Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı Melikgazi/KAYSERİ	
	TELEFON	0 352 437 49 10 - 11	
	FAKS	0 352 437 52 85	
	E-POSTA	byancar@erciyes.edu.tr	
BAŞVURU BİLGİLERİ	KOORDİNATÖR / SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI / ADI / SOYADI	Yard. Doç. Dr. Kenan Canteğin	
	KOORDİNATÖR SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Çocuk Diş Hekimliği	
	KOORDİNATÖR / SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Erciyes Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Çocuk Diş Hekimliği/Kayseri	
	VARSA İDARI SORUMLU UNVANI/ ADI SOYADI		
	DESTEKLEYİCİ		
	PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ UNVANI/ADI/SOYADI (TÜBİTAK vb. gibi kaynaklardan destek alanlar için)		
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMCİLCİSİ		
	ARAŞTIRMANIN FAZİ VE TÜRÜ	FAZ 1	☒
	FAZ 2	☐	
	FAZ 3	☐	
	FAZ 4	☐	
	Gözetimsel ilaç çalışması	☐	
	Tıbbi cihaz klinik araştırması	☐	
	In vitro tıbbi tanı cihazları ile yapılan performans değerlendirme çalışmaları	☐	
	İlaç dışı klinik araştırma	☒	
	Diğer ise belirtiniz	☐	Doktora Tezi
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER		TEKMERKEZ ☒	ÇOKMERKEZ ☐
		ULUSAL ☒	ULUSLARARASI ☐

Etik Kurul Başkanı
Unvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Ruhan DÖŞÖNSEL
İmza:

Not: Etik kurul başkanı, imzasının yer almadığı her sayfaya imza atmalıdır





Turnitin Orijinallik Raporu

**ANTİBİYOTİK Lİ KANAL PATLARININ
APİKAL PAPİLLA MEZENKİMAL KÖK
HÜCRELERİNDE MEYDANA GETİRDİĞİ
DEĞİŞİKLİKLERİN VE ANTİMİKROBİYAL
ETKİNLİKLERİNİN İNCELENMESİ** Seçil
Çalışkan tarafından

Quick Submit (Quick Submit) den

Benzerlik Endeksi	Kaynağa göre Benzerlik
%18	İnternet Sources: %16 Yayınlar: %7 Öğrenci Ödevleri: N/A

19-Haz-2017 09:18 EEST' de işleme
kondu **kaynaklar:**

NUMARA: 826053001

Kelime Sayısı: 15933

1

4% match (03-Oca-2017 tarihli internet)

<http://dergipark.ulakbim.gov.tr/gaziao/article/download/5000114063/5000106138>

2

4% match (16-Kas-2015 tarihli internet)

http://www.dent.ege.edu.tr/yayinlarimiz/bitirme_tezleri/pdf/1009.pdf

3

2% match (29-Haz-2016 tarihli internet)

<http://docplayer.biz.tr/2592475-Gelisimini-tamamlayamamis-genc-daimi-dislerde-rejeneratif-endodontik-tedavi-yaklasimi.html>

4

2% match (18-Nis-2011 tarihli internet)

http://dfd.atauni.edu.tr/UploadsCild/files/2006-1/2006_1_%209.pdf

5

1% match (27-Haz-2016 tarihli internet)

http://dent.ege.edu.tr/yayinlarimiz/bitirme_tezleri/pdf/1194.pdf

6

1% match (yayınlar)

CANOĞLU, Ebru and ÇEVHERİ, Zafer Cavit. "Rejeneratif pulpa tedavilerinde bir güncelleme". Hacettepe Üniversitesi, 2008.

7

1% match (11-Eyl-2013 tarihli internet)

http://www.ido.org.tr/lib_yayin/221.pdf

8

1% match (yayınlar)

Yıldırım, Ceren. "Current approach to root canal irrigants", Gulhane Medical Journal, 2012.

9

< 1% match (26-May-2015 tarihli internet)

http://www.mikrobiyolbul.org/managete/fu_folder/2013-03/html/2013-47-3-523-528.htm

10

< 1% match (06-Ağu-2015 tarihli internet)

<http://library.neu.edu.tr/Neutez/6316406794.pdf>

11

< 1% match (yayınlar)

TUNÇ, Emine, Sen and CETİNER, Serap. "Mineral trioxide aggregate: Literatür derlemesi". Atatürk Üniversitesi, 2006.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı: Seçil ÇALIŞKAN

Uyruğu: Türkiye (TC)

Doğum Tarihi ve Yeri: 6 Haziran 1989, Mersin

Medeni Durumu: Evli

Tel: +90 5448073311

email: sclctn@hotmail.com

Yazışma Adresi: Erciyes Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Pedodonti Anabilim Dalı
Talas/KAYSERİ

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Doktora	Erciyes Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Pedodonti Anabilim Dalı, Kayseri	2017
Lisans	Erciyes Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi, Kayseri	2012
Lise	Karaman Milli Piyango Fen Lisesi, Karaman	2007

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görev
2012- Halen	Erciyes Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Pedodonti Anabilim Dalı	Doktora Öğrencisi

YABANCI DİL

İngilizce

YAYINLAR

1. Cantekin K., Yıldırım M.D., Delikan E., **Çetin S.** Postoperatif Discomfort Of Dental Rehabilitation Under General Anesthesia. Pak J Med. 2014; 30(4):784-8
- 2.Cantekin K., Delikan E., **Cetin S.** In vitro bond strength and fatigue stress test evaluation of different adhesive cements used for fixed space maintainer cementation.Eur J Dent. 2014;8(3):314-9
3. Aydınbelge,M., **Çalışkan,S.**, Gumus,H.,Sekerci A.E:Clinical and radiographic evaluation of primary double teeth and their effect on permanent successors Nigerian Journal of Clinical Practice 309_15
4. Doğan S.,Aydınbelge M., **Çetin S.**,Borlu M.,Kartal,D. Kindler Sendromlu İki Kardeşin Ağız İçi Bulguları ve Dental Tedavi Planı: Olgu Sunumu Türkiye Klinikleri J Pediatr Dent-Special Topics 2015;1(2)