



**T.C.
SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
HAMİDİYE SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**GÜNÜMÜZDE DİREKT VE/VEYA
İNDİREKT KUAF AJ TEDAVİSİNDE
KULLANILAN MATERYALLERİN
DENTAL PULPA KÖK HÜCRELERİ
ÜZERİNDEKİ SİTOTOKSİSİTE VE
BİYOUYUMLULUĞUNUN
İNCELENMESİ**

BANU ÇİÇEK TEZ

**TEZ DANIŞMANI
DOÇ.DR. BAHAR BAŞAK KIZILTAN ELİAÇIK**

**ÇOCUK DİŞ HEKİMLİĞİ ANABİLİM DALI
ÇOCUK DİŞ HEKİMLİĞİ DOKTORA PROGRAMI**

**DOKTORA TEZİ
AĞUSTOS/2023**

İTHAF

“Desteklerini her zaman yanımda hissettiğim; canım annem Rahime TEZ’e, canım babam Coşkun TEZ’e ve biricik kardeşim Doğa Can TEZ’e ithaf ediyorum.”

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca hekimlik mesleği ve hayata yaklaşımıyla idolüm olan, değerli bilgi birikimi ve tecrübeleriyle akademik hayatıma yön veren, sabır ve hoşgörüsünün yanı sıra ailem gibi her zaman sevgisini ve desteğini hissettiğim, öğrencisi olmaktan gurur duyduğum çok değerli danışman hocam Sayın Doç. Dr. Bahar Başak KIZILTAN ELİAÇIK'a,

Tecrübelerini ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen ve tüm samimiyetiyle bizlere destek olan ana bilim dalı başkanımız hocam Sayın Prof. Dr. Günseli GÜVEN POLAT'a, çocuk diş hekimliği pratiğinde kendisinden çok şey öğrendiğim hocam Sayın Doç. Dr. Barış KARABULUT'a, Sayın Dr. Öğr. Üyesi Şükriye TÜRKOĞLU KAYACI'ya, tez izleme jürimde yer alan ve yol gösteren hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Sibel DİKİCİER'e,

Doktora tezimin planlanması ve gerçekleştirilmesi için laboratuvar çalışmalarında desteklerini esirgemeyen ve bunun için imkân sağlayan Yeditepe Üniversitesi Genetik ve Biyomühendislik Bölümü Ana Bilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Fikretin ŞAHİN'e, Dr. Pakize Neslihan TAŞLI'ya ve MSc. Hazal YILMAZ'a,

İkinci ailem gibi hissettiğim, tecrübeleriyle her zaman yanımda olan ve bana yol gösteren başta çok değerli hocam Sayın Prof. Dr. Servet ÖZCAN'a, Doç. Dr. Zeynep Burçin GÖNEN'e, Dr. Mustafa Burak ACAR'a ve MSc. Ahmet ŞİMŞEK'e, Erciyes Üniversitesi GENKÖK ekibine,

Her zaman yanımda olduklarını bildiğim, her türlü zorluğu ve sevinci birlikte yaşadığım dostlarım, eş kıdemlerim Dt. İpek ALTINTAŞ KINIKOĞLU, Dt. Ayça KURT BORAN, Dt. Gözde CUMHUR ve Dt. Hakan KARAOĞLAN'a, doktora eğitimim boyunca kendisinden çok şey öğrendiğim öncelikle kıdemli ağabeyim ve şimdi çok değerli hocam olan Sayın Dr. Öğr. Üyesi Cafer ATAŞ'a, dostlarım Dr. Öğr. Üyesi Fatma ÇELİK, Dt. Duygu ÇAKIR, Dt. Muhsin ERGEN, Dt. Meltem KARAHAN'a, ismini buraya sığdıramadığım arkadaşlarım ve tüm Sağlık Bilimleri Üniversitesi Çocuk Diş Hekimliği bölümü ailesine,

Eğitim hayatım süresince desteklerini ve sevgisini hep yanı başımda hissettiğim, varlığıma anlam katan çok değerli ailem; canım babam Prof. Dr. Coşkun TEZ'e, canım annem Rahime TEZ'e ve biricik kardeşim Doğa Can TEZ'e,

Sonsuz teşekkür ve saygılarımı sunarım.

İÇİNDEKİLER

İTHAF.....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER	vi
TABLolar LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLER LİSTESİ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR	xiv
ÖZET	xviii
ABSTRACT.....	xx
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. DENTİN-PULPA KOMPLEKSİ HİSTOLOJİSİ VE FİZYOLOJİSİ	4
2.1.1. Pulpanın Tabakaları	4
2.1.1.1. Odontoblast Tabakası	5
2.1.1.2. Hücreden Fakir Tabaka (Weil Tabakası).....	5
2.1.1.3. Hücreden Zengin Tabaka.....	5
2.1.1.4. Santral Tabaka	5
2.1.2. Pulpanın Hücreleri	5
2.1.2.1. Odontoblastlar.....	5
2.1.2.2. Fibroblastlar..	6
2.1.2.3. İmmunolojik savunma hücreleri	7
2.2. KÖK HÜCRE	8
2.2.1. Farklılaşma ve Bölünme Özelliklerine Göre Kök Hücreler	8
2.2.1.1. Totipotent kök hücreler.....	8
2.2.1.2. Pluripotent kök hücreler.....	8
2.2.1.3. Multipotent kök hücreler	8
2.2.1.4. Oligopotent kök hücreler.	9
2.2.1.5. Unipotent kök hücreler.	9
2.2.2. Kaynaklarına Göre Kök Hücre Tipleri	9
2.2.2.1. Embriyonik kök hücreler	9
2.2.2.2. Uyarılmış Pluripotent Kök Hücreler (iPS).....	9
2.2.2.3. Yetişkin kök hücreler.....	9
2.2.3. Dental epitelyal kök hücreler.....	11
2.2.4. Dental dokulardan elde edilen mezenkimal kökenli kök hücreler.....	11
2.2.4.1. Dental pulpa kök hücreleri (DPSCs)	12

2.2.4.2. Dental folikül kök hücreleri (DFPCs).....	13
2.2.4.3. Apikal papilla kök hücreleri (SCAPs)	13
2.2.4.4. Periodontal ligament kök hücreleri (PDLSCs)	13
2.2.4.5. Eksfoliye olmuş süt dişlerinden elde edilen kök hücreler (SHEDs).....	13
2.3. DERİN DENTİN ÇÜRÜKLÜ DİŞLERDE DENTİN-PULPA KOMPLEKSİ VE KLİNİK PROSEDÜRLER	14
2.3.1. İndirekt Pulpa Kuafajı.....	14
2.3.2. Direkt Pulpa Kuafajı	15
2.4. PULPA KUAFAJ TEDAVİSİNDE KULLANILAN DENTAL MATERYALLER	15
2.4.1. Kalsiyum Hidroksit.....	15
2.4.2. Çinko Oksit Ojenol	16
2.4.3. Kalsiyum Silikat İçerikli Materyaller	17
2.4.3.1. Mineral Trioksit Agregat (MTA).....	17
2.4.3.2. Biodentin.....	18
2.4.3.3. Endosequence	18
2.4.3.4. Rezin Modifiye Kalsiyum Silikat (TheraCal LC).....	19
2.4.3.5. Bioagregat	19
2.4.4. Kalsiyumla Zenginleştirilmiş Karışım (CEM)	20
2.5. SİTOTOKSİSİTE VE BİYUYUMLULUK	20
2.5.1. İn Vitro Sitotoksiste ve Biyouyumluluk Testleri.....	20
2.5.1.1. Canlılık değerlendirme (kısa dönem toksiste) testleri	22
2.5.1.2. Yaşam değerlendirme (uzun dönem toksiste) testleri.....	22
2.5.1.3. Hücre proliferasyonunu değerlendiren testler.....	22
2.5.1.4. Metabolik sitotoksiste değerlendirme testleri	23
2.5.2. Apoptoz Tayini	25
2.5.2.1. Flow sitometri- Anneksin V/FITC- Propidyum İyodür (PI).....	27
2.5.3. Serbest Radikaller	28
2.5.3.1. Serbest radikal kaynakları.....	29
2.5.3.2. Canlı organizmasında ROS ve RNS oluşumunun avantaj ve dezavantajları	29
2.5.4. Gen Anlatım Analizinde Polimeraz Zincir Reaksiyonu	30
2.5.4.1. mRNA'dan cDNA elde edilmesi	31
2.5.4.2. Housekeeping gen kavramı.....	32
2.5.4.2. Gerçek Zamanlı Revers Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Revers-Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-qPCR)).....	32
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	34
3.1. GEREÇLER.....	34
3.1.1. Çalışmada Kullanılan Kuafaj Materyalleri	34

3.1.2. Hücre Kültür Çalışmasında Kullanılan Kimyasal Materyaller	35
3.1.3. Hücre Kültür Çalışmasında Kullanılan Sarf Malzemeler	35
3.1.4. Kullanılan Kit ve Testler.....	36
3.1.5. Kullanılan Cihazlar	36
3.1.6. Çalışmada Kullanılan Kuafaj Materyallerinin Hücre Kültürü Öncesi Hazırlanması	37
3.2. YÖNTEM	40
3.2.1. Kök Hücre İzolasyonu ve Kültürü	40
3.2.2. İzole Edilen Dental Pulpa Kök Hücrelerinin Pasajlanması	41
3.2.3. İzole Edilen Kök Hücrelerin Flow Sitometri ile Karakterizasyon Analizi	41
3.2.4. Ekstraksiyon Yöntemi ile Materyallerin Salınım Sıvılarının Elde Edilmesi	42
3.2.5. Hücre Canlılığı- MTS Analizi	43
3.2.6. Anneksin-PI ile Apoptoz-Nekroz Analizi (Flow Sitometri).....	46
3.2.7. Reaktif Oksijen Seviyesini Belirleme-ROS.....	46
3.2.8. Total RNA İzolasyonu- Gen Analizi	47
3.2.9. RNA'dan cDNA (Tamamlayıcı DNA) Sentezi	50
3.2.10. Gerçek Zamanlı Revers Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu(RT-qPCR)	53
3.2.11. SEM görüntüleme	57
3.2.12. İstatistiksel Analiz.....	57
4. BULGULAR.....	58
4.1. İZOLE EDİLEN KÖK HÜCRELERİN FLOW SİTOMETRİ İLE KARAKTERİZASYONUNUN BELİRLENMESİ.....	58
4.2. HÜCRE CANLILIĞI-MTS TESTİ ANALİZ SONUÇLARI	59
4.2.1. Materyallerin Hücre Canlılığı-MTS Testi Sonuçlarının Zamana Göre Gruplar Arası Karşılaştırmalı Analizi	59
4.2.2. Materyallerin Hücre Canlılığı-MTS Testi Sonuçlarının Zamana Göre Grup İçi Karşılaştırmalı Değerlendirilmesi.....	63
4.3. ANNEXİN V- PROPİDYUM İYODÜR (PI) İLE APOPTOZ-NEKROZ TAYİNİ-FLOW SİTOMETRİ ANALİZİ.....	65
4.3.1. Annexin V- Propidylum İyodür (PI) ile Apoptoz-Nekroz Tayini-Flow Sitometri Analizinde 7. ve 14. Güne ait Bulgular	65
4.4. HÜCRE İÇİ SERBEST RADİKAL DEĞİŞİMİ ANALİZİ (ROS).....	70
4.5. GERÇEK ZAMANLI REVERS TRANSKRİPTAZ POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (RT-qPCR) MRNA GEN EKSPRESYONU ANALİZİ.....	72
4.5.1. ALP/18m/RNA Gen Ekspresyonu RT-qPCR Analiz Bulguları	72
4.5.1.1. Materyallerin ALP/18m/RNA gen ekspresyonu RT-qPCR bulgularının zamana göre grup içi karşılaştırmalı istatistiksel analizi	72
4.5.1.2. Materyallerin ALP/18m/RNA gen ekspresyonu RT-qPCR bulgularının zamana göre gruplar arası karşılaştırmalı istatistiksel analizi	74

4.5.2. OCN/18m/RNA Gen Ekspresyonu RT-qPCR Analiz Bulguları	76
4.5.2.1. Materyallerin OCN/18m/RNA gen ekspresyonu RT-qPCR bulgularının zamana göre grup içi karşılaştırmalı istatistiksel analizi	76
4.5.2.2. Materyallerin OCN/18m/RNA gen ekspresyonu RT-qPCR bulgularının zamana göre gruplar arası karşılaştırmalı istatistiksel analizi	78
4.5.3. VEGF/18m/RNA Gen Ekspresyonu RT-qPCR Analiz Bulguları	79
4.5.3.1. Materyallerin VEGF/18m/RNA gen ekspresyonu RT-qPCR bulgularının zamana göre grup içi karşılaştırmalı istatistiksel analizi	79
4.5.3.2. Materyallerin VEGF/18m/RNA gen ekspresyonu RT-qPCR bulgularının zamana göre gruplar arası karşılaştırmalı istatistiksel analizi	81
4.5.4. Col1A/18m/RNA Gen Ekspresyonu RT-qPCR Analiz Bulguları	82
4.5.4.1. Materyallerin Col1A/18m/RNA gen ekspresyonu RT-qPCR bulgularının zamana göre grup içi karşılaştırmalı istatistiksel analizi	82
4.5.4.2. Materyallerin Col1A/18m/RNA gen ekspresyonu RT-qPCR bulgularının zamana göre gruplar arası karşılaştırmalı istatistiksel analizi	84
4.5.5. SPARC (Osteonektin)/18m/RNA Gen Ekspresyonu RT-qPCR Analiz Bulguları	86
4.5.5.1. Materyallerin SPARC/18m/RNA gen ekspresyonu RT-qPCR bulgularının zamana göre grup içi karşılaştırmalı istatistiksel analizi	86
4.5.5.2. Materyallerin SPARC(Osteonektin)/18m/RNA gen ekspresyonu RT-qPCR bulgularının zamana göre gruplar arası karşılaştırmalı istatistiksel analizi	87
4.6. YÜZEY YAPISINDAKİ MORFOLOJİK DEĞİŞİMLERİN TARAMALI ELEKTRON MİKROSKOBU İLE İNCELENMESİ (SEM- SCANNING ELECTRON MICROSCOPE).....	89
5. TARTIŞMA	98
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	119
KAYNAKLAR	122
EKLER.....	135

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 2. 1: ISCT'ye göre MKH yüzey antijenleri.....	11
Tablo 2. 2: MTT ile MTS testi arasındaki farklar.....	25
Tablo 2. 3: Apoptoz ve nekroz arasındaki farklar.....	26
Tablo 2. 4: Apoptozun tayin edilmesinde kullanılan yöntemler.....	27
Tablo 3. 1: Çalışmada kullanılan kuafaj materyalleri, içerikleri ve üretici firma isimleri..	38
Tablo 3. 2: cDNA reaksiyon karışımı	51
Tablo 3. 3: cDNA sentez reaksiyon protokolü.....	51
Tablo 3. 4: RT-qPCR'da ekspresyonu çalışılan genlere ait primer dizileri	54
Tablo 3. 5: RT-qPCR'da her primer için gerekli olan master mix solüsyonu karışım oranları	54
Tablo 3. 6: Real Time qPCR protokolü	55
Tablo 4. 1: Hücre canlılığı 1. gün MTS testi sonuçları.....	60
Tablo 4. 2: Hücre canlılığı 3. gün MTS testi sonuçları.....	61
Tablo 4. 3: Hücre canlılığı 5. gün MTS testi sonuçları.....	61
Tablo 4. 4: Hücre canlılığı 7. gün MTS testi sonuçları.....	62
Tablo 4. 5: Hücre canlılığı 14. gün MTS testi sonuçları.....	62
Tablo 4. 6: Negatif kontrol grubu, negatif kontrol Annexin V grubu, negatif kontrol PI grubu, negatif kontrol Annexin V-PI grubu ile 4 farklı kuafaj materyalinin 7. güne ait flow sitometri analiz bulguları	67
Tablo 4. 7: Negatif kontrol grubu, negatif kontrol Annexin V grubu, negatif kontrol PI grubu, negatif kontrol Annexin V-PI grubu ile 4 farklı kuafaj materyalinin 14. güne ait flow sitometri cihazı analiz bulguları.....	69
Tablo 4. 8: ROS analiz sonuçları	71

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 3. 1: Çalışmada kullanılan kuafaj materyalleri, A) Dycal (Dentsply), B) TheraCal (Bisco Inc, Schamburg,IL, ABD), C) NuSmile NeoPUTTY 0.65 gram Starter Kit, D) Harvard BioCal®-CAP	37
Şekil 3. 2: 2x6 mm boyutlarında boşluklar bulunan teflon disk	39
Şekil 3. 3: Kuafaj materyallerinin hücre kültürü öncesi hazırlanması	39
Şekil 3. 4: T75'lik flaskta büyütülen dental pulpa hücreleri	42
Şekil 3. 5: Marker karakterizasyonu için hazırlanan falcon tüpleri (Negatif kontrol grubu ve CD73, CD90, CD105, CD44, CD14, CD34, CD45, CD146, CD29, CD31 antibodyleri) ..	42
Şekil 3. 6: Dycal, TheraCal LC, NeoPutty MTA ve Harvard BioCal'ın ekstrakt salınım sıvılarının elde edilmesi	43
Şekil 3. 7: Negatif kontrol, pozitif kontrol ve kuafaj materyallerinden elde edilen ekstrakt salınım sıvıları ile muamele edilmiş hücrelere MTS solüsyonun eklenmesi.....	44
Şekil 3. 8: PBS-glukoz çözeltisi ile karıştırılmış MTS solüsyonunun deney gruplarına göre renk değişimi.....	45
Şekil 3. 9: İnkübasyon sürecinden sonra 490 nm dalga boyunda abzorbans ölçümü yapılan ELISA plaka okuyucu (Biotek, Winooski, VT) cihazı	45
Şekil 3. 10: 24 saatlik inkübasyon sürecinin ardından hücrelerin toplanması	47
Şekil 3. 11: Numune örneklerini 3 ayrı faza ayırmak için 12000 x g'de 15 dakika santrifüj edilmesi (Gyrozen 416, Korea).....	48
Şekil 3. 12: 12000 x g'de 15 dakika santrifüj edilen örneklerin 3 faza ayrılması, üstteki renksiz faz	48
Şekil 3. 13: RNA örneklerinin 400 µl %75'lik etanol ile karıştırılıp vortekslenmesi (Dragon Lab, MX-F, China)	49
Şekil 3. 14: RNA örneklerini çözmek için kullanılan RNase/DNase içermeyen su (Nuclease-free water BIO-RAD)	50
Şekil 3. 15: cDNA reaksiyon karışımının hazırlandığı -20°C'lik mini soğutucu	52
Şekil 3. 16: cDNA sentez reaksiyon protokolü şeması	52

Şekil 3. 17: Thermal Cyclers (termal sıcaklık döngüsü) cihazı (Sensoquest, Almanya).....	53
Şekil 3. 18: ALPL, VEGF, COL1A1, SPARC(Osteonektin), BGLAP(OCN) isimli genlerin STRING network haritası analiz grafiği	56
Şekil 3. 19: ALPL, VEGF, COL1A1, SPARC(Osteonektin), BGLAP(OCN) isimli genlerin STRING network haritası renklendirme tanımları	56
Şekil 4. 1: Kök hücrelerin marker ekspresyonlarının flow sitometri analizi ile belirlenmesi	58
Şekil 4. 2: Materyallerin hücre canlılığı-MTS testi sonuçlarının zamana göre gruplar arası karşılaştırmalı analizi	59
Şekil 4. 3: Materyallerin hücre canlılığı-MTS testi sonuçlarının zamana göre grup içi karşılaştırmalı değerlendirilmesi	63
Şekil 4. 4: Negatif kontrol grubu, negatif kontrol Annexin V grubu, negatif kontrol PI grubu, negatif kontrol Annexin V-PI grubu ile 4 farklı kuafaj materyalinin 7. güne ait flow sitometri analizi (x: Annexin y: PI).....	66
Şekil 4. 5: Negatif kontrol grubu, negatif kontrol Annexin V grubu, negatif kontrol PI grubu, negatif kontrol Annexin V-PI grubu ile 4 farklı kuafaj materyalinin 14. güne ait flow sitometri analizi (x: Annexin y: PI)	68
Şekil 4. 6: Kuafaj materyallerinin hücrelerde oluşturduğu hücre içi serbest radikal ölçümü (ROS) nün istatistiksel analizi (intensity fold, %)	70
Şekil 4. 7: Materyallerin ALP/18m/RNA gen ekspresyonu RT-qPCR bulgularının zamana göre grup içi karşılaştırmalı istatistiksel analizi	72
Şekil 4. 8: Materyallerin ALP/18m/RNA gen ekspresyonu RT-qPCR bulgularının zamana göre gruplar arası karşılaştırmalı istatistiksel analizi.....	74
Şekil 4. 9: Materyallerin OCN/18m/RNA gen ekspresyonu RT-qPCR bulgularının zamana göre grup içi karşılaştırmalı istatistiksel analizi	76
Şekil 4. 10: Materyallerin OCN/18m/RNA gen ekspresyonu RT-qPCR bulgularının zamana göre gruplar arası karşılaştırmalı istatistiksel analizi.....	78
Şekil 4. 11: Materyallerin VEGF/18m/RNA gen ekspresyonu RT-qPCR bulgularının zamana göre grup içi karşılaştırmalı istatistiksel analizi	79

Şekil 4. 12: Materyallerin VEGF/18m/RNA gen ekspresyonu RT-qPCR bulgularının zamana göre gruplar arası karşılaştırmalı istatistiksel analizi	81
Şekil 4. 13: Materyallerin Col1A/18m/RNA gen ekspresyonu RT-qPCR bulgularının zamana göre istatistiksel analizi	82
Şekil 4. 14: Materyallerin Col1A/18m/RNA gen ekspresyonu RT-qPCR bulgularının zamana göre gruplar arası karşılaştırmalı istatistiksel analizi	84
Şekil 4. 15: Materyallerin SPARC (Osteonektin)/18m/RNA gen ekspresyonu RT-qPCR bulgularının zamana göre istatistiksel analizi	86
Şekil 4. 16: Materyallerin SPARC (Osteonektin)/18m/RNA gen ekspresyonu RT-qPCR bulgularının zamana göre gruplar arası karşılaştırmalı istatistiksel analizi	87
Şekil 4. 17: Dycal (Dentsply) materyalinin hücresiz 500x (A) ve 1000x (B) büyültmede SEM görüntüleri.....	90
Şekil 4. 18: Dycal (Dentsply) materyali ile muamele edilen DPSC'lerin 100x (A), 250x (B), 500x (C), 1000x (D), 2500x (E, F) büyültme ile SEM görüntüleri	91
Şekil 4. 19: NeoPutty MTA (NuSmile) materyalinin hücresiz 500x (A) ve 1000x (B) büyültmede SEM görüntüleri.....	92
Şekil 4. 20: NeoPutty MTA (NuSmile) materyali ile muamele edilen DPSC'lerin 500x (A), 1000x (B, C), 2000x (D), 2500x (E, F) büyültme ile SEM görüntüleri (pseudopod uzantıları sarı okla gösterilmiştir.)	93
Şekil 4. 21: Harvard BioCal-Cap materyalinin hücresiz 500x (A) ve 1000x (B) büyültmede SEM görüntüleri	94
Şekil 4. 22: Harvard BioCal-Cap materyali ile muamele edilen DPSC'lerin 1000x (A), 2500x (B) büyültme ile SEM görüntüleri	95
Şekil 4. 23: TheraCal LC materyalinin hücresiz 100x (A) ve 250x (B) büyültmede SEM görüntüleri.....	96
Şekil 4. 24: TheraCal LC materyali ile muamele edilen DPSC'lerin 100x (A), 250x (B), 500x (C), 1000x (D) büyültme ile SEM görüntüleri	97

SİMGELER VE KISALTMALAR

ALP	: Alkalen Fosfataz
ATP	: Adenozin trifosfat
Bis-GMA	: Bisfenolglisidil Metakrilat
BMP	: Kemik morfogenetik proteini
BMSC	: Kemik iliği stromal mezenkimal kök hücreleri
BrdU	: Bromodeoksiüridin
BSA	: Sığır Serum Albümini
Ca(OH)₂	: Kalsiyum hidroksit
CaCl₂	: Kalsiyum klorür
cDNA	: Tamamlayıcı (komplementer) deoksiribonükleik asit
CEM	: Kalsiyumla zenginleştirilmiş karışım
CO₂	: Karbondioksit
Col1A	: Kollajen Tip 1 Alfa 1
CSH	: Kalsiyum silikat-hidrat
DCFDA	: 2',7'-Diklorodihidrolüorescein Diasetat Boyama
DFPC	: Dental folikül projenitör hücreler
dH₂O	: Deiyonize su
DMEM	: Dulbecco'nun Modifiye Eagle Medyumu
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DMF	: Dimetil formamid
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dNTP	: Deoksiribonükleik asit trifosfat
DPBS	: Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
DPSC	: Dental pulpa kök hücresi

ECM	: Ekstrasellüler matriks
EDTA	: Etilendiamin Tetraasetik Asit
ELISA	: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
FBS	: Fetal bovin serum
FGF	: Fibroblast büyüme faktörü
FITC	: Floresan izotiyosiyonat
GAG	: Glikozaminoglikan
GAPDH	: Gliseraldehid 3-fosfat dehidrogenaz
HCS	: Hidratlı kalsiyum-silikat
HeLa	: İnsan epitel hücreleri
hDPSC	: İnsan dental pulpa kök hücreleri
HEMA	: Hidroksietil metakrilat
HKH	: Hematopoetik kök hücre
hNDPSCs	: İnsan neonatal diş pulpası kök hücresi
H₂O₂	: Hidrojen Peroksit
HNO₂	: Nitroz Asit
HOCl	: Hipokloröz Asit
IL	: İnterlökin
ISTC	: Uluslararası Hücresel Tedavi Derneği
ISO	: Uluslararası Standardizasyon Örgütü
iPS	: İndüklenmiş pluripotent kök hücre
LDH	: Laktat Dehidrogenaz
LOOH	: Lipit hidroperoksit
MKH	: Mezenkimal kök hücre
MTA	: Mineral Trioksit Aggregate

MTS	:5- (3-karboksimetoksifenil) -2- (4,5-dimetil-tiyazol) -3- (4-sülfofenil) tetrazolyum
MTT	:3- (4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2-5-difeniltetrazolyum bromür
mm	: Milimetre
mW/cm²	: güç yoğunluğu
ml	: Mililitre
NaOCl	: Sodyum hipoklorit
NGF	: Sinir büyüme faktörü
nm	: Nanometre
NO	: Nitrik oksit
NO₂	: Nitrojen dioksit
N₂O₃	: Dinitrojen trioksit
NW-MTA	: Nano-beyaz mineral trioksit aggregate
O₂	: Oksijen
O₃	: Ozon
OCN(BGLAP)	: Osteokalsin
OH	: Hidroksil
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
PBS	: Fosfat tamponlu salin çözeltisi
PDLSC	: Periodontal ligament kök hücresi
PFA	: Paraformaldehit
PES	: Fenazin etil sülfat
pH	: Çözeltideki hidrojen iyon konsantrasyonunun negatif logaritması
PMS	: Fenazin metil sülfat
pmol	: pikomol
PI	: Propidyum iyodür

PRF : Trombositten zengin fibrin

Real-Time PCR: Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu

RNA : Ribonükleik asit

RNS : Reaktif azot türleri

RO : Alkoksil

ROO : Peroksil

ROS : Reaktif oksijen türleri

rpm : Dakikadaki devir sayısı (revolution per minute)

RT : Revers transkripsiyon

SCAP : Apikal papilla kök hücresi

SEM : Taramalı elektron mikroskobu (Scanning electron microscope)

SHED : Süt dişi kök hücresi

SPARC(ON) : Osteonektin

Ta₂O₅ : Tantalyum oksit

TEGDMA : Trietilen Glikol Dimetakrilat

TNF : Tümör Nekroz Faktör

tHPCs : Transfekte edilmiş dental pulpa kök hücresi

UDMA : Üretan dimetakrilat

UPLC_MS : Kütle spektrometresi

VEGF : Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü

WST : 2-(2-metoksi-4- nitrofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disülfofenil)-2H

XTT : 2,3-bis-(2-metoksi-4-nitro-5-sulfofenil)-2Htetrazolyum-5-karboksanilid

xg : Yerçekimi birimi

µl : Mikrolitre

µg : Mikrogram

°C : Santigrat derece

GÜNÜMÜZDE DİREKT VE/VEYA İNDİREKT KUAF AJ TEDAVİSİNDE KULLANILAN MATERYALLERİN DENTAL PULPA KÖK HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ SİTOTOKSİSİTE VE BİYOUYUMLULUĞUNUN İNCELENMESİ

ÖZET

Amaç: Bu çalışmanın amacı, dört farklı pulpa kuafaj materyalinin in vitro ortamda dental pulpa kök hücreleri (hDPSCs) üzerindeki osteojenik, odontojenik ve anjiyojenik etkilerini değerlendirmek, bununla birlikte sitotoksosite ve biyouyumluluklarını karşılaştırmaktır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmada, gömülü üçüncü büyük azı dişlerinden izole edilen DPSC'ler kullanılmıştır. DPSC'ler, Harvard BioCal-Cap, NeoPutty MTA, TheraCal LC ve Dycal'ın ekstrakt yöntemi ile elde edilen salınım sıvılarına maruz bırakılmıştır. MTS testi ile hücre canlılığı, Annexin V/PI boyası ile flow sitometride apoptoz/nekroz hücre tayini yapılmış ve materyallerin hücre içi oluşturduğu ROS değerlerine bakılmıştır. Osteo/odontojenik belirteçlerden ALP, OCN, Col1A, SPARC(ON) ve anjiyojenik belirteç olan VEGF'nin gen ekspresyonu RT qPCR ile belirlenmiştir. Yüzey yapısındaki morfolojik değişimler SEM ile görüntülenmiştir.

Bulgular: MTS testi 1.3.5. ve 7. gün sonuçları değerlendirildiğinde Harvard BioCal-Cap, NeoPutty MTA ve TheraCal LC negatif kontrol grubuna göre hücre canlılığını olumsuz etkilemediği görülmüş, 14.gün sonu MTS sonuçlarına göre, Dycal, Harvard BioCal-Cap, NeoPutty MTA ve TheraCal LC arasında anlamlı bir farklılık bulunamamıştır ($p > 0.05$). Dycal, ROS seviyesini arttıran tek materyal olmuştur ($p \leq 0.0001$). Harvard BioCal-Cap, TheraCal LC ($p \leq 0.0001$) ve NeoPutty MTA'da ($p \leq 0.01$) yüksek seviyede VEGF mRNA gen ekspresyonu gözlenmiştir. NeoPutty MTA ve Dycal; OCN mRNA gen ekspresyonunu, TheraCal LC ise Col1A ve SPARC (ON) mRNA gen ekspresyonunu yukarı yönde regüle etmiştir ($p \leq 0.0001$). ALP mRNA gen ekspresyonunu arttıran tek materyal Dycal olmuştur ($p \leq 0.0001$). TheraCal LC ve Harvard BioCal-Cap'ın SEM'de DPSC'lere karakteristik iç morfolojisini kazandırdığı görülmüştür.

Sonuç: Zemin esaslı MTA olan Harvard BioCal-Cap ve NeoPutty MTA, uyumlu biyouyumluluk değerleri göstermiş ve özellikle anjiyojenik belirteci desteklediği saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Biyouyumluluk, Dental pulpa kök hücresi, Kuafaj tedavisi, mRNA gen ekspresyonu, Sitotoksisite



EVALUATION OF CYTOTOXICITY AND BIOCOMPATIBILITY OF RECENTLY IN USE MATERIALS IN DIRECT/INDIRECT CAPPING TREATMENT ON DENTAL PULP STEM CELLS

ABSTRACT

Aim: This study aimed to evaluate the in vitro osteogenic, odontogenic and angiogenic effects of four pulp capping materials on dental pulp stem cells (hDPSCs), as well as to compare cytotoxicity and biocompatibility.

Materials and Methods: Impacted third molars were used to isolate hDPSCs, which were treated with extract release fluids of pulp capping materials (Harvard BioCal-Cap, NeoPutty MTA, TheraCal LC, and Dycal). Effects of capping materials on cell viability were assessed using MTS assay and the apoptotic/necrotic cell ratios and ROS levels from a flow cytometry. Marker expressions (ALP, OCN, Col1A, SPARC (ON) and VEGF) were determined by RT-qPCR. Changes in surface morphology of hDPSCs were visualized by SEM.

Results: The MTS assay results at days 1, 3, 5 and 7 indicated that Harvard BioCal-Cap, NeoPutty MTA and TheraCal LC did not adversely affect cell viability when compared to the control group. According to the MTS assay results at day 14, no significant difference was found among Dycal, Harvard BioCal-Cap, NeoPutty MTA and TheraCal LC affecting the cell viability. Dycal was the only capping material that increases the ROS level. High levels of VEGF expression were observed in Harvard BioCal-Cap, TheraCal LC, and NeoPutty MTA. NeoPutty MTA and Dycal up-regulated OCN expression, whereas TheraCal LC up-regulated Col1A and SPARC expression. Only Dycal increased ALP expression. The hDPSCs were visualized in characteristic spindle morphology by SEM due to TheraCal LC and Harvard BioCal-Cap.

Conclusion: NeoPutty MTA and Harvard BioCal-Cap MTA showed suitable biocompatibility values, and in particular, these capping materials were observed to support the angiogenic marker.

Key Words: Biocompatibility, Cytotoxicity, Dental pulp stem cells, mRNA Expression, Pulp capping treatment

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Geçmişten günümüze pulpa hastalıklarının tedavilerinde, tedavi yöntemi ve materyal seçimi ile ilgili birçok gelişmeler kaydedilmiş ancak tek bir tedavi protokolü oluşturulamamıştır (1). İndirekt kuafaj tedavisi, direkt kuafaj tedavisi ve pulpotomi gibi geri dönüşümlü pulpa tedavilerinde, ikincil yaralanmalardan pulpayı korumak amacı ile üzeri bir materyal ile kapatılıp, tedavi sonrası iyileşme ve tersiyer dentin oluşumu beklenmektedir. Son yıllarda pulpayı korumak ve tersiyer dentin mekanizmasının oluşumunu indüklemek için, geliştirilen kuafaj materyallerinin sitotoksikite ve biyouyumluluk özellikleri değerlendirilmiş ve tamir, sızdırmazlık kapasiteleri artırılmaya çalışılmıştır (2). Sekonder dentin yapımı sonucu oluşan tersiyer dentin tübül yapısı, daha düzensiz yapıda olup, pulpal reaksiyonlarda en önemli faktörler arasında yer alan dentin geçirgenliğini azaltmaktadır. Dentin tübül ve matriksinde, difüzyon yoluyla veya tübül geçirgenliği ile pulpaya toksik bileşikler ulaşabilmekte ve inflamatuvar reaksiyonları başlatabilmektedir (3,4). Derin dentin çürüklü dişlerde çürük lezyonun pulpaya yaklaşması sonucu oluşan patolojik durumlar; travma, mekanik veya iatrojenik sebeple pulpa yaralanmasının görüldüğü vakalarda seçilen materyallerin ve uygulama prosedürlerinin farklı iyileşme paternleri gösterebileceği bilinmektedir (5).

Direkt/indirekt kuafaj tedavisinde, kalsiyum hidroksit ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) içeren ve hızlı sertleşme özelliği olan patlar uzun yıllardır klinik kullanımda yerini almaktadır. Ancak bu materyallerin, dentin yüzeyi ile zayıf bağlantı oluşturduğu, mikrosızıntıyı önleyemedikleri ve restorasyon altında bir süre sonra rezorbe oldukları görülmüştür (6). Ayrıca kalsiyum hidroksit altında oluşan dentin köprülerinde tünel defektleri olabileceği bilinmektedir (3). Mineral Trioksit agregat (MTA), kalsiyum hidroksite alternatif olarak piyasaya sürülmüş yüksek fiziksel dayanıma sahip bir materyaldir. Mikrosızıntıyı engelleyebilmesi, biyouyumluluğunun yüksek olması ve restorasyon altında rezorbe olmayıp pulpayı hermetik kapatabilmesiyle süt ve daimî vital pulpa tedavilerinde başarıyla kullanılmaktadır. Kalsiyum hidroksite benzer alkaliği özelliği ile pulpa hücrelerinin odontoblastlara farklılaşmasını indükleyen biyolojik olarak aktif bir substrat olarak görülmektedir (7). TheraCal LC (Bisco Inc, Schamburg, IL, ABD), rezin modifiye kalsiyum silikat esaslı kaide/astar materyalidir. Ayrıca kalsiyum silikat bazlı bu materyal yüksek kalsiyum salınımı yapmaktadır. Salınan kalsiyum iyonları, pulpadaki

odontoblastları indükleyerek proliferasyonu ve farklılaşmayı sağlamakta ve sert doku oluşumunu uyarmaktadır (3,8). Yeni bir materyal olan Harvard BioCal-CAP; rezin içerikli MTA içeren ve ışıkla polimerize olan kuafaj materyali olarak piyasaya sürülmüştür. TheraCal LC ve MTA'nın üstün özelliklerinin birleştirilmesi ile piyasaya çıkmış olan Harvard BioCal-CAP ile ilgili literatürde sitotoksosite ve biyouyumluluk özelliklerinin değerlendirildiği herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. NeoPutty MTA (NuSmile), macun kıvamında bulunan, manipülasyon zorluğunun ortadan kaldırıldığı, hazır karıştırılmış şekilde piyasaya sürülen yeni MTA içerikli kuafaj materyalidir. Yeni bileşimlere sahip materyalleri, klinik uygulamalarından önce kapsamlı bir şekilde değerlendirecek daha fazla in vitro ve in vivo araştırma yapılması gerekmektedir.

Canlı dokular, doku gelişimi ve tamirinden sorumlu kök hücre veya öncü hücreleri barındırmaktadır. Kök hücreler, uzun zaman dilimleri boyunca bölünebilme, kendilerini yenileyebilme, özelleşmiş hücrelere kaynaklık etme ve hasar sinyallerini algılama özellikleriyle vücuttaki diğer hücrelerden farklı, özelleşmemiş hücrelerdir. Bu hücreler, embriyonik gelişimde ve organların oluşmasında ve hasarlı dokuların tamir edilmesinde önemli rol oynamaktadır (9).

Diş pulpası kök hücreleri, tedavi amaçlı uygulamalar için gerekli bütün özellikleri taşımaktadır ve bu hücrelerin elde edilmesi oldukça kolaydır. Pulpa dokusundan elde edilen kök hücrelerin, yüksek proliferasyon ve farklılaşma yeteneğine sahip olduğu bilinmektedir. Dental pulpa kök hücreler ile biyo-materyallerin, rejenerasyon protokolleri kapsamında etkin olarak kullanımları mümkündür. Yaşam süreleri uzundur, güvenli olarak dondurulup saklanmaları mümkündür (10).

İn vitro sitotoksosite testlerinde; doku kültürleri, organ kültürleri, hücre kültürleri ve hücre organelleri kullanılabilir. Bir materyalin biyouyumluluğu materyalin; tipine, uygulandığı bölgeye ve fonksiyonuna bağlı olarak değişmektedir. Biyouyumluluk bir materyalin canlı dokular ile temas halinde iken sistemik ve lokal toksisite, alerjik, mutajenik ve karsinojenik etkiler gibi doku reaksiyonları oluşturmamasıdır (11). Günümüzde yeni bir materyalin insanlarda uygulanmadan önce geniş kapsamlı testler ile biyouyumluluğunun değerlendirilmesi gerekmektedir (12,13). Dental materyallerin sitotoksosite testleri için en fazla kullanılmakta olan biyolojik sistemler, kültür hücreleridir. Kültür hücreleri ya ticari olarak kültürlerden elde edilen hücrelerden oluşabilir ya da canlı dokulardan izole edilebilmektedir (14). Dental dokulara ait hücre

kültürleri, vücut organizmasının bütününe yönelik değil hücre morfolojileri, DNA ve protein sentezleri gibi hücresel düzeyde değerlendirme için kullanılmaktadır (15).

Bu çalışmanın amacı, dört farklı pulpa kuafaj materyalinin in vitro ortamda dental pulpa kök hücreleri (hDPSCs) üzerindeki osteojenik, odontojenik ve anjiyojenik etkilerini değerlendirmek, bununla birlikte sitotoksikite ve biyouyumluluklarını karşılaştırmaktır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. DENTİN-PULPA KOMPLEKSİ HİSTOLOJİSİ VE FİZYOLOJİSİ

Pulpa; mine, dentin ve sement gibi sert ve mineralize dokuları tarafından sınırlandırılan, koronal ve radiküler bölümde yer alıp duysal ve besleyici fonksiyonları yerine getiren, ekto-mezenşim kökenli damar ve sinir ağı ile sarılmış homojen bir bağ dokusudur (16).

İnsan vücudundaki diğer dokulardan farklı olarak; mineralize ve sert dentin duvarları arasında bulunan dental pulpada, inflamatuvar reaksiyon sonucu vazodilatasyon gerçekleşmekte ve kan akımı artmaktadır. Bununla birlikte şiddetli pulpal inflamasyon sonucu nekrotik pulpa dokusuna dönüşmektedir. Dental pulpadaki hücre popülasyonlarının büyük çoğunluğunu fibroblastlar oluşturmaktadır. Fibroblastlarla ilgili yapılan birçok çalışmada, bu hücre grubunun diğer hücre gruplarına kıyasla daha farklı kollajen tiplerini sentezleme ve salgılama kapasitelerine odaklanılmıştır. Dental pulpanın fonksiyonlarına devam edebilmesi için kan damarlarının desteklenmesi ve stabilizasyonunun sağlanması gerekmektedir. Dental pulpanın fonksiyonlarına devam edebilmesi için kollajen sentezi, hücre adezyonu ve ekstraselüler matriks (ECM) sentezinde rol almaktadır. Fibroblastlarla ilgili yapılan son çalışmalarda ise kollajen sentezinden ziyade diğer fonksiyonel görevlerine daha çok odaklanılmıştır. Fibroblastlar, dental pulpa inflamasyonu veya yaralanması durumunda, hücre sinyalizasyonu ile dentin-pulpa rejenerasyonunu ve vaskülarizasyonunu sağlamak için büyüme faktörleri sentezlemektedir (17,18).

2.1.1. Pulpanın Tabakaları

Işık mikroskobu altında incelenen dental pulpa histolojik olarak dıştan içe doğru; odontoblast tabaka, hücreden fakir tabaka (weil tabakası), hücreden zengin tabaka ve santral tabaka olmak üzere 4 bölgeden oluşmaktadır (19).

2.1.1.1. Odontoblast tabakası: Sağlıklı pulpanın en dışında odontoblast tabakası yer almaktadır. Bu tabaka, preentinin hemen altında bulunur ve odontoblastların hücre gövdelerinden oluşmaktadır.

Odontoblast hücrelerinin uzantıları, preentinin geçerek dentinin iç kısımlarına doğru ilerlemektedir. Odontoblast tabakasında aynı zamanda kılcal damarlar, sinir lifleri ve dendritik hücreler de bulunabilmektedir (19).

2.1.1.2. Hücreden fakir tabaka (Weil tabakası): Koronal pulpadaki odontoblast tabakasının hemen altında bulunan aynı zamanda sub-odontoblastik tabaka olarak da bilinen, yaklaşık 40 µm genişliğinde, hücre içermeyen kısımdır. Miyelinsiz sinir lifleri, fibroblastların sitoplazmik uzantıları ve kapillerin bulunduğu bu tabakanın varlığı pulpanın işlevini ve fonksiyonlarını belirlemektedir. Dentinin çok hızlı olduğu genç pulpalarda veya reperatif dentinin üretildiği yaşlı pulpalarda bu tabaka belirgin olarak görülememektedir (19).

2.1.1.3. Hücreden zengin tabaka: Radiküler pulpaya kıyasla koronal pulpada daha belirgin olan bu tabakada, yüksek oranda fibroblast hücre yoğunluğu gözlenmektedir. Fibroblastların yanı sıra hücre açısından zengin olan bu bölge, makrofajlar ve dentritik hücreler gibi değişken sayıda savunma hücresi bulundururken aynı zamanda farklılaşmamış mezenkimal kök hücreler de içerebilmektedir. Normal sağlıklı bir pulpada, bu tabakada hücre bölünmesi nadir görülürken geri dönüşümsüz olarak hasara uğrayan pulpada, hücreden zengin bölgede hücresel mitotik aktivite artmaktadır. Bu mitotik aktivite yeni bir odontoblastik tabakanın oluşumunu sağlayan yolun ilk adımını oluşturmaktadır (19).

2.1.1.4. Santral tabaka: Pulpanın en iç kısmında bulunmaktadır. Bu tabaka daha büyük kan damarları, sinir lifleri içermekte olup bu bölgenin en belirgin hücre grubunu fibroblastlar oluşturmaktadır (20).

2.1.2. Pulpanın Hücreleri

2.1.2.1. Odontoblastlar: Dentin-pulpa kompleksinin en karakteristik ve özelleşmiş hücre grubu olan odontoblastlar hem diş gelişimi hem de yaşlanma döneminde dentinogenezden sorumlu olup tersiyer ve sekonder dentin yapımında görev yapan hücrelerdir.

Dentinogenez sırasında dentini ve dentin tübüllerini oluşturmaktadır. Tübül içerisinde bulunan odontoblastlar hücre uzantıları (Tomes lifleri), dentine canlı ve duyuşsal bir doku olma özelliğı sağlamaktadır. Odontoblast, osteoblast ve sementoblastların birçok ortak özelliğinin bulunması dentinogenez, osteogenez ve sementogenez süreçlerinin mekanizmalarının benzer olmalarının en belirgin nedenidir. Bu hücrelerin her biri, kollajen fibriller ve mineralizasyon sürecinde rol oynayan proteoglikan yapıda bir matriks üretmektedir. RNA açısından da zengin olan bu hücrelerde belirgin endoplazmik retikulum, golgi kompleksi, salgı granülleri ve çok sayıda mitokondri bulunmaktadır (20).

Genç pulpanın koronal kısmında bulunan ve aktif olarak kollajen salgılayan odontoblastlar, uzun silindirik bir form şeklinde görölmektedir (21). Odontoblastların hücre gövdeleri arasında yaklaşık 30 ila 40 nm genişliğinde hücreler arası boşluk bulunmakta olup hücre gövdeleri arasında bağlantı kompleksleri yer almaktadır. Bağlantı kompleksi, sinyal moleküllerinin hücreden hücreye geçişine izin veren konneksin proteinlerinden oluşmaktadır. Bitişik odontoblastları birbirine bağlayan yapılar arasında; dezmozomlar (zonula yapışıyor), boşluk bağlantıları (nexuslar) ve sıkı bağlantılar (zonula oklüdens) dahil olmak bir dizi özel hücre-hücre bağlantısı (bağlantı kompleksi) bulunmaktadır. Odontoblast hücre gövdelerinin apikal kısmında yer alan nokta dezmozomlar, odontoblastları mekanik olarak birleştirmektedir. Boşluk bağlantıları (nexuslar), preentin katmanı üreten ve salgı aktivitesini sekronize eden sinyal moleküllerinin, hücreler arasından geçirgenliğı sağlayan boşluklar oluşturur. Preentin, sağlam mine dokusu ve sement ile sınırlandırılan pulpaya hücre dışı molekül, iyon ve sıvı geçişini kısıtlamaktadır. Bitişik odontoblastları birbirine bağlayan yapılar arasında yer alan zonula oklüdensin (sıkı bağlantılar), odontoblast tabakasının geçirgenliğini belirlediğı görölmektedir. Kavite preparasyonu sırasında bu bağlantılar bozulmakta ve böylece dentin geçirgenliğı artmaktadır (20).

2.1.2.2. Fibroblastlar: Pulpada sayıca en fazla bulunan hücrelerdir. Uygun sinyal proteinleri ile odontoblast benzeri hücrelere farklılaşabilmektedir.

Bu hücreler tip I, III kolajen sentezinin yanı sıra proteoglikanlar ve glikozaminoglikanları (GAG) da sentezleyebilmektedir. Bu sayede ECM'in matriks proteinleri üretilmektedir. Ayrıca fibroblastlar, kolajeni fagosite edip sindirebildikleri için pulpadaki kolajen döngüsünden sorumludur. Pulpada sayıca en fazla bulunan hücre olan

fibroblastlar, özellikle hücreden zengin tabakada görülmektedir. Farklılaşmamış fibroblastlar, daha modern bir terim olan kök hücreler olarak ifade edilmektedir. Pulpa fibroblast hücreleri diğer bağ dokularındaki fibroblastlarla karşılaştırıldığında farklılaşmamış hücrelerin daha yoğunlukta olduğu görülmektedir (22). Bu görüntü pulpada çok sayıda retikülin benzeri liflerin gözlenmesiyle desteklenmiştir (23).

Pulpada dokusunda yara iyileşme mekanizmasını modellemek adına, ekspoz olmuş pulpa dokusu ve pulpotomi tedavisi sonrasında oluşan dentin köprüsü incelenmiştir. Yapılan bir çalışmada, odontoblastların farklılaşmasından önce gerçekleşen mitotik aktivitenin özellikle perivasküler fibroblastlar arasında meydana geldiği gösterilmiştir (19). Büyümesi ve sentezi için nöropeptitler tarafından uyarılan fibroblast hücreleri, inflamasyon sırasında sinir büyüme faktörü (NGF) ve proinflamatuvar sitokinler üretmektedir. NGF'in sadece diş gelişimi aşamasında değil pulpal yaralanma sonucu oluşan odontoblast yanıtlarının düzenlenmesinde de önemli bir rol oynadığını düşünülmektedir (24–26).

2.1.2.3. İmmunolojik savunma hücreleri: Makrofajlar, monosit ve lenfositlerden diferansiye olarak kan dolaşımı ile pulpaya ulaşan immunolojik savunma hücrelerinden dentritik hücrelerin, odontoblast tabakasına yakın kısımda bulunduğu ve sitoplazmik uzantıları ile dentin tübüllerinin içerisine girdiği görülmektedir (27). Pulpanın orta kısmında lokalize olan immünolojik savunma hücrelerinin, tamir ve inflamasyona bağlı immünolojik savunma reaksiyonlarında sayıları artmaktadır (28).

Bu hücreler inflamasyon sürecinde antijen sunucu makrofajlar gibi protein antijenlerini hücre içine alarak MHC sınıf II (Büyük Doku Uyuşum Kompleksi) molekülleri aracılığıyla T lenfositlerinin indüklenmesinde rol oynamaktadır. Fibroblastlara benzer şekilde makrofajlar da pulpadaki sinyal yollarında aktif rol almaktadır. Uygun inflamatuvar uyaranlar tarafından aktive edilen makrofajlar, interlökin (IL-1), tümör nekroz faktörü (TNF), büyüme faktörleri ve diğer sitokinleri üretebilmektedir (29). Sağlıklı pulpada T lenfositlerinin bulunduğu bilinmektedir (30). T-lenfositler, makrofajlar ve dendritik hücrelerin varlığı, pulpanın immün cevabı başlatmak için gerekli olan hücre donanımına sahip olduğunu göstermektedir. B lenfositler ise sağlıklı pulpada daha az sayıda bulunmaktadır (27,31).

2.2. KÖK HÜCRE

Fonksiyonel olarak kendilerini yenileyebilme kapasitesinin yanı sıra farklılaşmış hücreler üretebilme yeteneğine sahip hücre grubuna kök hücre denilmektedir (32,33). Telomeraz aktivitesi sayesinde tekrar tekrar bölünebilme ve hücrenin temel karakteristik özelliklerini taşıyan hücreler oluşturabilme (self renewal) özelliğine sahiptir. Hücreler arası sinyalizasyonla, birden fazla hücre grubuna farklılaşıp, dönüşebilmektedir (34).

2.2.1. Farklılaşma ve Bölünme Özelliklerine Göre Kök Hücreler

Kök hücreler, bölünme ve farklılaşma derecelerine göre; totipotent, pluripotent, multipotent, oligopotent ve unipotent olmak üzere beş başlık altında sınıflandırılmaktadır (35).

2.2.1.1. Totipotent kök hücreler: Sınırsız farklılaşma ve tüm olası hücre gruplarına dönüşebilme yeteneği olan kök hücrelerdir.

Totipotent kök hücreler; embriyo, embriyo sonrası tüm doku ve organlar ile embriyo-dışı membran ve organları oluşturabilen kök hücre grubu olarak bilinmektedir (36).

2.2.1.2. Pluripotent kök hücreler: Embriyonik kök hücreler ve embriyonik kök hücre farklılaşmasının başlangıç aşamalarında oluşan mezoderm, endoderm ve ektoderm germ tabakalarından oluşan kök hücrelerdir.

Hemen hemen tüm hücre tiplerine farklılaşabilmektedir (35,37).

2.2.1.3. Multipotent kök hücreler: Sınırlı farklılaşma yeteneğine sahip ve özelleşmiş hücre tipini üreten kök hücre grubudur.

Bulundukları dokunun erişkin (hematopoietik) kök hücre grubuna dönüşebilmektedirler. Örnek olarak; trombositler, kırmızı ve beyaz kan hücreleri bu gruptadır (38).

2.2.1.4. Oligopotent kök hücreler: Bulundukları doku içerisinde birkaç hücre grubuna farklılaşma özelliği olan kök hücrelerdir. Örnek olarak (yetişkin) lenfoid veya miyeloid kök hücreler bu grupta sayılabilir (35).

2.2.1.5. Unipotent kök hücreler: Sadece kendi türünde hücreler üretebilen bu hücreler, kendini yenileyebilme özelliği sayesinde unipotent kök hücre olarak adlandırılmaktadır. Yetişkin kas kök hücreleri unipotent kök hücrelerdir (35).

2.2.2. Kaynaklarına Göre Kök Hücre Tipleri

2.2.2.1. Embriyonik kök hücreler: Pluripotent kök hücre grubu olan embriyonik kök hücreler, kendi kendini kopyalayan ve birçok hücre tipine farklılaşabilen hücrelerdir. Uterusta, implantasyon meydana gelmeden önce gelişimsel aşamada olan embriyolardan elde edilir (39). İnsan embriyonik kök hücrelerinin üretildiği embriyolar tipik olarak dört veya beş günlük olan blastosist adı verilen embriyonun iç hücre kitlesinden elde edilir (40,41).

2.2.2.2. Uyarılmış pluripotent kök hücreler (iPS): Pluripotent kök hücre genlerinin (Oct3/4, Sox2, Klf4, vb.) aktarılmasıyla oluşan indüklenmiş pluripotent kök hücreler, ilk olarak 2006 yılında uygulanmıştır. Araştırmacılar, iPS uygulaması ile 2012 yılında Nobel ödülü almaya hak kazanmışlardır. Embriyonik kök hücre kullanımındaki etik sorunlar ve blastokist kullanımını gerektirmeyen bu yöntem gelecek araştırmalar için umut vaat etmektedir ve önemli bir gelişme olarak kabul edilmektedir (42).

2.2.2.3. Yetişkin kök hücreler: Yetişkin kök hücreler (embriyonik olmayan kök hücre), embriyonik gelişimden sonra vücutta bulunan, ölmekte olan hücreleri yenilemek ve hasarlı dokuları tamir etmek için hücre bölünmesiyle çoğalan, farklılaşmamış totipotent veya multipotent hücrelerdir. Yetişkin kök hücrelerin canlı organizmadaki birincil rolleri, bulundukları dokuyu korumak ve onarmaktır. Blastosisten köken alan embriyonik kök hücrelerin aksine, bazı olgun dokulardaki yetişkin kök hücrelerin kökeni hala araştırılmaktadır (43).

Kendilerini yenileyebilme ve farklılaşabilme yeteneklerine sahip embriyonik olmayan kök hücreler, yerleşim ve farklılaşma özelliklerine göre alt gruplara (hematopoetik kök hücreler ve mezenkimal kök hücreler) ayrılmaktadır.

2.2.2.3.1. Hematopoetik kök hücreler: Bütün kan hücrelerine farklılaşabilme özelliği olan hematopoetik kök hücreler (HKH), yetişkin kök hücre grubunda yer almaktadır. Embriyonik dönemde oluşan hematopoetik kök hücreler doğumdan sonra kemik iliğine yerleşmektedir. Çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılan hematopoetik kök hücrelerin transplantasyonu için sıklıkla kemik iliği, periferik kan tercih edilirken kordon kanı da üçüncü bir seçenek olarak kullanılmaktadır (44).

2.2.2.3.2. Mezenkimal kök hücreler (MKH): Kemik iliğinin stromal bölmesinde bulunan mezenkimal kök hücreler (MKH'ler), ilk olarak, sıçan kemik iliğinde progenitör hücrelerden izole eden Friedenstein ve Petrakova'nın (1966) öncü çalışmalarında tanımlanmıştır (45).

Kemik, yağ, kıkırdak ve kas dahil olmak üzere bağ dokusu hücrelerinde farklı dokulara farklılaşma kapasitesi göstermektedir. Ayrıca kemik iliğinde hematopoietik kök hücreler için stromal desteğin sağlanmasında rol oynamaktadır. Mezenkimal kök hücreler, kemik iliğindeki çekirdekli hücre popülasyonunun %0,001–0,01'i gibi çok küçük bir bölümünü temsil etmekte olup yüksek verimlilik ve kültür ortamında değişik hücre gruplarına farklılaşma kapasitesine sahiptir. Bu sebeple mezenkimal hücreler, rejeneratif tıp ve doku mühendisliği alanında kullanımlarıyla büyük ilgi görmektedir (46). Multipotent mezenkimal stromal kök hücreler (MKH) tıp alanındaki terapötik potansiyelleri ve çeşitli rejeneratif prosedürlerdeki başarıları nedeni ile her geçen gün ilgi görmektedirler. Bu alanda kaydedilen aşamalar ile birlikte çalışma sonuçlarını karşılaştırmak ve standardizasyonu sağlamak amacıyla Uluslararası Hücresel Tedavi Derneği (ISTC), MKH'leri tanımlamak için minimal kriterler önermiştir. Bunlar;

- 1) Standart kültür koşullarında muhafaza edildiğinde, MKH'ler plastik yüzeye yapışabilmeli
- 2) CD105, CD73 ve CD90 gibi spesifik yüzey antijen ekspresyonu sağlayabilmeli
- 3) İn vitro ortamda osteoblast, adiposit ve kondroblastlara farklılaşabilmelidir (47).

Tablo 2. 1: ISCT'ye göre MKH yüzey antijenleri (47)

Pozitif yüzey antijenleri (> %95)	Negatif yüzey antijenleri (<%2)
CD90, CD73, CD105, CD29, CD146	CD34, CD14, CD45, CD19, CD28

MKH'lerin pozitif ve negatif yüzey antijen belirteçleri flow sitometri veya boyama analizleri (çift boyama, üçlü boyama) ile belirlenebilmektedir. Ayrıca mezenkimal kök hücrelerin farklılaşmasını tespit etme yöntemleri arasında; Alizarin Red, Von Kossa, Oil Red ve Alkalın Fosfataz gibi boyalar yer almaktadır (46).

2.2.3. Dental epitelyal kök hücreler

Diş gelişimi, ektodermal ve ekto-mezenkimal (nöral krest) germ tabakaları arasındaki etkileşimlere dayanmaktadır. Diş gelişiminin ektodermden başladığı kabul edilmektedir. Ektoderm tabakası tarafından salgılanan iki önemli büyüme faktörü, BMP-4 (Kemik Morfogenetik Proteini-4) ve FGF-8 (Fibroblast Büyüme Faktörü-8), diş gelişiminin başlaması için çok önemlidir (48). Fibroblast büyüme faktörlerinden FGF-10 (Fibroblast Büyüme Faktörü-10), dental epitelyal kök hücrelerin ameloblastlara ve stratum intermedium hücrelerine farklılaşmasında aktif rol alırken aynı zamanda farklılaşmanın indüklenmemesi için sinyalizasyon mekanizmasında görev almaktadır. Farklılaşma kapasitesi yüksek olan dental epitelyal kök hücreler, diş sürmesinden sonra kaybolur ve diş gelişimi ile ilgili çalışmalar için kullanılmamaktadır (49,50).

2.2.4. Dental dokulardan elde edilen mezenkimal kökenli kök hücreler

Dental dokulardan izole edilen dental pulpa kök hücreler (DPSCs), ekfoliyel süt dişlerindeki kök hücreler (SHEDs), periodontal ligament kök hücreleri (PDLSCs), dental folikül kök hücreler (DFSCs) ve dental apikal papilla kökenli kök hücreler (SCAPs) mezenkimal kökenli kök hücreler bu gruba dahildir (51). Son dönemde yapılan çalışmalarda yenidoğan natal dişlerinden izole edilen insan natal diş pulpasının (hNDP) karakterizasyonu yapılmış ve hNDP-SC'ler insan kemik iliğinden izole edilen MKH'lerin özellikleri ile karşılaştırılmıştır. Yenidoğan natal diş her 2000 ila 3000 canlı doğumda bir görülmektedir ve denk gelme olasılığı nadirdir, bu da yapılan çalışmaları sınırlandırmaktadır (52).

2.2.4.1. Dental pulpa kök hücreleri (DPSCs): İlk kez 2000 yılında Gronthos ve arkadaşları tarafından izolasyonu yapılan dental pulpa kök hücreleri, doku mühendisliği çalışmalarında çok önemli kaynak olarak kabul edilebilmektedir (53).

İlk olarak gömülü üçüncü molar dişlerden izole edilen dental pulpa kök hücrelerinin, mikro çevresel koşullar altında yüksek çoğalma ve farklılaşma potansiyelleri olduğu belirlenmiştir. Uygun koşullar sağlandığında DPSC'ler, odontoblast, osteoblast, kondrosit, miyosit, nörosit, adiposit, kornea epitel hücreleri ve iPS hücrelerine farklılaşabildiği bilinmektedir (54,55). Yapılan bir çalışmada, taşıyıcı solüsyon olarak hidroksiapatit-trikalsiyum fosfat kullanılan ve laboratuvar ortamında iki yıl bekletilen DPSC'lerin, sıçanlarda kabul edilebilir seviyelerde kemik oluşumunu indüklediği görülmüştür. Dolayısıyla bu hücrelerin, uygun izolasyon koşullarıyla dondurulup saklanması ile gelecek çalışmalar için kullanımının mümkün olacağı bilinmektedir (56). 2009 yılında d'Aquino ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, dental pulpa kök hücreleri ilk kez klinik ortamda uygulanmıştır. Kortikal alveolar laminada gömülü halde bulunan, ikinci büyük azı dişlerin distalinde kemik defektine ve alveolar krette bilateral kemik rezorpsiyonuna neden olan üçüncü büyük azı dişlerinden DPSCs izole edilmiş ve 17 gönüllü hasta bu çalışmaya katılmıştır. İzole edilen dental pulpa kök hücreleri, kolajen bir iskelenin üzerine ekilip daha sonrasında rezorpsiyon ve defekt alanına yerleştirilmişlerdir. 3 ay sonra yapılan klinik ve radyografik muayenede defekt ve rezorpsiyon alanında tam iyileşme sağlandığı ve rejenerasyonun tamamlandığı gözlenmiş DPSC'lerin kemik dokusuna farklılaşabildiği bildirilmiştir (57). Yapılan in vitro çalışmalara göre DPSC'lerin farklılaşma potansiyelinin, güncel olarak standart kabul edilen kemik iliği kök hücrelerine kıyasla daha iyi olduğu bildirilmiştir (58). Dental pulpa kök hücrelerinin, yalnızca diş hekimliği ve maksillofasiyal cerrahide değil aynı zamanda rejeneratif tıbbın farklı alanlarında da kök hücre bazlı rejeneratif ve onarıcı tedaviler için umut verici bir kaynak olduğu bildirilmektedir. DPSC'lerin miyokard enfarktüsü, sinir dokusu rejenerasyonu, kas distrofisi, serebral iskemi ve kornea rejenerasyonu gibi tedavilerde de kullanıldığı bilinmektedir (59,60).

2.2.4.2. Dental folikül kök hücreleri (DFPCs): Gelişmekte olan dişleri çevreleyen ve gevşek bir bağ dokusu yapısında olan dental folikül, osteogenezis ve osteoklastogenezisi düzenleyerek erüpsiyonda önemli bir rol oynamaktadır. Sement, kemik ve periodontal bağ dokularının dental folikülden oluşması folikülde bulunan kök hücreler hakkında fikir vermektedir. Periodontal dokunun öncülü olan dental folikül kök hücrelerinin, periodontal rejenerasyon için iyi bir kaynak olabileceği düşünülmektedir (61). Dental folikül kök hücrelerinin kemik iliği kök hücrelerine göre daha yüksek proliferasyon hızına ve osteojenik farklılaşma potansiyeline sahip olduğu bildirilmiştir (62).

2.2.4.3. Apikal papilla kök hücreleri (SCAPs): Kökleri tam oluşmamış immatür dişlerde apikal papilla bulunmakta ve pulpaya gevşek bir bağ dokusu ile bağlanmaktadır. Apikal papilla kök hücreleri (SCAP) ilk olarak 2006 yılında izole edilmiş ve doku mühendisliği alanında yapay diş kökü oluşturmak amacıyla kullanılmıştır (63).

Apikal papilla ile pulpa arasında kalan bölgede hücre yönünden zengin bir alan bulunmaktadır. Sonoyama ve ark. bu alanda hem DPSC hem de SCAP hücrelerinin bulunduğunu ve farklı özellikler taşıdığını belirtmişlerdir. Aynı zamanda apikal papilla kök hücrelerinin diğer dental pulpa kök hücrelerine göre daha başarılı proliferasyon özelliği göstererek hücre bazlı rejenerasyon için uygun bir kaynak olabileceği bildirilmiştir (64).

2.2.4.4. Periodontal ligament kök hücreleri (PDLSCs): Periodontal bağ dokusunda osteoblastlara ve sementoblastlara farklılaşabilen progenitör hücreler bulunmaktadır. Bu hücrelerin de kök hücre özelliği taşıdığı, 2004 yılında Seo ve arkadaşları tarafından rapor edilmiştir. Aynı zamanda PDLSC'lerin sementoblast benzeri yapılara, adipositlere, kollajen üreten hücelere farklılaşabileceği bildirilmiştir (65). Periodontal ligament kök hücrelerinin doku mühendisliği için potansiyel bir aday olabileceği, özellikle periodontal defektlerin onarımı ve kök gelişiminde etkili rol oynayabileceği savunulmaktadır (66).

2.2.4.5. Eksfoliye olmuş süt dişlerinden elde edilen kök hücreler (SHEDs): Çekilmiş süt dişi pulpalarından elde edilen kök hücrelerin, DPSC'lerden farklı özelliklere sahip olduğu görülmüş ve bu nedenle SHED olarak adlandırılmıştır (67). Bu hücreler BMSC, PDLSC ve DPSC ile karşılaştırıldığında, daha iyi replikasyon ve proliferasyon

özellikleri göstermiştir (68,69). Daha iyi replikasyon ve proliferasyon gösteren ve aktif telomerez aktivitesi bulunan SHED'ler, DPSC'lere göre daha az sayıda matür (olgun) hücreye sahiptirler (70).

2.3. DERİN DENTİN ÇÜRÜKLÜ DİŞLERDE DENTİN-PULPA KOMPLEKSİ VE KLİNİK PROSEDÜRLER

Akut ve hızlı ilerleyen çürüklerde pulpada inflamatuvar reaksiyonlar başlamadan önce odontoblast hücreleri içinde dejeneratif değişiklikler meydana gelmektedir. Bu durum hücre ölümüne daha sonra alttaki hücreden zengin tabakada odontoprojenitör hücrelerin yer değiştirmesine ve mezenkimal kök hücrelerin odontoblast benzeri hücrelere farklılaşmasına neden olmaktadır. Akut ve hızlı ilerleyen çürüklerde düzensiz tübül yapısı gözlenirken daha yavaş ilerleyen kronik çürüklerde düzenli tübüllerin olduğu ve tamir dentini üretiminin gerçekleştiği görülmektedir (71).

Derin dentin çürük lezyonlarında çürüğün ilerleme hızı ile pulpa-dentin kompleksinin savunma mekanizması hızı arasında bir denge bulunmaktadır. Dentin-pulpa kompleksinin savunma mekanizması için pulpa dokusunun sağlıklı olması önemlidir. Çürüğün kontrolsüz ve hızlı ilerlemesi sonucu pulpada inflamasyona doğru dengenin bozulduğu bir durum ortaya çıkmaktadır (72).

2.3.1. İndirekt Pulpa Kuafajı

Derin dentin çürüğü görülen dişlerde, kavite preparasyonu yapılırken pulpanın ekspozite olmadığı, çürük lezyonunun tamamen uzaklaştırılmadığı veya uzaklaştırıldığı durumlarda indirekt pulpa kuafajı tedavisi protokolleri uygulanmaktadır (73,74).

Tek aşamalı seçici çürük dokusu uzaklaştırma protokolü; kavitenin sadece pulpaya yakın tabanında sert veya yumuşak dentin bırakıldıktan sonra bir biyomateryel ile dentin yüzeyinin örtülmesini içermektedir. Aynı seansta kalıcı restorasyonla işlem tamamlanmaktadır (75,76). İki aşamalı, kademeli çürük dokusu uzaklaştırma protokolünde ise seçici çürük dokusu temizlendikten sonra biyomateryal uygulanmakta ve geçici bir restorasyon ile seans bitirilmektedir. 6-12 ay sonra geçici restoratif materyalin uzaklaştırılması ve çürük dokunun tamamen uzaklaştırılmasıyla daimî restorasyon yapılmaktadır. Her iki yöntemde de NaOCl ve %2'lik klorheksidin diğlkonat solüsyonu ile kavite dezenfeksiyonu, izolasyon kontrolü için rubber dam kullanımı tavsiye edilmektedir (75,76).

2.3.2. Direkt Pulpa Kuafajı

Direkt pulpa kuafaj tedavisi; çürük, travma, diş preparasyonu veya çürük dokunun uzaklaştırılması sırasında pulpanın ekspozite olduğu ve pulpanın asemptomatik bulgular gösterdiği durumlarda uygulanan vital pulpa tedavi seçeneğidir. Pulpanın ekspozite yüzeyine bir biyomateryalin uygulanması ve ardından daimî bir restorasyonun hemen yapılmasını içermektedir. Direkt pulpa kuafaj tedavi uygulaması için sağlıklı bir pulpa dokusu, iyi bir izolasyon, steril bir ortam, kavite dezenfeksiyonu ve tercihen kalsiyum silikat bazlı biyomateryal uygulamasını içeren gelişmiş bir protokol kullanılmalıdır (77).

İndirekt ve direk kuafaj tedavisinde pulpa dokusu çıkarılmazken parsiyel pulpotomide etkilenmiş pulpa dokusunun 2-3 mm'lik bölümü çıkarılmaktadır. Bu teknik ile çürük dokusu ile enfekte olan yüzeyel pulpa dokusu elimine edilmektedir. Pulpa kaplama prosedürleri pulpa dokusunu korumaktadır ancak yüzeyel inflamasyon sürecini tersine çevirememektedir. Bu nedenle parsiyel pulpotomi prosedüründe 2-3 mm'lik dokunun çıkarılması önerilmektedir. Asemptomik veya inflamasyonlu pulpa dokusunun ayrılmasında ve uygun tedavi protokolünün uygulanmasında sorunlar çıkabilmektedir. Pulpanın dokusunun inflamasyon durumunu dolaylı olarak gösteren bir belirteç olan hemostaz ve kanama kontrolü, uygun protokolün seçilmesinde yardımcı olmaktadır (78).

2.4. PULPA KUAFAJ TEDAVİSİNDE KULLANILAN DENTAL MATERYALLER

2.4.1. Kalsiyum Hidroksit

Kalsiyum hidroksit, diş hekimliği klinik uygulamalarında yüzyılı aşkın süredir kullanılmaktadır. İlk olarak 1920'de Herman tarafından, diş hekimliğinde pulpa kuafaj materyali olarak tanıtılmış olup günümüzde pulpa tedavilerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Kalsiyum hidroksit, moleküler ağırlığı 7.08 u olan beyaz, kokusuz bir tozudur. Kalsiyum hidroksit tozu, sıvı bir çözücü ile veya metil selüloz ile süspanse edilip pat kıvamına getirilip kullanılabilir. Katalizör ile kalsiyum hidroksit, oda sıcaklığında reaksiyona girmekte ve dakikalar içinde sert ve amorf yapıda bir bileşik oluşturmaktadır (79). Kimyasal olarak su içerikli sıvılarla temas edince güçlü bir bazik özellik göstermektedir. PH'ı yaklaşık olarak 12,5-12,8 arasındadır ve dokuya temas ettiğinde kalsiyum ve hidroksil iyonlarına ayrışmaktadır (80). Ca (OH)_2 , antimikrobiyal

aktivitesini sıvı bir ortamda hidroksil iyonlarının salınımı ile gerçekleştirmektedir. Hidroksil iyonları, biyomoleküller ile reaksiyona giren, oldukça oksidan özellikte olan reaktif serbest bir radikallerdir ve bakteriler üzerinde etkilerini serbest radikaller üreterek gösterir. Bu olay bakteriyel sitoplazmik membranlarda hasar, protein denatürasyonu ve DNA’da hasar gibi muhtemel sonuçlar meydana getirmektedir (81).

Kalsiyum hidroksit ekspozite pulpa yüzeyine uygulandığında yüksek alkali özelliği ve ortama salınan hidroksil iyonları nedeniyle üç tabaka halinde yüzeysel bir nekroz alanı oluşturmaktadır. Bu salınan iyonlar ile kontrollü bir kimyasal hasar meydana gelmektedir. Nekroz bölgesinde meydana gelen irritasyon ve sonrasında devam eden pulpa stimülasyonu ile tamir oluşumu başlamaktadır. Dokuda meydana gelen hasar sonrasında vasküler ve inflamatuvar hücre göçü ve proliferasyonu meydana gelmektedir. Onarım sürecinde, mezenkimal ve endotelial pulpa hücrelerinin göçü aynı zamanda proliferasyonunu takiben kollajen oluşumu izlenmektedir. Pulpa hücreleri, nekroz alanında odontoblastlara farklılaşmakta ve dentin benzeri doku oluşumu gözlenmektedir. Nekroz bölgesinde kollajen mineralizasyonu, komşu dokudaki dejenerasyon olmuş hücrelerin distrofik kalsifikasyonu ile başlamaktadır. Kalsiyum iyonlarının varlığı, yara bölgesinde kalsiyum karbonatın çökmesini uyarır ve böylece mineralizasyonun başlamasına katkıda bulunmaktadır (82).

2.4.2. Çinko Oksit Ojenol

Çinko oksit ojenol, ojenolat kristal matriksi arasına gömülmüş şekilde bulunmaktadır. Bununla birlikte fiziksel ve kimyasal bir dizi reaksiyon sonucu çinko oksit ojenol kristalleri oluşturmaktadır. Sertleşme reaksiyonu sonucunda kalsiyum ojenolat ve protein kompleksi oluşturmaktadır. Antienflamatuvar etkisi sayesinde siklooksijenaz ve lipooksijenaz reaksiyonları sonucu oluşan reaksiyon ürünlerinin biyosentezini engellemektedir. Çinko oksit ojenol, pulpada anestetik (sedatif) etki göstererek nöronal aktiviteyi inhibe edici rol oynamaktadır. Aynı zamanda vazodilatasyon sağlayarak toksik iritanların birikimini önler ve bunların kısa sürede uzaklaştırılmasına yardımcı olur. Çinko oksit ojenolün, vital pulpa tedavilerinden biri olan direkt pulpa kuafajında, ekspozite olmuş pulpa üzerinde kullanımı tartışmalıdır. Ancak indirekt pulpa kuafajında, derin dentin yüzeyine uygulanan çinko oksit ojenol simanın, bakterisit etki göstererek bakteri eliminasyonu sağladığı, toksik ürünlerin pulpaya difüzyonunu engelleyerek pulpal inflamasyon bulgularını sınırladığı ve mikrosızıntıyı önlediği belirtilmektedir (83).

2.4.3. Kalsiyum Silikat İçerikli Materyaller

2.4.3.1. Mineral trioksit agregat (MTA): 1993 yılında Dr. Mahmoud Torabinejad tarafından tanılan biyoaktif ve osteokondüktif bir materyal olan MTA endodontik tedavilerde kullanılmış ve diş materyalleri arasında bir paradigmaya yol açmıştır (84).

MTA pulpa ile temas ettiğinde biyoyoumlu bir özellik göstererek, dentin yapımını indüklemek için gerekli olan sinyal moleküllerinin salınımı uyarmaktadır. Ayrıca kök ucunda kullanıldığında sementoblastlar ve periodontal ligamanın yenilenmesini sağlayan bir biyomateryal olarak bildirilmiştir (85,86). MTA tozunun ana bileşenlerini, radyo-opak özelliğini veren trikalsiyum silikat (%52-53), dikalsiyum silikat (%23), trikalsiyum alüminat (%0-4), kalsiyum sülfat (%1.5) ve bizmut oksit (%20) oluşturmaktadır (87). Piyasaya sürülen ilk ürün olan demir oksit içeren ve gri renkli toz formunda bulunan ProRooT MTA, daha sonra 2002 yılında, yerini demir oksit çıkarılıp magnezyum oksit eklenerek piyasaya sunulan beyaz renkli ProRoot MTA'ya bırakmıştır (88). Hidrofilik bir biyomateryal olan MTA, sertleşme reaksiyonu için neme ihtiyaç duymaktadır (89). Toz ve suyun karışımı sonucu gerçekleşen kimyasal reaksiyonla hidrasyon tepkimesi meydana gelmektedir. Hidrasyonla amorf yapıda kalsiyum oksit kristallerinden oluşan kolloidal jel oluşmaktadır (90,91). MTA tozu ve likiti karıştırıldığında 10.2 olan pH değeri, 3 saat sonunda 12.5'e yükselmektedir (92).

MTA'nın uzun sertleşme süresi, renk değiştirme potansiyeli, zor klinik manipülasyonu ve bazı tedavilerin tamamlanması için birden fazla klinik ziyaret gerektirmesi dezavantajları arasında yer almaktadır. Bu sınırlandırmaları en aza indirmek ve klinik kullanımını arttırmak için 2001 yılında değiştirilen formülüyle MTA Angelus piyasaya sürülmüştür. MTA Angelus'ta sertleşme süresini kısaltmak için formülünden kalsiyum sülfat çıkarılmıştır (93). Hızlı sertleşen ve bu süreyi 43 dakikadan 6 dakikaya düşüren, parçacık boyutunun küçüldüğü nano-beyaz MTA (NW-MTA)'nın stronsiyum tuzları içerdiği ve bu sayede biyoaktivitesinin arttığı bildirilmiştir. Sodyum hipoklorit (NaOCl) ilavesinin sertleşme süresini (%30-60) azalttığı belirtilmiştir (94). Yine aynı amaçla sertleşme reaksiyon süresini kısaltmak için ışıkla sertleşen rezin modifiye MTA tanıtımı yapılmıştır. Formülüne 2-hidroksi etil metilakrilat (HEMA) ve trietilen glikol di-metakrilat (TEGDMA) ilave edilmiştir (95).

2.4.3.2. Biodentin: Biodentin (Septodont), ilk olarak 2009'da MTA'nın eksiklikleri ve dezavantajlarını gidermek amacıyla MTA teknolojisine dayanarak piyasaya sürülmüştür (96).

Biodentin; pulpa kuafajı, pulpotomi, endodontik perforasyon tamiri, kök rezorpsiyonu tedavisi, kök ucu rejenerasyonu olmak üzere geniş bir uygulama alanına sahiptir ve dentin replasman materyali olarak kabul edilmektedir. Sertleşme süresi, 12-13 dakika arasında olup bu sürenin MTA'dan önemli ölçüde az olduğu bildirilmektedir. Bu hızlı sertleşme reaksiyonu, artan partikül boyutu, sıvı bileşenine eklenen kalsiyum klorür (CaCl_2) ve sıvı içeriğinin azaltılmasına bağlanmaktadır (97). Aynı zamanda yapılan çalışmalar, hidrasyon reaksiyonu ile bağlantılı olan di-kalsiyum silikatın çıkarılmasının, kalsiyum silikat-hidrat (CSH) için bir çekirdeklenme merkezi olan kalsiyum karbonatın eklenmesinin kısa sertleşme süresine etki eden faktörler arasında yer aldığını bildirmişlerdir (98). Biodentin'in sertleşme reaksiyonu MTA'ya benzemekte olup CSH (kalsiyum silikat-hidrat) ve $\text{Ca}(\text{OH})_2$ oluşumu ile sonuçlanmaktadır. Biodentin ayrıca toz halinde kalsiyum karbonat içermektedir ve bu da karbonat fazının varlığını açıklamaktadır. Biodentin'in içindeki trikalsiyum silikat partikül boyutu daha küçüktür ve bileşimine hidrofilik polimerin eklenmesi manipülasyonu ve kullanımını daha kolay hale getirmektedir (98).

2.4.3.3. Endosequence: Endosequence BC (Brasseler ABD), yüksek oranda radyo-opak olan, boyutsal olarak kararlı, hidrofilik ve sertleşme reaksiyonu sonucu hidroksiapatit oluşturan başka bir biyoaktif materyaldir.

Sertleşme reaksiyonu için dentin tübüllerinde bulunan tübüler nemi kullanılmaktadır. MTA'ya göre kullanımı daha kolay olan bu materyal macun formunda şırınga içerisinde ve daha önceden karıştırılmış şekilde bulunmaktadır (99). Üretici firma, malzemenin alüminyum içermediğini, daha az çözünür olduğunu ve sertleşme reaksiyonu sırasında boyutsal olarak daha kararlı olduğunu bildirmektedir (100). Sertleşme süresi 2-4 saat arasında değişmektedir. Perforasyon tamiri, apikal cerrahi, apikal tıkaç ve pulpa kuafajı için uygun bir materyal olduğu bildirilmektedir. MTA ile karşılaştırılabilir güçlü biyolojik özelliklere sahip olduğu ve bu nedenle MTA'ya alternatif bir materyal olduğu belirtilmektedir (101).

2.4.3.4. Rezin modifiye kalsiyum silikat (TheraCal LC): TheraCal LC, direkt veya indirekt kuafaj tedavilerinde kullanılması önerilen ışıkla polimerize olan rezin modifiye kalsiyum silikat bazlı biyometaryel olarak tanıtılmıştır (102). TheraCal LC, portland çimentosu, polietilen dimetakrilat, polimerize edilebilir metakrilat monomerleri, baryum zirkonattan oluşmaktadır (103). Ayrıca kalsiyum silikat bazlı bu materyal, yüksek seviyede kalsiyum salınımı yapmaktadır. Salınan kalsiyum iyonları, pulpadaki odontoblastları indükleyerek proliferasyonu ve farklılaşmayı sağlamakta ve sert doku oluşumunu uyarmaktadır (3,104). Antibakteriyel etkinlikle ilgili olarak, TheraCal LC'nin, *S. mutans*'lara karşı kalsiyum hidroksit kadar etkili olduğu bulunmuştur. Ancak *S. sanguis* ve *S. salivarius* üzerinde daha düşük etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (105). Yapılan çalışmalarda, TheraCal LC'nin basınç dayanımı ve direncinin, MTA ve Biodentin'e kıyasla daha yüksek olduğu bulunmuştur (106). Yüksek radyo-opak özelliği sebebiyle daimî restorasyonun altında ince bir tabaka halinde uygulanması önerilmektedir (102).

2.4.3.5. Bioagregat: Nano partikül boyutunda trikalsiyum silikat, tantal pentaoksit, kalsiyum fosfat ve silikon dioksitten oluşmaktadır.

Biyoseramik içerikli bu biyomateryal, ana bileşen fazını trikalsiyum silikat oluşturmakta olup formülasyonunda alüminyum içermediği bildirilmiştir. MTA'dan farklı olarak radyoopak özelliğini bizmut oksit yerine tantal pentaoksit ile göstermektedir. Toz/likit oranı 1/0.38 g/ml olacak şekilde 2-5 dakika karıştırılan Bioagregat'ın sertleşme reaksiyonu yaklaşık olarak 4 saat sürmekte ve daimî restorasyonun sonrasında yapılması gerekmektedir. Aynı seans daimî restorasyonun yapılamaması Bioagregat'ın dezavantajları arasında yer almaktadır. Hidratlı kalsiyum silikat (HCS) jelden oluşan nano-kompozit bir ağ sayesinde bu materyalin sızdırmazlık potansiyelinin çok yüksek olduğu bildirilmiştir(107). Bioagregat'ın, insan fibroblast hücreleriyle biyouyumlu olduğu ve osteoblastlarda osteoblastik farklılaşmayı uyardığı rapor edilmiştir (108). Biyouyumluluk ve sızdırmazlık kapasitesi açısından MTA'ya benzemektedir. Ancak sert doku bariyeri oluşturma potansiyelinin daha yüksek olduğu vurgulanmıştır. Kök perforasyonu onarımı, kök rezorpsiyonu onarımı, kök ucu dolgusu, apeksifikasyon ve pulpa kuafajı endikasyonları arasında yer almaktadır (109).

2.4.4. Kalsiyumla Zenginleştirilmiş Karışım (CEM)

Kalsiyumla zenginleştirilmiş karışım (CEM), 2006 yılında endodontik dolgu malzemesi olarak diş hekimliği alanına girmiştir. Film kalınlığı (materyalin belirli bir yük altında gösterebileceği minimal kalınlık), materyalin akışkanlığı ve sertleşme süresi uygun fiziksel özelliklere sahiptir. Ayrıca nem varlığında MTA'ya göre daha kısa sürede sertleşme reaksiyonu gösterdiği bildirilmiştir (99,110). CEM'in klinik uygulamaları, MTA ve Biodentin'e benzer olmakla birlikte pulpa kuafajı, pulpotomi, rezorpsiyon ve onarım materyali olarak kullanıldığı ve güzel sonuçlar verdiği bildirilmiştir (111,112). CEM tozu, su bazlı çözelti ile karıştırıldığında, hidrasyon reaksiyonu gerçekleşmekte ve biyoaktif kalsiyum ve fosfatla zenginleştirilmiş ürünler açığa çıkmaktadır. Ayrıca hidroksiapatit oluşumuyla ortama kalsiyum ve fosfor iyonları salınmaktadır (113). CEM'in; klinik uygulamalarda manipülasyonu, sertleşme süresi, antibakteriyel ve antifungal özellikleri, biyouyumluluğu, renklenme yapmaması ve sızdırmazlık gibi avantajları olduğu bildirilmektedir (114).

2.5. SİTOTOKSİSİTE VE BİYOUYUMLULUK

Biyouyumluluk (doku uyumluluğu), bir materyalin uygun hedef dokuya yerleştirildiğinde, dokunun verdiği reaksiyon ve fonksiyon yeteneği olarak tanımlanmaktadır. Biyouyumlu bir materyal, sistemik ve lokal toksisite, alerjik, mutajenik ve karsinojenik etki gibi değerlendirme skalalarında başarılı sonuçlar kaydetmelidir. Malzemelerin biyolojik uyumlarını test ederken ortak yaklaşım ve ilke, hücre kültürlerine dayanan basit in vitro sitotoksisite testleri ile başlamaktadır. Bir malzemenin biyouyumluluğu ve karakterizasyonu ile ilişkin bilgiler veren bu deneyler ve araştırmalarda umut verici bulgular rapor edilirse, deney hayvanları üzerinde daha kapsamlı çalışmalar yapılabilir. Klinik çalışmalar ise bu değerlendirme sürecinin son adımı olmaktadır (115).

2.5.1. İn Vitro Sitotoksisite ve Biyouyumluluk Testleri

Üreticiler tarafından materyallerin biyouyumluluğuna ilişkin birçok hipotez, hücre kültürü çalışmalarından elde edilen verilere dayanmaktadır. Hayvan veya insan dokularından izole edilen hücreler, hücre kültür kaplarında büyütülmekte ve daha sonra bu testler için kullanılmaktadır (116).

Biyouyumluluğun değerlendirilmesi için yapılan in vitro sitotoksite testlerinin amacı, dental materyallerin vücut dokuları ile temas ettiğinde veya doku içerisine yerleştirildiğinde gerçekleşebilecek biyolojik reaksiyonları simüle etmektir. Yeni geliştirilen materyalleri araştırmak için in vitro hücre kültürü çalışmaları, hayvan ve klinik çalışmaları öncesi başarı şansını azaltacak seçeneklerin eliminasyonu sağlamak ve güvenilir sonuçlar elde etmek için ilk adımı oluşturmaktadır. Materyallerin in vitro laboratuvar testlerinin yapılmadan hayvan testlerine geçilmesi çok zaman alıcı ve pahalı bir yöntem olduğu bilinmektedir (117). Canlı dokulardan alınan örneklerin; uygun besi yerlerinde üretilerek, canlılıklarını ve üreme fonksiyonlarını devam ettirmelerini sağlayan in vitro yöntem hücre kültürü denilmektedir. Hücre bileşenleri, uygun sıcaklık değeri olan 36° C’de %5 CO₂ ve %95 nem içeren koşullarda inkübe edilip hücre kültür flaskların içerisinde üretilmektedir (118,119).

Günümüzde hazır hücre grupları kullanılmaya başlanmış olup, bu hücrelerin kolayca çoğaltılabilmesi, karakterizasyonunun bilinmesi ve nispeten tutarlı olması bu grubun avantajları arasında yer almaktadır (115). Sıklıkla tercih edilen hazır hücre gruplarında; fare fibroblastları (L-929, 3T3), insan epitel hücreleri (HeLa) yer almaktadır. Periodontal veya dental pulpa fibroblastları gibi hedef dokularından alınan biyopsiler doğrudan izole edilip, büyütülüp, kültüre edilen diğer hücre gruplarındandır. Bu hücre gruplarına primer kültür denilmektedir ve alınan doku örneklerinin fizyolojik özelliklerini en iyi yansıtan hücre kültürleridir (120). Son zamanlarda, birincil hücreler, orijinal dokunun özelliklerini (gen ekspresyon paterni) korumak ve kültürde uzun (teorik olarak sınırsız) bir süre tutabilmek için belirli virüs partikülleri (onkogenler) ile transfeksiyon yoluyla dondurulup saklanmaktadır (121,122). Hücrelerin in vitro olarak üç boyutlu olarak büyütülebilmesi sayesinde in vivo çalışmalar öncesi daha iyi sonuçlar elde edilebilmektedir (123).

İn vitro sitotoksite test yöntemleri dört başlık altında incelenip biyouyumluluk değerlendirmeleri yapılabilir. Bu test yöntemleri şunlardır;

1. Canlılık değerlendirme testleri
2. Yaşam değerlendirme testleri
3. Hücre proliferasyonunu değerlendiren testler
4. Metabolik sitotoksite değerlendirme testleri (118)

2.5.1.1. Canlılık değerlendirme (kısa dönem toksisite) testleri: Hücre kültüründe canlılığı devam ettiren hücre oranının belirlenmesi amacıyla kolorimetrik veya floresans ölçüm yöntemlerinin uygulandığı testlerdir. Sub-lethal hücre değişikliklerinin ölçülemediği bu test yönteminde, membran bütünlüğünün bozulmadığı hücrelerde diasetil floresan veya nötral kırmızı boya kullanılırken membran bütünlüğünün bozulduğu hücrelerde tripan mavisi, eritrosin veya naftalin siyahı gibi boyalar kullanılmaktadır (124).

Membran bütünlüğünün bozulmadığı hücrelerde, optik mikroskop altında hemosimetrede ile canlı hücrelerin oranı tespit edilirken, vital bir boya olan nötral kırmızı boya testi kullanılmaktadır (125).

Membran bütünlüğü bozulmuş hücrelerde kullanılan tripan mavisi testi, non-vital bir boya olup optik mikroskop altında hemosimetrede tripan mavisi ile boyanmış hücrelerin işaretlenmesine yardımcı olur (13).

Membran bütünlüğü bozulmuş hücrelerin içerisine girebilen propidium iodide (PI) boyası, DNA ve RNA'yı etkilemektedir. Floresan boyalar içerisinde sınıflandırılan PI; flow sitometri, ışık kaynağı ve floresan mikroskobu ile ölçülebilmektedir. Bu ölçüm yöntemi ile floresan görüntü veren hücreler, canlılığı kaybetmiş ölü hücre olarak tanımlanmaktadır (125).

2.5.1.2. Yaşam değerlendirme (uzun dönem toksisite) testleri: İn vitro sitotoksisite değerlendirme testleri ile hızlı ve pratik sonuçlar ortaya çıkmaktadır.

Değerlendirme sonucunda sadece ölü hücrelerin sonucu kaydedilmektedir. Toksik etkilerin sonuçları birkaç saat, gün veya daha geç alınabilmektedir. Toksisite reaksiyonlarının uzun dönemdeki etkilerini inceleyebilmek için uzun dönem test değerlendirme yöntemlerine de başvurulur. Hücrelerin yaşam değerlendirme testleri, düşük hücre yoğunluğunda koloni oluşturma kabiliyetini ölçen test yöntemidir (124).

2.5.1.3. Hücre proliferasyonunu değerlendiren testler: Örneklem sayısının az olduğu durumlarda, 3H-timidin ve Bromodeoksiuridin immüno-histokimyasal tekniklerinin kullandığı değerlendirme testidir.

Örnek sayısının arttığı durumlarda verimlilik azalmakta olup hücre sayımında, büyüme eğrisi analizleri kullanılmaktadır (124,126).

Bir radyoizotop olan ^3H -timidin, hücre proliferasyonu sırasında hücre içine geçerek maddenin radyoaktivite ölçümü yapılabilmektedir. Proliferasyon mekanizmasını destekleyen yeni DNA sentezi ile proliferasyon değerleri ölçülür. DNA sentezini analiz etmek için kullanılan timidin testine eş değer bir diğer test, Bromodeoksiuridin immüno-histokimyasal tekniğidir. İşaretlenen antikorların kullanıldığı bu testte BrdU (5- bromo-2'-deoxyuridine), DNA içine girer, hücre ve dokularda antijenlerin gösterilmesini sağlar. Boyama ile sayım yapılabileceği gibi ELİSA (enzyme-linked immunosorbent assay) kiti de kullanılabilmektedir (126,127).

2.5.1.4. Metabolik sitotoksite değerlendirme testleri: Deney gruplarının ve örneklem sayısının fazla olduğu durumlarda yaşam değerlendirme (survival) testleri yetersiz kalmakta ve çok zaman almaktadır.

Yeni izole edilmiş, düşük yoğunluktaki hücrelerin koloni oluşturma yetenekleri zayıftır. Yüksek yoğunlukta koloni oluşturan hücrelerin hücre sayısındaki artış, enzimatik reaksiyonlar, protein ve DNA artışı metabolitik ve proliferasyon testleri ile belirlenir. Metabolitik aktiviteyi belirleyen testler, mikro plaka okuyuculu spektrometre yardımıyla hızlı sonuçlar verebilmektedir. Bu testler kullanılarak tetrazolyum tuzunun formazon kristaline indirgenmesi ile DNA artışı saptanabilmektedir. Bu gruba dahil olan test yöntemleri arasında; MTT, MTS, XTT, WST-1, LDH ve Alamar mavisi sayılabilir (124).

Canlı hücreleri tayin etmek için çeşitli tetrazolyum bileşikleri kullanılmıştır. En sık kullanılan bileşikler, MTT, MTS, XTT ve WST-1 iken bu bileşikler iki temel kategoriye ayrılmaktadır. İlk göze çarpan testlerin başında, pozitif yüklü olup, canlı ökaryotik hücrelere kolayca nüfuz eden ve en sık kullanılan test yöntemi MTT yer almaktadır. Negatif yüklü olan ve hücrelere kolayca nüfuz etmeyen MTS, XTT ve WST-1 testleri ise diğer gruplandırmada yer almaktadır. MTS, XTT ve WST-1 yöntemlerinde tipik olarak, tetrazolyumun renkli formazan ürününe indirgenmesini kolaylaştırmak için sitoplazmadan veya plazma zarından elektronları aktarabilen bir ara elektron alıcısı kullanılmaktadır (128).

MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür) tetrazolyum indirgeme testi, 96 kuyucuklu bir hücre kültür besiyeri için geliştirilen ilk homojen hücre canlılığı testidir (129). MTT tetrazolyum tuzu ile yapılan canlılık analiz testi, geniş çapta benimsenmiş ve akademik laboratuvarlarda popüler olarak kullanılmaya devam etmektedir. MTT testinde bulunan tetrazolyumun formazan ürünü, hücre membranı

evresinde ve kültür ortamında çökelti oluşturabildiği gibi hücre içinde de çözünmez bir çökelti olarak birirmektedir. Absorbans okumaları kaydedilmeden önce ise formazanın çözündürülmesi gerekmektedir. Formazan ürününü çözündürmek, rengi stabilize etmek, buharlaşmayı önlemek, fenol kırmızısı ve diğer kültür ortamı bileşenlerinin etkisini azaltmak için çeşitli yöntemler kullanılmıştır. Çözündürme yöntemleri içerisinde; asitleştirilmiş izopropanol, dimetil sülfoksit (DMSO), dimetilformamid (DMF) ve organik solvent kombinasyonları yer almaktadır. Çözücü olarak genellikle tercih edilen DMSO'nun hücreler üzerine olan toksik etkisinin test güvenilirliğini azalttığı bildirilmektedir (128). Diğer canlılık test analizlerinden MTS ise MTT' den daha hassas ve verimli sonuçlar sunabilmektedir (130).

Hücre kültürü ortamında doğrudan çözünebilir formazan ürünlerini üretmek için yakın zamanda geliştirilen tetrazolyum reaktifleri, canlı hücreler tarafından indirgenebilir. Bu kategoride yer alan tetrazolyum bileşikleri arasında MTS, XTT ve WST kitleri bulunmaktadır (131). Geliştirilmiş tetrazolyum reaktiflerinde formazan çökeltilerini çözmek amacıyla hücre kültür kuyucuklarına eklenmesi gereken ikinci bir reaktife gerek kalmamaktadır. Bu durum prosedürü daha hızlı ve kolay hale getirmektedir. Bu tetrazolyum reaktif seti, tetrazolyumu, sitoplazmada çözünebilir formazan ürününe dönüştürmektedir. Hücre membranında indirgenip membrandan geçebilen fenazin metil sülfat (PMS) veya fenazin etil sülfat (PES) gibi ara elektron alıcıları reaktiflerle kombinasyon halinde kullanılmaktadır (132).

Tablo 2. 2: MTT ile MTS testi arasındaki farklar (128)

	MTT	MTS
Deney aşamaları	Hücre metabolik aktivitesini değerlendirmek için kullanılan 2 aşamalı kolorimetrik test	MTT analizindeki gerekli ara basamaklar kullanılmadan reaktifin doğrudan hücre kültürüne eklenmesini kolaylaştıran, tek aşamalı MTT testi
Boya türü	3- (4, 5-dimetiltiazol-2-il) -2, 5-difeniltetrazolyum bromür	3- (4, 5-dimetiltiazol-2-il) -5
Formazan ürününün çözünürlüğü	Formazan ürünü çözünmez	Formazan ürünü çözünür
Absorbans ölçümü	570 nm	490 nm
Zaman	Daha yavaş	Daha hızlı
Test hassasiyeti	Hücrede çökelmiş proteinler absorbans değerini yansıtabilir. Duyarlılığı daha azdır.	Kültür ortamında formazan ürününün oluşumu nedeniyle daha hassas
Maliyet	Daha ucuz	Daha pahalı

2.5.2. Apoptoz Tayini

Apoptoz fizyolojik hücre ölümü olarak bilinen, dokularda hücre büyüme ve gelişiminden yaşlanma sürecine kadar devam eden fizyolojik bir olaydır. Apoptotik hücreler, organizmanın bazı doku ve organlarında ömür boyu devam eden apoptoz (yıkım) ve mitoz (yapım) dengesinde dinamik bir süreç oluşturur (133).

Apoptoz mekanizmasının başlaması için sinyal alan bir hücrede, birçok biyokimyasal ve morfolojik değişim süreci başlamaktadır. Hücrelerde küçülme, bozunma ve sitoplazmada çekilme meydana gelmektedir. Kromatin ve çekirdekte bulunan yapısal

proteinlerin parçalanması sonucu çekirdekte kondensasyon başlar. Çekirdek zarı yer yer erir ve DNA parçalanması gerçekleşir. Fosfolipidlerin molekülleri normalde hücre membranının iç yüzeyinde bulunurken aminofosfolipid transferaz enzimiyle membranın dış yüzeyine geçer. Apoptoz sürecinin sonlarına doğru parçalanmış membranlar ve organeller ile birlikte hücre içi apoptotik cisimcikler gözlenmeye başlamaktadır (134).

Diğer bir hücre ölüm şekli ise nekroz olarak adlandırılmaktadır. Hipoksi, hipertermi, fiziksel hasar veya UV gibi zararlı uyaranlar sonucu oluşan olağan dışı bir sonuçtur. Hücre plazma membranında lipidlerin peroksidasyonu sonucu hücre içeriği dağılır ve plazmaya geçer, bunun sonunda dokuda inflamatuvar yanıt oluşur ve çevre hücreler de bu durumdan etkilenir (135).

Tablo 2. 3: Apoptoz ve nekroz arasındaki farklar (135)

Özellik	Nekroz	Apoptoz
Etkilenen hücreler	Hücresinin kendisi ve komşu hücreleri de etkiler	Hücreler tek tek etkilenir
Sebebi	Patolojik	Fizyolojik veya Patolojik
Mekanizma	Kimyasal veya fiziksel parçalanma	Aktif hücresel yıkım
Mikroskop	Hücrede şişme, kromatinde erime veya kayıp	Apoptotik cisimler, hücre büzülmesi

Tablo 2. 4: Apoptozun tayin edilmesinde kullanılan yöntemler (134)

Morfolojik Görüntüleme Yöntemleri	İmmüno-Histokimyasal Yöntemler	Biyokimyasal Yöntemler	İmmunolojik Yöntem
Işık Mikroskobu 1) Hematoksilen-eozin boyama 2) Giemsa boyama	Anneksin V yöntemi	Agaroz Jel Elektroforezi	ELİSA (Enzyme linked immunosorbent assay)
Floresan Mikroskobu	TUNEL yöntemi	Westen Blotting	
Faz Kontrast Mikroskobu	M30 yöntemi	Flow Sitometri	
Elektron Mikroskobu	Kaspaz-3 yöntemi		

2.5.2.1. Flow sitometri- Anneksin V/FITC- Propidyum iyodür (PI): Hücre zarının sitoplazmik iç yüzeyinde bulunan membran lipidi fosfatidilserin (PS), hücre apoptoz sürecine girdiğinde aminofosfolipid transferaz enzimiyle hücre zarının dış yüzeyine yerleşir. Bu enzimatik aktivite, membran bütünlüğünün bozulmadığı, apoptoz sürecinin erken safhalarında gerçekleşmektedir. Anneksin V, aminofosfolid tranferaz enzimiyle transloke olan ve hücre zarının dış yüzeyine yerleşen fosfatidilserin (PS)'e bağlanan bir proteindir. Annexin V'in, FITC (floresan izotiyosiyanat) gibi floresan bir madde ile işaretlenmesiyle, apoptotik süreç flow sitometri ile ölçülebilmektedir (136).

Lazer kaynaklı florometre ile ışık yayılım analizi yapan flow sitometrede, farklı molekül ve hücreler, düşük ve dik açılı ışık yayılımı yapılarak ayırt edilebilmektedir. Hücre kültür çalışmalarında flow sitometri kullanımı kolay uygulanabilmesi, zamandan tasarruf edilmesi, kantitatif sonuçlar vermesi ve apoptoz sürecinin tayin edilmesinde kullanışlı bir yöntem olması nedeni ile tercih sebebidir. Flow sitometride apoptoz analizi,

floresan bir boya olan propidyum iyodür (PI) ve Anneksin V/FITC boyası kullanılarak yapılmaktadır (134).

Nekrotik ve apoptotik hücrelerin ayrımında Anneksin V/FITC yetersiz kalmaktadır. Nekrotik hücrelerin membran dış yüzeyine bağlanabilen bir diğer boya propidyum iyodür (PI) olmaktadır. Yeşil floresans boya olan Anneksin V-FITC ve non-vital kırmızı floresans bir boya olan propidyum iyodür (PI) ile aynı zamanda boyanan hücreler, canlı hücreler (FITC-PI-), erken apoptoza uğrayan hücreler (FITC+PI-), geç apoptoza uğrayan hücreler (FITC+PI+) veya nekrotik hücreler (FITC-PI+) flow sitometride birbirinden ayırt edilebilmektedir (134,136) .

2.5.3. Serbest Radikaller

Serbest radikaller, dış yörüngesinde eşlenmemiş elektron bulunduran enerji seviyesi yüksek atom/molekül olarak tanımlanmaktadır. Bu sayede diğer moleküllerle kolaylıkla reaksiyona girebilmektedir. Dış orbitalinde eşlenmiş elektron bulunduran atom veya moleküller daha kararlı bir yapıda bulunmakta olup başka molekül veya atomlarla reaksiyona girme potansiyelleri serbest radikaller kadar yüksek değildir. Kararlı yapıda bulunan ve diğer moleküllerle reaksiyona girme potansiyeli düşük olan bu moleküller non-radikaller olarak adlandırılmaktadır. Serbest radikaller, oksijen kaynaklı ise reaktif oksijen türleri (ROS) veya azot kaynaklı ise reaktif nitrojen türleri (RNS) olarak tanımlanmaktadır (137,138).

Reaktif oksijen türleri (ROS) arasında; süperoksit ($O_2^{\cdot-}$), hidroksil ($OH^{\cdot}$), peroksil ($ROO^{\cdot}$), lipid peroksil ($LOO^{\cdot}$), ve alkoksil ($RO^{\cdot}$) radikalleri yer almaktadır. Reaktif azot türleri grubunu (RNS) ise nitrik oksit ($NO^{\cdot}$) ve nitrojen dioksit ($NO_2^{\cdot}$) oluşturmaktadır. ROS ve RNS diğer non-radikal reaktif türlere dönüşebilmektedir. Oksidanlar olarak adlandırılan, patolojik ve fizyolojik olarak canlılar tarafından üretilen hidrojen peroksit (H_2O_2), ozon (O_3), singlet oksijen (1O_2), hipokloröz asit ($HOCl$), nitrik asit (HNO_2), peroksinitrit ($ONOO^{\cdot}$), dinitrojen trioksit (N_2O_3) ve lipid peroksit ($LOOH$) ise serbest radikaller arasında yer almamaktadır fakat organizmada kolaylıkla serbest radikallere dönüşebilmektedir (137–139).

2.5.3.1. Serbest radikal kaynakları: Canlı organizmasında oluşan serbest radikaller hem endojen kaynaklı hem de eksojen kaynaklı olabilmektedir.

Başlıca endojen kaynaklı serbest radikal oluşum mekanizmaları aşağıdaki gibi sıralanabilmektedir:

- İnflamasyon durumunda sitokinler salınır bununla beraber uyarılan makrofaj ve nötrofillerden serbest radikal üretimi gerçekleşmektedir
- Stres, vücut yorgunluğu durumunda serbest radikal üretimi meydana gelebilir.
- Bağışıklık sistemi hücreleri patolojik durumlarda ROS veya oksidanlardan serbest radikal oluşumuna sebep olabilir.
- Hücre içi mitokondride aerobik solunumla serbest radikaller yan ürün olarak ortaya çıkabilir.

UV ışınlar, X ışınları, gamma ışınları, mikrodalga ışınları, alkol ve sigara kullanımı, orman yangınları, temizlik ürünleri gibi kaynaklar eksojen kaynaklar başlığı altında sayılabilmekte ve çevresel etkenler sonucu serbest radikallerin ortaya çıkmasını sağlamaktadır (140–145).

2.5.3.2. Canlı organizmasında ROS ve RNS oluşumunun avantaj ve dezavantajları: Düşük seviyelerde ROS ve RNS oluşumunun organizma için yararlı etkileri olduğu düşünülmektedir.

Bunlardan başlıcaları;

- İnflamasyon ve enfeksiyon aşamasında lenfositler ve makrofajlar tarafından kanser hücrelerinin fagosite edilmesi, mitokondride ATP sentezi, hücre büyümesi, hücre içi kalsiyum salınımı, hücre içi sinyaller ve büyüme faktörü salınımı, nükleer transkripsiyon faktörlerinin indüklenmesi gibi önemli aşamalarda rol aldığı görülmektedir (146–148).
- Reaktif oksijen türleri, prostaglandin ve tiroksin gibi moleküllerin biyosentezine katılmaktadır. Bununla beraber hücrede çözünerek guanilat siklaz aktivitesinin düzenlenmesinde ve gen ekspresyonunda rol almaktadır (138).

- RNS türlerinden NO, endotel hücreleri tarafından kullanılmakta ve lökosit adezyonu, platelet agregasyonu, anjiyogenez ve trombozis gibi aşamalarda rol almaktadır (138).

Serbest radikaller, hücre içi organellerin membranlarında bulunan lipitlerle reaksiyona girdiğinde yüksek derecede zararlı sonuçlara yol açabilmektedir.

- Lipit peroksidasyonu hücre membranının akışkanlığı ve geçirgenliğini bozarak hücre membranının bütünlüğüne zarar verebilmektedir(139,144).
- Serbest radikaller, yapısal proteinlerin fonksiyonunu ve enzim aktivitesini bozarak protein hasarı meydana getirir ve birçok hastalığın gelişmesine neden olabilir (148).
- DNA, OH gibi serbest radikal türleriyle etkileşime girerek oksidatif hasara uğrayabilmektedir (149).

2.5.4. Gen Anlatım Analizinde Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Gen anlatım analizi, bir hücrede hangi genlerin aktif olduğunu belirlemek ve hangi koşullar altında çalıştıklarını anlamak için kullanılan bir dizi yöntemdir. Gen ifadesi; belirli bir zaman diliminde bir hücreye ait olan hangi genlerin transkripsiyonel düzeyde ifade edildiğini tanımlar. Bu analizler, belirli koşullarda farklı gen ifade profilleri arasındaki farklılıkları belirlemeye ve farklı hücre tipleri veya hastalıklar arasındaki gen ifade değişikliklerini araştırmaya yardımcı olabilir. Gen ifadesi analizleri, DNA mikroarrayler, RNA dizileme, ters transkripsiyon, Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ve kantitatif PCR gibi bir dizi yöntem kullanarak gerçekleştirilebilir (150).

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR), DNA'nın in vitro (laboratuvar ortamında) kopyalanmasını sağlayan bir moleküler biyoloji teknolojisidir (151) . Bu teknik, belirli bir DNA bölgesinin milyonlarca kopyasının üretilmesini sağlayarak DNA'nın tanımlanması, analizi ve manipülasyonu için birçok uygulamada kullanılmaktadır (152).

İn vitro ortamda gerçekleştirilen DNA replikasyonu, PCR tekniğinin tekrarlayan döngüleri ile gerçekleştirilmektedir. Bu teknikte, amplifikasyon yapılacak olan hedef DNA, hedef bölgeye özgü tek iplikli oligonükleotidler (primerler), dNTP'ler (deoksiribonükleosit trifosfatlar) ve ısıya dayanıklı bir DNA polimeraz yer almaktadır. Taq DNA polimeraz, *Thermus Aquisticus* bakterisinden izole edilmiş en yaygın kullanılan

DNA polimerazdır. Ayrıca, magnezyum iyonları dNTP'lerle kompleks oluşturarak polimeraz aktivitesini uyarmakta ve reaksiyonun verimliliğini artırmaktadır (153).

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) döngüsü üç aşamadan oluşur;

1. Aşama: Denatürasyon aşamasıdır. 90°C'de hidrojen bağları parçalanarak DNA çift sarmalı çözülür.

2. Aşama: Primer bağlanma aşamasıdır. 45-65°C'ye soğutulan reaksiyonda her bir primer, her bir 3' hidroksil ucundan gelen uzantı diğerine doğru yönlendirilecek şekilde iki ayrılmış sarmaldan birbirine hibridize olur.

3. Aşama: Uzatma aşamasıdır. Sıcaklık DNA polimeraz aktivitesinin en yüksek olduğu 72°C'ye yükseltilir. Bağlanmış primerler daha sonra bir DNA polimeraz ile şablon şerit üzerinde uzatılır (154).

Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qPCR veya Real-Time PCR) ise, amplifikasyon reaksiyonu sırasında DNA üretiminin, gerçek zamanlı olarak izlenebildiği bir tekniktir. Bu teknikte, flüoresan boyalar ile DNA üretimi izlenebilir. QPCR, gen ifadesinin nicel olarak belirlenmesi, genetik farklılıkların tanımlanması ve diğer birçok uygulama için kullanılmaktadır (155).

QPCR; monitörize edilebilen, floresan işaretli prob ve boyaların kullanıldığı, floresanın oluşan DNA ile doğru orantılı olarak arttığı bir çoğaltma yöntemi olarak kullanılmaktadır. "SYBR Green I" en fazla kullanılan boya çeşidi olup, 497 nm dalga boyunda yükseltgenir ve 520 nm dalga boyunda indirgenmektedir. Çift sarmal DNA'nın küçük oluşuna bağlanan boya 30 amplifikasyon döngüsü sonrası yalnızca aktivitesinin % 6'sını kaybetmektedir (156).

2.5.4.1. mRNA'dan cDNA elde edilmesi: mRNA (messenger RNA), hücrelerdeki DNA dizilerinde kodlanan bilginin protein sentezi için taşınmasında kilit rol oynayan bir moleküldür. Ancak, çoğu moleküler teknik, protein sentezi yerine mRNA'nın tespitine odaklanmaktadır. Bu nedenle, mRNA'nın tespitinde sıklıkla kullanılan bir yöntem, mRNA'dan tamamlayıcı DNA (cDNA) sentezi işlemidir (157).

cDNA sentezi, mRNA'nın üzerindeki ribozomların çevirme işlemine müdahale etmeden, mRNA'nın nükleotid diziliminden oluşan bir kopyasının sentezlenmesini sağlar. Bu kopya, DNA bazlı olduğu için daha kolay tespit edilir ve daha stabil bir

formdadır (158). cDNA sentezi, ters transkripsiyon adı verilen bir reaksiyonla gerçekleştirilir. Bu işlemde, öncelikle mRNA'nın üzerine, öncül primer adı verilen bir kısa DNA parçası takılır. Daha sonra, ters transkriptaz adı verilen bir enzim kullanılarak mRNA'nın üzerindeki nükleotid dizilimi cDNA'ya kopyalanır. Bu işlem sırasında, DNA polimeraz enzimleri tarafından sağlanan nükleotidler, cDNA zincirine eklenir. Son olarak, RNA zinciri sindirilir ve çift zincirli cDNA üretilir. Bu işlem, moleküler biyolojide birçok uygulama için kullanılır. Örneğin, gen ifadesi analizi, viral tanı ve ilaç geliştirme gibi araştırmalarda cDNA sentezi sıklıkla kullanılmaktadır (158).

2.5.4.2. Housekeeping gen kavramı: Housekeeping genler, tüm hücrelerde yer alan ve temel metabolik süreçleri yöneten genlerdir. Bu genlerin ekspresyonu, hücrenin hayatta kalması ve normal fonksiyonlarını sürdürebilmesi için gereklidir. Bazı örnekler arasında GAPDH (Glyceraldehyde-3-fosfat dehidrogenaz), ACTB (Beta-aktin) ve RPL13A (Ribozomal protein L13a) gibi genler yer alır (159).

Housekeeping genler, hücrelerin farklı tipleri arasında karşılaştırılmasında ve gen ifadesi analizlerinde kullanılan stabil referans genler olarak da bilinirler. Çünkü bu genlerin ekspresyon düzeyleri nispeten sabit kalır ve hücreler arasında değişmez (160).

18S ribozomal RNA, bir RNA geni olup housekeeping gen olarak kabul edilir. 18S rRNA, hücrelerin ribozomlarında bulunan küçük bir RNA molekülüdür ve protein sentezi sırasında görev almaktadır. Ayrıca, 18S rRNA gen ekspresyon düzeyi hücrede değişmeden kalır ve farklı hücre tipleri arasında kıyaslanabilmektedir. Bu sebeple gen ifadesi analizlerinde referans olarak kullanılabilir (161).

2.5.4.2. Ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu (revers-transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR)): Revers-transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR); RNA şablonlarının PCR ile amplifikasyonu için kullanılan bir tekniktir.

Bu teknikte, öncelikle RNA şablonu, ters transkripsiyon adı verilen bir işlemle tamamlayıcı DNA'ya (cDNA) dönüştürülür. Daha sonra, bu cDNA şablonu PCR ile amplifiye edilir (162). RT-PCR, özellikle gen ifadesinin belirlenmesi veya virüslerin tespiti için kullanılmaktadır. Bu yöntemde, mRNA'dan ters transkripsiyon ile elde edilen cDNA, florokromlu bir prob varlığında araştırılan gene özgü primerler kullanılarak, PCR ile amplifiye edilmekte ve oluşan sinyal PCR döngüsünde ölçülmektedir. Ayrıca çeşitli

örneklerden izole edilen RNA'ların tam olarak karşılaştırılabilmesi için, test probunun floresansı referans proba (18S ribozomal RNA, GAPDH vb. housekeeping gen) karşı normalizasyonu yapılmaktadır. RT-PCR ile ilgili çok çeşitli problemler (TaqMan problemleri, SYBR Green I vb.) ve cihaz sistemleri (ABI7900, Lightcycler, iCycler vb.) mevcut olup, mRNA analiz çalışmaları haricinde, DNA kopya sayısının ölçümü, gen çeşitliliğinin ayrımı ve mikroarray'den elde edilen gen ekspresyon verilerinin doğrulanmasında da kullanılmaktadır (163).



3. GEREÇ VE YÖNTEM

Sağlık Bilimleri Üniversitesi Hamidiye Diş Hekimliği Fakültesi Ağız Diş Çene Hastalıkları ve Cerrahisi Ana Bilim Dalı'nda çekim endikasyonu konulmuş olan çekime bağlı kırık, çatlak bulunmayan, yumuşak doku retansiyonlu, tam gömülü üçüncü büyük azı dişleri kullanıldı. Dental pulpa bütünlüğünün bozulmadığı, yumuşak doku retansiyonlu, tam gömülü, üçüncü büyük azı dişleri serum içerisinde, dental pulpa kök hücrelerinin izole edilip üretilmesi için Yeditepe Üniversitesi Genetik ve Biyo-Mühendislik Ana Bilim Dalı Laboratuvarı'na, dental pulpanın vitalitesini kaybetmemesi adına iki saat içerisinde ulaştırıldı.

Bu doktora tez çalışmasında ticari olarak ulaşılabilen kuafaj materyallerinin [Harvard BioCal®-CAP, NuSmile NeoPutty MTA 0.65 gram Starter Kit, TheraCal LC (Bisco Inc, Schamburg, IL, ABD), Dycal (Dentsply)] dental pulpa kök hücreleri üzerindeki biyoyumluluk ve sitotoksosite değerleri karşılaştırıldı.

Bu çalışma için Sağlık Bilimleri Üniversitesi Hamidiye Bilimsel Araştırmalar Etik Kurulu'ndan onay alındı (Dosya No: 21/772) (Ek 1. Etik Kurul Onayı). Hastalardan çekilen dişler, etik kurul onaylı gönüllü onam formu imzalatılarak onam alındıktan sonra araştırmamıza dahil edildi (Ek 2. Gönüllü Onam Formu). Çalışmada kullanılacak kuafaj materyallerinin hazırlığı, hücre kültürü aşamaları, sitotoksosite ve biyoyumluluk deneyleri Yeditepe Üniversitesi Genetik ve Biyomühendislik Ana Bilim Dalı Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi.

3.1. GEREÇLER

3.1.1. Çalışmada Kullanılan Kuafaj Materyalleri

- Dycal (Dentsply Sirona, ABD)
- TheraCal LC (Bisco Inc, Schamburg, IL, ABD)
- NuSmile NeoPUTTY 0.65 gram Starter Kit (NuSmile, Houston, TX, ABD)
- Harvard BioCal®-CAP (Harvard, Hoppegarten, Almanya)

3.1.2. Hücre Kültür Çalışmasında Kullanılan Kimyasal Materyaller

- Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Low Glucose, Gibco 31885, Thermo F. Scientific
- Fetal Bovine Serum (FBS), Gibco 10500-056, Thermo F. Scientific
- Penisilin/Streptomisin/Amfoterisin, Gibco 15140-122, Thermo F. Scientific
- Phosphate Buffered Saline (PBS), Lonza BE17-517Q
- Trypsin-EDTA Solüsyonu, Gibco 25200056, Thermo F. Scientific
- TRIzol™ Reaktifi, 15596-018, ThermoFisher Scientific
- %1'lik Bovine Serum Albumin (BSA) , ThermoFisher Scientific
- Annexin V Human Apoptosis Detection Kit (BD Pharmingen, ABD, 550474)
- Bağlama tamponu (Annexin V Binding Buffer, BioLegend, San Diego, ABD)
- CD45 PE (ab269298, Abcam, ABD)
- CD90 PE (ab23894, Abcam, ABD)
- CD73 PE (ab157335, Abcam, ABD)
- CD105 PE (ab69772, Abcam, ABD)
- CD44 PE (ab81424, Abcam, ABD)
- CD14 FITC (ab28061, Abcam, ABD)
- CD34 FITC (ab35038, Abcam, ABD)

3.1.3. Hücre Kültür Çalışmasında Kullanılan Sarf Malzemeler

- Hücre Kültür Flaskları, T-25, T-75, T-150, İsviçre
- Serolojik Pipetler 5,10,25,50 mL CAPP, Almanya
- Multipipet 100 µL (Eppendorf Research, Almanya), 2231300002, Almanya
- Mikropipet tips, 301-03-051, Axygen, ABD
- Mikrosantrifüj tüpleri 1.5, 2 mL, 078.03.002, 078.03.003, Isolab, Almanya
- Falcon tüp, 15 and 50 mL, Isolab, Almanya

- 0.22 µm ve 0.45 µm’lik Filtreler TPP, İsviçre
- Hemasitometre, Sigma Aldrich, Z359629, ABD
- 22 x 22 mm Lamel, Sigma, Z375357, ABD

3.1.4. Kullanılan Kit ve Testler

- CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS) (Madison, ABD)
- FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit (BD Pharmingen, ABD, 550474)
- DCFDA- Cellular ROS Assay Kit (Abcam, ABD)
- QuantiTect SYBR Green PCR Kit (204145) (Qiagen, Hilden, Almanya)
- iScript™ cDNA synthesis kit, (cat#1708890), (BioRad, ABD)

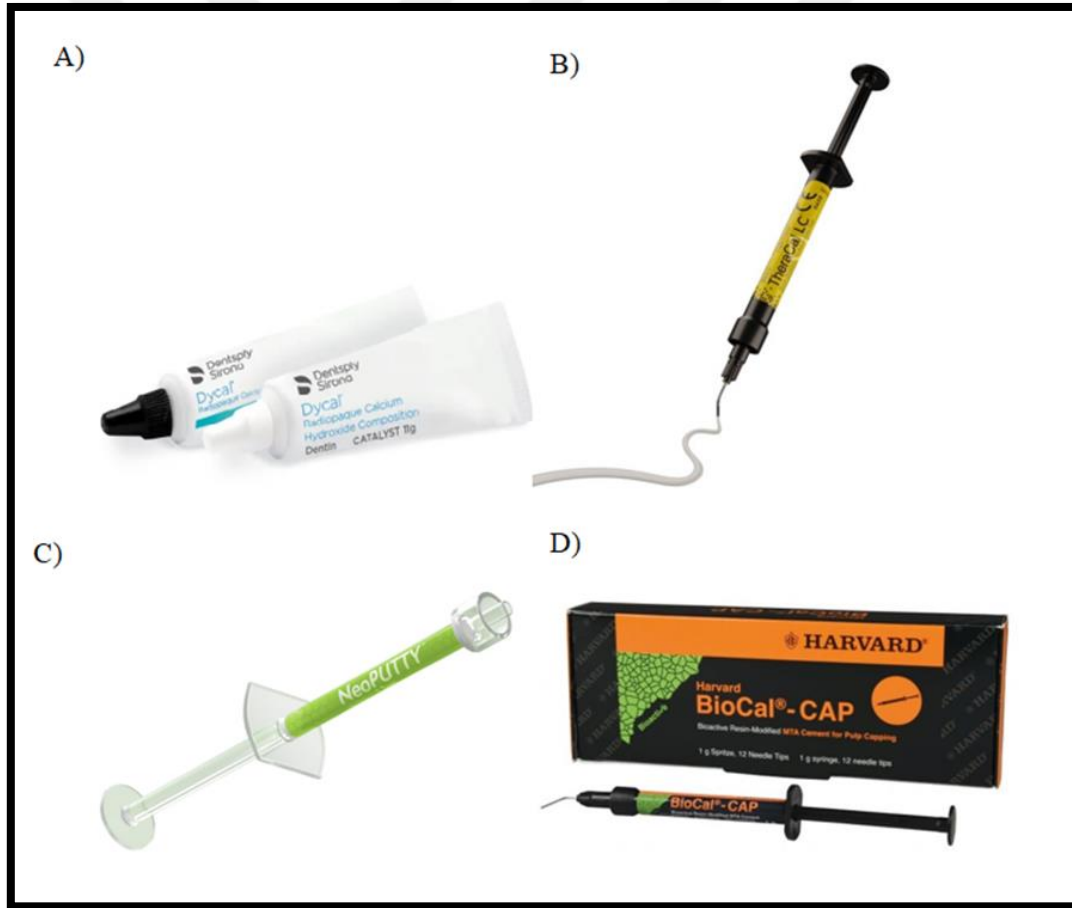
3.1.5. Kullanılan Cihazlar

- Laminar Flow Kabin, Heal Force Class II Biosafety Cabinet A2
- LED ışın cihazı, Woodpecker LED C, Çin
- CO₂ İnkübatör, InVitro Cell ES NU-5800, NuAire, ABD
- Ters Işık Mikroskobu, Nikon, TS100, Hollanda
- -80° C Dondurucu, New Brunswick, Almanya
- Flow Sitometri Cihazı, FACS Calibur (BD Biosciences, ABD)
- Elisa Mikroplak Okuyucu, Bio-techELx800, ABD
- Santrifüj, Sigma A. 3-18KS, Almanya
- Nanodrop Spektrometre, Thermo F. Scientific, ABD
- Termal Döngü Cihazı (Thermal Cycler), Biorad Mycycler 1709703, ABD
- CFX96 Real-Time PCR, Bio-Rad, C1000 Touch, ABD
- Vortex, Dragon Lab, MX-F, Çin
- Floresans Mikroskop, Axio Vert. Zeiss, Almanya
- Taramalı Elektron Mikroskobu, Scanning Electron Microscope (SEM),

SEM Zeiss EVO 40 (Jena, Almanya)

3.1.6. Çalışmada Kullanılan Kuafaj Materyallerinin Hücre Kültürü Öncesi Hazırlanması

Yeditepe Üniversitesi Genetik ve Biyo-mühendislik Laboratuvarı'nda çalışmada kullanılacak Harvard BioCal®-CAP, NuSmile NeoPUTTY 0.65 gram Starter Kit, TheraCal LC (Bisco Inc, Schamburg,IL, ABD) ve Dycal (Dentsply) (Şekil 3.1), kullanım kılavuzunda yazan üretici talimatları doğrultusunda teflon disk kullanılarak hazırlandı. Çalışmada kullanılan kuafaj materyalleri içerikleri ve üretici firma bilgileri Tablo 3.1'de gösterilmektedir.

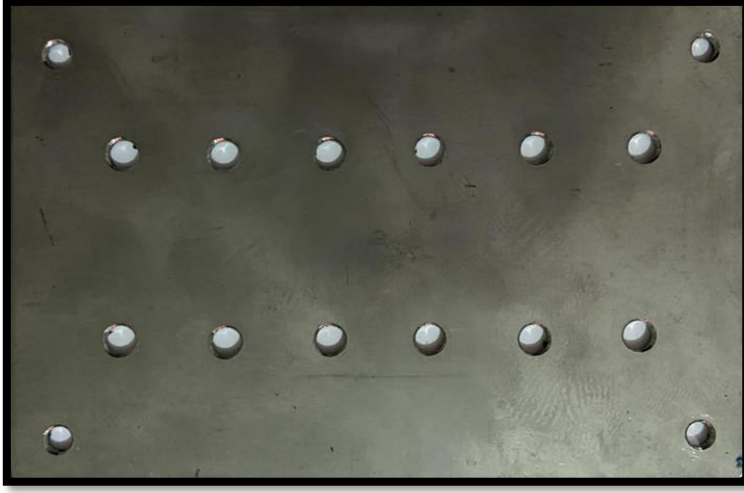


Şekil 3. 1: Çalışmada kullanılan kuafaj materyalleri, A) Dycal (Dentsply), B) TheraCal (Bisco Inc, Schamburg,IL, ABD), C) NuSmile NeoPUTTY 0.65 gram Starter Kit, D) Harvard BioCal®-CAP

Tablo 3. 1: Çalışmada kullanılan kuafaj materyalleri, içerikleri ve üretici firma isimleri

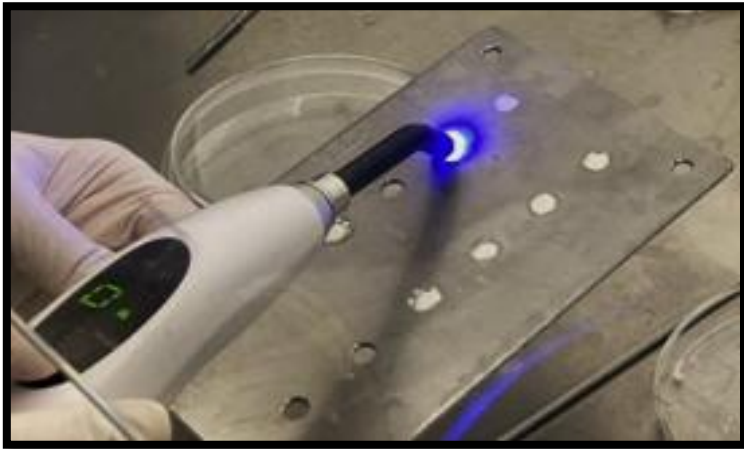
Materyal	İçerik	Üretici Firma
Dycal	Base:1,3 bütlen glikol disalisalat,çinko oksit, kalsiyum fosfat, kalsiyum tungstat,demir oksit pigmentleri Katalizör: kalsiyum hidroksit, Netil-o/p-tolun sülfonamid, çinko oksit, titanyum dioksit, çinko stearat, demir oksit pigmentleri	Dentsply Sirona, ABD
TheraCal LC	Rezinle güçlendirilmiş kalsiyum silikat, polimerize olabilen metakrilat monomerleri, tip III Portland simanı, polietilen glikol dimetakrilat, baryum zirkonat	Bisco Inc, Schaumburg, IL, ABD
NeoPUTTY MTA 0.65 gram Starter Kit	Trikalsiyumun silikat, dikalsiyum silikat tozları içeren önceden karıştırılmış macun kıvamında bioaktif, biyoseramik MTA	NuSmile, Houston, TX, ABD
Harvard BioCal-CAP	Hidrofilik reçine (%35-45), Portland simanı, radyoopasifleştirici BaSO ₄ (%7-12), mineral oksit ve metaakrilat karışımı bioaktif rezin modifiye MTA	Harvard, Hoppegarten, Almanya

Kuafaj materyallerinin hücre kültürüne yerleştirilmesi aşamasında standardizasyonu sağlamak için 2 milimetre yüksekliğinde 6 milimetre çapında teflon disk kullanıldı (Şekil 3.2). Teflon diskin her iki yüzeyi de ultraviyole ışık altında, beşer dakika olmak üzere steril edildi.



Şekil 3. 2: 2x6 mm boyutlarında boşluklar bulunan teflon disk

Dycal (Dentsply) için eşit miktarlarda baz ve katalizör (1.17g: 1.00g) hazırlanıp, karıştırma kağıdında karıştırma işlemi 10 saniye içerisinde tamamlandı. Teflon diske yerleştirilen Dycal (Dentsply), 2½ ila 3½ dakika içerisinde sertleşti (23°C ve %50 nisbi nem). ThereCal LC kuafaj materyali 20 saniye, Harvard BioCal- CAP 40 saniye olmak üzere dalga boyu 400-500 nm aralığında, 1000 mW/cm² gücünde olan ışık cihazı (Woodpecker LED C, Çin) ile polimerize edildi. Hazır macun kıvamında bulunan NeoPutty MTA (NuSmile)'nın ilk sertleşme süresi 37°C'de +10 saat iken oda sıcaklığında +4 saat olarak kaydedildi. Nemli pamuk pelet aracılığı ile teflon diske yerleştirildi ve sertleşme süresi beklendi.



Şekil 3. 3: Kuafaj materyallerinin hücre kültürü öncesi hazırlanması

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Kök Hücre İzolasyonu ve Kültürü

Bu doktora tez çalışmasında, Sağlık Bilimleri Üniversitesi Hamidiye Diş Hekimliği Fakültesi Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı'na başvurmuş, herhangi bir sistemik rahatsızlığı bulunmayan genç erişkin kişilerde, çekim endikasyonu konulan, çekime bağlı kırık, çatlak bulunmayan, yumuşak doku retansiyonlu, tam gömülü, üçüncü büyük azı dişleri kullanıldı. Helsinki bildirgesi uyarınca hastaya açıklama yapıp, gönüllü onam formu imzalatıldıktan sonra minimal travmatik diş çekimi gerçekleştirildi. Çekim işleminden hemen sonra üçüncü büyük azı dişleri, steril saf su ile ıslatılmış gazlı bez ile temizlendi. Dişler PBS 1X (Gibco, Carlsbad, US) içeren falkon tüplere yerleştirildi. Dental pulpa kök hücrelerinin izole edilip üretilmesi için Yeditepe Üniversitesi Genetik ve Biyomühendislik Ana Bilim Dalı Laboratuvarı'na serum içerisinde dental pulpanın vitalitesini kaybetmemesi adına 2 saat içerisinde ulaştırıldı. Laboratuvara ulaştırılan örnekler laminar flow kabin içerisinde petri kaplarına alındı. Dişler fizyodispenser, streil cerrahi anguldurva ve karbon separeler yardımı ile mesio-distal yönde pulpa odası sınırına kadar kesildi. Büyük azı davyesi ile tutulan dişler steril elevatör ile mesio-distal yönde kesilen hat boyunca kırılarak birbirinden ayrıldı. Steril bistüri ucu ile pulpa dokusu çıkarıldı ve +4 derecede bekletilen tampon solüsyonlarına aktarıldı. 3 mg/mL kollajenaz tip I (Sigma-Aldrich, ABD) ve 4 mg/mL dispaz (Sigma-Aldrich, ABD) ile 37°C de 45 dakika enzimatik sindirim gerçekleştirildi ve 1500 xg (devir)'de 3 dakika santrifüj edildi. Hücre fraksiyonu, PBS 1X ile 2 kere yıkanarak oda sıcaklığında 1500 xg'de 3 dakika tekrar santrifüj edildi.

İzole edilen insan dental pulpa kök hücreleri, %10 (v/v) Fetal Bovin Serum (FBS) ve %1 Penisilin / Streptomisin / Amfoterisin (100 ünite/ml) antibiyotik içeren Dulbecco's Modified Eagle Medium (low glucose, DMEM) isimli besiyerinde kültürlendi. Yüksek oranda nemlendirilmiş bir atmosferde (RH % 80), 37°C sıcaklıkta, %5 CO₂ ve % 95 (h/h) hava ile hücreleri büyötmek ve inkübe etmek için inkübatörde (Nuair NU5510/E/G), T25, T75, T125'lik flasklar hücre yoğunluğuna göre kademeli olarak kullanıldı.

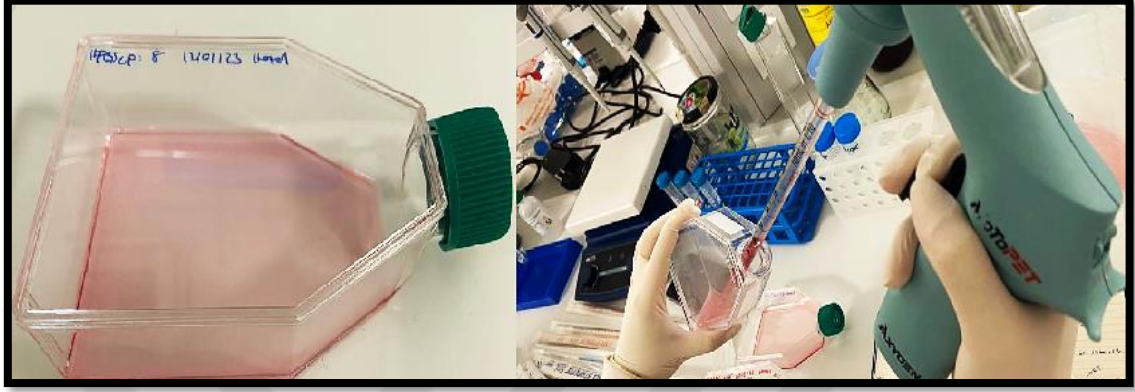
3.2.2. İzole Edilen Dental Pulpa Kök Hücrelerinin Pasajlanması

Hücre pasajı için laminar flow hücre kültür kabini kullanıldı (ESCO Labculture Class II Biohazard Safety Laminar Flow). Laminar flow hücre kültür kabini içinde gerçekleştirilen pasajlama işleminde; hücre medyumunu serolojik pipet ile uzaklaştırılıp, flask içerisinde büyüyen hücreler 5 ml DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline) solüsyonu ile medium kalıntısından arındırmak için yıkandı. Yıkama işlemi sonrası DPBS solüsyonu uzaklaştırıldı. Flasklara yapışan hücreleri, yapıştıkları alandan ayırmak için 5 ml Tripsin-EDTA solüsyonu (Thermo Fischer, ABD) hücreler üzerine eklendi. Tripsinle muamele edilen hücreler, 37°C'de 4 dakika inkübe edilerek hücrelerin flask yüzeyinden ayrılması sağlandı. Flask içerisindeki tripsin enzimi aktivasyonunu durdurmak için üzerine tripsinle aynı miktarda DMEM besiyeri eklenerek, tripsin enzim aktivitesi durduruldu ve hücreler flask içerisinden toplandı. Hücreler steril 15 ml'lik falkon tüplere alınıp 300 xg'de 5 dakika santrifüj edilerek tüplerin üzerinde kalan süpernatant uzaklaştırıldı ve alt kısımda çökelen hücre pelletini yeniden süspanse etmek için taze medya kullanıldı. Pipetaj işlemi ile homojenizasyon sağlanarak yeniden süspanse edilen hücrelerin 10 ul'si bir hemositometreye yerleştirildi ve hücre sayısı ters ışık mikroskobu altında sayıldı. Hücreler günlük olarak gözlendi ve yüzde 70 ila 80 doluluk oranına ulaştıklarında pasajlandı, 3. pasajdaki hücreler kullanıldı.

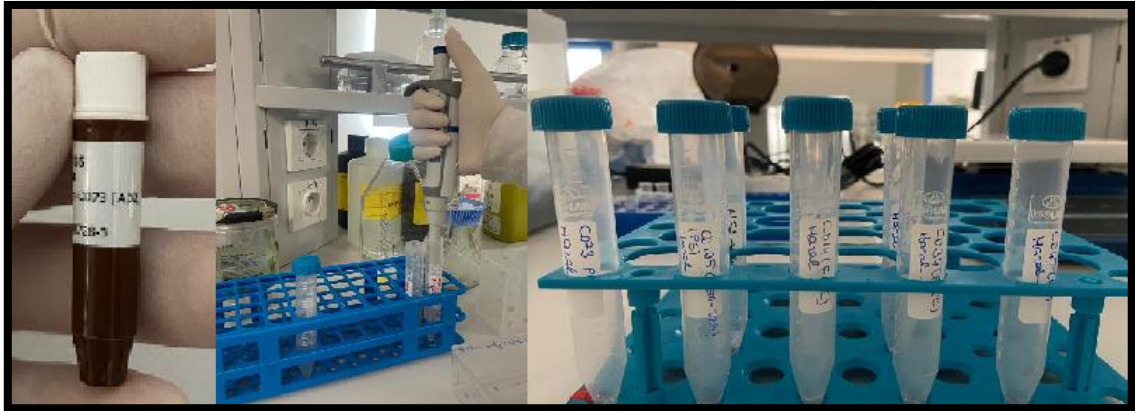
3.2.3. İzole Edilen Kök Hücrelerin Flow Sitometri ile Karakterizasyon Analizi

T75'lik flaskta büyütülen dental pulpa hücreleri flasktan kaldırıldı ve 15 ml'lik falcon tüpte hücre pelleti elde edildi. Daha sonra bu hücre pelletine, 1 ml PBS ile pipetajlama işlemi yapıldıktan sonra 300 xg 5 dk süre ile santrifüj edildi. Santrifüjden sonra üzerindeki PBS solüsyonu uzaklaştırıldı ve kalan hücre pelleti 1 ml %4'lük PFA (Paraformaldehit) kullanılarak çözüldü. +4 derecede 30 dakika boyunca inkübe edildi. İnkübasyondan sonra PFA'dan arındırılması için yeniden santrifüj işlemi yapıldı. Daha sonra PFA solüsyonu atıldı, hücre pelleti üzerine 1 ml PBS eklendi ve tekrar santrifüj işlemi gerçekleştirildi. Bu işlemlerden sonra hücre pelleti 800 µl %1'lik BSA (sığır serum albümini)'da çözülerek 11 tüpe bölündü. 1'i negatif kontrol grubu olmak üzere 10 tane kök hücre marker'ı olan CD73, CD90, CD105, CD44, CD14, CD34, CD45, CD146, CD29, CD31 antibody grupları oluşturuldu. Her tüpe 1 µl kök hücre markerı eklendi (her tüpte 1/100 olacak şekilde). 24 saat boyunca inkübasyon gerçekleştirildi. 24 saatin

sonunda her tüpe 400 µl PBS eklenerek santrifüj işlemi gerçekleştirildi. Bu santrifüj aşaması bir kez daha tekrarlandı. Son olarak hücre pelleti 400 µl PBS ile çözülerek flow tüplerine aktararak flow sitometri cihazında (Merck Millipore, Germany) analiz edildi.



Şekil 3. 4: T75'lik flaskta büyütülen dental pulpa hücreleri



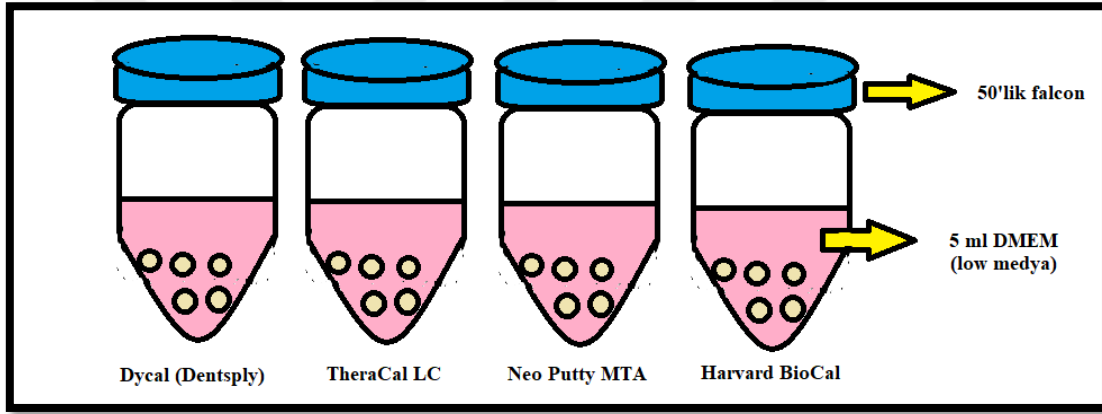
Şekil 3. 5: Marker karakterizasyonu için hazırlanan falcon tüpleri (Negatif kontrol grubu ve CD73, CD90, CD105, CD44, CD14, CD34, CD45, CD146, CD29, CD31 antibodyleri)

3.2.4. Ekstraksiyon Yöntemi ile Materyallerin Salınım Sıvılarının Elde Edilmesi

2x6 mm ölçülerinde teflon disk kalıbı kullanılarak hazırlanan, 4 farklı kuafaj materyalinden (Dycal, Neo Putty MTA, TheraCal LC, Harvard BioCal-Cap) elde edilen

5 ayrı disk, 50'lik falcon tüplere konuldu ve tüpler etiketlendi. Daha sonra bakteri, mantar kontaminasyonunu engellemek amacıyla 1 saat UV ile steril edildi.

Her disk başına her falkona ayrı ayrı 1 ml medya konuldu ve toplamda her falkonda 5 ml DMEM low medya kullanıldı (Şekil 3.6). Hazırlanan diskler 1 gün medyada bekledikten sonra gün aşırı medyalar toplandı ve üzerine yine aynı miktarda fresh medya konulup protokol devam ettirildi. Kontaminasyon riskini en aza indirmek ve materyalden uzak kalan medyanın homojenizasyonun sağlanması için hücre kültürü kabini içerisinde 0.22'lik mikrobiyolojik filtreden geçirilerek partiküllerden arındırıldı, materyal salınım sıvıları elde edildi. Dört farklı kuafaj materyalden elde edilen ekstrakt salınım sıvıları -80°C'de saklandı.



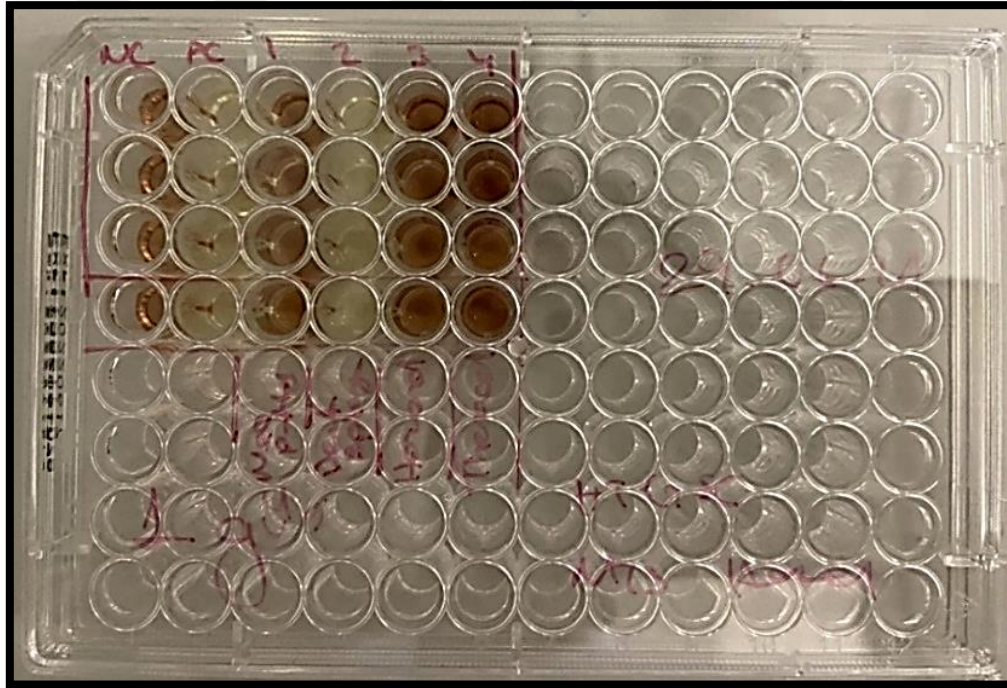
Şekil 3. 6: Dycal, TheraCal LC, NeoPutty MTA ve Harvard BioCal'ın ekstrakt salınım sıvılarının elde edilmesi

3.2.5. Hücre Canlılığı- MTS Analizi

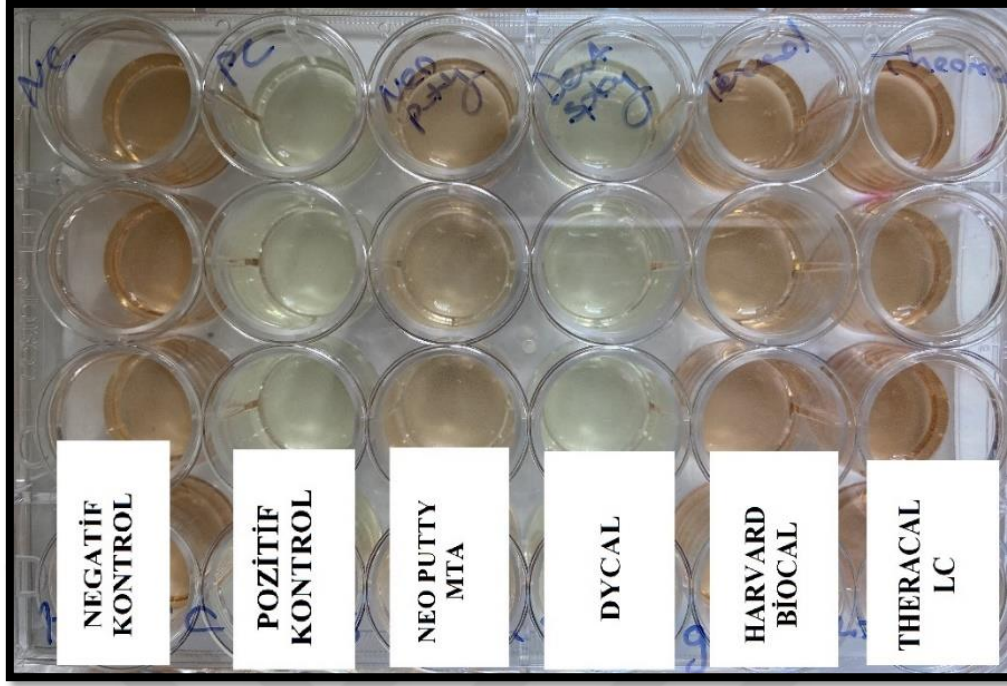
Hücre canlılığı 3-(4,5-di- methyl- thiazol-2-yl)-5-(3-carboxy-methoxy-phenyl)-2-(4-sulfo-phenyl) -2H- tetrazolium (MTS)- metodu (CellTiter 96® Aqueous One Solution Proliferation Assay; Promega, Southampton, UK) kullanılarak analiz edildi.

Hücreler, %10 fetal bovin serum (Invitrogen) ve %1 PSA (Biological Industries, Beit Haemek, Israel) ve Dulbecco's modified Eagle's medium, low glucose (DMEM) içeren kültür ortamında, 96 kuyucuklu kültür kaplarına (Corning Glasswork, Corning, NY) 5×10^3 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekildi. Pozitif kontrol grubu, negatif kontrol

grubu ve 4 farklı kuafaj materyalden elde edilen salınım sıvıları ile 6 farklı deney grubu oluşturuldu. Negatif kontrol grubunda sadece hücreler yer alırken pozitif kontrol grubunda hücrelere %20'lik DMSO (Dimetilsülfoksit) ile muamele edildi. Daha sonra hücre canlılığı analizi için kullanılacak MTS çözeltisi, PBS-glukoz solüsyonu ile yüzde 10'luk bir nihai konsantrasyon elde etmek adına karıştırıldı. Hücreler, % 5 CO₂ ve % 95 (h/h) hava ile yüksek oranda nemlendirilmiş bir atmosferde (Rh % 80), 37°C'de, 1 saat süre PBS-glukoz-MTS solüsyonu ile inkübe edildi. İnkübasyon sürecinden sonra 490 nm dalga boyunda ELISA plaka okuyucu (Biotek, Winooski, VT) cihazı ile abzorban ölçümü yapılarak canlılık analizi gözlemlendi (Resim 3.5). MTS analizinde bu aşamalar, 1,3,5,7, ve 14. günler için tekrarlandı.



Şekil 3. 7: Negatif kontrol, pozitif kontrol ve kuafaj materyallerinden elde edilen ekstrakt salınım sıvıları ile muamele edilmiş hücrelere MTS solüsyonun eklenmesi



Şekil 3. 8: PBS-glukoz çözeltisi ile karıştırılmış MTS solüsyonunun deney gruplarına göre renk değişimi



Şekil 3. 9: İnkübasyon sürecinden sonra 490 nm dalga boyunda abzorban ölçümü yapılan ELISA plaka okuyucu (Biotek, Winooski, VT) cihazı

3.2.6. Anneksin-PI ile Apoptoz-Nekroz Analizi (Flow Sitometri)

6 kuyucuklu kültür kaplarına ekilen ve her kuyucukta 1×10^5 yoğunluğunda bulunan hücreler toplanarak 1300 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüj edildi. Daha sonra üzerinde kalan süpernantlar atılarak hücre peleti 1 ml PBS içerisinde pipetajlanarak tekrar santrifüj edildi. Santrifüjlenen hücre peletleri 300 μ l PBS ve 100 μ l FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit içerisinde çözdürüldü. Kullanılan kitin üretici talimatlarına göre bağlama tamponu (Annexin V Binding Buffer, BioLegend, San Diego, USA) ile karıştırılarak vortekslendi. Daha sonra 3 μ l Annexin V eklendi ve 15 dakika karanlık ortamda inkübe edildi. İnkübasyondan sonra hücrelere 1 μ l Propidyum İyodür (PI) ilave edildi. Negatif kontrol, Annexin V kontrol (sadece 3 μ l Annexin), PI kontrol (sadece 1 μ l Propidyum İyodür), Annexin V-PI kontrol ve 4 farklı kuafaj materyali ile muamele edilmiş, kit protokolü uygulanmış hücrelerin canlı, erken apoptoz, geç apoptoz ve nekroz hücre ölçümleri flow sitometri cihazı (Merck Millipore, Germany) ile gerçekleştirildi. Bu protokol 1. 7. ve 14. Günlerde tekrarlandı.

3.2.7. Reaktif Oksijen Seviyesini Belirleme-ROS

Kuafaj materyallerinin hücreler üzerinde oluşturduğu reaktif oksijen miktarını göstermek amacıyla, hücrelerinin hücre içi ROS seviyeleri DCFDA- Cellular ROS Assay Kit (Abcam) ile ölçüldü. İnsan dental pulpa kök hücreleri, %10 (v/v) (FBS) ve %1 Penisilin / Streptomisin / Amfoterisin (100 ünite/ml) antibiyotik içeren DMEM isimli medyada kültürlendi. Yüksek oranda nemlendirilmiş bir atmosfer (RH % 80), 37°C sıcaklıkta %5 CO₂ ve % 95 (h/h) hava ile hücreleri büyütmek ve inkübe etmek için inkübatörde (Nuaire NU5510/E/G), T25, T75, T125'lik flasklar kademeli olarak kullanıldı. Hücreler günlük olarak gözlendi ve yüzde 70 ila 80 birleşme noktasına ulaştıklarında pasajlandı. 2.5×10^4 hücre, 96 kuyucuklu kültür kaplarına ekildi ve 37°C 'de inkübe edildi. 24 saatin sonunda kontrol grubuna DMEM eklenirken diğer gruplar kuafaj materyallerinden elde edilen salınım sıvıları muamele edildi (50-100 μ g/ml). Daha sonra hücreler, 100 μ l ROS Assay buffer ve ardından PBS ile yıkandı. Bu yıkamadan sonra 100 μ l 1x ROS etiketli ROS assay buffer içerisinde dilüe edilmiş solüsyondan her kuyucuğa eklenerek 45 dakika, karanlık ortamda, 37°C sıcaklıkta inkübasyon gerçekleştirildi. Bu inkübasyondan sonra koyulan solüsyon atılarak 100 μ l PBS kuyucuklara eklenerek floresans plaka okuyucuda (Varioskan LUX (Thermo Fisher Bilimsel)), 495/529 nm floresans yoğunluğunda okutuldu.

3.2.8. Total RNA İzolasyonu- Gen Analizi

4 farklı kuafaj materyalinden elde edilen ekstrakt salınım sıvıları ile muamele edilmiş hücreler, her kuyucukta 1×10^5 hücre/kuyucuk olacak şekilde 6'lı kültür kaplarına ekildi. 24 saat boyunca, %5 CO₂ ve %95 (h/h) hava ile yüksek oranda nemlendirilmiş bir atmosferde (RH %80), 37°C sıcaklıkta inkübe edildi. 24 saat sonra hücreler toplandı ve üreticinin talimatlarına uygun olarak TRIzol™ reaktifi (#15596026, Thermo-Fischer Scientific, Massachusetts, ABD)'nin bulunduğu kit protokolü uygulandı.

İlk olarak hücrelerin homojenizasyonu sağlandı. Pellet halindeki hücrelerin üzerine önce 400 µl Trizol eklendi ve 5 dakika inkübasyon sürecinin ardından her örnek 100 µl kloroform ile karıştırılıp, 3 dakika inkübe edildi. Numune örneklerini 3 ayrı faza ayırmak için 12000 x g'de 15 dakika santrifüj edildi (Gyrozen 416, Korea) (Şekil 3.11). Ardından üst renksiz faz (Şekil 3.12), dikkatlice yeni bir tüpe alındı. Daha sonra üzerine 200 µl izopropanol eklenip karıştırıldı ve 10 dakika inkübe edildi. Örnekler tekrar 12.000 x g'de 10 dakika santrifüjlendi (Gyrozen 416, Korea).



Şekil 3. 10: 24 saatlik inkübasyon sürecinin ardından hücrelerin toplanması

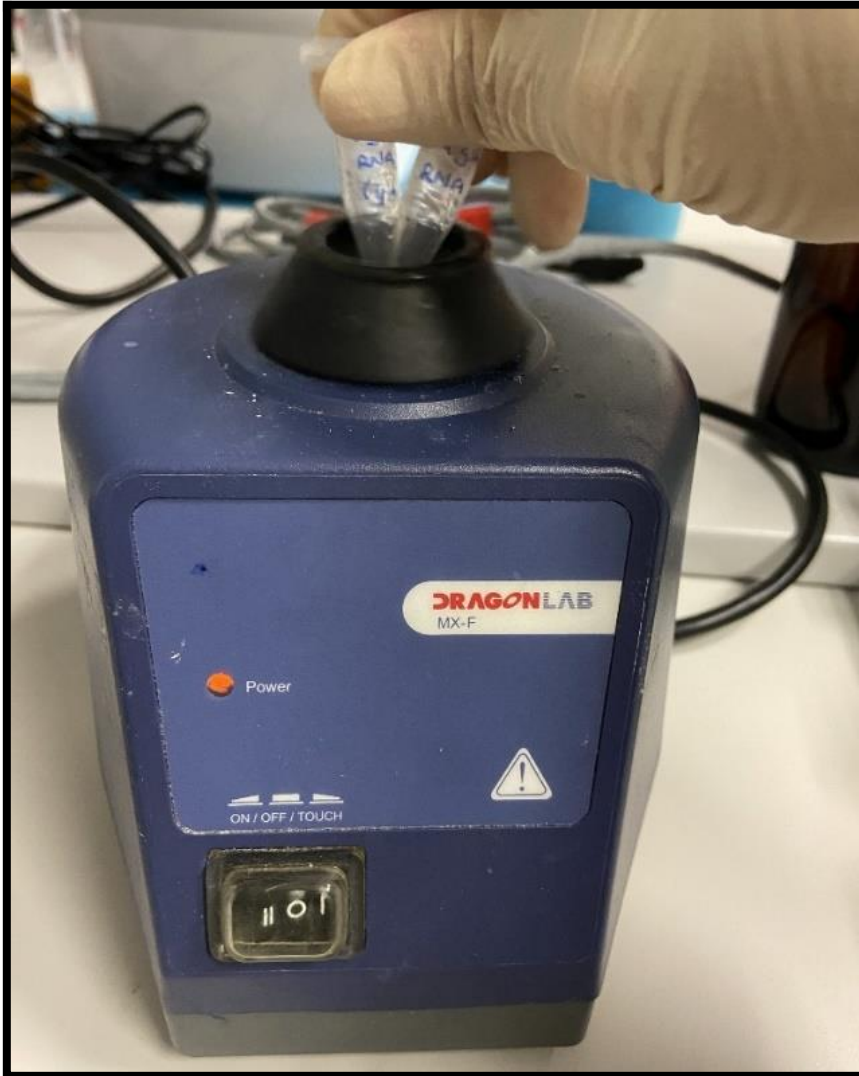


Şekil 3. 11: Numune örneklerini 3 ayrı faza ayırmak için 12000 x g'de 15 dakika santrifüj edilmesi (Gyrozen 416, Korea)

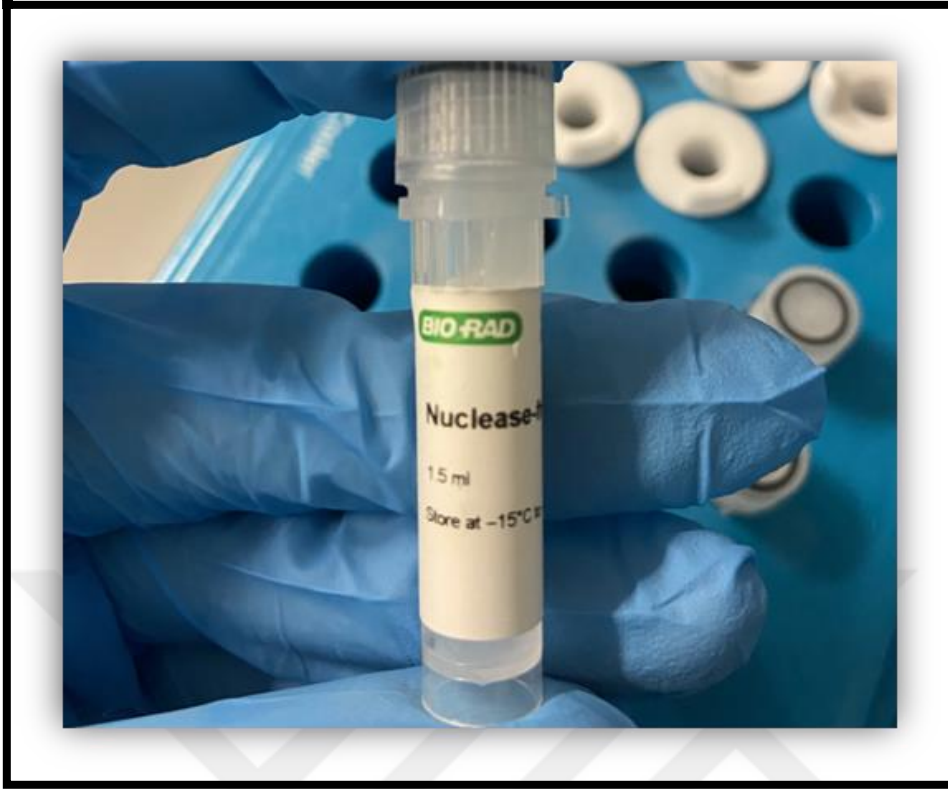


Şekil 3. 12: 12000 x g'de 15 dakika santrifüj edilen örneklerin 3 faza ayrılması, üstteki renksiz faz

Tüpün alt kısmına çökelen beyaz jel benzeri formdaki RNA örnekleri toplanıp RNA içermeyen süpernatantlar atıldı. Daha sonra alınan RNA örnekleri 400 µl %75'lik etanol ile iyice karıştırılıp vortekslendi (Dragon Lab, MX-F, China) (Şekil 3.13). Örnekler daha sonra 5 dakika 7500 x g'de santrifüjlendikten sonra süpernatant atıldı. Santrifüjün ardından, RNA örneklerini çözmek için 30 µl RNase/DNase içermeyen su kullanıldı (Şekil 3.14). Örneklerin RNA konsantrasyonları Nanodrop (Nano-Drop 2000, Thermo Fisher Scientific, USA) ile ölçüldü. Bu aşamalar 1. Gün, 7.gün ve 14.gün için tekrarlandı.



Şekil 3. 13: RNA örneklerinin 400 µl %75'lik etanol ile karıştırılıp vortekslenmesi (Dragon Lab, MX-F, China)



Şekil 3. 14: RNA örneklerini çözmek için kullanılan RNase/DNase içermeyen su (Nuclease-free water BIO-RAD)

3.2.9. RNA'dan cDNA (Tamamlayıcı DNA) Sentezi

Örneklerin RNA konsantrasyonları Nanodrop (Nano-Drop 2000, Thermo Fisher Scientific, USA) ile ölçüldükten sonra, BioRad iScript™ cDNA Synthesis kiti (#1708891, BioRad, ABD) protokolü baz alınarak total RNA'dan cDNA sentezi yapıldı. Sentegen Biotech (Ankara, Türkiye) tarafından, sentezlenen hedef primerleri tasarlamak için Ulusal Biyoteknoloji Merkezi'nin (NCBI, Bethesda, MD) Primer-BLAST çevrimiçi yazılımı kullanıldı. Tablo 3.2'de verilen karışım oranlara göre cDNA reaksiyon karışımı -20°C'lik mini soğutucu üzerinde hazırlandı (Şekil 3.15). Gen ekspresyon datalarının normalizasyonu için 18S ribozomal RNA, housekeeping gen olarak kullanıldı.

Tablo 3. 2: cDNA reaksiyon karışımı

cDNA Reaksiyon Bileşenleri	Hacim (µl)
5X iScript Reaction Mix	4
iScript Reverse Transcriptase	1
Nükleaz içermeyen su	Değişken (Variable)
RNA şablonu (random primer)	Değişken (Variable)
Total Hacim	20

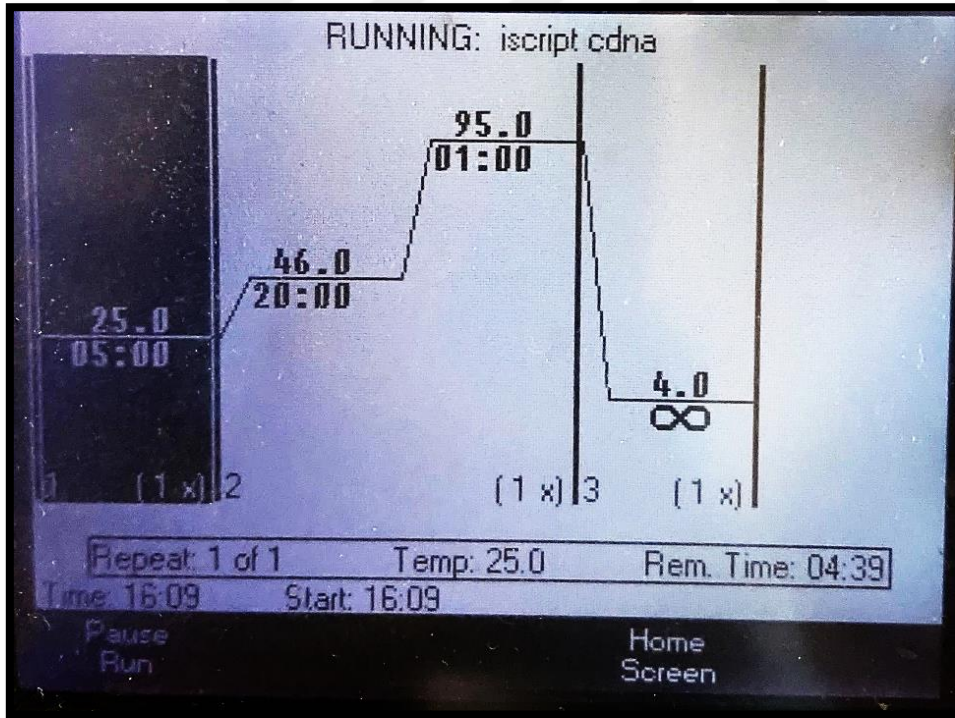
Hazırlanan reaksiyon karışımı, Dycal, ThereCal LC, Neo Putty MTA, Harvard BioCal ve kontrol grubu olarak etiketlenerek 15 PCR tüpüne 20'şer µL olarak dağıtıldı. Tablo 3.3'te verilen protokol doğrultusunda, Thermal Cycler (Sensoquest, Almanya) cihazında revers transkripsiyon gerçekleştirildi (Şekil 3.16, Şekil 3.17).

Tablo 3. 3: cDNA sentez reaksiyon protokolü

Aşamalar	Süre/Sıcaklık
Hazırlık	5 dakika, 25 °C
Revers transkripsiyon	20 dakika, 46 °C
RT inaktivasyonu	1 dakika, 95 °C
Son aşama	∞, 4 °C



Şekil 3. 15: cDNA reaksiyon karışımının hazırlandığı -20°C'lik mini soğutucu



Şekil 3. 16: cDNA sentez reaksiyon protokolü şeması



Şekil 3. 17: Thermal Cycler (termal sıcaklık döngüsü) cihazı (Sensoquest, Almanya)

3.2.10. Gerçek Zamanlı Revers Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu-Real Time PCR (RT-qPCR)

Gerçek zamanlı revers transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu için hazırlanan mater mix solüsyonu, (Tablo 3.5) QuantiTect SYBR Green PCR Kiti (#204145, Qiagen, Hilden, Almanya) kullanılarak üretici talimatlarına uyularak, dH₂O (deiyonize su) ve her primerden 10 pmol (primerlerin dizileri Tablo 3.4’te verilmiştir) olacak şekilde karıştırıldı. QuantiTect SYBR Green PCR Kit’inde (#204145, Qiagen, Hilden, Almanya) 10 ul’lik bir son hacmin elde edilmesi için 800 ng cDNA’lar da eklendi. Gen ekspresyon datalarının normalizasyonu için 18S rRNA, ekspresyon seviyelerinin ortalaması için kullanıldı. Real Time PCR deneyleri, iCycler RT-PCR sistem analizi (Bio-Rad, Hercules, CA) aracılığıyla Tablo 3.6’da verilen protokole göre 96 kuyucuklu RT-qPCR kültür kapları kullanılarak gerçekleştirildi.

Tablo 3. 4: RT-qPCR'da ekspresyonu çalışılan genlere ait primer dizileri

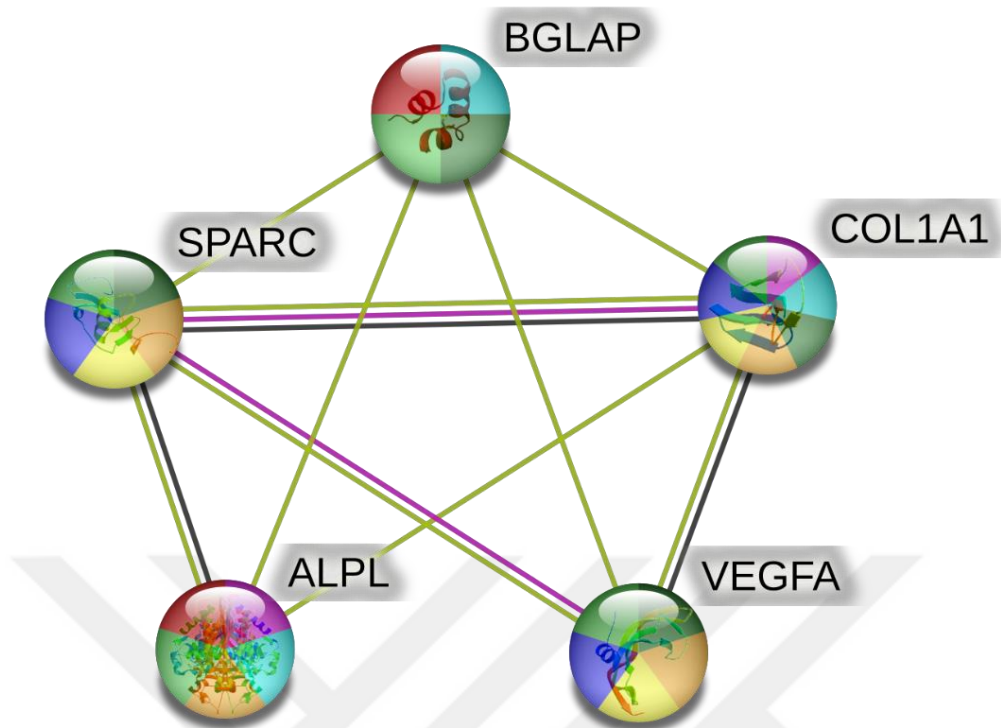
Gen	Yön	Primer Prob Dizisi
SPARC (Osteonektin)	Forward	5'-CCCTCTGCGTGCTCCTCTTA-3'
	Reverse	5'-GCATCGCACTGCTCAAAGAA-3'
ALP	Forward	5'-GCTGTAAGGACATCGCCTACCA-3'
	Reverse	5'-CCTGGCTTTCTCGTCACTCTCA-3'
OCN (Osteokalsin, BGLAP)	Forward	5'-CGCTACCTGTATCAATGGCTGG-3'
	Reverse	5'-CTCCTGAAAGCCGATGTGGTCA-3'
VEGF	Forward	5'- TTGCCTTGCTGCTCTACCTCCA -3'
	Reverse	5'-GATGGCAGTAGCTGCGCTGATA-3'
Col1A1 (Kollajen tip 1 alfa 1)	Forward	5'-GATTCCCTGGACCTAAAGGTGC-3'
	Reverse	5'- AGCCTCTCCATCTTTGCCAGCA -3'
18S rRNA	Forward	5'- TGTGCCGCTAGAGGTGAAATT -3'
	Reverse	5'- TGGCAAATGCTTTTCGCTTT -3'

Tablo 3. 5: RT-qPCR'da her primer için gerekli olan master mix solüsyonu karışım oranları

Reaktif	Miktar
Deiyonize su	32 µL
SYBR Green	100 µL
Forward Primer	10 µL
Reverse Primer	10 µL

Tablo 3. 6: Real Time qPCR protokolü

Bölüm	Döngü	Step	Süre	Sıcaklık
Başlangıç Bozunması (Initial denaturation)	1	1	5 dakika	95 °C
Bozunma (Denatürasyon)	40	1	60 saniye	95 °C
Primer Bağlama (Annealing)		2	60 saniye	55 °C
Uzama (Extension)		3	60 saniye	72 °C
Son Uzama (Final Extension)	1	1	10 dakika	72 °C
Erime Eğrisi	110	1	12 saniye	-0.5 °C/döngü
Son	1	1	-	4°C



Şekil 3. 18: ALPL, VEGF, COL1A1, SPARC(Osteonektin), BGLAP(OCN) isimli genlerin STRING network haritası analiz grafiği (164)

Functional enrichments in your network					explain columns
Biological Process (Gene Ontology)					
GO-term	description	count in network	strength	false discovery rate	
GO:0034505	Tooth mineralization	2 of 16	2.69	0.0057	
GO:0042476	Odontogenesis	3 of 120	1.99	0.0024	
GO:0071363	Cellular response to growth factor stimulus	4 of 494	1.5	0.0024	
Cellular Component (Gene Ontology)					
GO-term	description	count in network	strength	false discovery rate	
GO:0031012	Extracellular matrix	4 of 527	1.47	0.0045	
Reactome Pathways					
pathway	description	count in network	strength	false discovery rate	
HSA-76002	Platelet activation, signaling and aggregation	3 of 260	1.65	0.0368	
Subcellular localization (COMPARTMENTS)					
compartment	description	count in network	strength	false discovery rate	
GOCC:0062023	Collagen-containing extracellular matrix	3 of 197	1.78	0.0239	
GOCC:0005576	Extracellular region	5 of 2035	0.98	0.0239	
Annotated Keywords (UniProt)					
keyword	description	count in network	strength	false discovery rate	
KW-0091	Biomineralization	2 of 31	2.4	0.0106	

Şekil 3. 19: ALPL, VEGF, COL1A1, SPARC(Osteonektin), BGLAP(OCN) isimli genlerin STRING network haritası renklendirme tanımları (164)

3.2.11. SEM görüntüleme

Kuafaj materyallerinin dental pulpa kök hücreleri üzerindeki morfolojik değişimleri ve yüzey yapısı taramalı elektron mikroskobu (SEM-Scanning electron microscopy) ile görüntülendi. Dycal (Dentsply), ThereCal LC, NeoPutty MTA (NuSmile) ve Harvard BioCal-Cap örnekleri 22 x 22 mm'lik cam lamel üzerine yerleştirildi. Her malzemeden beş lamel örnek hazırlandı. Her lamel üzerine 1×10^5 hücre olacak şekilde dental pulpa kök hücreleri ekildi. 48 saatlik kültür ve inkübasyon süresinin ardından toplanan örnekler, 2 saat boyunca +4 derecede, %2,5'lik glutaraldehit- 0,1 M sodyum kakodilat ile fikse edildi. Daha sonra fikse edilen hücreler PBS ile 3 kere yıkandı. Yüzde 30, 40, 50, 70, 90, 95 ve 100'lük alkol dilüsyonları ile dehidre edildi. Örnekler alüminyum tutucular üzerine yerleştirildi ve püskürtme yapıp altın/paladyum ile kaplandı (BAL-TEC SCD 005, İsviçre). Son olarak, altın/paladyum kaplı numuneler, 100x, 250x, 500x, 1000x, 2000x, 2500x ve 5000x büyütme kullanılarak SEM ile incelendi. SEM görüntüleri SEM Zeiss EVO 40 (Jena, Almanya) kullanılarak değerlendirildi.

3.2.12. İstatistiksel Analiz

Tez çalışmasının sonuçları, deney grupları arasındaki anlamlılığı belirtmek için kullanılan "GraphPad Prism 8.0.2." (GraphPad Prism, San Diego, CA) programı ile gerçekleştirildi. Hücre canlılığı-MTS sonuçları ve RT-qPCR'da gen ekspresyon bulgularının grup içi ve gruplar arası karşılaştırılmalı analizi için Tukey-testi ve Two way Anova metodu kullanılmıştır. Kontrol grubu ile karşılaştırılan ROS bulgularının değerlendirilmesi için Dunn Bonferroni düzeltmeli Bartlett testi kullanılmıştır.

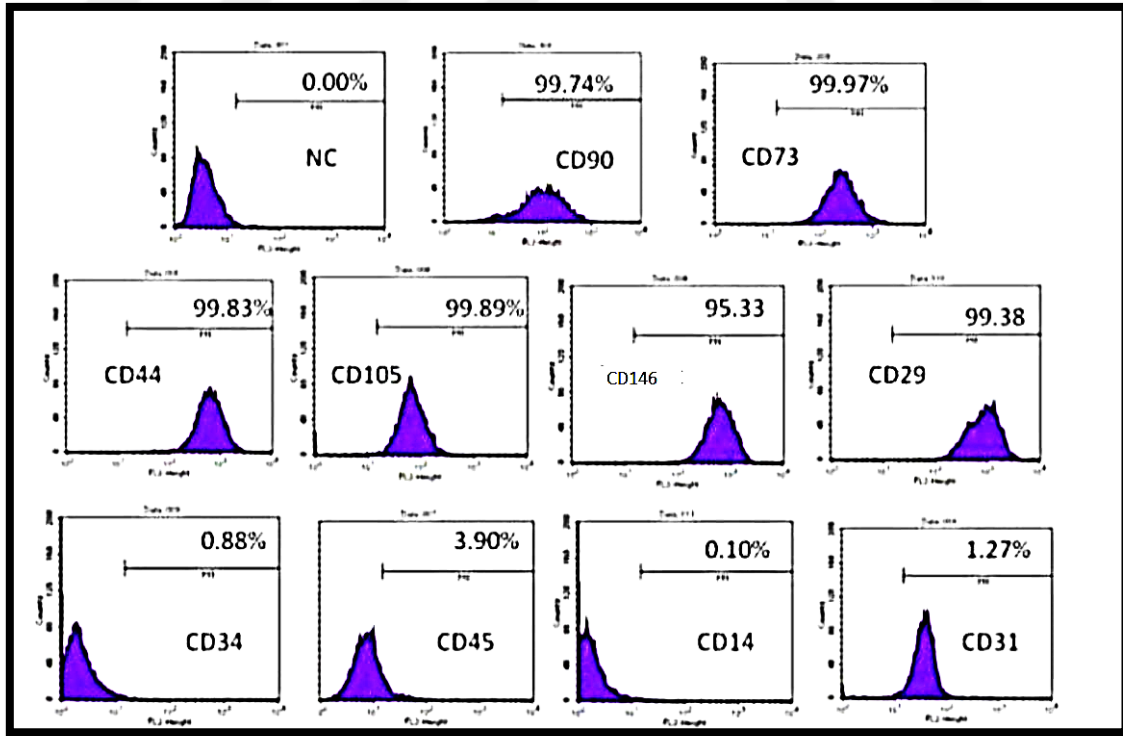
İstatistiksel anlamlılıkta kullanılan sembollerden; $p > 0.05$ (ns) istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamasını, $p \leq 0.05$ (*) sınırda anlamlılığın bulunmasını, $p \leq 0.01$ (**) istatistiksel anlamlılığı, $p \leq 0.001$ (***) istatistiksel anlamlılığın yüksek düzeyde olduğunu ve $p \leq 0.0001$ (****) istatistiksel anlamlılığın çok yüksek düzey olduğunu ifade etmektedir.

4. BULGULAR

4.1. İZOLE EDİLEN KÖK HÜCRELERİN FLOW SİTOMETRİ İLE KARAKTERİZASYONUNUN BELİRLENMESİ

24 saatlik inkübasyon periyodunun ardından dental pulpa kök hücrelerinin (P0) flow sitometri analizi ile marker ekspresyonları belirlenip karakterizasyonu yapılmıştır. Bu analiz sonucunda mezenkimal kök hücre belirteci olan CD90, CD73, CD44, CD105, CD146 ve CD29 yüzey işaretlerini gösterirken, hematopoetik kök hücre belirteci olan CD34, CD45, CD14 ve CD31 yüzey işaretlerini göstermediği görülmüştür.

Mezenkimal kök hücre yüzey belirteçlerinden; CD90 %99.74, CD73 %99.97, CD44 %99.83, CD105 %99.89 iken CD146'da %95.33 pozitif ekspresyon kaydedilmiştir. Hematopoetik kök hücre yüzey belirteçlerinden CD34 %0.88, CD45 %3.90, CD14 %0.10 iken CD31 %1.27 olarak kaydedilmiştir (Şekil 4.1).

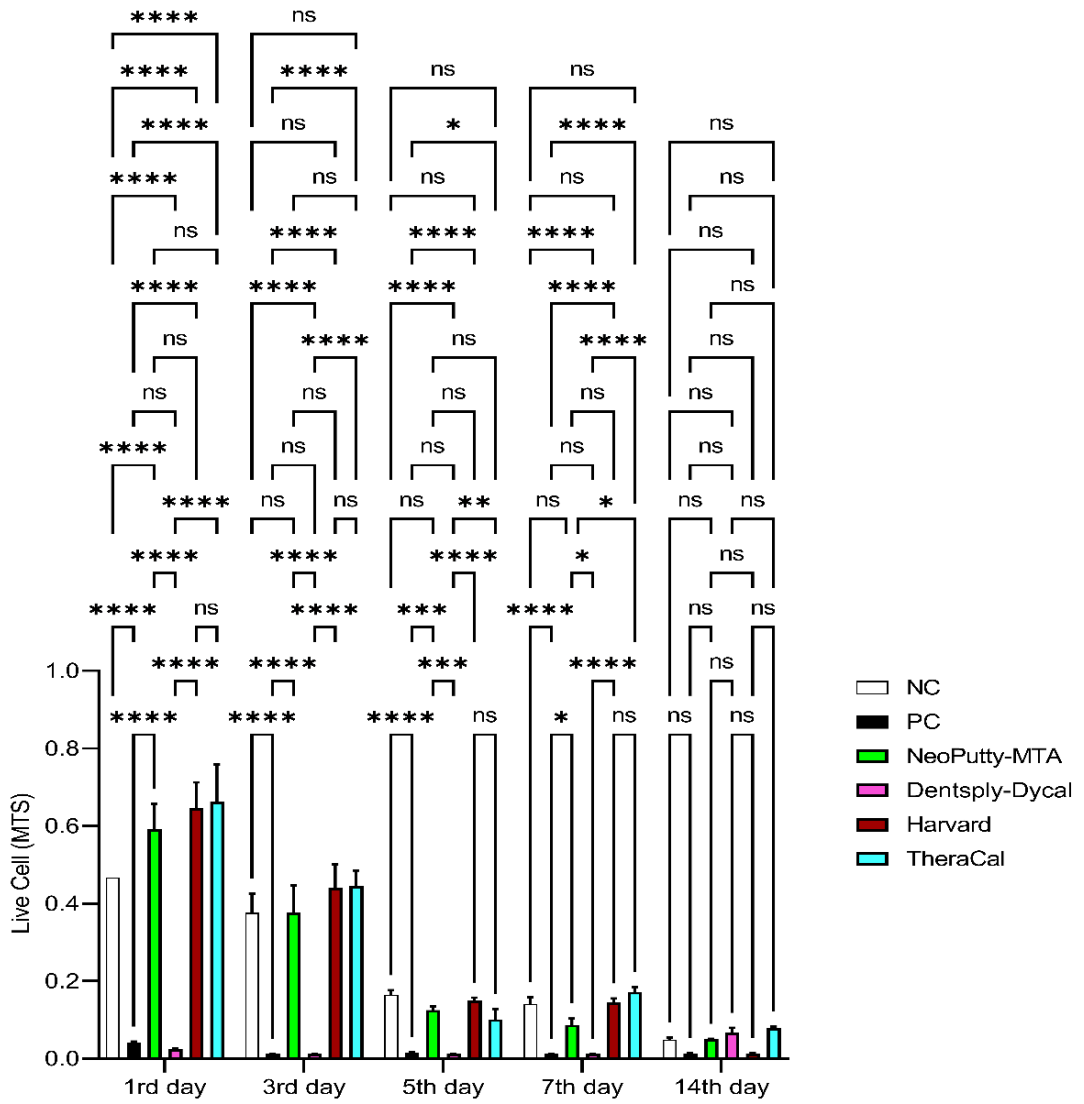


Şekil 4. 1: Kök hücrelerin marker ekspresyonlarının flow sitometri analizi ile belirlenmesi

4.2. HÜCRE CANLILIĞI-MTS TESTİ ANALİZ SONUÇLARI

Negatif kontrol, pozitif kontrol, Dycal (Dentsply), TheraCal LC, NeoPutty MTA ve Harvard BioCal-Cap olmak üzere 6 grubun hücre canlılığı analizi; 3-(4,5-di- methyl-thiazol-2-yl)-5-(3-carboxy-methoxy-phenyl)-2-(4-sulfo-phenyl) -2H- tetrazolium (MTS)- metodu (CellTiter96 AqueousOne Solution; Promega, Southampton, UK) kullanılarak 1. 3. 5. 7. ve 14. günler için ayrı ayrı yapılmıştır.

4.2.1. Materyallerin Hücre Canlılığı-MTS Testi Sonuçlarının Zamana Göre Gruplar Arası Karşılaştırmalı Analizi



Şekil 4. 2: Materyallerin hücre canlılığı-MTS testi sonuçlarının zamana göre gruplar arası karşılaştırmalı analizi *

* $p > 0.05$ (ns) istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamasını, $p \leq 0.05$ (*) sınırda anlamlılığın bulunmasını, $p \leq 0.01$ (**) istatistiksel anlamlılığı, $p \leq 0.001$ (***) istatistiksel anlamlılığın yüksek düzeyde olduğunu ve $p \leq 0.0001$ (****) istatistiksel anlamlılığın çok yüksek düzey olduğunu ifade etmektedir.

1. Gün: 4 farklı kuafaj materyalinin MTS değerleri negatif kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, hücre canlılığının yüksek olduğu görülürken istatistiksel ($p \leq 0.0001$ (****)) olarak çok yüksek düzey anlamlılık görülmektedir. Pozitif kontrol grubu ile NeoPutty MTA, TheraCal LC, Harvard BioCal-Cap MTS canlılık değerleri karşılaştırıldığında istatistiksel ($p \leq 0.0001$ (****)) olarak çok yüksek düzey anlamlılık belirlenmişken, pozitif kontrol grubu ile Dycal arasında istatistiksel olarak $p > 0.05$ (ns) anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır. Dycal ile diğer kuafaj materyallerinden Harvard BioCal-Cap, NeoPutty MTA ve TheraCal LC'nin MTS canlılık değerleri karşılaştırıldığında istatistiksel ($p \leq 0.0001$ (****)) olarak çok yüksek düzey anlamlılık görülürken, Dycal deney grubu en düşük hücre canlılığı gösteren kuafaj materyali olmuştur (Tablo 4.1). NeoPutty MTA, Harvard BioCal-Cap ve TheraCal LC'nin kendi aralarındaki ikili karşılaştırmalarında istatistiksel olarak $p > 0.05$ (ns) anlamlı bir farklılık bulunamamıştır (Şekil 4.2).

Tablo 4. 1: Hücre canlılığı 1. gün MTS testi sonuçları

n=4	NC	PC	NeoPutty MTA	Dycal (Dentsply)	Harvard BioCal	TheraCal LC
Ortalama	0,467	0,0405	0,59225	0,0235	0,6445	0,662
Standart Sapma	0,004472	0,002291	0,055607	0,002693	0,058183	0,082861
cell via	100	8,672377	126,8201	5,03212	138,0086	141,7559

3. Gün: Negatif kontrol grubu ile Dycal'ın MTS canlılık değerleri karşılaştırıldığında istatistiksel ($p \leq 0.0001$ (****)) olarak çok yüksek düzey anlamlılık görülürken, Dycal deney grubunda hücre canlılığı daha düşüktür (Tablo 4.2). Kontrol grubu ile Harvard BioCal-Cap, NeoPutty MTA ve TheraCal LC'nin kendi aralarındaki ikili karşılaştırmada istatistiksel olarak $p > 0.05$ (ns) anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır. Aynı şekilde Dycal ile pozitif kontrol grubu arasında istatistiksel

olarak $p > 0.05$ (ns) anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır. Dycal'ın diğer üç kuafaj materyaline göre hücre canlılığı daha düşük değerler gösterirken Dycal ve diğer kuafaj materyalleri arasında istatistiksel ($p \leq 0.0001$ (****)) olarak çok yüksek düzey anlamlılık bulgulanmıştır (Şekil 4.2).

Tablo 4. 2: Hücre canlılığı 3. gün MTS testi sonuçları

n=4	NC	PC	NeoPutty MTA	Dycal (Dentsply)	Harvard Biocal	TheraCal LC
Ortalama	0,376	0,012	0,37575	0,01225	0,441	0,44575
Standart Sapma	0,042849	0,000707	0,061759	0,00109	0,051851	0,034106
cell via	100	3,191489	99,93351	3,257979	117,2872	118,5505

5. Gün: Negatif kontrol grubu ile Dycal'ın MTS canlılık değerleri karşılaştırıldığında istatistiksel ($p \leq 0.0001$ (****)) olarak çok yüksek düzey anlamlılık görülürken, Dycal deney grubunda hücre canlılığı daha düşüktür (Tablo 4.3). Kontrol grubu ile Harvard BioCal-Cap, NeoPutty MTA ve TheraCal LC'nin kendi aralarındaki ikili karşılaştırmada istatistiksel olarak $p > 0.05$ (ns) anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır. Dycal (Dentsply) ile NeoPutty MTA'nın MTS canlılık değerleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak ($p \leq 0.001$ (**)) anlamlılığın yüksek olduğu belirlenmiştir. Dycal (Dentsply) ile Harvard BioCal-Cap'in MTS canlılık değerleri arasında istatistiksel ($p \leq 0.0001$ (****)) olarak çok yüksek düzey anlamlılık bulunmaktadır. Dycal (Dentsply) ile TheraCal LC'nin MTS canlılık değerlerinin karşılaştırılmalı analizi ise $p \leq 0.01$ (**) istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Şekil 4.2).

Tablo 4. 3: Hücre canlılığı 5. gün MTS testi sonuçları

n= 4	NC	PC	NeoPutty MTA	Dycal Dentsply	Harvard BioCal	TheraCal LC
Ortalama	0,16375	0,01525	0,12475	0,0115	0,149	0,10125
Standart Sapma	0,01028	0,000829	0,008584	0,0005	0,006671	0,023026
cell via	100	9,312977	76,18321	7,022901	90,99237	61,83206

7. Gün: Negatif kontrol grubu ile Dycal'ın MTS canlılık değerleri karşılaştırıldığında istatistiksel ($p \leq 0.0001$ (****)) olarak çok yüksek düzey anlamlılık bulunmakta olup Dycal deney grubunda hücre canlılığı daha düşük değerler göstermiştir (Tablo 4.4). NeoPutty MTA'nın MTS canlılık değerleri ile Dycal, NeoPutty MTA ile TheraCal LC'nin değerleri arasında istatistiksel olarak $p \leq 0.05$ (*) sınırdaki bir anlamlılık belirlenirken en yüksek hücre canlılığı TheraCal LC deney grubunda, en düşük hücre canlılığı ise Dycal deney grubunda bulunmuştur (Tablo 4.4). NeoPutty MTA ile Harvard BioCal-Cap'in ikili karşılaştırılmasında istatistiksel olarak $p > 0.05$ (ns) anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır. Dycal ile Harvard BioCal-Cap ve TheraCal LC arasında istatistiksel ($p \leq 0.0001$ (****)) olarak çok yüksek düzey anlamlılık belirlenmiştir. Harvard BioCal-Cap ile TheraCal LC'nin MTS canlılık değerleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak $p > 0.05$ (ns) anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır (Şekil 4.2).

Tablo 4. 4: Hücre canlılığı 7. gün MTS testi sonuçları

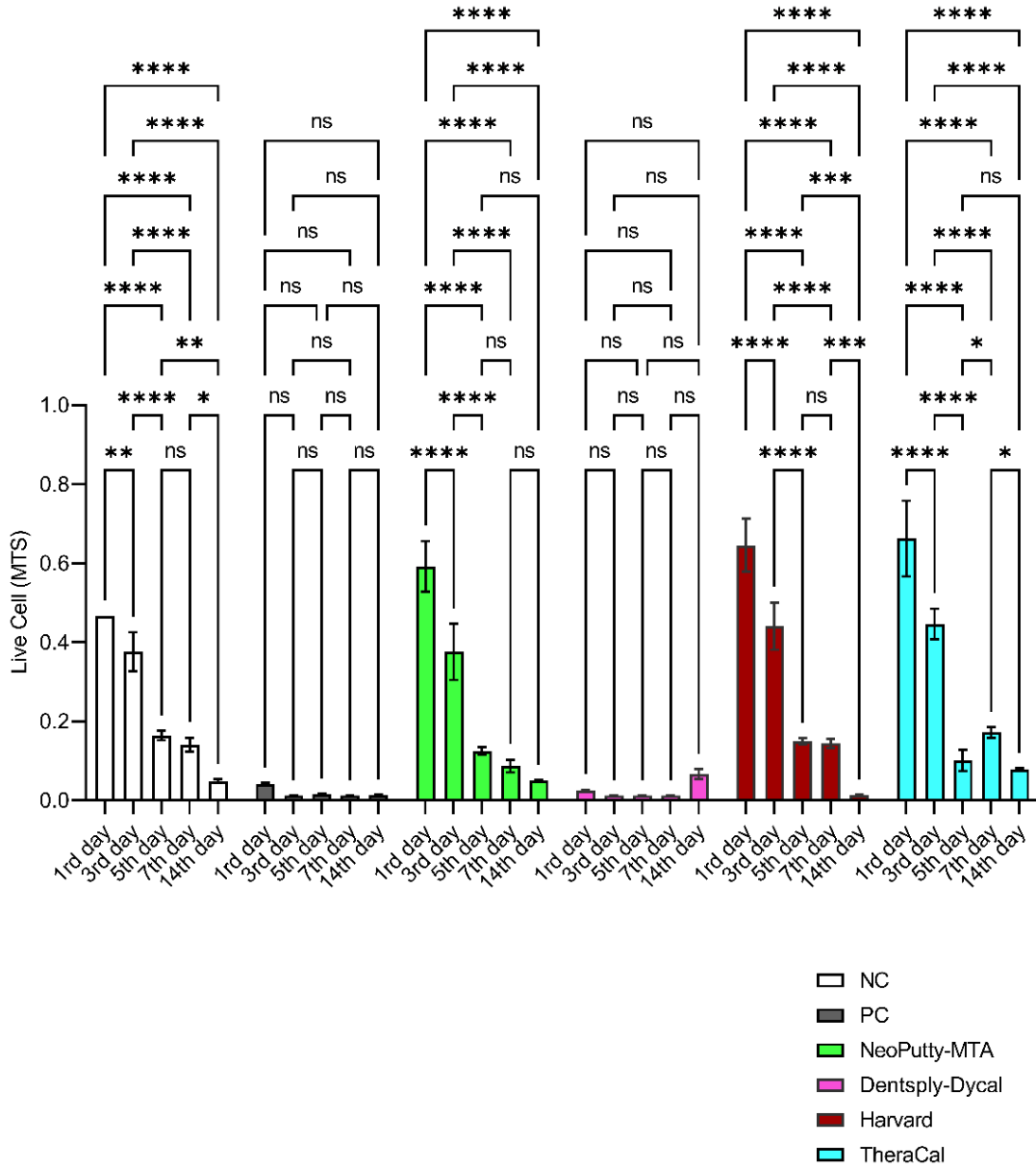
n=4	NC	PC	NeoPutty MTA	Dycal (Dentsply)	Harvard BioCal	TheraCal LC
Ortalama	0,1405	0,0115	0,087	0,0115	0,1435	0,17225
Standart Sapma	0,015532	0,0005	0,013838	0,0005	0,009206	0,011121
cell via	100	8,185053	61,92171	8,185053	102,1352	122,5979

14. Gün: Negatif kontrol grubu, pozitif kontrol grubu, Neo Putty MTA, Dycal, Harvard BioCal-Cap ve TheraCal LC'nin birbirleri ile MTS canlılık verileri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak $p > 0.05$ (ns) anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır (Şekil 4.2).

Tablo 4. 5: Hücre canlılığı 14. gün MTS testi sonuçları

n=4	NC	PC	NeoPutty MTA	Dycal (Dentsply)	Harvard BioCal	TheraCal LC
Ortalama	0,0485	0,0125	0,05	0,0665	0,013	0,0775
Standart Sapma	0,0045	0,0015	0,001	0,0115	0,001	0,0035
cell via	100	25,7732	103,0928	137,1134	26,80412	159,7938

4.2.2. Materyallerin Hücre Canlılığı-MTS Testi Sonuçlarının Zamana Göre Grup İçi Karşılaştırmalı Değerlendirilmesi



Şekil 4. 3: Materyallerin hücre canlılığı-MTS testi sonuçlarının zamana göre grup içi karşılaştırmalı değerlendirilmesi *

* $p > 0.05$ (ns) istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamasını, $p \leq 0.05$ (*) sınırda anlamlılığın bulunmasını, $p \leq 0.01$ (**) istatistiksel anlamlılığı, $p \leq 0.001$ (***) istatistiksel anlamlılığın yüksek düzeyde olduğunu ve $p \leq 0.0001$ (****) istatistiksel anlamlılığın çok yüksek düzey olduğunu ifade etmektedir.

Negatif Kontrol Deney Grubu: 1.gün ile 5.gün, 7.gün ve 14.gün arasında MTS canlılık değerleri arasında istatistiksel olarak ($p \leq 0.0001$ (****)) çok yüksek düzey anlamlılık bulunmaktadır. 1.gün ile 3.gün ve 5.gün ile 14.gün MTS canlılık değerleri karşılaştırıldığında $p \leq 0.01$ (**) istatistiksel olarak anlamlıdır. 7.gün ile 14.gün verileri arasında istatistiksel olarak ($p \leq 0.05$ (*)) sınırda anlamlılık görülmüşken 5.gün ile 7.gün MTS canlılık değerleri arasında istatistiksel olarak $p > 0.05$ (ns) anlamlı bir farklılık belirlenmemiştir (Şekil 4.3).

Pozitif Kontrol Deney Grubu: 1.gün, 3.gün, 5.gün, 7.gün ve 14.gün için MTS canlılık değerleri ikili olarak karşılaştırıldığında istatistiksel olarak $p > 0.05$ (ns) anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır (Şekil 4.3).

NeoPutty MTA Deney Grubu: 1.gün ile diğer günler arasında MTS canlılık değerleri arasında istatistiksel olarak ($p \leq 0.0001$ (****)) çok yüksek düzey anlamlılık bulunmaktadır. Aynı şekilde 3.gün ile diğer günler arasında da istatistiksel olarak ($p \leq 0.0001$ (****)) çok yüksek düzey anlamlılık olduğu belirlenmiştir. 5.gün ile 7.gün, 5.gün ile 14.gün ve 7.gün ile 14.gün için MTS canlılık değerleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak $p > 0.05$ (ns) anlamlı bir farklılık görülmektedir (Şekil 4.3).

Dycal (Dentsply) Deney Grubu: 1.gün, 3.gün, 5.gün, 7.gün ve 14.gün için MTS canlılık değerleri ikili olarak karşılaştırıldığında istatistiksel olarak $p > 0.05$ (ns) anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır (Şekil 4.3).

Harvard BioCal-Cap Deney Grubu: 1.gün ile diğer günler arasında MTS canlılık değerleri istatistiksel olarak ($p \leq 0.0001$ (****)) çok yüksek düzey anlamlılık göstermektedir. Aynı şekilde 3.gün ile diğer günler arasında istatistiksel olarak ($p \leq 0.0001$ (****)) çok yüksek düzey anlamlılık bulunmaktadır. 5.gün ile 7.gün MTS canlılık değerleri karşılaştırılmasında istatistiksel olarak $p > 0.05$ (ns) anlamlı bir farklılık bulunmazken 5.gün ile 14.gün MTS canlılık değerleri arasında istatistiksel olarak ($p \leq 0.001$ (**)) anlamlılığın yüksek olduğu görülmektedir. 7.gün ile 14.gün değerleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak ($p \leq 0.001$ (**)) anlamlılığın yüksek olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.3).

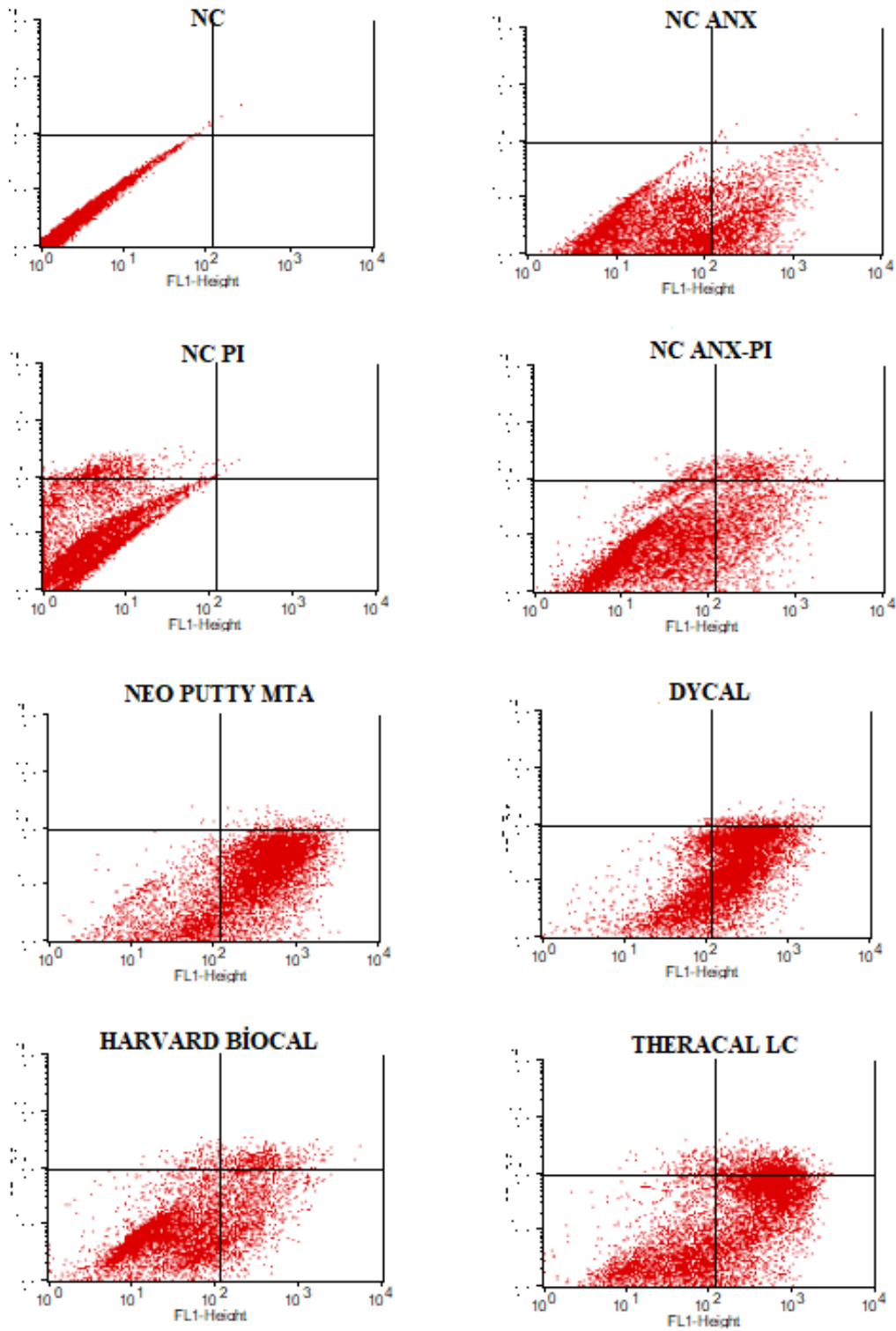
TheraCal LC Deney Grubu: 1.gün ile diğer günler arasında MTS canlılık değerleri istatistiksel olarak ($p \leq 0.0001$ (****)) çok yüksek düzey anlamlılık göstermektedir. Aynı şekilde 3.gün ile diğer günler arasında istatistiksel olarak ($p \leq 0.0001$ (****)) çok yüksek düzey anlamlılık bulunmuştur. 5.gün ile 7.gün ve 7.gün ile

14.gün MTS canlılık değerleri arasında istatistiksel olarak ($p \leq 0.05(*)$) sınırda anlamlılık belirlenmiştir. 5.gün ile 14.gün MTS canlılık değerleri arasında ise istatistiksel olarak $p > 0.05$ (ns) anlamlı bir farklılık bulunamamıştır (Şekil 4.3).

4.3. ANNEXİN V- PROPİDYUM İYODÜR (PI) İLE APOPTOZ-NEKROZ TAYİNİ-FLOW SİTOMETRİ ANALİZİ

4.2.1. Annexin V- Propidyum İyodür (PI) ile Apoptoz-Nekroz Tayini-Flow Sitometri Analizinde 7. ve 14. Güne ait Bulgular

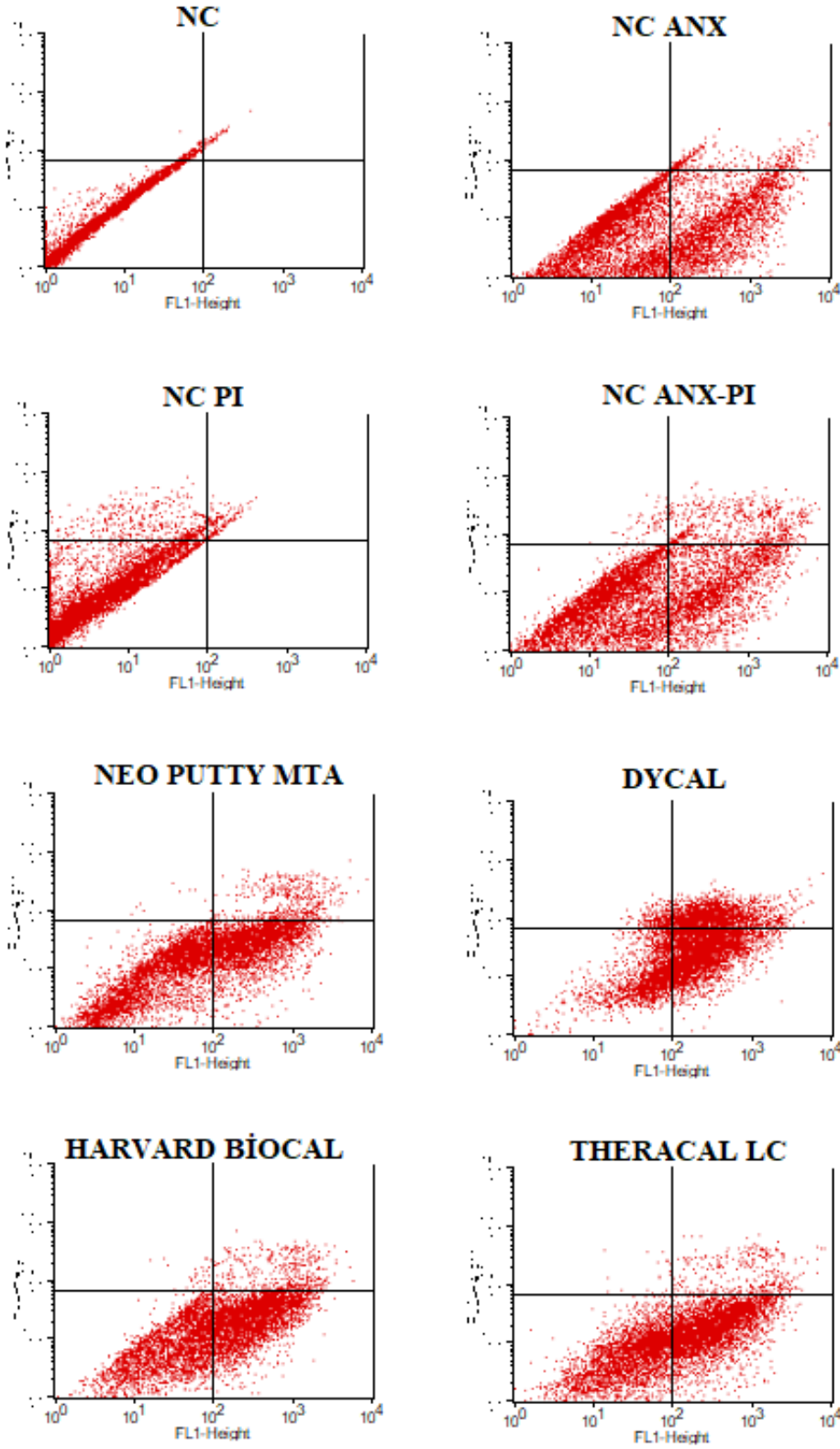
Negatif kontrol grubu, negatif kontrol Annexin V grubu, negatif kontrol PI grubu, negatif kontrol Annexin V-PI grubu ile kuafaj materyallerinin 7. güne ait flow sitometri grafiği Şekil 4.4'te, 14. güne ait akım sitometri grafiği Şekil 4.5'te verilmiştir. 1.gün sonuçları n=4 tekrar almak üzere yapılmış ve anlamlı sonuçlar kaydedilememiştir. Flow sitometri analiz grafiğinde canlı dental pulpa kök hücre grubu alt-sol alan (LL), nekrotik hücre grubu üst-sol alan (UL), geç apoptotik hücre grubu üst-sağ alan (UR), erken apoptotik hücre grubu alt-sağ alan (LR) şeklinde gösterilmektedir.



Şekil 4. 4: Negatif kontrol grubu, negatif kontrol Annexin V grubu, negatif kontrol PI grubu, negatif kontrol Annexin V-PI grubu ile 4 farklı kuafaj materyalinin 7. güne ait flow sitometri analizi (x: Annexin y: PI)

Tablo 4. 6: Negatif kontrol grubu, negatif kontrol Annexin V grubu, negatif kontrol PI grubu, negatif kontrol Annexin V-PI grubu ile 4 farklı kuafaj materyalinin 7. güne ait flow sitometri analiz bulguları

	Canlı Hücre Yüzdesi (LL)	Erken Apoptozdaki Hücre Yüzdesi (LR)	Geç Apoptozdaki Hücre Yüzdesi (UR)	Nekroz Hücre Yüzdesi (UL)
NC	%99,81	%0,00	%0,03	%0,16
NC ANX	%75,08	%24,70	%0,19	%0,03
NC PI	%93,18	%0,00	%0,09	%6,73
NC ANX-PI	%77,33	%15,34	%5,38	%1,94
NeoPutty MTA	%27,23	%70,64	%2,07	%0,06
Dycal (Dentsply)	%29,36	%66,36	%4,08	%0,19
Harvard BioCal-Cap	%75,59	%16,23	%6,36	%1,83
TheraCal LC	%35,00	%48,84	%14,21	%1,95



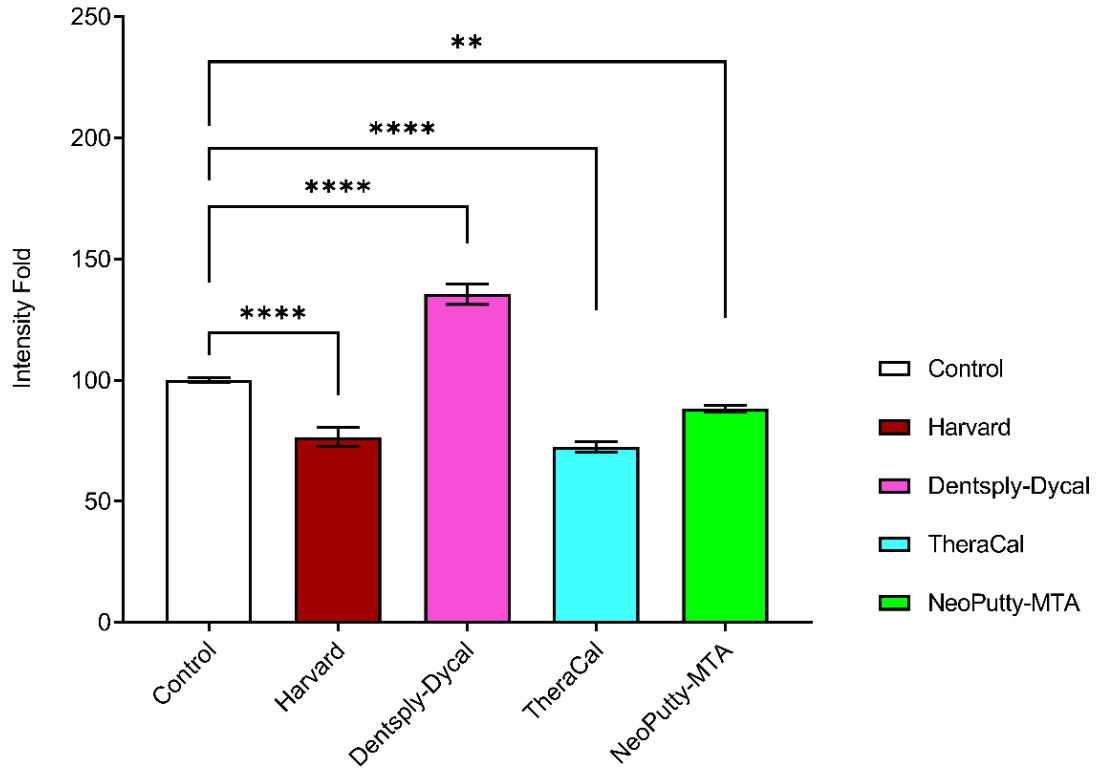
Şekil 4. 5: Negatif kontrol grubu, negatif kontrol Annexin V grubu, negatif kontrol PI grubu, negatif kontrol Annexin V-PI grubu ile 4 farklı kuafaj materyalinin 14. güne ait flow sitometri analizi (x: Annexin y: PI)

Tablo 4. 7: Negatif kontrol grubu, negatif kontrol Annexin V grubu, negatif kontrol PI grubu, negatif kontrol Annexin V-PI grubu ile 4 farklı kuafaj materyalinin 14. güne ait flow sitometri cihazı analiz bulguları

	Canlı Hücre Yüzdesi (LL)	Erken Apoptozdaki Hücre Yüzdesi (LR)	Geç Apoptozdaki Hücre Yüzdesi (UR)	Nekroz Hücre Yüzdesi (UL)
NC	%97,28	%0,00	%0,61	%2,11
NC ANX	%63,60	%32,53	%3,72	%0,15
NC PI	%91,22	%0,00	%2,00	%6,78
NC ANX-PI	%61,91	%29,26	%7,91	%0,93
NeoPutty MTA	%54,53	%39,14	%6,12	%0,22
Dycal (Dentsply)	%23,70	%46,78	%25,69	%3,84
Harvard BioCal-Cap	%43,45	%49,77	%6,27	%0,51
TheraCal LC	%44,37	%51,01	%4,33	%0,29

4.4. HÜCRE İÇİ SERBEST RADİKAL DEĞİŞİMİ ANALİZİ (ROS)

Hücre içi artan serbest radikaller hücre DNA'sında hasara yol açarak apoptozis mekanizmasını tetikleyen en önemli mekanizmalardan birisidir. Kuafaj materyallerinin hücrelerde oluşturduğu hücre içi serbest radikal ölçümü (ROS), DCFDA- Cellular ROS Assay Kit (Abcam) kullanılarak analiz edilmiştir.



Şekil 4. 6: Kuafaj materyallerinin hücrelerde oluşturduğu hücre içi serbest radikal ölçümü (ROS) nün istatistiksel analizi (intensity fold, %) *

** $p \leq 0.01$ (**) istatistiksel anlamlılığı ve $p \leq 0.0001$ (****) istatistiksel anlamlılığın çok yüksek düzey olduğunu ifade etmektedir.*

Pulpa kuafaj materyalleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, Dycal deney grubu %135,47 yoğunluğunda hücre içi serbest radikal oluşturarak en yüksek ROS değeri gözlenen kuafaj materyali olmuştur. Dycal'ı %88,14 ile NeoPutty MTA izlemektedir. Kontrol grubuna göre Harvard BioCal-Cap deney grubunda %76,54 yoğunlukta hücre içi

serbest radikal oluşumu gözlenirken, TheraCal LC deney grubunda %72,54 ile en az hücre içi serbest radikal yoğunluğu görülmektedir (Tablo 4.8).

Kontrol deney grubuna göre Dycal (Dentsply) deney grubu ROS ölçüm değerleri istatistiksel olarak $p \leq 0.0001$ (****) çok yüksek düzey anlamlılık göstermekteyken Dycal ROS'u arttıran tek kuafaj materyali olarak bulgulanmıştır. NeoPutty MTA deney grubunun kontrol grubuna göre hücre içi serbest radikal yoğunluğu $p \leq 0.01$ (**) istatistiksel olarak anlamlı iken ROS artışı göstermemiştir. Kontrol deney grubuna göre Harvard BioCal-Cap ve TheraCal LC deney gruplarının ROS ölçüm değerleri istatistiksel olarak $p \leq 0.0001$ (****) ile çok yüksek düzey anlamlılık göstermekteyken ROS artışı gözlenmemiştir (Şekil 4.6).

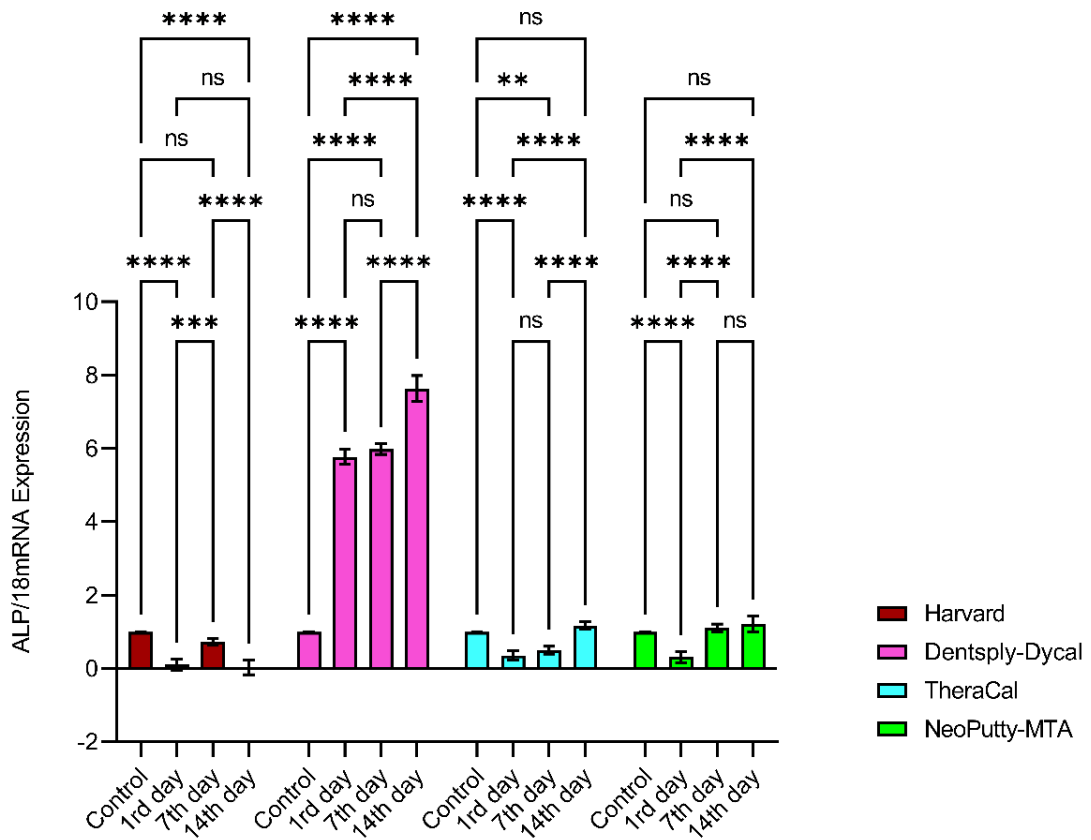
Tablo 4. 8: ROS analiz sonuçları

ROS yoğunluğu				
	Kontrol	Materyal Sonuçları	Standart Sapma	n
Harvard BioCal-Cap	100	76,541	0,1782	3
Dycal (Dentsply)	100	135,475	0,10025	3
TheraCal LC	100	72,546	0,20175	3
NeoPutty MTA	100	88,1402	0,158	3

4.5. GERÇEK ZAMANLI REVERS TRANSKRİPTAZ-POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (RT-qPCR) MRNA GEN EKSPRESYONU ANALİZİ

4.5.1. ALP/18m/RNA Gen Ekspresyonu RT-qPCR Analiz Bulguları

4.5.1.1. Materyallerin ALP/18m/RNA gen ekspresyonu RT-qPCR bulgularının zamana göre grup içi karşılaştırmalı istatistiksel analizi



Şekil 4. 7: Materyallerin ALP/18m/RNA gen ekspresyonu RT-qPCR bulgularının zamana göre grup içi karşılaştırmalı istatistiksel analizi*

* $p > 0.05$ (ns) istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamasını, $p \leq 0.05$ (*) sınırda anlamlılığın bulunmasını, $p \leq 0.01$ (**) istatistiksel anlamlılığı, $p \leq 0.001$ (***) istatistiksel anlamlılığın yüksek düzeyde olduğunu ve $p \leq 0.0001$ (****) istatistiksel anlamlılığın çok yüksek düzey olduğunu ifade etmektedir.

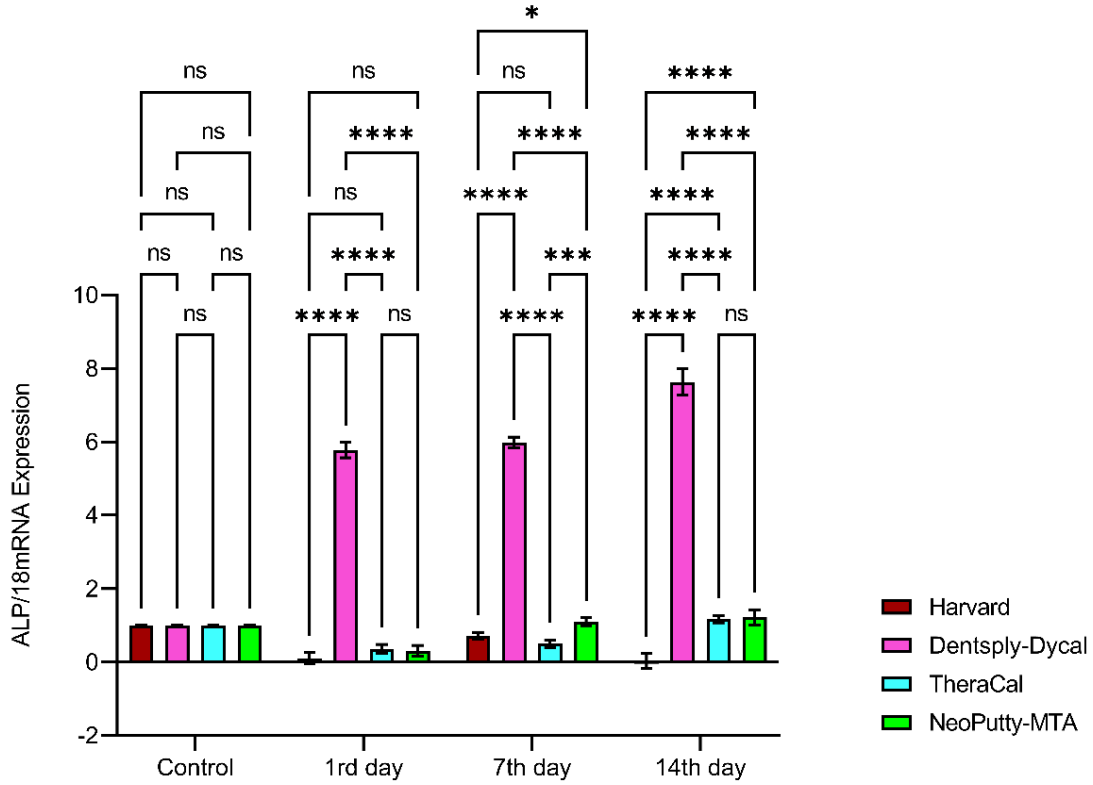
Harvard BioCal-Cap Deney Grubu: 1.gün ALP mRNA gen ekspresyonu ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak çok yüksek düzey anlamlılık ($p \leq 0.0001$ (****)) görülürken, 1. ve 7. gün arasında istatistiksel olarak ($p \leq 0.001$ (***) anlamlılığın yüksek olduğu belirlenmiştir. 1. ve 14. gün değerleri kıyaslandığında istatistiksel olarak $p > 0.05$ (ns) anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır. 7. ve 14. gün değerleri kıyaslandığında istatistiksel olarak ($p \leq 0.001$ (***) anlamlılığın yüksek olduğu görülmektedir. Kontrol grubu ve 7. gün seviyeleri arasında istatistiksel olarak $p > 0.05$ (ns) anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır. Kontrol grubu ve 14. Gün ALP mRNA gen ekspresyon seviyeleri arasında istatistiksel olarak ($p \leq 0.001$ (***) anlamlılığın yüksek olduğu görülmektedir (Şekil 4.7).

Dycal (Dentsply) Deney Grubu: Kontrol grubu ALP mRNA gen ekspresyon değeri ile 1. 7. ve 14. gün değerleri karşılaştırıldığında istatistiksel ($p \leq 0.0001$ (****)) olarak çok yüksek düzey anlamlılık görülmektedir. 1. Gün ALP mRNA gen ekspresyonu değeri ile 7. gün değerleri arasında istatistiksel olarak ($p > 0.05$ (ns)) anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır (Şekil 4.7).

TheraCal LC Deney Grubu: Kontrol grubu ile 1. gün, 7. gün ile 14 gün ve 1. gün ile 14. gün ALP mRNA gen ekspresyon değerleri karşılaştırıldığında istatistiksel $p \leq 0.0001$ (****) olarak çok yüksek düzey anlamlılık görülmektedir. Kontrol grubu ile 7. gün ALP mRNA gen ekspresyonu seviyeleri arasında istatistiksel ($p \leq 0.01$ (**)) olarak anlamlılık bulunmaktadır. Kontrol grubu ile 14.gün ve 1.gün ile 7.gün değerleri arasında istatistiksel olarak ($p > 0.05$ (ns)) anlamlı bir farklılık kaydedilmemiştir (Şekil 4.7).

NeoPutty MTA Deney Grubu: 1. gün ALP mRNA gen ekspresyon değeri kontrol grubu, 7.gün ve 14.gün ile kıyaslandığında istatistiksel ($p \leq 0.0001$ (****)) olarak çok yüksek düzey anlamlılık görülmektedir. Kontrol grubu ile 7. ve 14. gün değerleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak ($p > 0.05$ (ns)) anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır (Şekil 4.7).

4.5.1.2. Materyallerin ALP/18m/RNA gen ekspresyonu RT-qPCR bulgularının zamana göre gruplar arası karşılaştırmalı istatistiksel analizi



Şekil 4. 8: Materyallerin ALP/18m/RNA gen ekspresyonu RT-qPCR bulgularının zamana göre gruplar arası karşılaştırmalı istatistiksel analizi*

* $p > 0.05$ (ns) istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamasını, $p \leq 0.05$ (*) sınırda anlamlılığın bulunmasını, $p \leq 0.01$ (**) istatistiksel anlamlılığı, $p \leq 0.001$ (***) istatistiksel anlamlılığın yüksek düzeyde olduğunu ve $p \leq 0.0001$ (****) istatistiksel anlamlılığın çok yüksek düzey olduğunu ifade etmektedir.

1. Gün: Gruplar karşılaştırıldığında ALP mRNA gen ekspresyonu değerleri 1. gün sonunda büyükten küçüğe doğru; Dycal, TheraCal LC, NeoPutty MTA, Harvard BioCal-Cap şeklindedir. Dycal kuafaj materyali deney grubunun ALP mRNA gen ekspresyon seviyesinin, Harvard BioCal-Cap, TheraCal LC ve NeoPutty MTA deney gruplarının ALP mRNA gen ekspresyon seviyesine göre istatistiksel olarak ($p \leq 0.0001$ (****)) çok yüksek düzeyde anlamlılığın olduğu görülmüştür. Harvard BioCal-Cap, TheraCal LC ve NeoPutty MTA deney grubunun ALP mRNA gen ekspresyon

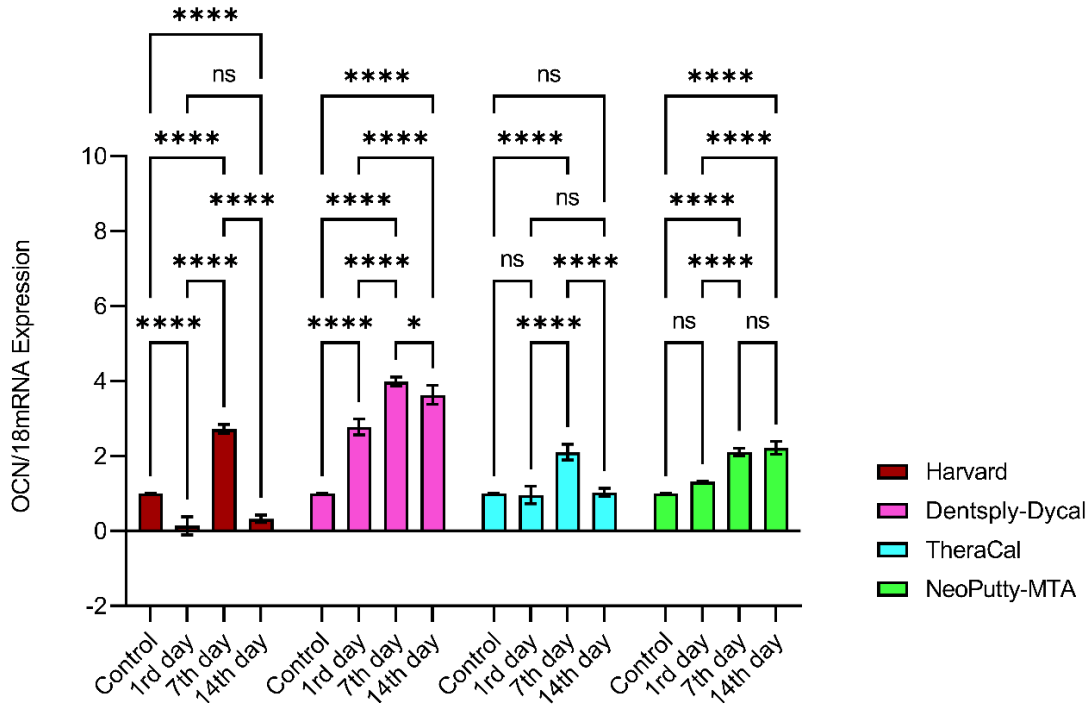
seviyeleri arasında istatistiksel ($p > 0.05(\text{ns})$) olarak anlamlı farklılık bulunamamıştır (Şekil 4.8).

7. Gün: Gruplar karşılaştırıldığında ALP mRNA gen ekspresyonu değerleri 7. gün sonunda büyükten küçüğe doğru; Dycal, NeoPutty MTA, Harvard BioCal-Cap, TheraCal LC olarak sıralanmıştır. NeoPutty MTA'nın ekspresyon seviyesi, TheraCal LC deney grubunun ekspresyon seviyesine göre istatistiksel ($p \leq 0.001(\text{***})$) olarak anlamlılığın yüksek düzeyde olduğunu görülmektedir. NeoPutty MTA deney grubu ile Harvard BioCal-Cap deney grubu arasında istatistiksel olarak ($p \leq 0.05(*)$) sınırda bir anlamlılık söz konusudur. ALP mRNA gen ekspresyonu seviyeleri karşılaştırıldığında, Harvard BioCal-Cap ve TheraCal LC arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p > 0.05(\text{ns})$) (Şekil 4.8).

14. Gün: Gruplar karşılaştırıldığında ALP mRNA gen ekspresyonu değerleri 14. gün sonunda büyükten küçüğe doğru; Dycal, NeoPutty MTA, TheraCal LC, Harvard BioCal-Cap şeklinde sıralanmıştır. Dycal kuafaj materyali deney grubunun ALP mRNA gen ekspresyon seviyesi, Harvard BioCal-Cap, TheraCal LC ve NeoPutty MTA deney gruplarının ALP mRNA gen ekspresyon seviyesine göre istatistiksel olarak ($p \leq 0.0001(\text{****})$) çok yüksek düzeyde anlamlılığın olduğu görülmüştür. NeoPutty MTA ve TheraCal LC'nin ekspresyon seviyeleri, Harvard BioCal-Cap deney grubunun ekspresyon seviyesine göre istatistiksel ($p \leq 0.001(\text{***})$) olarak anlamlılığın yüksek düzeyde olduğu kaydedilmiştir. NeoPutty MTA deney grubu ile TheraCal LC deney grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p > 0.05(\text{ns})$) (Şekil 4.8).

4.5.2. OCN/18m/RNA Gen Ekspresyonu RT-qPCR Analiz Bulguları

4.5.2.1. Materyallerin OCN/18m/RNA gen ekspresyonu RT-qPCR bulgularının zamana göre grup içi karşılaştırmalı istatistiksel analizi



Şekil 4. 9: Materyallerin OCN/18m/RNA gen ekspresyonu RT-qPCR bulgularının zamana göre grup içi karşılaştırmalı istatistiksel analizi*

* $p > 0.05$ (ns) istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamasını, $p \leq 0.05$ (*) sınırda anlamlılığın bulunmasını, $p \leq 0.01$ (**) istatistiksel anlamlılığı, $p \leq 0.001$ (***) istatistiksel anlamlılığın yüksek düzeyde olduğunu ve $p \leq 0.0001$ (****) istatistiksel anlamlılığın çok yüksek düzey olduğunu ifade etmektedir.

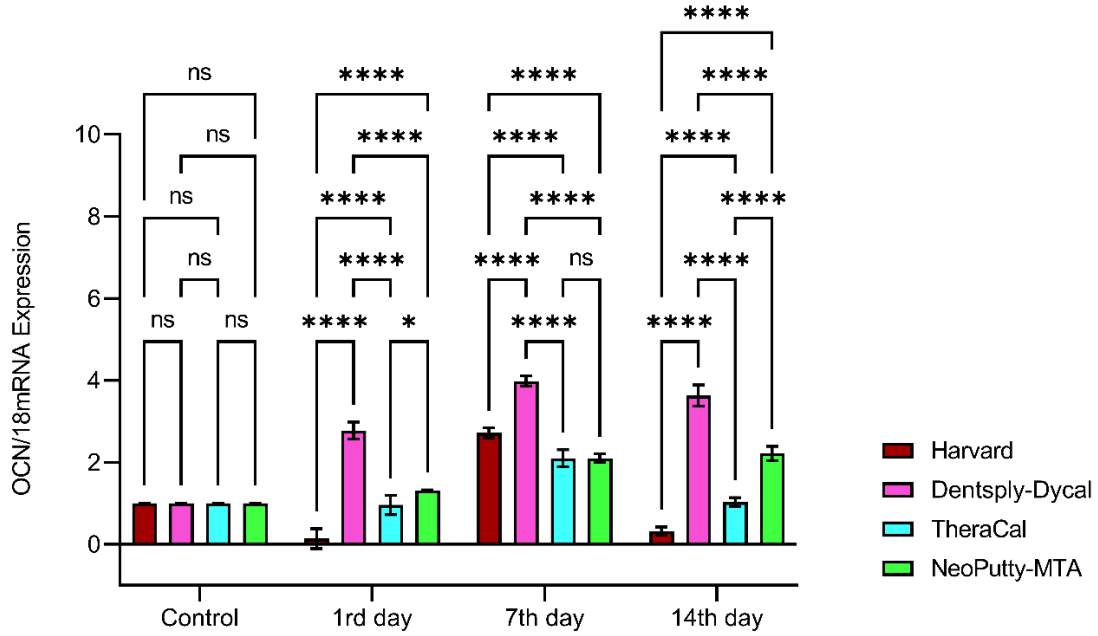
Harvard BioCal-Cap Deney Grubu: Kontrol grubu OCN mRNA gen ekspresyon değeri ile 1., 7., ve 14. gün değerleri karşılaştırıldığında istatistiksel ($p \leq 0.0001$ (****)) olarak çok yüksek düzey anlamlılık görülmektedir. 1. gün OCN mRNA gen ekspresyon değeri ile 7. gün değeri arasında istatistiksel ($p \leq 0.0001$ (****)) olarak çok yüksek düzey anlamlılık gözlenirken 1.gün değeri ile 14. gün OCN mRNA ekspresyon değeri arasında ($p > 0.05$ (ns)) istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır (Şekil 4.9).

Dycal (Dentsply) Deney Grubu: Kontrol grubu OCN mRNA gen ekspresyon değeri ile 1., 7., ve 14. gün değerleri karşılaştırıldığında istatistiksel ($p \leq 0.0001$ (****)) olarak çok yüksek düzey anlamlılık görülmektedir. 1.gün ile 7.gün ve 1. gün ile 14.gün değerleri karşılaştırıldığında aynı şekilde istatistiksel ($p \leq 0.0001$ (****)) olarak çok yüksek düzey anlamlılık bulunmaktadır (Şekil 4.9).

TheraCal LC Deney Grubu: 7. gün OCN mRNA gen ekspresyon değerleri kontrol grubu, 1.gün ve 14.gün ile karşılaştırıldığında istatistiksel ($p \leq 0.0001$ (****)) olarak çok yüksek düzey anlamlılık göstermektedir. Kontrol grubu ile 1.gün ve kontrol grubu ile 14. gün OCN mRNA ekspresyon değeri arasında ($p > 0.05$ (ns)) istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır (Şekil 4.9).

NeoPutty MTA Deney Grubu: Kontrol grubu, 1.gün değerleri ile karşılaştırıldığında ($p > 0.05$ (ns)) istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmazken, 7. ve 14. günlerle istatistiksel ($p \leq 0.0001$ (****)) olarak çok yüksek düzey anlamlılık göstermektedir. 1. gün OCN mRNA gen ekspresyon değerleri 7. ve 14.günlerle karşılaştırıldığında istatistiksel ($p \leq 0.0001$ (****)) olarak çok yüksek düzey anlamlılık kaydedilirken, 7. ve 14.gün OCN mRNA gen ekspresyon değerleri kendi aralarında karşılaştırıldığında ($p > 0.05$ (ns)) istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır (Şekil 4.9).

4.5.2.2. Materyallerin OCN/18m/RNA gen ekspresyonu RT-qPCR bulgularının zamana göre gruplar arası karşılaştırmalı istatistiksel analizi



Şekil 4. 10: Materyallerin OCN/18m/RNA gen ekspresyonu RT-qPCR bulgularının zamana göre gruplar arası karşılaştırmalı istatistiksel analizi*

* $p > 0.05$ (**ns**) istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamasını, $p \leq 0.05$ (*) sınırda anlamlılığın bulunmasını, $p \leq 0.01$ (**) istatistiksel anlamlılığı, $p \leq 0.001$ (***) istatistiksel anlamlılığın yüksek düzeyde olduğunu ve $p \leq 0.0001$ (****) istatistiksel anlamlılığın çok yüksek düzey olduğunu ifade etmektedir.

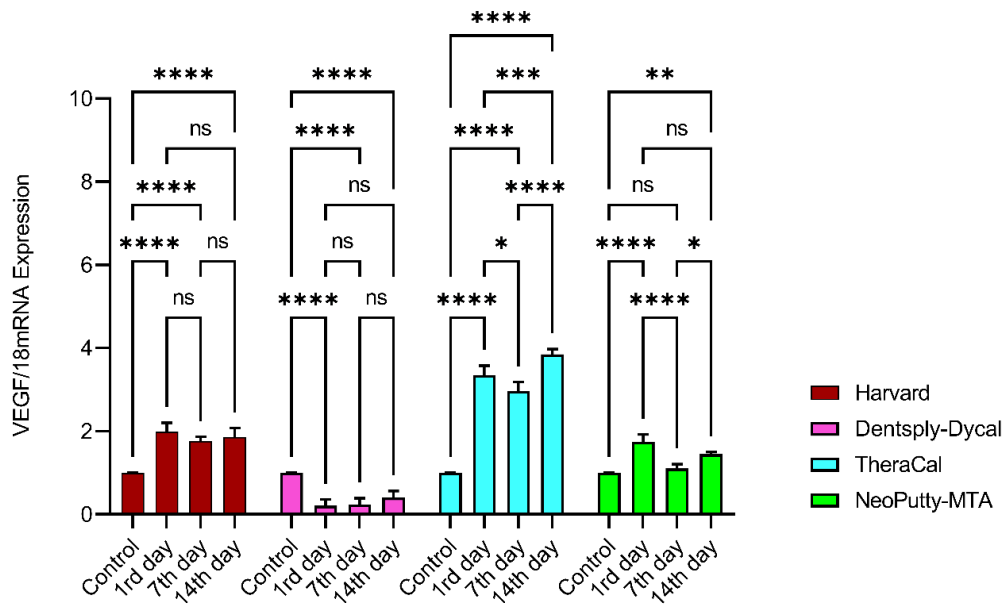
1. Gün: Gruplar karşılaştırıldığında OCN mRNA gen ekspresyonu değerleri 1. gün sonunda büyükten küçüğe doğru; Dycal, NeoPutty MTA, TheraCal LC, Harvard BioCal-Cap şeklinde sıralanmıştır. Dycal ile diğer kuafaj materyallerinden Harvard BioCal-Cap, TheraCal LC, NeoPutty MTA grupları arasında istatistiksel olarak ($p \leq 0.0001$ (****)) olarak çok yüksek düzey anlamlılık görülmektedir. Harvard BioCal-Cap ile diğer kuafaj materyallerinden Dycal, TheraCal LC, NeoPutty MTA grupları arasında istatistiksel olarak ($p \leq 0.0001$ (****)) olarak çok yüksek düzey anlamlılık kaydedilmiştir. TheraCal LC ile NeoPutty MTA deney gruplarının OCN mRNA gen ekspresyon seviyeleri arasında istatistiksel olarak ($p \leq 0.05$ (*)) sınırda anlamlılık bulunmuştur (Şekil 4.10).

7. Gün: Gruplar karşılaştırıldığında OCN mRNA gen ekspresyonu değerleri 7. gün sonunda büyükten küçüğe doğru; Dycal, Harvard BioCal-Cap, TheraCal LC, NeoPutty MTA olarak sıralanmıştır. Dycal ile diğer kuafaj materyallerinden Harvard BioCal-Cap, TheraCal LC, NeoPutty MTA grupları arasında istatistiksel olarak ($p \leq 0.0001$ (****)) olarak çok yüksek düzey anlamlılık görülmektedir. Harvard BioCal-Cap ile diğer kuafaj materyallerinden Dycal, TheraCal LC, NeoPutty MTA grupları ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak ($p \leq 0.0001$ (****)) çok yüksek düzey anlamlılık göstermiştir. TheraCal LC ile NeoPutty MTA deney gruplarının OCN mRNA gen ekspresyon seviyeleri arasında istatistiksel olarak ($p > 0.05$ (ns)) anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır (Şekil 4.10).

14. Gün: Gruplar karşılaştırıldığında OCN mRNA gen ekspresyonu değerleri 14. gün sonunda büyükten küçüğe doğru; Dycal, NeoPutty MTA, TheraCal LC, Harvard BioCal-Cap şeklinde sıralanmıştır. Tüm deney grupları arasında istatistiksel olarak ($p \leq 0.0001$ (****)) olarak çok yüksek düzey anlamlılık görülmektedir (Şekil 4.10).

4.5.3. VEGF/18m/RNA Gen Ekspresyonu RT-PCR Analiz Bulguları

4.5.3.1. Materyallerin VEGF/18m/RNA gen ekspresyonu RT-qPCR bulgularının zamana göre grup içi karşılaştırmalı istatistiksel analizi



Şekil 4. 11: Materyallerin VEGF/18m/RNA gen ekspresyonu RT-qPCR bulgularının zamana göre grup içi karşılaştırmalı istatistiksel analizi*

** $p > 0.05$ (ns) istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamasını, $p \leq 0.05$ (*) sınırda anlamlılığın bulunmasını, $p \leq 0.01$ (**) istatistiksel anlamlılığı, $p \leq 0.001$ (***) istatistiksel anlamlılığın yüksek düzeyde olduğunu ve $p \leq 0.0001$ (****) istatistiksel anlamlılığın çok yüksek düzey olduğunu ifade etmektedir.*

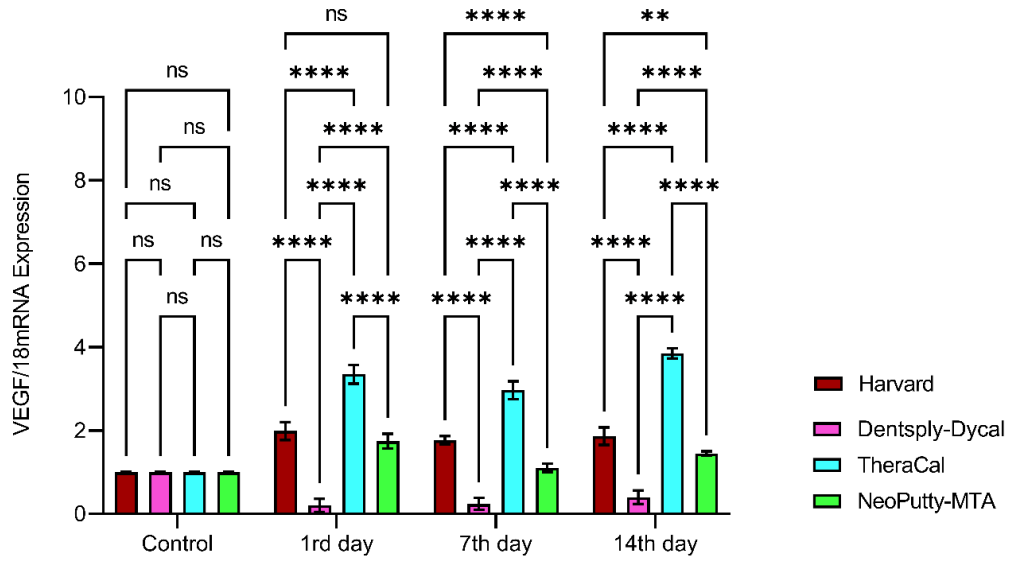
Harvard BioCal-Cap Deney Grubu: Kontrol grubu ile 1.gün, 7.gün ve 14.gün VEGF mRNA ekspresyon değerleri arasında istatistiksel olarak ($p \leq 0.0001$ (****)) olarak çok yüksek düzey anlamlılık görülmektedir. 1.gün ile 7.gün, 1. Gün ile 14.gün ve 7.gün ile 14.gün OCN mRNA ekspresyon değerleri arasında istatistiksel olarak ($p > 0.05$ (ns)) anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır (Şekil 4.11).

Dycal (Dentsply) Deney Grubu: Kontrol grubu ile 1., 7. ve 14. gün VEGF mRNA gen ekspresyon değerleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak ($p \leq 0.0001$ (****)) olarak çok yüksek düzey anlamlılık görülmektedir. 1., 7. ve 14. gün VEGF mRNA gen ekspresyon değerleri arasında istatistiksel olarak ($p > 0.05$ (ns)) anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır (Şekil 4.11).

TheraCal LC Deney Grubu: Kontrol grubu ile 1., 7. ve 14.gün VEGF mRNA gen ekspresyon değerleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak ($p \leq 0.0001$ (****)) olarak çok yüksek düzey anlamlılık görülmektedir. 1. gün ile 7. gün VEGF mRNA ekspresyon değerleri arasında istatistiksel olarak ($p \leq 0.05$ (*)) sınırda bir anlamlılık söz konusudur. 1.gün ve 14.gün ekspresyon değerleri arasında $p \leq 0.001$ (***) istatistiksel anlamlılığın yüksek düzeyde olduğunu kaydedilmiştir. 7.gün ve 14.gün VEGF mRNA gen ekspresyon değerleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak ($p \leq 0.0001$ (****)) olarak çok yüksek düzey anlamlılık görülmektedir (Şekil 4.11).

NeoPutty MTA Deney Grubu: Kontrol grubu ile 1.gün ve 1.gün ile 7. günün VEGF mRNA ekspresyon değerleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak ($p \leq 0.0001$ (****)) olarak çok yüksek düzey anlamlılık görülmektedir. 7. Ve 14.gün ekspresyon değerleri arasında istatistiksel olarak ($p \leq 0.05$ (*)) sınırda bir anlamlılık söz konusudur. 1.gün ile 14.gün ve kontrol grubu ile 7.gün VEGF mRNA gen ekspresyon değerleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak ($p > 0.05$ (ns)) anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır. Kontrol grubu ile 14. Gün VEGF mRNA gen ekspresyon değerleri arasında istatistiksel ($p \leq 0.01$ (**)) olarak anlamlılık görülmektedir (Şekil 4.11).

4.5.3.2. Materyallerin VEGF/18m/RNA gen ekspresyonu RT-qPCR bulgularının zamana göre gruplar arası karşılaştırmalı istatistiksel analizi



Şekil 4. 12: Materyallerin VEGF/18m/RNA gen ekspresyonu RT-qPCR bulgularının zamana göre gruplar arası karşılaştırmalı istatistiksel analizi*

* $p > 0.05$ (ns) istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamasını, $p \leq 0.05$ (*) sınırda anlamlılığın bulunmasını, $p \leq 0.01$ (**) istatistiksel anlamlılığın, $p \leq 0.001$ (***) istatistiksel anlamlılığın yüksek düzeyde olduğunu ve $p \leq 0.0001$ (****) istatistiksel anlamlılığın çok yüksek düzeyde olduğunu ifade etmektedir.

1. Gün: Gruplar karşılaştırıldığında VEGF mRNA gen ekspresyonu değerleri 1. gün sonunda büyükten küçüğe doğru; TheraCal LC, Harvard BioCal-Cap, NeoPutty MTA, Dycal olarak sıralanmıştır. Tüm deney grupları arasında VEGF mRNA gen ekspresyon değerleri arasında istatistiksel olarak ($p \leq 0.0001$ (****)) olarak çok yüksek düzey anlamlılık görülürken Harvard BioCal-Cap ile NeoPutty MTA deney grubu arasında istatistiksel olarak ($p > 0.05$ (ns)) anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır (Şekil 4.12).

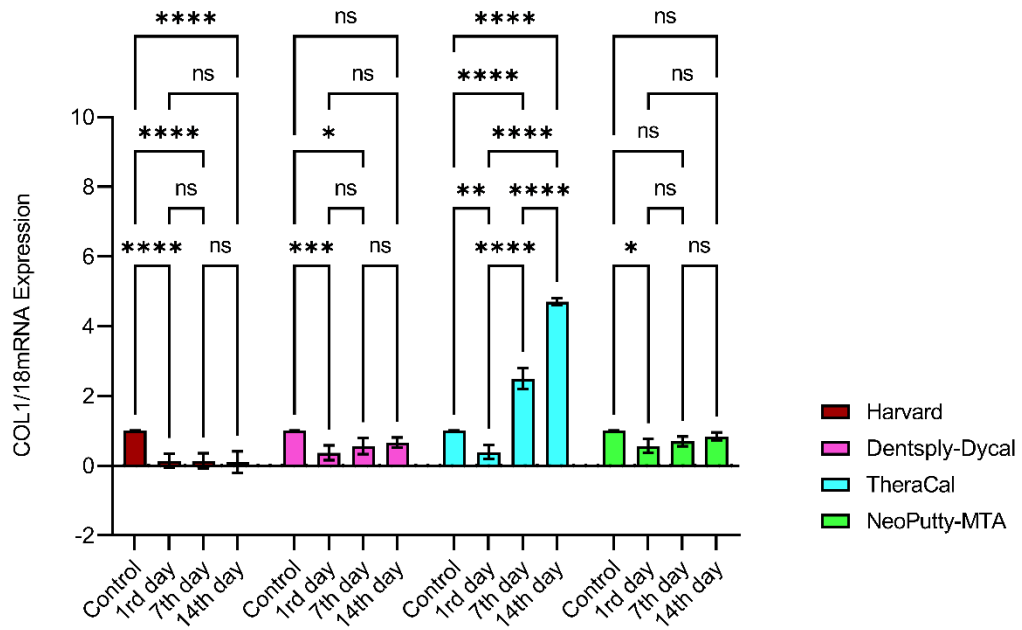
7. Gün: Gruplar karşılaştırıldığında VEGF mRNA gen ekspresyonu değerleri 7. gün sonunda büyükten küçüğe doğru; TheraCal LC, Harvard BioCal-Cap, NeoPutty MTA, Dycal olarak sıralanmıştır. Tüm deney grupları arasında VEGF mRNA gen

ekspresyon değerleri arasında istatistiksel olarak ($p \leq 0.0001$ (****)) olarak çok yüksek düzey anlamlılık bulunmaktadır (Şekil 4.12).

14. Gün: Gruplar karşılaştırıldığında VEGF mRNA gen ekspresyonu değerleri 14. gün sonunda büyükten küçüğe doğru; TheraCal LC, Harvard BioCal-Cap, NeoPutty MTA, Dycal şeklinde sıralanmıştır. Tüm deney grupları arasında VEGF mRNA gen ekspresyon değerleri arasında istatistiksel olarak ($p \leq 0.0001$ (****)) olarak çok yüksek düzey anlamlılık bulunurken Harvard BioCal-Cap ile NeoPutty MTA deney grubunun VEGF mRNA gen ekspresyon değerleri arasında istatistiksel ($p \leq 0.01$ (**)) olarak anlamlılık bulunmaktadır (Şekil 4.12).

4.5.4. Col1A/18m/RNA Gen Ekspresyonu RT-qPCR Analiz Bulguları

4.5.4.1. Materyallerin Col1A/18m/RNA gen ekspresyonu RT-qPCR bulgularının zamana göre grup içi karşılaştırmalı istatistiksel analizi



Şekil 4. 13: Materyallerin Col1A/18m/RNA gen ekspresyonu RT-qPCR bulgularının zamana göre istatistiksel analizi*

* $p > 0.05$ (**ns**) istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamasını, $p \leq 0.05$ (*) sınırda anlamlılığın bulunmasını, $p \leq 0.01$ (**) istatistiksel anlamlılığı, $p \leq 0.001$ (***) istatistiksel anlamlılığın yüksek düzeyde olduğunu ve $p \leq 0.0001$ (****) istatistiksel anlamlılığın çok yüksek düzey olduğunu ifade etmektedir.

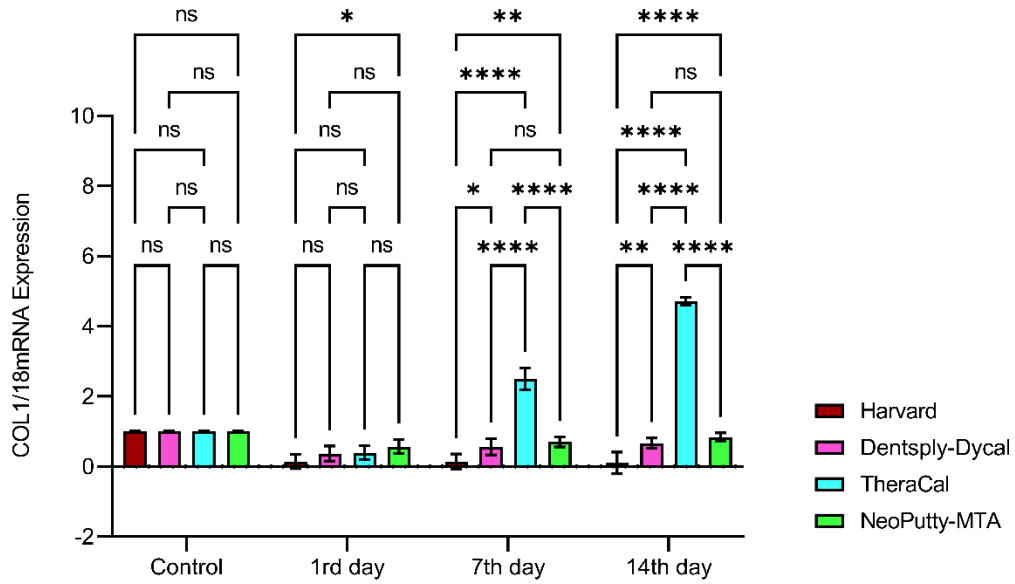
Harvard BioCal-Cap Deney Grubu: Kontrol grubu ile 1.gün, 7.gün ve 14.gün Col1A mRNA gen ekspresyon değerleri arasında istatistiksel olarak ($p \leq 0.0001$ (****)) olarak çok yüksek düzey anlamlılık bulunmaktadır. 1.gün ile 7.gün, 7.gün ile 14.gün ve 1.gün ile 14.gün Col1A mRNA gen ekspresyon değerleri arasında istatistiksel olarak ($p > 0.05$ (ns)) anlamlı bir farklılık görülmemiştir (Şekil 4.13).

Dycal (Dentsply) Deney Grubu: Kontrol grubu ile 1. gün Col1A mRNA gen ekspresyon değerleri arasında $p \leq 0.001$ (**) istatistiksel anlamlılığın yüksek düzeyde olduğu görülmektedir. Kontrol grubu ile 7. gün Col1A mRNA gen ekspresyon değerleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak ($p \leq 0.05$ (*)) sınırda bir anlamlılık söz konusudur. 1. gün ile 7. gün, 7. gün ile 14. gün, 1. gün ile 14. gün ve kontrol grubu ile 14. gün arasında istatistiksel olarak ($p > 0.05$ (ns)) anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır (Şekil 4.13).

TheraCal LC Deney Grubu: Kontrol grubu ile 1. gün Col1A mRNA gen ekspresyonu değerleri karşılaştırıldığında, $p \leq 0.01$ (**) istatistiksel anlamlılık bulunmaktadır. Diğer günler ve kontrol grubu arasındaki değerler arasında $p \leq 0.001$ (**) istatistiksel anlamlılığın yüksek düzeyde olduğu görülmektedir (Şekil 4.13).

NeoPutty MTA Deney Grubu: Kontrol grubu ile 1. gün Col1A mRNA gen ekspresyonu değerleri arasında istatistiksel olarak ($p \leq 0.05$ (*)) sınırda bir anlamlılık söz konusudur. Diğer günler ve kontrol grubu değerleri arasında istatistiksel olarak ($p > 0.05$ (ns)) anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır (Şekil 4.13).

4.5.4.2. Materyallerin Col1A/18m/RNA gen ekspresyonu RT-qPCR bulgularının zamana göre gruplar arası karşılaştırmalı istatistiksel analizi



Şekil 4. 14: Materyallerin Col1A/18m/RNA gen ekspresyonu RT-qPCR bulgularının zamana göre gruplar arası karşılaştırmalı istatistiksel analizi*

* $p > 0.05$ (**ns**) istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamasını, $p \leq 0.05$ (*) sınırda anlamlılığın bulunmasını, $p \leq 0.01$ (**) istatistiksel anlamlılığı, $p \leq 0.001$ (***) istatistiksel anlamlılığın yüksek düzeyde olduğunu ve $p \leq 0.0001$ (****) istatistiksel anlamlılığın çok yüksek düzey olduğunu ifade etmektedir.

1. Gün: Gruplar karşılaştırıldığında Col1A mRNA gen ekspresyonu değerleri 1.günde büyükten küçüğe sırasıyla; TheraCal LC, Harvard BioCal-Cap, NeoPutty MTA, Dycal şeklinde bulunmuştur. Harvard BioCal-Cap ile NeoPutty MTA'nın Col1A mRNA gen ekspresyon değerleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak $p \leq 0.05$ (*) sınırda anlamlılık söz konusudur. Diğer gruplar arasında istatistiksel olarak ($p > 0.05$ (ns)) anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır (Şekil 4.14).

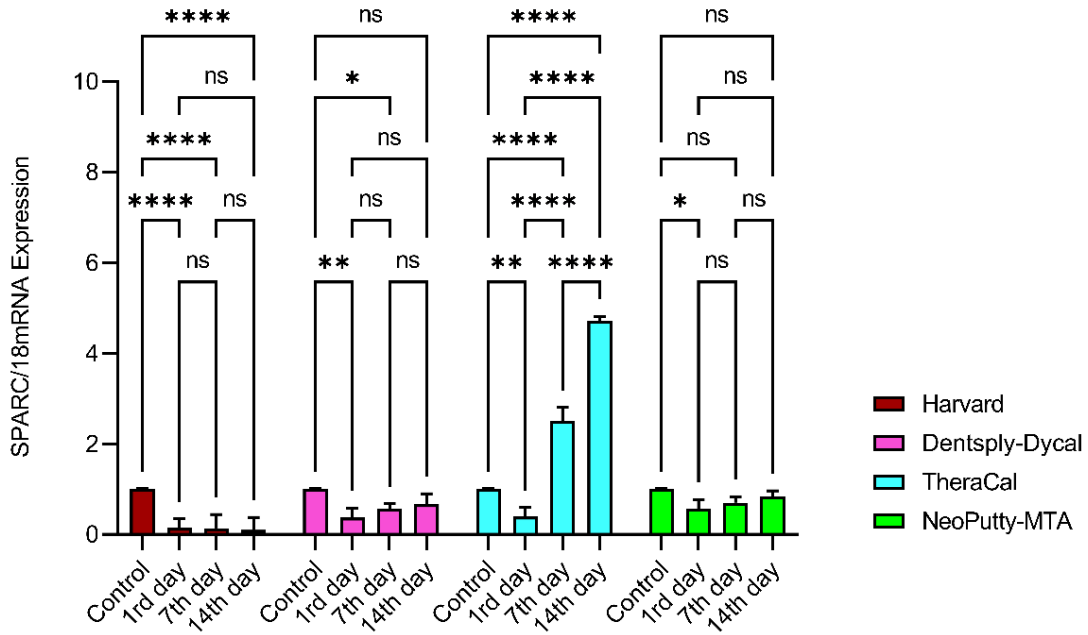
7. Gün: Gruplar karşılaştırıldığında Col1A mRNA gen ekspresyonu değerleri 7.gün sonunda büyükten küçüğe; TheraCal LC, Harvard BioCal-Cap, NeoPutty MTA, Dycal şeklinde sıralanmıştır. TheraCal LC ile diğer kuafaj materyalleri arasında istatistiksel olarak ($p \leq 0.0001$ (****)) olarak çok yüksek düzey anlamlılık göstermektedir. Harvard BioCal-Cap ile NeoPutty MTA'nın Col1A mRNA gen

ekspresyon değerleri karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak $p \leq 0.01(**)$ anlamlılık bulunurken, Harvard BioCal-Cap ile Dycal'ın Col1A mRNA gen ekspresyon değerleri arasında istatistiksel olarak $p \leq 0.05(*)$ sınırdan anlamlılık söz konusudur. Dycal ile NeoPutty MTA değerleri arasında istatistiksel olarak ($p > 0.05$ (ns)) anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır (şekil 4.14).

14. Gün: Gruplar karşılaştırıldığında Col1A mRNA gen ekspresyonu değerleri 14.gün sonunda büyükten küçüğe; TheraCal LC, Harvard BioCal-Cap, NeoPutty MTA, Dycal şeklinde sıralanmıştır. TheraCal LC deney grubu ile diğer 3 kuafaj materyalinin Col1A mRNA gen ekspresyon değerleri karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak ($p \leq 0.0001(****)$) çok yüksek düzey anlamlılık bulunmaktadır. Harvard BioCal-Cap ile Dycal materyalleri arasında istatistiksel olarak $p \leq 0.01(**)$ anlamlılık saptanmışken, Dycal ile NeoPutty MTA'nın Col1A mRNA gen ekspresyon değerleri arasında istatistiksel olarak ($p > 0.05$ (ns)) anlamlı bir farklılık görülmemektedir (şekil 4.14).

4.5.5. SPARC (Osteonektin)/18m/RNA Gen Ekspresyonu RT-PCR Analiz Bulguları

4.5.5.1. Materyallerin SPARC (Osteonektin)/18m/RNA gen ekspresyonu RT-qPCR bulgularının zamana göre grup içi karşılaştırmalı istatistiksel analizi



Şekil 4. 15: Materyallerin SPARC (Osteonektin)/18m/RNA gen ekspresyonu RT-qPCR bulgularının zamana göre istatistiksel analizi*

* $p > 0.05$ (ns) istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamasını, $p \leq 0.05$ (*) sınırda anlamlılığın bulunmasını, $p \leq 0.01$ (**) istatistiksel anlamlılığı, $p \leq 0.001$ (***) istatistiksel anlamlılığın yüksek düzeyde olduğunu ve $p \leq 0.0001$ (****) istatistiksel anlamlılığın çok yüksek düzey olduğunu ifade etmektedir.

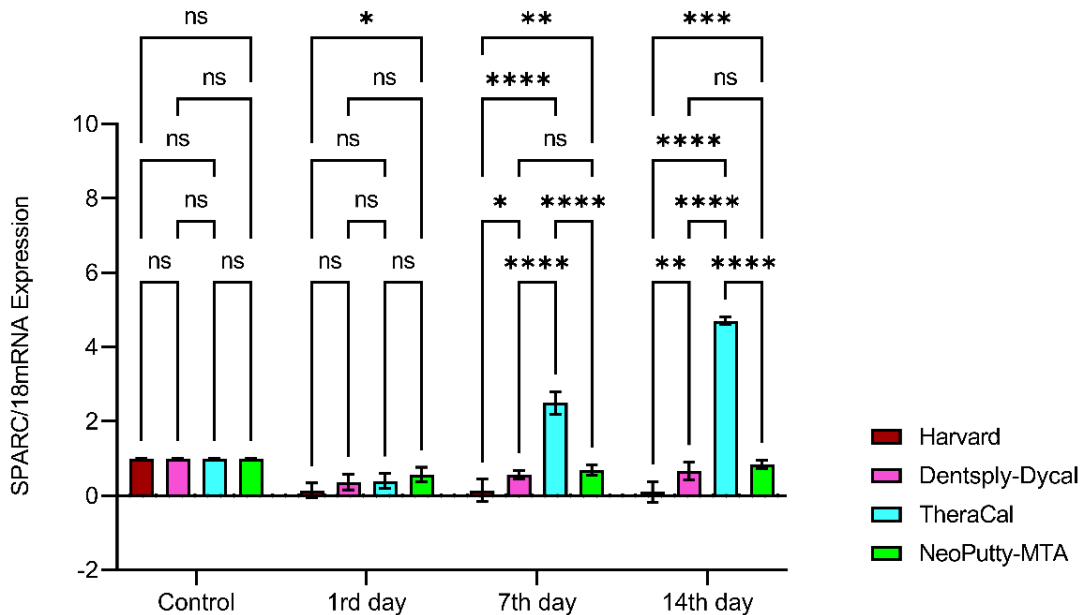
Harvard BioCal-Cap Deney Grubu: Kontrol grubu ile 1.gün, 7.gün, 14.gün SPARC mRNA gen ekspresyon değerleri arasında istatistiksel olarak ($p \leq 0.0001$ (****)) çok yüksek düzey anlamlılık görülmektedir. Diğer günler arasındaki ekspresyon değerleri arasında istatistiksel olarak ($p > 0.05$ (ns)) anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır (Şekil 4.15).

Dycal (Dentsply) Deney Grubu: Kontrol grubu ile 1. gün SPARC gen ekspresyonu değerleri arasında istatistiksel olarak $p \leq 0.01(**)$ anlamlılık bulunurken, kontrol grubu ile 7.gün değerleri arasında istatistiksel olarak $p \leq 0.05(*)$ sınırdan anlamlılık söz konusudur. Diğer gruplar arasında istatistiksel olarak ($p > 0.05$ (ns)) anlamlı bir farklılık saptanmamıştır (Şekil 4.15).

TheraCal LC Deney Grubu: Kontrol grubu ile 1. gün SPARC gen ekspresyon değerleri arasında istatistiksel olarak $p \leq 0.01(**)$ anlamlılık bulunmaktadır. Diğer günler arasında istatistiksel olarak ($p \leq 0.0001(****)$) olarak çok yüksek düzey anlamlılık görülmemiştir (Şekil 4.15).

NeoPutty MTA Deney Grubu: Kontrol grubu ile 1.gün SPARC gen ekspresyon değerleri arasında istatistiksel olarak $p \leq 0.05(*)$ sınırdan anlamlılık söz konusudur. Diğer günler arasında istatistiksel olarak ($p > 0.05$ (ns)) anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır (Şekil 4.15).

4.5.5.2. Materyallerin SPARC (Osteonektin)/18m/RNA gen ekspresyonu RT-qPCR bulgularının zamana göre gruplar arası karşılaştırmalı istatistiksel analizi



Şekil 4. 16: Materyallerin SPARC (Osteonektin)/18m/RNA gen ekspresyonu RT-qPCR bulgularının zamana göre gruplar arası karşılaştırmalı istatistiksel analizi*

** $p > 0.05$ (ns) istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamasını, $p \leq 0.05$ (*) sınırda anlamlılığın bulunmasını, $p \leq 0.01$ (**) istatistiksel anlamlılığı, $p \leq 0.001$ (***) istatistiksel anlamlılığın yüksek düzeyde olduğunu ve $p \leq 0.0001$ (****) istatistiksel anlamlılığın çok yüksek düzey olduğunu ifade etmektedir.*

1. Gün: Gruplar karşılaştırıldığında SPARC mRNA gen ekspresyonu değerleri 1.gün sonunda büyükten küçüğe; NeoPutty MTA, TheraCal LC, Dycal, Harvard BioCal-Cap şeklinde sıralanmıştır. Harvard BioCal-Cap ile NeoPutty MTA SPARC mRNA ekspresyon değerleri arasında istatistiksel olarak $p \leq 0.05$ (*) sınırda anlamlılık söz konusudur. Diğer gruplar arasında istatistiksel olarak $p > 0.05$ (ns) anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır (Şekil 4.16).

7. Gün: Gruplar karşılaştırıldığında SPARC mRNA gen ekspresyonu değerleri 7.gün sonunda büyükten küçüğe; TheraCal LC, NeoPutty MTA, Dycal, Harvard BioCal-Cap olarak sıralanmıştır. TheraCal LC ile diğer grupların SPARC mRNA gen ekspresyon değerleri arasında istatistiksel olarak ($p \leq 0.0001$ (****)) çok yüksek düzey anlamlılık bulunmaktadır. Dycal ile Harvard BioCal-Cap değerleri arasında istatistiksel olarak $p \leq 0.05$ (*) sınırda anlamlılık söz konusudur. NeoPutty MTA ile Harvard BioCal-Cap arasında istatistiksel olarak $p \leq 0.01$ (**) anlamlılık bulunurken, NeoPutty MTA ile Dycal arasında istatistiksel olarak $p > 0.05$ (ns) anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır (Şekil 4.16).

14. Gün: 14.gün sonunda deney gruplarının SPARC mRNA gen ekspresyon değerleri büyükten küçüğe; TheraCal LC, NeoPutty MTA, Dycal, Harvard BioCal-Cap şeklinde sıralanmıştır. TheraCal LC ile diğer grupların SPARC mRNA gen ekspresyon değerleri arasında istatistiksel olarak ($p \leq 0.0001$ (****)) çok yüksek düzey anlamlılık bulunmaktadır. Dycal ile Harvard BioCal-Cap değerleri arasında istatistiksel olarak $p \leq 0.01$ (**) anlamlılık söz konusu iken, Harvard BioCal-Cap ile NeoPutty MTA değerleri arasında $p \leq 0.001$ (***) istatistiksel anlamlılığın yüksek düzeyde olduğu görülmektedir. Dycal ile NeoPutty MTA değerleri arasında istatistiksel olarak $p > 0.05$ (ns) anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır (Şekil 4.16).

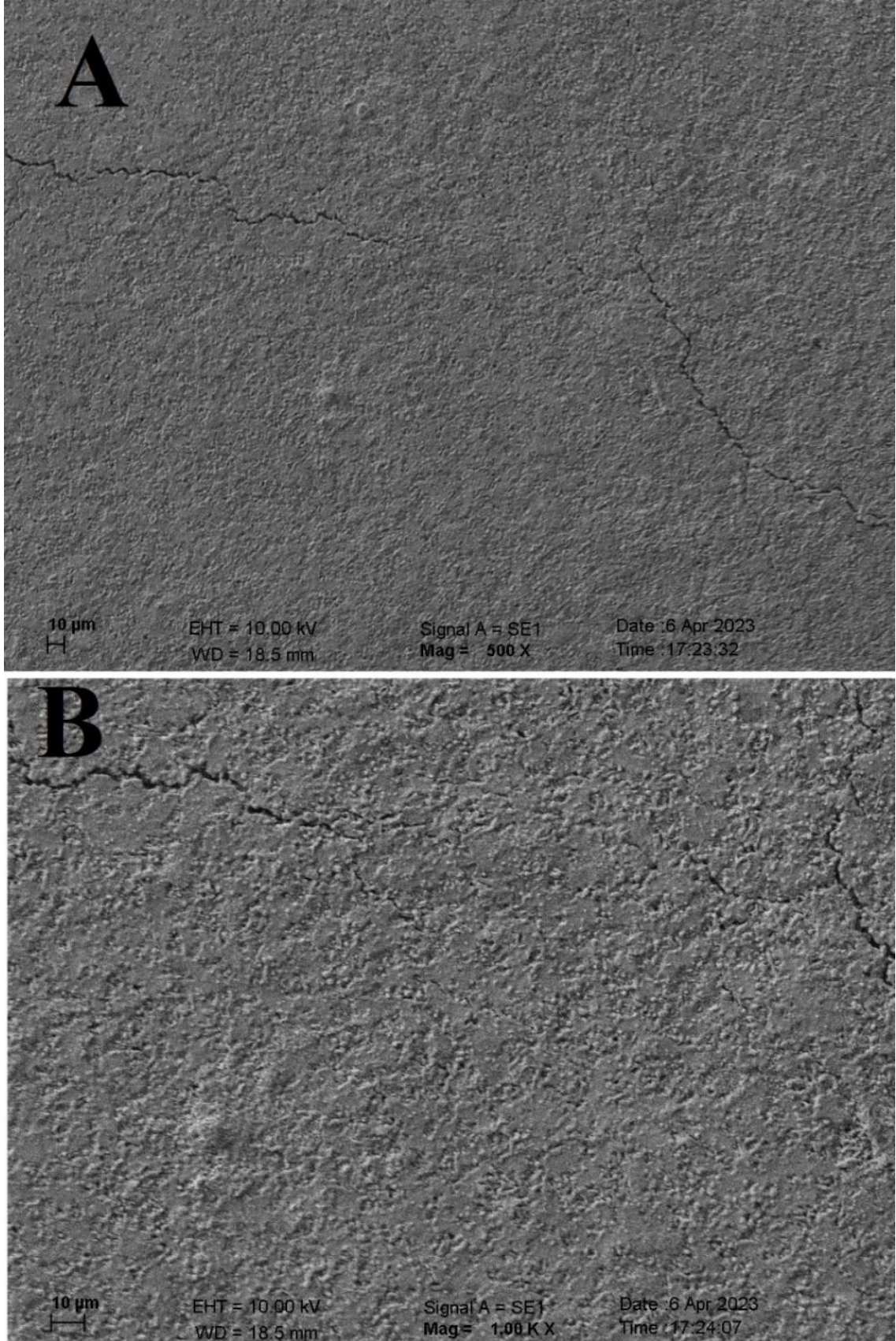
4.6. YÜZEY YAPISINDAKİ MORFOLOJİK DEĞİŞİMLERİN TARAMALI ELEKTRON MİKROSKOBU İLE İNCELENMESİ (SEM-SCANNING ELECTRON MICROSCOPE)

SEM görüntüleri ile farklı kuafaj materyalleri ile muamele edilmiş DPSC'lerin yüzey yapısındaki morfolojik değişimlerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

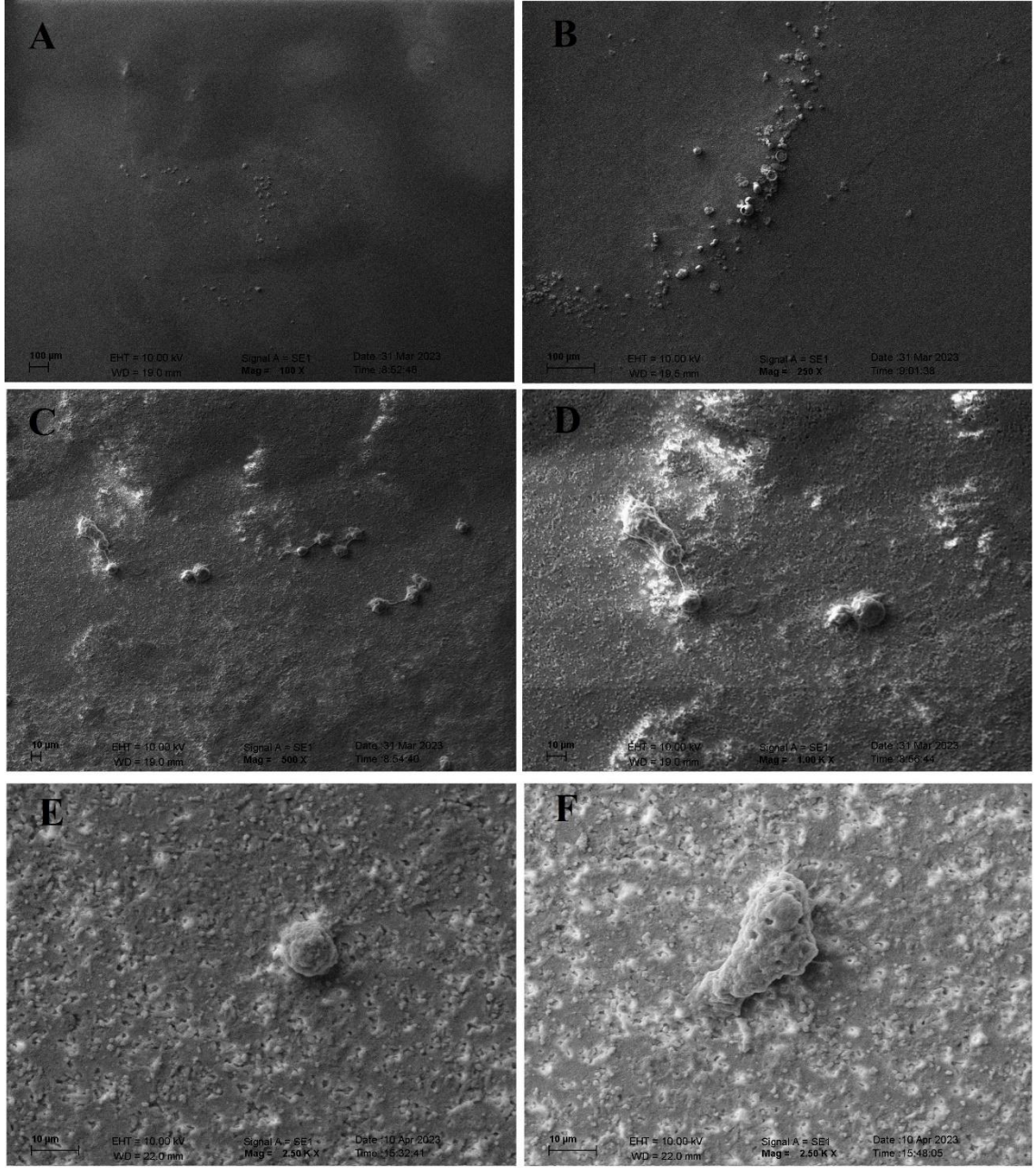
Dycal (Dentsply) materyali Şekil 4.17'de hücresiz şekilde görüntülenmiştir. Dycal'ın dental pulpa kök hücreler üzerindeki morfolojik değişimlerinin 100x, 250x, 500x, 1000x ve 2500x büyültmedeki SEM görüntü sonuçlarına göre hücrelerin küresel morfolojilerini muhafaza ettiği görülmektedir (Şekil 4.18). Bu görüntü DPSC'lerin materyal yüzeyine tam tutunmaya başlamadıkları anlamına gelmektedir.

NeoPutty MTA (NuSmile) materyali Şekil 4.19'da hücresiz şekilde görüntülenmiştir. NeoPutty MTA'nın dental pulpa kök hücreler üzerindeki morfolojik değişimlerinin 500x, 1000x, 2000x ve 2500x büyültmedeki SEM görüntü sonuçlarına göre adezyonu sağlayan pseudopodların oluştuğu ve hücrelerin küresel morfolojiden iğsi yapıya dönüşmeye başladığı görüntülenmiştir (Şekil 4.20).

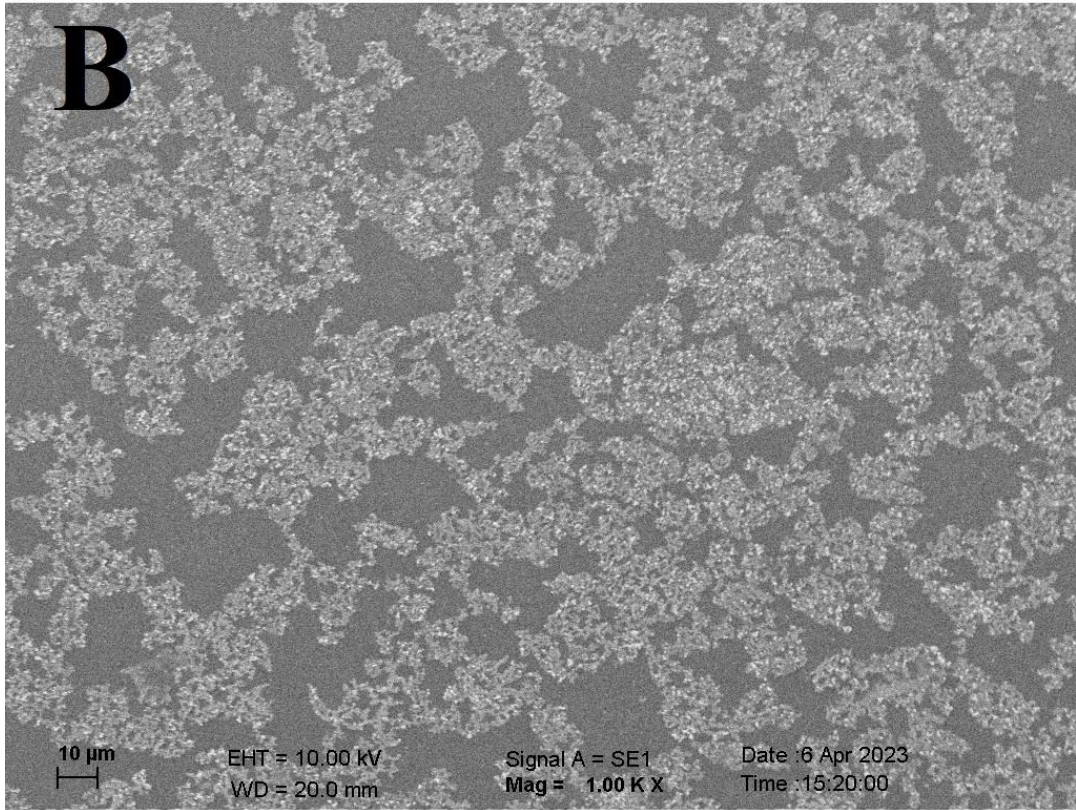
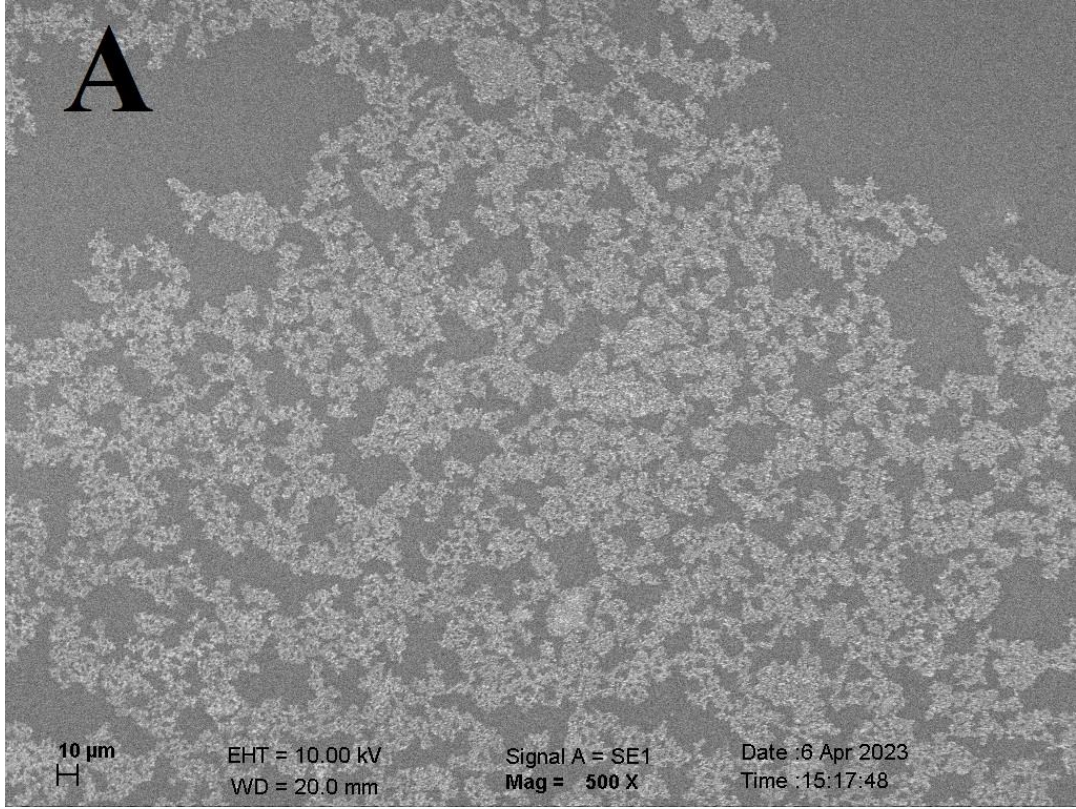
Harvard BioCal-Cap (Şekil 4.21) ve TheraCal LC (Şekil 4.23) materyallerinin hücresiz şekilde SEM görüntüleri kaydedilmiştir. Harvard BioCal-Cap (1000x ve 5000x büyütme) ve TheraCal LC'nin (100x, 250x, 500x ve 1000x büyültme) dental pulpa kök hücrelerine karakteristik iğ morfolojisini kazandırdığı ve yüzey adezyonun gerçekleştiği görülmektedir (Şekil 4.22-24).



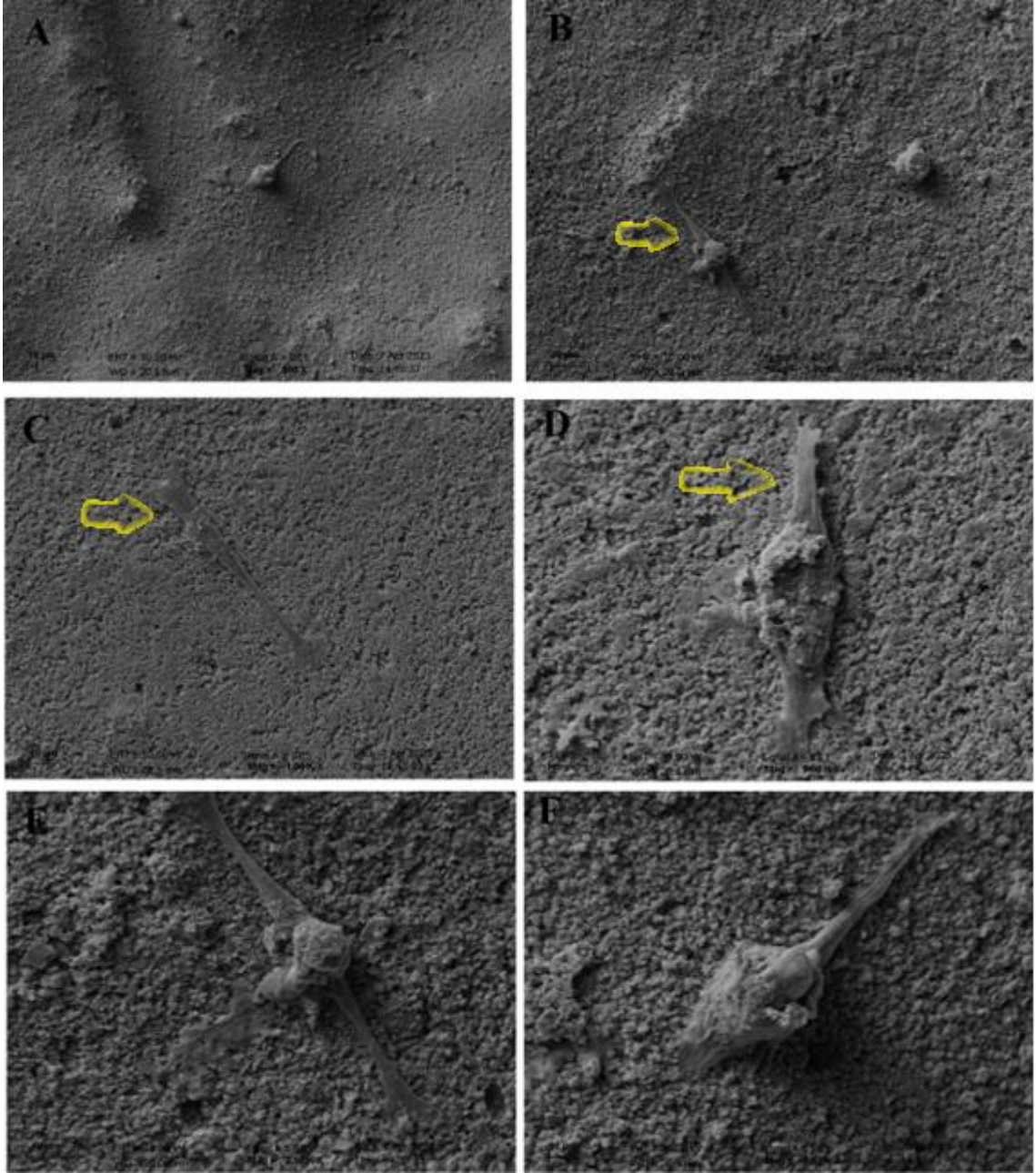
Şekil 4. 17: Dycal (Dentsply) materyalinin hücresiz 500x (A) ve 1000x (B) büyültmede SEM görüntüleri



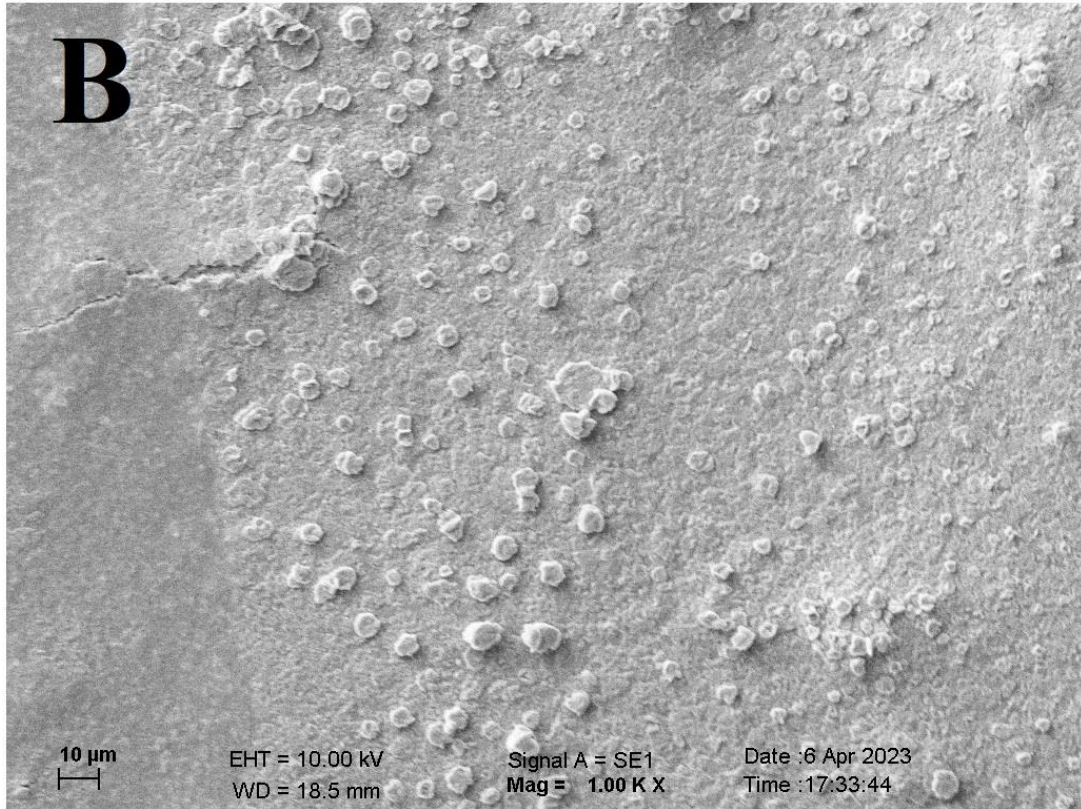
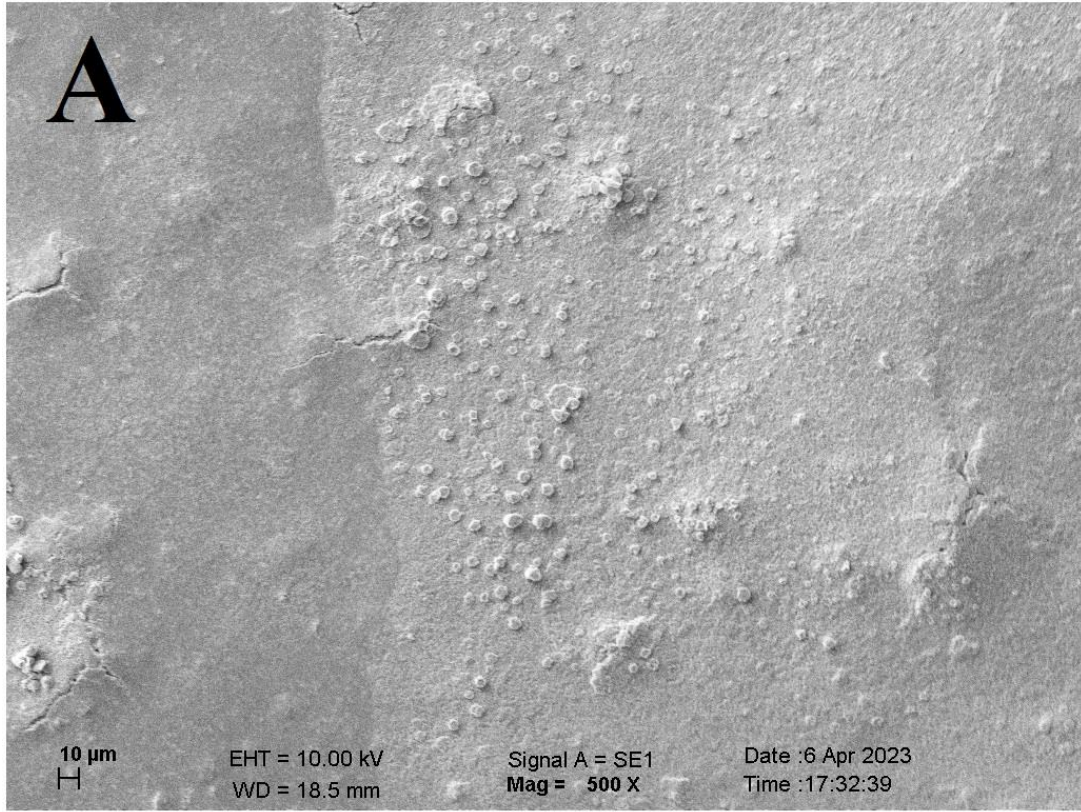
Şekil 4. 18: Dycal (Dentsply) materyali ile muamele edilen DPSC'lerin 100x (A), 250x (B), 500x (C), 1000x (D), 2500x (E, F) büyültme ile SEM görüntüleri



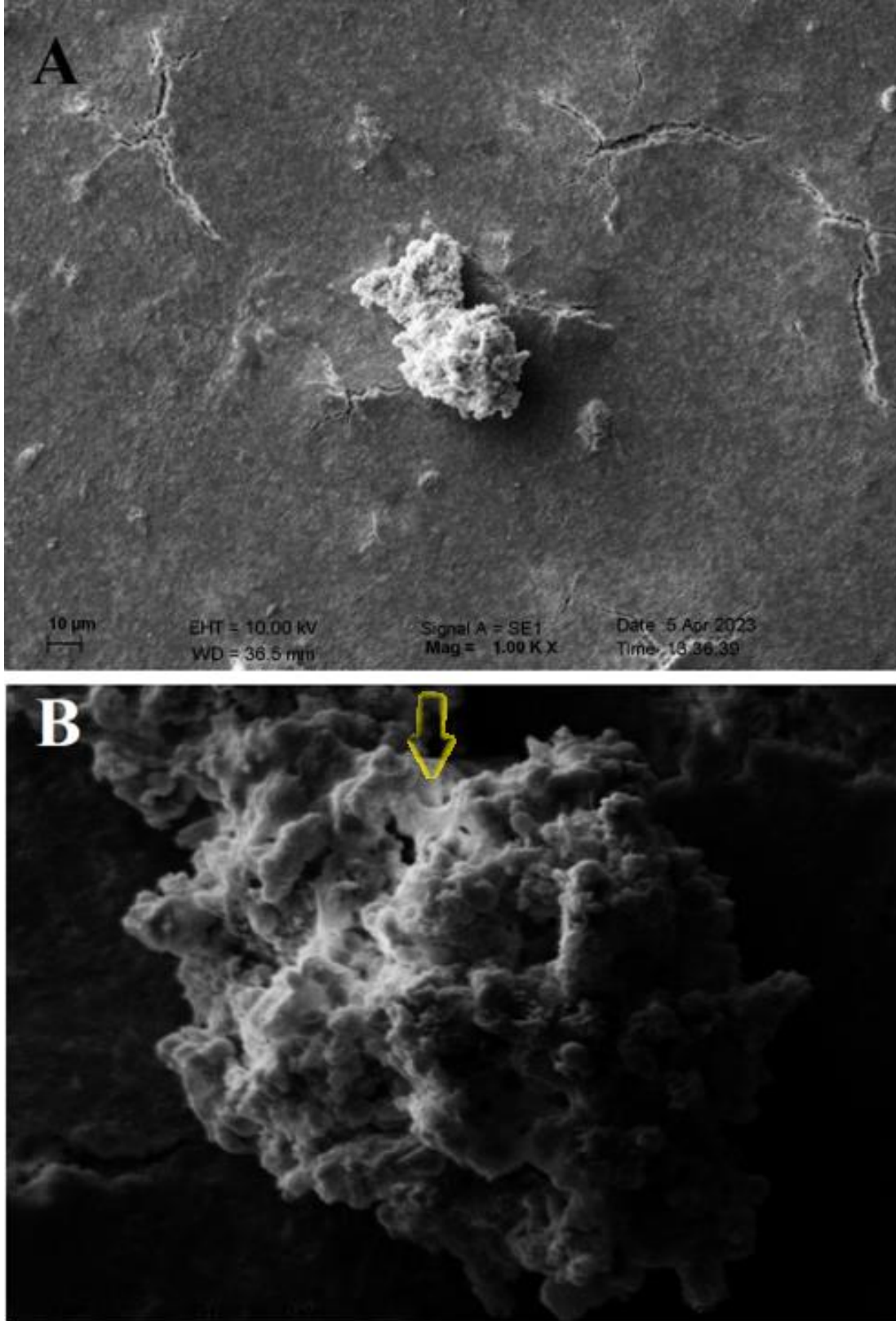
Şekil 4. 19: NeoPutty MTA (NuSmile) materyalinin hücresiz 500x (A) ve 1000x (B) büyültmede SEM görüntüleri



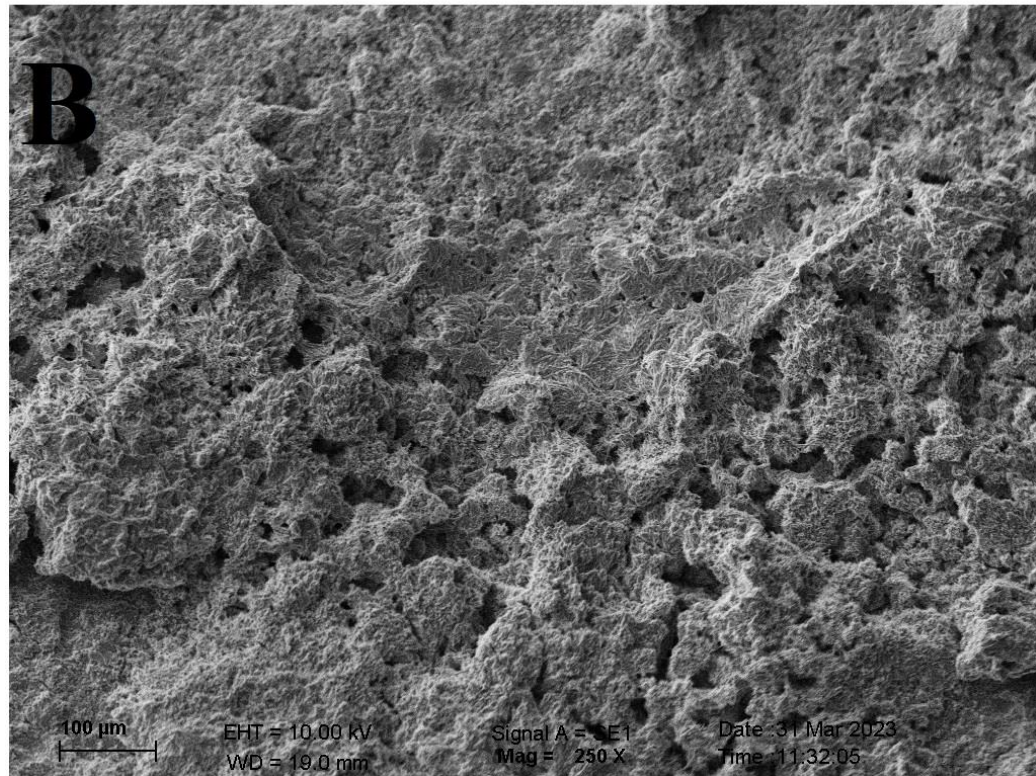
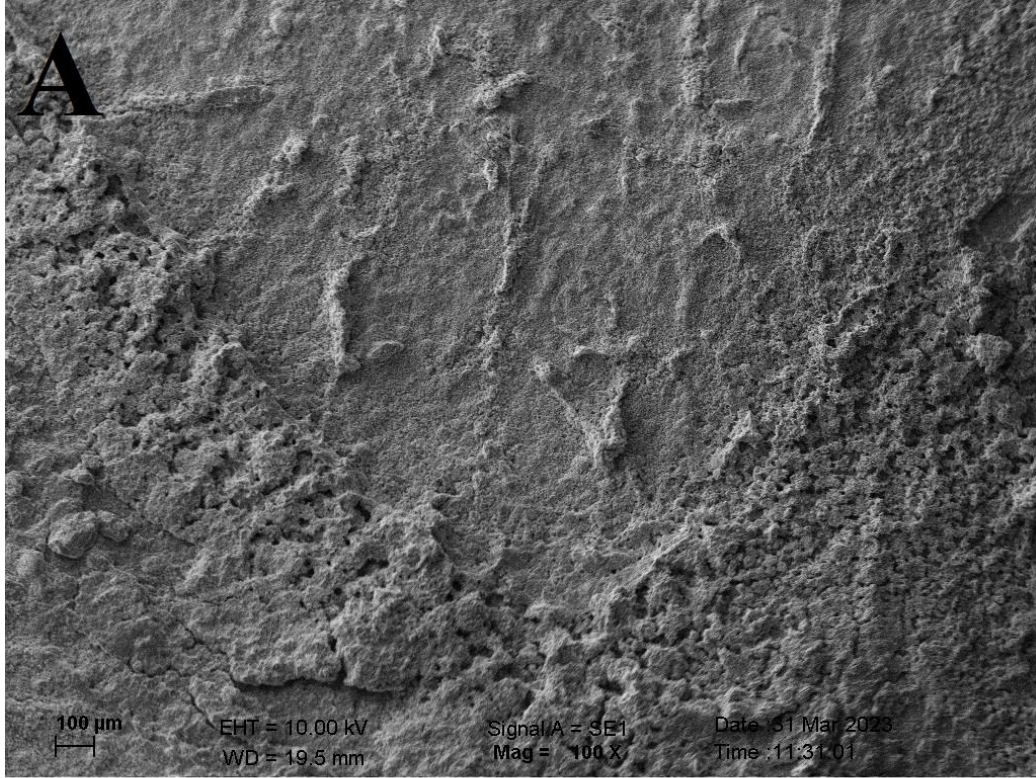
Şekil 4. 20: NeoPutty MTA (NuSmile) materyali ile muamele edilen DPSC'lerin 500x (A), 1000x (B, C), 2000x (D), 2500x (E, F) büyültme ile SEM görüntüleri (pseudopod uzantıları sarı okla gösterilmiştir.)



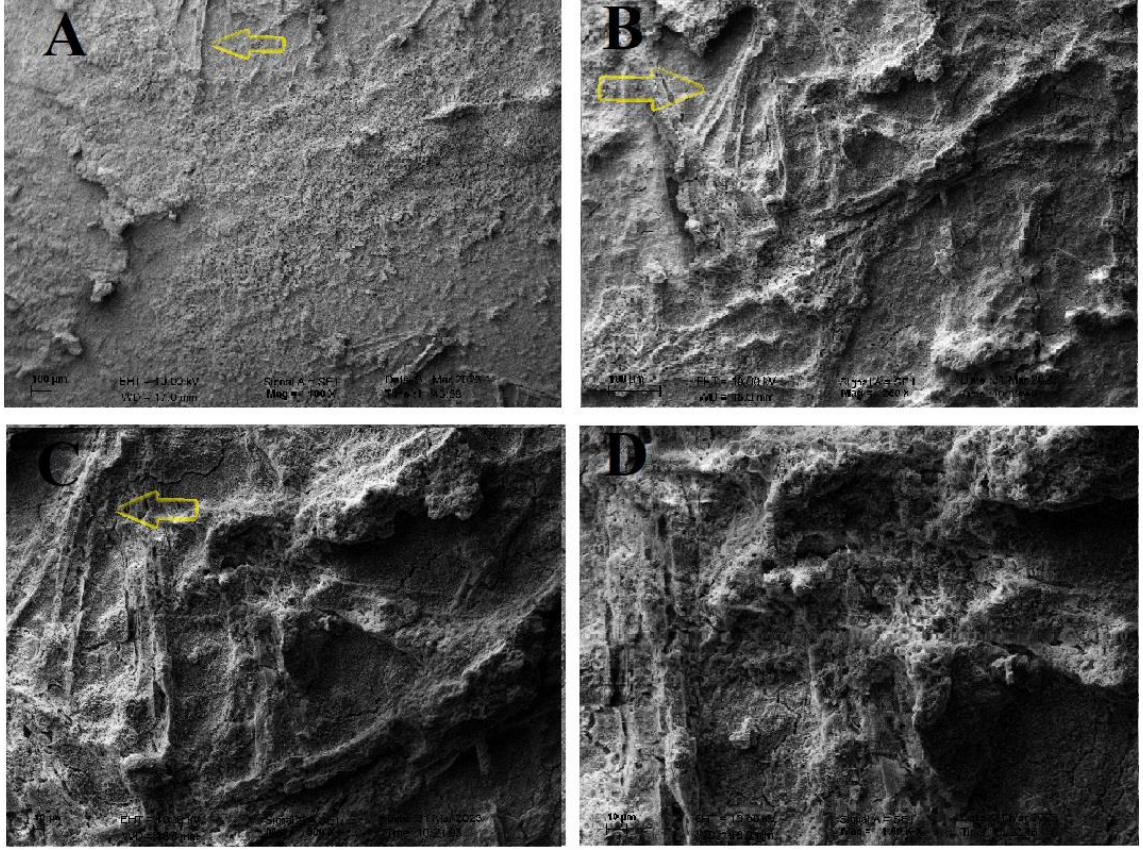
Şekil 4. 21: Harvard BioCal-Cap materyalinin hücresiz 500x (A) ve 1000x (B) büyültmede SEM görüntüleri



Şekil 4. 22: Harvard BioCal-Cap materyali ile muamele edilen DPSC'lerin 1000x (A), 2500x (B) büyültme ile SEM görüntüleri



Şekil 4. 23: TheraCal LC materyalinin hüresiz 100x (A) ve 250x (B) büyültmede SEM görüntüleri



Şekil 4. 24: TheraCal LC materyali ile muamele edilen DPSC'lerin 100x (A), 250x (B), 500x (C), 1000x (D) büyültme ile SEM görüntüleri

5. TARTIŞMA

Çocuk diş hekimliği pratiğinde uygulanan pulpa tedavileri ve kullanılan materyaller birçok çalışmanın hipotezlerini oluşturmaktadır. İmmatür (olgunlaşmamış) daimî dişlerde, travmatik yaralanmalar, anatomik anomaliler ve yaygın derin dentin çürükleri, pulpanın inflamasyonu ve kök gelişiminin durmasına neden olabilmektedir. Vital pulpa tedavileri ile dentin oluşumu uyarılmakta ve pulpa canlılığı korunmaktadır. Vital pulpa tedavisi için çeşitli klinik prosedürler kullanılmıştır ve bu prosedürler arasında indirekt/direkt pulpa kuafaj tedavisi ile pulpotomi yer almaktadır (165). Vital pulpa tedavi yöntemlerinde amaç bakterilerle kontamine olmuş dokuyu uzaklaştırıp pulpa dokusunu korumak ve mineralize doku bariyerinin (dentin köprüsü) oluşumunu desteklemektir. Derin dentin çürüklü dişlerde indirekt pulpa kuafaj tedavisi, minimal invaziv bir yöntem olması nedeniyle sıklıkla tercih edilmektedir. Direkt pulpa kuafaj tedavisi, pulpanın ekspozite olduğu durumlarda dentin-pulpa kompleksinin doku uyumlu bir biyomateryal ile örtülerek doku rejenerasyonunun indüklenmesini amaçlayan bir klinik prosedür. Bu yöntem ile kök kanal tedavisinden kaçınılmakta veya en azından kök oluşumu tamamlanana kadar kök kanal tedavisinin ertelenmesi mümkün olabilmektedir (166,167).

Pulpa kuafaj tedavisi için seçilen biyomateryaller, biyoyumlu olmalı ve pulpanın rejeneratif kapasitesini indükleyebilmelidir. Yeni ve güncel dental materyallerin klinik uygulama pratiğinde kullanılmadan önce biyoyumluluk kapasiteleri ve sitotoksikite bulgularını değerlendirebilmek için hücre kültürü testleri (in vitro testler) veya hayvan deneyleri (in vivo testler) yapılmaktadır. Hücre kültürü test yöntemleri, hayvan deneyleri ile karşılaştırıldığında; daha iyi standardize olması, tekrarlanabilirliği, hızlı ve kolay olması, etik açıdan tartışmaya neden olmaması ve nispeten daha düşük maliyetlerle gerçekleştirilebilmesi gibi önemli teknik avantajlara sahiptir (168,169). Bu çalışmada bahsedilen kıyaslamalar göz önünde bulundurularak, direkt ve indirekt pulpa kuafaj tedavisinde kullanılan materyallerin in vitro ortamda, sitotoksikite ve biyoyumlulukları değerlendirilmiştir.

İn vitro çalışmalarda iki tip hücre kullanılmakta olup bunlar primer hücreler ve devamlı hücre hatlarıdır. Devamlı hücre hatları, süresiz çoğalabilme özelliğine sahip

transformasyona uğramış primer hücreler olup daha stabil bir karakterizasyondadır. Sıklıkla tercih edilen devamlı hücre hatları grubunda; fare fibroblastları (L-929, 3T3), insan epitel hücreleri (HeLa) yer almaktadır (118). Primer hücre kültürleri, doku veya organdan izole edilen hücreler olup kültür ortamında en az 24 saatlik inkübasyonu ile elde edilebilmektedir. Dental pulpa fibroblastları ve diş eti fibroblastları primer hücre kültürüne örnek olarak verilebilir. Dokudan izole edilen hücrelerin izolasyonu ve kültüre edilmesi zahmetli ve zor olmaktadır. Kültür aşamalarının oldukça zahmetli ve hassas olmasına rağmen primer hücrelerin, laboratuvar koşullarında in vivo şartlara en yakın fizyolojik ortamı yansıttığı bildirilmiştir (115,118). Bu karşılaştırmalar neticesinde, bu çalışmada in vivo ortamı daha iyi taklit etmesi ve fizyolojik reaksiyonları daha iyi gözlemleyebilmek adına dental pulpadan izole edilen primer hücre kültürü kullanılmıştır.

Dental pulpadan elde edilen kök hücreler, ortodontik amaçlı çekilen premolar dişler, gömülü üçüncü büyük azı dişleri, süpernümerer dişler ve süt dişlerinden izole edilebilmektedir. Yapılan birçok çalışmada, hücresel açıdan zengin olması, çoğalma ve farklılaşma kapasitelerinin yüksek olması, ağızda en son gelişim gösteren diş olması ve gömük halde bulunup ağız ortamıyla kontamine olmaması nedeniyle kök hücre kaynağı olarak sıklıkla gömülü 3. büyük azı dişleri kullanılmıştır (53,58,170,171). Bu çalışmada dental pulpa kök hücre kaynağı olarak, elde edilebilirliği kolay olan tıbbi atık olarak görülüp etik sorunlar teşkil etmeyen ve ağız ortamıyla ilişkili olmayan 3. büyük azı dişleri kullanılmıştır. Çekime bağlı kırık, çatlak, travma, termal vb. sebeplerden etkilenmemesi adına yumuşak doku retansiyonlu gömülü üçüncü büyük azı dişleri çalışmamıza dahil edilmiştir.

Dental pulpa kök hücreleri, pulpa hücrelerinin sadece %5'ini oluşturur ve ilk olarak Gronthos ve ark. tarafından 2000 yılında izole edilmiştir (53). 2004 yılında yayınlanmış bir doktora tez çalışmasında, Kızıltan ve Seymen isimli araştırmacılar dental pulpadan fibroblastları izole ettiklerini bildirmişlerdir (172). Farklılaşmamış fibroblastlar, daha modern bir terim olan kök hücreler olarak ifade edilmektedir (22). İzole edilen DPSC'lerin kalitesi, öncelikli olarak rejeneratif potansiyellerini etkilemektedir. Üçüncü büyük azıların ekstraksiyonu sonrasında, yumuşak pulpa dokusunun mekanik olarak parçalara ayrılması, enzimatik ayrışma, taşıma ortamı, kültürleme yöntemi ve doğru karakterizasyon, DPSC'lerin izolasyonunda önemli aşamalardır (170). Daha önce yapılan bir çalışmada, dişlerin fosfat tamponlu salin

çözeltisi (PBS) içerisinde, + 4 °C’de beş güne kadar canlılığını sürdürebildiği ancak canlılığın 24 saatlik depolamadan sonra önemli ölçüde azaldığı belirtilmiştir (173). Bu bilgiler doğrultusunda, hücre canlılığı için, dişlerden dental pulpa kök hücre izolasyonunun hemen yapılması gerektiği anlaşılmaktadır. Bu nedenle bu çalışmada kullanılan gömülü üçüncü büyük azı dişlerin ekstraksiyonundan sonra laboratuvara PBS içerisinde, dental pulpanın vitalitesini kaybetmemesi adına, 2 saat içerisinde ulaştırılmıştır.

DPSC’lerin izolasyonu için yaygın olarak kullanılan yöntemler arasında; enzimatik sindirim ve hücre kültür kaplarına yerleştirilen doku eksplantları yer almaktadır. Enzimatik sindirimde, kollajenaz tip I ve II, dispaz, tripsin ve aktaz gibi enzimler kullanılarak, tek hücreli süspansiyonlar hazırlanmaktadır (53,174,175). Diğer yöntemde ise, pulpanın 1-2 mm³’lik fragmanları doğrudan hücre kültür kaplarına yerleştirilmektedir (170). İki yöntemin karşılaştırıldığı çalışmalarda, enzimatik sindirim yönteminde, DPSC’lerin daha yüksek proliferasyon ve farklılaşma gösterdiği bununla birlikte karakterizasyon markerlarını daha iyi ifade ettiği belirtilmektedir (176,177) . Buna karşılık Hilken ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, iki yöntem karşılaştırılmış ve hücre yüzey belirteci ekspresyonu ve farklılaşma potansiyelinde anlamlı bir farklılık bulunamamıştır (178) . Bu doktora tez çalışmasında, DPSC’lerin izolasyonu ve tanımlanması Gronthos ve arkadaşlarının 2000 yılında bildirdiği şekilde enzimatik ayrışma yöntemi kullanılarak yapılmıştır (53).

Bu araştırmada, direkt ve indirekt pulpa kuafaj tedavilerinde kullanılan piyasa isimleri Dycal (Dentsply Sirona, ABD), NuSmile NeoPutty MTA 0.65 gram Starter Kit (NuSmile, Houston, TX, ABD), TheraCal LC (Bisco Inc, Schamburg,IL, ABD) ve Harvard BioCal®-CAP (Harvard, Hoppegarten, Almanya) olan materyaller incelenmiştir. Harvard BioCal-Cap, yeni bir kuafaj materyali olup literatürde dental pulpa kök hücreler üzerinde sitotoksikite, biyoyumluluk ve gen ekspresyonunun değerlendirildiği herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Harvard BioCal-Cap ve TheraCal LC’nin organik bileşimlerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada, termogravimetrik analiz sonucu elde edilen sonuçlara göre, Harvard BioCal-Cap’in içeriğinde uçucu bileşik bulunmadığı ve TheraCal LC’ye kıyasla daha dirençli olduğu rapor edilmiştir. Gaz kromatografisi ve kütle spektrometresi sonuçlarına göre, Harvard BioCal-Cap’te reaksiyona girmemiş HEMA monomerlerine rastlanılmamıştır. Yine aynı analiz

sonucunda TheraCal LC ekstraktlarında ise reaksiyona girmemiş kamforokinon (fotobaşlatıcı) olduğu saptanmıştır (179). Bu olumlu sonuçlar doğrultusunda, klinik kullanımda yerini alabilmesi için Harvard BioCal-Cap kuafaj materyali hakkında, daha fazla in vitro ve in vivo çalışmaya ihtiyaç olduğu, buna bağlı olarak da bu doktora tez çalışmasının literatüre katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Çalışmamızda kullanılan materyallerden NeoPutty MTA, yeni bir pulpa kuafaj materyali olup toz/likit karışım ürünü olan MTA'ların aksine macun formunda bulunmaktadır. Toz/likit karışımının sertleşme reaksiyonu üzerindeki etkisini azaltmak ve klinik uygulamaları kolaylaştırmak adına geleneksel toz/likit simanlara alternatif olarak geliştirilmiştir. NeoPutty üreticisi olan NuSmile (NuSmile, Houston, TX, ABD), toz/likit formunda olan materyallerin kapakları açıldıktan sonra atmosferik neme maruz kalmaları durumunda raf ömürlerinin kısaldığını belirtmektedir. Ancak, NeoPutty MTA ürünü ile bu sorunun elimine edildiğini belirtmişlerdir. NeoPutty MTA'nın su içermeyen organik bir sıvı ile formüle edildiği ve klinik uygulamada dentin tübülleri, pulpa ve apikalden gelen nem ile sertleştiği belirtilmiştir. İn vivo nem varlığında, sertleşme zamanı 37 °C'de yaklaşık 4 saat olarak bildirilmiştir (180). Literatürde NeoPutty MTA ile ilgili sınırlı çalışma bulunmakta olup yapılan bir çalışmada NeoPutty'nin, EndoSequence BC macununa göre biyouyumluluğunun daha iyi olduğu ve raf ömrünün daha uzun olduğu rapor edilmiştir (181). Neo Putty MTA'da renklenme probleminin önüne geçilmesi adına, radyopaklaştırıcı ajan olarak bizmut oksit yerine tantalyum oksit (Ta₂O₅) kullanılmıştır (182). Yeni bir materyal olan NeoPutty MTA'nın, sitotoksikite ve biyouyumluluk değerlerinin, gelecek çalışmalar adına literatüre katkı yapacağı düşünüldüğü için bu çalışmada araştırma grubuna dahil edilmiştir.

Materyallerin hücre kültürüne yerleştirilmesinden önce, çalışmada gruplar arası farklılıkların doğru bir şekilde değerlendirilebilmesi ve belli bir standardizasyonu sağlaması için farklı boyutlarda kalıplar kullanılmaktadır. Bu çalışmada steril teflon disk kullanılırken çapı 6 mm derinliği 2 mm olarak belirlenmiştir. Rodrigues-Lozana ve ark., çapı 5mm derinliği 2mm'lik silindirik kauçuk kalıp, Bortoluzzi ve ark., çapı 5mm derinliği 3mm teflon kalıp tercih ederken Wildbiller ve ark., çalışmamızla benzer şekilde 6mm çapında 2 mm derinliğinde teflon kalıp kullanmışlardır (183–185).

Dental materyallerin hücre kültürü ile teması, direkt veya indirekt olabilmektedir. Direkt temas yöntemi ile materyal veya materyalin ekstrakt salınım sıvıları temas halinde

iken indirekt yöntemde materyal ile hücreler arasında agar, filtre membran veya dentin bariyer gibi sistemler bulunmaktadır. Saw ve arkadaşlarının 2005 yılında yaptıkları bir çalışmada, kompozitlerin L-929 hücre hattı üzerindeki sitotoksiteleri MTT canlılık analizi ile değerlendirilmiş, ekstraksiyon temas testi, direkt temas testi ve indirekt temas testinin hassasiyeti karşılaştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre ekstraksiyon temas testinin en hassas yöntem olduğu belirtilmiştir (186). Ek olarak, ekstraksiyon temas testi için ISO standartlarına göre, hücrelerin 37°C sıcaklık ve 24 saatlik inkübasyon süresinde ekstrakt salınım sıvıları ile temas etmesi gerektiği belirtilmektedir (187). Diğer bir yaklaşıma göre Gandolfi ve arkadaşları, materyallerin hücreler üzerine direkt temas yöntemi ile uygulanmasının in vivo ortamı tam olarak yansıtmayacağını, vücudun savunma mekanizmasının göz ardı edildiğini belirtmişlerdir (15,95). Bunun yanı sıra Cao ve arkadaşları, agar, filtre membran ve dentin bariyer sisteminin kullanılmadığı hücre kültürü direkt temas test yönteminde, hücre ile materyal temasının in vivo şartlara yakın sonuçlar oluşturacağını bildirmişlerdir (188). Bu çalışmada ekstraksiyon test yöntemi ile materyallerin salınım sıvılarının elde edilmesi aşamasında sterilizasyon filtreleri (0.22'lik) kullanılmıştır. Böylece hem kontaminasyon riskinin en aza indirilmesi hem de materyal ekstraktından uzakta kalan hücrelerin daha doğru ve homojen sonuçlarla incelenebilmesi amaçlanmıştır (188).

Multipotent kök hücrelerin tanımlanması ve diğer hücrelerden farklılarının belirtilebilmesi adına 2006 yılında Uluslararası Hücresel Tedavi Derneği (ISCT) üç minimal kriter yayınlamıştır. Bu kriterler arasında; mezenkimal kök hücrelerin farklılaşma yetenekleri, plastisite (kültür kabına yapışma) ve spesifik yüzey antijenleri eksprese edebilme özellikleri yer almaktadır. Hematopoetik kök hücreler ile mezenkimal kök hücrelerin ayırt edilmesi açısından spesifik yüzey antijenlerinin ekspresyonu ile karakterizasyonu yapılabilmektedir. Flow sitometrik analizler mezenkimal kök hücrelerin fenotipik karakteristiklerinin belirlenmesi amacıyla yapılmaktadır (47,68).

Literatürde flow sitometri kullanılarak dental pulpa kök hücreleri (DPSC) üzerinde kök hücre marker karakterizasyonun incelendiği birçok çalışma mevcuttur. Yapılan bu çalışmalarda, dental pulpa mezenkimal kök hücrelerin pozitif yüzey antijenleri CD90, CD73 ve CD105'e olarak belirlenirken, hematopoetik kök hücrelerin markerı olan ve negatif yüzey antijeni olarak belirtilen CD44, CD45, CD14 ve CD34'ü taşımadıkları rapor edilmiştir. Bu sonuçlar Uluslararası Hücresel Tedavi Derneği

(ISCT)’ne göre, multipotent mezenkimal kök hücreleri tanımlama ve karakterizasyon analizine yönelik minimal kriterleri karşılamaktadır (47,189,190) . Bu araştırmada yumuşak doku retansiyonlu, tam gömülü, çekime bağlı kırık, çatlak veya herhangi bir termal hasar bulunmayan üçüncü büyük azı dişlerinden izole edilen dental pulpa mezenkimal kök hücreleri kullanılmıştır. İzole edilen bu hücrelerin flow sitometri analizi sonucunda, mezenkimal kök hücre belirteci olan CD90, CD73, CD44, CD105, CD146 ve CD29 yüzey işaretlerini gösterirken, hematopoetik kök hücre belirteci olan CD34, CD45, CD14 ve CD31 yüzey işaretlerini göstermediği belirlenmiştir.

Dental kuafaj materyallerinin sitotoksikite ve biyouyumluluğunun değerlendirilmesinde birçok test ve yöntem kullanılmaktadır. Hücre canlılığının ölçüldüğü çalışmalarda en sık, canlı hücrelerin metabolik aktivitesi, enzim aktivitesi ve canlı hücrelerin sayısı ile orantılı olarak oluşturduğu sinyalizasyon mekanizmasına bakılmaktadır. Bu sinyalizasyonlar sonucunda tetrazolyum indirgemesi, resazurin indirgemesi ve proteaz aktivasyonu gerçekleşmektedir. Sıklıkla kullanılan başka bir test yöntemi ise ATP miktarının canlı hücre sayısı ile doğru orantılı olarak kaydedildiği luminojenik ATP tahlilidir. ATP tahlili en hızlı ve hassas yöntem olmasına karşın tetrazolyum indirgeme analizleri, uygun verimlilikte daha ucuz bir alternatif olarak karşımıza çıkmaktadır. Tetrazolyum indirgeme deneylerinde en sık kullanılan yöntemler arasında hücrelere nüfuz etmeyen MTS (5- (3-karboksimetoksifenil) -2- (4,5-dimetil-tiyazol) -3- (4-sülfofenil) tetrazolyum), XTT (2,3-bis-(2-metoksi-4-nitro-5-sulfofenil)-2Htetrazolyum-5-karboksanilid), WST-1(2-(2-metoksi-4- nitrofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disülfofenil)-2H) ve canlı hücrelere nüfuz eden MTT (3- (4,5-dimetiltiyazol-2-il) -2-5-difeniltetrazolyum bromür) testi yer almaktadır (128).

Yaygın olarak kullanılan birinci nesil tetrazolyum türevidir olan MTT, mitokondriyal dehidrogenazlar tarafından suda çözünmeyen formazana indirgenir ve bu nedenle vücutta sitozolik kristaller birikmektedir. Formazan ürününün spektrometrik ölçümünde, hücre parçalanması ve sitozolik kristallerin gece boyu çözünmesi gerekmektedir. Sitozolik kristaller küçük miktarda olsa bile sitotoksik etkilidir. Galluzzi ve arkadaşları bu sebeple MTT testinin, uç nokta değerlerin belirlenmesinde kullanılabileceğini belirtmiştir. MTT’nin aksine ikinci nesil tetrazolyum testleri, kültür süpernatantında serbestçe yayılabilen, toksik olmayan, suda çözünen ve hücre

zarından geçebilen ürünlere metabolize edilmektedir. Galluzzi ve arkadaşları, MTS ve WST-1'nin kültür ortamındaki canlılığı MTT kadar olumsuz etkilemediğini, dolayısıyla tekrar eden deneylere ve/veya gerçek zamanlı belirteçlerle uyumlu olduğunu bildirmişlerdir (191).

Canlı hücreler, MTS içerisindeki formazanı kültür ortamında çözünür hale indirmediği için MTS testinde suda çözme prosedürü ortadan kalkmıştır ve MTT'ye göre uygulama prosedürü daha kolaydır. Canella ve arkadaşları yaptıkları araştırmada hücre canlılık testi olarak, düşük maliyeti, doğruluğu, hızlı ve tekrarlanabilir olması ve kullanım hassasiyeti nedeniyle MTS yöntemini tercih etmişlerdir (192). Birçok araştırmacı tarafından da kullanılan ve desteklenen MTS test yöntemi ile elde edilen verilerin karşılaştırılabilmesi mümkündür. Bu çalışmada ölçüm kolaylığı, doğruluğu, hızlı ve tekrarlanabilir olması nedeniyle 1., 3., 5., 7., ve 14.günlerin hücre canlılığı bulgularının karşılaştırıldığı MTS yöntemi tercih edilmiştir.

Küden ve arkadaşları, WST-1 testi ile 1., 3.ve 7.günlerdeki MTA Angelus, TheraCal LC ve TheraCal PT hücre canlılık değerlerini karşılaştırmışlar ve TheraCal LC ve TheraCal PT'nin MTA'ya göre daha sitotoksik etkili olduğunu rapor etmişlerdir. Ancak MTA Angelus'un da hücre canlılığı değerlerinin kontrol grubuna göre yarı yarıya azaldığını bildirmişlerdir. Bu sonucun başlangıç ortamında gözlenen yüksek alkalın pH'tan kaynaklanabileceğini belirtmişlerdir (193). Bortoluzzi ve ark., piyasaya sürülen rezin esaslı kalsiyum silikat simanların, başlangıç ortamında yüksek alkalitelerinden dolayı sitotoksik olabileceğini belirten çalışmaları ile bu hipotezi desteklemektedir (185). Yapılan bu çalışmada, klinik kullanımda yerini yeni alan NeoPutty MTA, rezin esaslı materyal olarak TheraCal LC ve yeni piyasaya sürülmüş rezin esaslı MTA içeren Harvard BioCal-Cap'in MTS test metoduyla 1., 3., 5., 7. ve 14. günler hücre canlılığına bakılmıştır. 1.gün sonunda NeoPutty MTA, TheraCal LC ve Harvard BioCal-Cap'in hücre canlılığı, negatif kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı derecede yüksek bulunmuş, diğer günlerde ise aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır. Bu çalışmada yer alan macun formundaki NeoPutty MTA'nın ortamdaki nemi kullanarak sertleşme reaksiyonunu gerçekleştirmesi, Küden ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada kullanılan MTA Angelus ile NeoPutty MTA'nın hücre kültürü ortamında aralarındaki farkı yaratan neden gibi görünmektedir.

Literatürde yeni bir materyal olan TheraCal PT'nin sitotoksitesini değerlendiren iki ayrı çalışmada TheraCal PT'nin, öncüsü olduğu TheraCal LC ile kıyaslandığında, hDPSC'ler üzerindeki in vitro biyouyumluluğunun pozitif yönde geliştiğini bildirmişlerdir. Bu çalışmalarda, MTT yöntemi kullanılarak 24, 48 ve 72.saatlerdeki hücre canlılığı değerlendirilmiştir. Yapılan bu iki çalışmada, TheraCal LC'nin tüm konsantrasyon oranlarında, hDPSC canlılığını olumsuz etkilediği, TheraCal PT'de ise bu etkinin daha düşük olduğu ve konsantrasyon oranlarının etkisinin olmadığı ortaya konmuştur (184,194). Bu doktora tez çalışmasında MTS test yöntemi tercih edilmiş olup 1. 3. 5.7. ve 14.gün hücre canlılığı değerleri karşılaştırılmıştır. Bu çalışmada kullanılan kuafaj materyalleri için farklı konsantrasyon oranları tercih edilmemiş olması, Sanz ve Rodriguez-Lozano'nun yaptıkları çalışmalardaki farklı konsantrasyon oranlarının hücre canlılığı üzerine herhangi bir farklılık oluşturmadığı sonucunu desteklemektedir. Yapılan bu iki ayrı çalışmanın aksine bu araştırmada TheraCal LC, negatif kontrol grubuna göre 1.gün sonunda anlamlı derecede yüksek hücre canlılığı göstermiştir (184,194). Mevcut literatür ışığında, MTS'nin kültür ortamında, MTT kadar hücre canlılığını olumsuz etkilemediği ve gerçek zaman belirteçlerine daha hassas bir test yöntemi olarak görülmesi farkı yaratan neden olarak düşünülmektedir (191).

2022 yılında Lozano ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, NeoPutty MTA, NeoMTA Plus ve MTA Angelus'un dental pulpa kök hücreler üzerindeki 24, 48 ve 72. saatlerdeki sitotoksite değerlerine bakılmış ve 1:1, 1:2, ve 1:4.'lük üç farklı konsantrasyonu karşılaştırılmıştır. MTT hücre canlılığı testinin kullanıldığı bu çalışmada 3.gün sonunda, seyreltilmemiş (1:1) NeoPutty MTA materyali ile muamele edilmiş hücrelerde hafif bir düşüş gözlenirken, 1:2 ve 1:4'lük dilüsyonlu bu üç materyalin, 24, 48 ve 72. saat sonunda kontrol grubu ile benzer bir sito-uyumluluk gösterdiği rapor edilmiştir (195). Bu doktora tezinde diğer çalışmadan farklı olarak yeni bir MTA ürünü olarak piyasaya sürülen NeoPutty MTA'nın MTS testi analiz sonuçlarında 1.3.5.7. ve 14.gün hücre canlılığı sitotoksite değerlerine bakılmış ve konsantrasyon farklılıkları elimine edilmiştir. 1.gün sonunda NeoPutty MTA'nın MTS testinde hücre canlılığı, negatif kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunmuş ve 3.gün sonunda hücre canlılığında düşüş gözlenmiştir. Negatif kontrol grubu ile 3. 5. 7.ve 14.gün sonu değerleri karşılaştırıldığında ise aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamamıştır. Bu çalışmanın bulguları, Lozano ve ark.,

hDPSC'ler üzerinde NeoPutty MTA ve NeoMTA Plus'ın altın standart olarak kabul edilen MTA Angelus'a benzer biyouyumluluk gösterdiğini rapor eden çalışmanın bulgularını destekler niteliktedir. Literatürde, NeoPutty MTA'nın biyolojik özelliklerine ilişkin bilimsel çalışmalar yetersiz kalmaktadır. 2021 yılında Sun ve arkadaşları tarafından yapılmış olan bir diğer çalışmada NeoPutty MTA ve EndoSequence BC RRM Putty (ES Putty) kuafaj materyallerinin 3. gün sonundaki MTT hücre canlılık değerlerine bakılmıştır ve NeoPutty MTA'nın hem periodontal kök hücreler üzerinde hem de dental pulpa kök hücreleri üzerinde, EndoSequence BC-RRM Putty'e kıyasla daha az sitotoksik etki gösterdiği ve EndoSequence Putty'e göre daha biyouyumlu olduğunu rapor edilmiştir (196).

Toksik bileşikler içerisinde yer alan ve kuafaj materyallerine radyo-opak özellik kazandıran tantalyum oksitin hücreler üzerinde kümülatif etki yapabileceği bildirilmiştir (197,198). Bu doktora tez çalışmasının MTS sonuçlarına göre, hücre canlılığının 3.günden sonra NeoPutty MTA deney grubu için istatistiksel olarak azalmaya başlaması mevcut literatürler ışığında anlamlı olmaktadır.

Kim ve arkadaşlarının, çeşitli pulpa kuafaj materyallerinden ProRoot MTA, TheraCal LC, Biodentin ve Dycal'ın dental pulpa kök hücreleri üzerindeki sitotoksikite ve biyouyumluluğu değerlendirildiği çalışmada 1., 2., 3. ve 5.günlerde MTT testi ile hücre canlılığına bakılmıştır. Hücre canlılığı ve migrasyonu açısından ProRoot MTA, Biodentin ve kontrol grubu arasında önemli ölçüde farklılık gözlenmezken, TheraCal LC'nin kontrol grubuna göre 2-4.günler arası hücre migrasyonunun daha yavaş olduğu belirtilmiştir. Dycal (Dentsply) grubunda ise hücre migrasyonunun olmadığı rapor edilmiştir (197). Bununla birlikte Dycal deney grubunun sonuçları ile benzer olan bu çalışmada, kullanılan kuafaj materyallerinden Dycal, kalsiyum silikat esaslı materyallerden yeni piyasaya sürülen rezin esaslı MTA içeren Harvard BioCal-Cap ve TheraCal LC kullanılmıştır. MTS testi ile yapılan hücre canlılığı analizi 1.3.5. ve 7.gün sonuçlarında, negatif kontrol grubuna göre Dycal deney grubu çok düşük bir hücre canlılığı gösterirken pozitif kontrol grubu ile benzer sonuçlar bulunmuştur. Kalsiyum hidroksit içerikli Dycal materyalinin başlangıç reaksiyonunda, ortama yayılan hidroksil iyonları nedeniyle ortam pH'ı yaklaşık olarak 12' ye kadar yükseltmektedir. Öte yandan yükselen pH ile pulpa dokusunda yüzeysel nekroz oluşmakta ve sonrasında mineralizasyon mekanizması ile onarım

gerçekleşmektedir (199). Dycal materyalinin 1.3.5.7. günlerde negatif kontrol grubuna göre oldukça düşük ve sitotoksik olması bu veriler ışığında anlamlı olmaktadır.

Bu araştırmada TheraCal LC ve Harvard BioCal-Cap'in hücre canlılığı 1. ve 3. günlerde kontrol grubuna göre yüksek bulunmuştur. Yapılan çalışmalarda, TheraCal LC'nin sitotoksitesinin pulpa dokusu ile temas ettikten sonra polimerize olmayan, Bis-GMA HEMA, TEDGMA ve UDMA gibi bileşiklerin artık monomerlerinden kaynaklandığı bahsedilmektedir (105,200–202). Bunun birlikte, TheraCal LC'nin güvenlik veri sayfasında Bis-GMA'nın bir bileşik olarak listelenmediği görülmektedir. Nilsen ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada tedarikçi tarafından sağlanan güvenlik bilgi formunda (2011 yılında yayınlanmış form) listelenmiş olmasına rağmen TheraCal LC'nin UPLC-MS (kütle spektrometresi) analizinde Bis-GMA'nın tespit edilmediği rapor edilmiştir (203,204). Aynı şekilde Nilsen ve arkadaşlarının, TheraCal LC'nin organik bileşimini ve elüatlarının güvenlik veri sayfalarıyla ilişkili olarak araştırdıkları çalışmada, bu veri sayfasında beyan edilmeyen birkaç reaktif ve organik madde içeriğine rastladıklarını bu malzemelerin kullanımı için daha ileri in vitro ve in vivo çalışmalara ihtiyaç olduğu belirtilmektedir. TheraCal LC ile ilgili yapılan sitotoksite çalışmalarında test edilen numunelerde farklı bir bileşime sahip materyal kullanılmış olabileceği düşünülmektedir. (203). Bu çalışmada kullanılan kalsiyum silikat esaslı bir materyal olan TheraCal LC ve piyasaya yeni sürülen rezin esaslı MTA içeren Harvard BioCal-Cap'in MTS testi kontrol grubu sonuçlarına göre, 1. ve 3. günlerde hücre canlılığı üzerine sitotoksite göstermemiştir. Mevcut literatür ışığında bu çalışmanın bulguları Nilsen ve arkadaşlarının yaptıklarını çalışmanın raporlarını desteklemektedir.

Yeni pulpa kuafaj materyallerin biri olan Harvard BioCal-Cap ile ilgili literatürde yayınlanmış yeterli bilgi bulunmamaktadır. Literatür taramaları yapılırken Harvard BioCal-Cap ile ilgili sadece bir doktora tezine rastlanılmıştır. 2022 yılında yayınlanan tez çalışmasında, Harvard BioCal-Cap, MTA, Biodentin, SRD ve Fuji II'nin insan diş eti fibroblastları üzerinde 1.3. ve 7.gün canlılık değerlerine bakılmıştır (205). Harvard BioCal-Cap'in hücre canlılığı üzerine olan etkisinin ve biyouyumluluğun diğer gruplardan daha iyi olduğu belirtilmiştir ve kaydedilen sonuçlar bu çalışmanın bulguları ile benzerlik göstermektedir. Çalışmamızda

kullanılan Harvard BioCal-Cap ile TheraCal LC'in MTS hücre canlılığı analiz bulguları benzer sito-uyumluluk göstermektedir. Eliaçık ve Seymen isimli araştırmacıların 2021 yılında yaptıkları bir çalışmada, rezin içerikli materyallerin üretici firma önerileri doğrultusunda uygulandığında pulpa dokusu üzerinde olumsuz etki göstermeyecekleri, ancak yapılarında bulunan monomerlerin polimerlere dönüşümü sağlanamadığında, salınacak monomerlerin pulpa dokusu üzerinde sitotoksik etkileri olacağı belirtilmiştir (206). Aynı şekilde literatürde yayınlanan başka bir çalışmada, polimerizasyon sonrası TheraCal LC ile yapılan pulpa kuafaj tedavisinin, artık monomerler nedeniyle başarısının düşük olabileceği bildirilmiştir (207). Desislava ve arkadaşlarının 2021 yılında yaptıkları bir çalışmada, Harvard BioCal-Cap ve TheraCal LC'nin organik bileşimleri araştırılmıştır. Her iki materyalin gaz kromatografisi ve kütle spektrometrisi analizi sonucunda herhangi bir serbest monomer bulanamamış, bunun olası bir nedeni olarak gaz fazına geçemeyen prepolimerin olabileceği varsayımı yapılmıştır. TheraCal LC'nin kromatogramlarında, kamforokinon (foto başlatıcı) dışında herhangi bir monomere ve her iki materyalde de Bis-GMA'ya rastlanılmamış, Nilsen ve ark. 2017'de yaptıkları bir çalışmanın bulgularını da desteklediği belirtilmiştir (179,203). Yeni kuafaj materyali Harvard BioCal-Cap'te ise ne HEMA ne de başka bir artık monomere rastlanılmamıştır (179). Bu sonuçlara göre çalışmamızda kullanılan kuafaj materyallerinden Harvard BioCal-Cap ve TheraCal LC'nin, sitotoksikite ve biyouyumluluğun kabul edilebilir olduğu, bahsedilen çalışmalarla benzer sonuçlar gösterdiği düşünülmektedir.

2015 yılında Saberi ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada, Biodentin, MTA, CEM ve Oktakalsiyum fosfat materyalinin apikal papilla kök hücreleri üzerindeki 24, 48 ve 168. saatlik hücre canlılığını, MTT analizi ile değerlendirmişler ve en az sitotoksik etki gösteren materyalin CEM olduğunu rapor etmişlerdir. Aynı çalışmada in vitro ortamda, hücre canlılığı testlerinin daha iyi analizi için çalışma sürelerinin 168 saate çıkarılmasının etkili olabileceği görüşü savunulmaktadır. ISO standartlarına göre hücre canlılığı testleri 24, 48 ve 72 saat sonunda değerlendirilebilmektedir (208). Bu çalışmada materyallerin uzun dönem toksik etkilerini de inceleyebilmek için 7.gün (168. saat) hücre canlılığı MTS analizinden sonra 14. gün MTS analizi de yapılmıştır. 7. gün ile 14.gün karşılaştırıldığında Harvard BioCal, TheraCal LC ve Neo Putty MTA'da hücre canlılığı azalırken Dycal'ın hücre canlılığında artış gözlenmiştir. Buna ek olarak

14.gün MTS analiz sonuçlarına göre Harvard BioCal, Neo Putty MTA, TheraCal LC ve Dycal kuafaj materyalleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadığı görülmüştür. Hücresel adezyonun daha iyi olması için inkübasyon süresinin uzatılmasının avantaj sağlayabileceğini bildiren bazı çalışmalar bulunmaktadır (209,210). Camilleri ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, beyaz ve gri MTA'nın 24 saatlik inkübasyon periyodunun ardından 28 günlük inkübasyonun sonunda biyouyumluluk değerlerinde düşüş olduğunu bildirirken bu sonuçların, bu çalışmadaki Harvard BioCal, TheraCal LC ve Neo Putty MTA'nın 14.gün MTS hücre canlılık değerlerindeki azalma ile uyumlu olduğu, inkübasyon süresinin artmasıyla hücre canlılığının ve adezyonun artmadığı görülmektedir (211).

Kolada ve arkadaşları, hücre canlılığını belirleyen yöntemlerden ISO'yu referans olarak MTT test metodunu kullanırken, Cannella ve arkadaşları hızlı, ucuz ve tekrarlanabilir olması nedeniyle MTS test metodunu tercih etmişlerdir (192,212). Bununla birlikte, MTT ve MTS gibi test yöntemlerinde, mikro-çevre koşullarına karşı canlı hücre sayısı tayininde duyarlılık azabilmekte ve hücre metabolizmasının önemli ölçüde azaldığı apoptoz aşaması, hücre ölümü olarak kaydedilebilmektedir (213,214). Bu yöntemlere benzer flow sitometri cihazının ise diğer metotlara göre daha hızlı olması, daha hassas sonuçlar vermesi ve daha güvenilir olması ile hücre canlılığının değerlendirilmesinde tercih edilen yöntemlerdendir (215).

Hücrede henüz nükleer farklılaşmalarının görülmediği, hücre membranında erken dönem değişikliklerinin olduğu sırada gerçekleşen apoptozis flow sitometri ile ölçülebilmektedir. Apoptozis olayı başladığında hücre membranının iç kısmında bulunan fosfotidilserin hücre membranının dış yüzeyine yerleşmektedir. Flow sitometride kullanılan Annexin V, fosfotidilserine bağlanmakta ve hücrelerde apoptoz tayini için kullanılmaktadır. Nekroz-canlı hücre ayrımı için ise hücreler eş zamanlı olarak propidyum iyodür boyası ile boyanarak sonuçlar daha güvenilir hale gelmektedir (216,217). Bu çalışmada hücre canlılığını tayin eden MTS canlılık analizinin yanı sıra daha hassas sonuçlar elde edilen, erken dönem değişikliklerinin de kaydedildiği flow sitometri yöntemi uygulanmış ve Annexin V/propidyum iyodür kullanılarak apoptoz/nekroz tayini yapılmıştır.

Dou ve arkadaşlarının 2020 yılında yaptıkları araştırmada, Dycal (Dentsply), Pro-Root MTA, iRoot BP, trombosit zengin fibrin (PRF) ve konsantre büyüme

faktörü (CGF), pulpa kuafaj materyali olarak kullanılmış ve dental pulpa kök hücreleri üzerinde sitotoksitesi ölçülmüştür. Tripan mavisi ile 1., 3., ve 7. gün canlılık analiz sonuçlarına göre Dycal deney grubu canlılık değerleri diğer gruplara göre anlamlı derecede düşük bulunmuştur. Ca (OH)₂ dışındaki tüm materyaller, hDPSC'ler ile iyi bir biyouyumluluk sergilemiştir (218). Kaydedilen sonuçların bu çalışmanın bulgularıyla uyumlu olduğu görülmektedir. Aynı çalışmada, beş farklı materyalin dental pulpa kök hücrelerindeki apoptoz üzerine etkisi, flow sitometri cihazında Annexin V/propidyum iyodür (PI) boyaları kullanılarak 1.3. ve 7.günler için değerlendirilmiştir. Kontrol grubu ile karşılaştırılan MTA, iRoot BP, PRF ve CGF; hücre canlılığı, hücre ölümü ve apoptozu önemli ölçüde etkilemezken, Dycal'ın dental pulpa kök hücreler üzerindeki sitotoksitesinin diğer materyallere göre nispeten daha yüksek olduğu kaydedilmiştir. Dycal grubunda, ölü veya apoptotik hücre sayısının önemli ölçüde arttığı bildirilmiştir (218). Bu doktora tezinde, MTS canlılık analiz metodun yanı sıra Annexin V/Propidyum İyodür (PI) boyaları kullanılarak yapılan flow sitometri analizinde, 1.7. ve 14.gün canlılık, erken ve geç apoptoz, nekroz hücre yüzdelere bakılmıştır. 1.gün sonuçları n=4 tekrar almak üzere yapılmış ve hiçbirinde anlamlı sonuçlar kaydedilememiştir. 7.gün sonuçlarına göre ışıkla polimerize olan rezin esaslı MTA içeren Harvard BioCal-Cap grubunda diğer grupların aksine canlılık, erken/geç apoptozdaki hücre yüzdesinin diğer gruplara göre daha yüksek olduğu kaydedilmiş. 14.gün flow sitometri sonuçlarına göre Harvard BioCal-Cap grubunda apoptotik hücre yüzdesi artarken NeoPutty MTA'da canlılık yüzdesi artmış, apoptotik hücre yüzdesi ise azalma eğilimi göstermiştir. Harvard BioCal-Cap, NeoPutty MTA ve TheraCal LC deney gruplarının Dycal deney grubuna göre dental pulpa kök hücreleri üzerinde daha uyumlu bir sitotoksite ve biyouyumluluk gösterdiği gözlenirken Dou ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmanın aksine bu çalışmada, 14. gün canlılık ve apoptoz değerleri karşılaştırılmış ve farklılıklar gözlenmiştir (218). Uzun dönem etkilerinin incelenmesi adına inkübasyon süresinin arttığı daha fazla in vitro ve in vivo çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır. Yeni materyallerin içerdiği bileşim ve bileşiklerinin araştırılması gerekmektedir.

MTA'nın in vitro ortamda gösterdiği sitotoksik etkilerin, hücrelerin materyale verdiği yanıt, hücre tipi, çalışma süresinin seçimi, medyum değiştirme sıklığı, materyalin konsantrasyonu, doğrudan veya indirekt temas gibi birçok faktöre bağlı olabileceği belirtilmektedir (86). Tsai ve arkadaşlarının 2018'de, MTA'nın SHED'ler

üzerinde hücre canlılığını direkt ve indirekt temas yöntemi ile incelediği çalışmada, WST-1 test metodu ve apoptoz tayin yöntemi olarak TUNEL ve Annexin V/7-AAD boyama yöntemi kullanılarak kalitatif analizi yapılmıştır. MTA'nın direkt temas etkisi ile SHED'ler üzerinde canlılığı olumsuz etkilediği bulunmuştur (219). Bu çalışmada ise materyalin hücre kültürü ile temasında, ekstrakt yöntemi kullanılmış, flow sitometride Annexin V/PI boya ile kantitatif bir analiz yapılmıştır. 7. gün Annexin V/ PI boyama flow sitometri analiz sonuçlarına göre NeoPutty MTA, Dycal ve TheraCal LC deney grupları benzerlik gösterirken Harvard BioCal-Cap deney grubunda hücre canlılığının yüksek ve hücre apoptoz düzeyinin ise düşük olduğu bulunmuştur. 14.gün Annexin V/ PI boyama ile flow sitometri analizinde NeoPutty MTA, TheraCal LC ve Harvard BioCal-Cap benzer canlılık ve apoptoz değerleri gösterirken en sitotoksik materyal Dycal olarak kaydedilmiştir. Saidon ve arkadaşları yaptıkları bir araştırmada, ProRoot MTA'nın yüksek pH'ının, hücrelerde protein denatürasyonuna neden olduğunu ve gün geçtikçe pH'ın dengelenmesiyle hücre sitotoksitesinin azaldığını bildirmişlerdir (220). Bu çalışmada yer alan NeoPutty MTA'nın 7.gün hücre apoptoz yüzdesinin 14. günde azalması, Saidon ve arkadaşlarının yaptığı çalışmanın verileriyle uyumlu sonuçlar göstermektedir.

Kalsiyum hidroksit (Dycal), yüksek pH sonucu oluşan yüzey nekrozu ve beraberinde gerçekleşen pulpanın inflamatuvar yanıtı ile tamir dentini oluşumunu indüklemektedir. MTA düzenli kalsiyum hidroksit salınımı ile, hücresel iyileşme süresinde onarımını devam ettirmekte ve kalsiyum hidroksit kadar sitotoksik sonuçlar göstermemektedir (221,222). Bu doktora tez çalışmasında, 7. gün Annexin V/ PI flow sitometri analiz sonuçlarına göre Dycal %29.36, NeoPutty MTA %27.23, TheraCal LC %35 ve Harvard BioCal-Cap %75.59 oranlarında canlı hücre kaydedilirken, 14. gün NeoPutty MTA'nın %54.53 ve Dycal'ın %23.7'lik hücre canlılığı göstermesi MTA'nın akut sitotoksitesinin zamanla hücreler tarafından tolere edilebilir olduğunu düşündürmüştür. Yeni bir materyal olan Harvard BioCal-Cap ile ilgili literatürde daha önce bir çalışma yapılmamış olması, verilerin karşılaştırılamaması, bileşimin tam olarak bilinmemesi, incelenen materyallerin tek bir konsantrasyon oranında kullanılması çalışmanın limitasyonları arasında yer almakta daha fazla in vitro ve in vivo çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

Dental materyallerin biyouyumluluğu değerlendirmek için in vitro ortamda, birçok hücrel analiz metodu önerilmiştir. Yöntem çeşitliliği ile bir materyalin temel biyolojik karakterizasyonu ve altta yatan hücrel mekanizmaların analizine imkân tanınmaktadır. Materyal ile muamele edilmiş hücrelerin, hücrel toksisite (sitotoksisite) ve ölümcül olmayan konsantrasyonlarda kalıtsal DNA hasarı (genotoksisite) gibi etkileri incelenmektedir. Son zamanlarda, dental materyallerde bulunan rezin monomerler tarafından, hücrelerde yüksek seviyelerde reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretilmesi, sitotoksisite, genotoksisite ve normal hücre döngüsündeki değişiklikler ile ilişkilendirilmiştir (10,223).

Camargo ve arkadaşlarının 2009'da yaptığı bir çalışmada, Vitrebond, kalsiyum hidroksit (Hydro C), hint yağı, gri ve beyaz MTA, tranfekte edilmiş dental pulpa kök hücreler (tHPCs) ile farklı dilüasyonlarda muamele edilmiştir. tHPC ile bir saatlik kısa maruziyet sonrasında ROS üretiminin göstergesi olan DCF floresansı oluşumu belirlenmiştir. Kalsiyum hidroksit (Hydro C)'in orijinal ekstraktı ile seyreltilmiş dilüasyonu (1:2), ROS üretiminde iki kat artışa yol açmıştır. Buna karşılık, gri ve beyaz MTA ve hint yağı ekstratlarında artmış ROS üretimi tespit edilememiştir. Öte yandan Vitrebond'un orijinal ekstratında ROS üretimi yaklaşık yedi kat artmıştır (222). Bu çalışmada ekstrakt yöntemi kullanılırken farklı dilüasyon oranları tercih edilmemiş ve 45 dakikalık inkübasyon sürecinin ardından floresans okuyucuda okutulan Harvard BioCal-Cap, NeoPutty MTA, TheraCal LC ve Dycal (Kalsiyum hidroksit)'in ROS ölçümleri yapılmıştır. Kontrol grubuna göre Dycal'da ROS üretimi artarken, Harvard BioCal, TheraCal ve Neo Putty MTA'da ROS artışı gözlenmemiştir. Diğer grupların kontrol grubu ile ROS üretimi arasındaki fark istatistiksel olarak yüksek düzey anlamlılık gösterirken ($p \leq 0.0001$), NeoPutty MTA ile kontrol grubu arasında ise istatistiksel olarak anlamlılık bulunmaktadır ($p \leq 0.01$). Bu bulgular Rezende ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada MTA'ya maruz kalan makrofajların, ROS üretiminde artışa sebep olmadığını belirten raporla uyumlu sonuçlar göstermektedir (224).

Sanz ve arkadaşlarının 2021 yılında yaptıkları bir çalışmada, TheraCal LC, TheraCal PT ve Biodentin'in dental pulpa kök hücreler (hDPSCs) üzerinde ROS artışı değerlendirmiştir. Test edilen materyallerin farklı dilüasyon oranlarıyla muamele edilen hDPSC'lerde hücre içi ROS salınımlarında, Biodentin'in dilüasyon gruplarının hiçbirinde kontrol grubu ile önemli farklılıklar göstermediği rapor edilmiştir.

TheraCal LC ile muamele edilen hücrelerde ROS artışı yüksekken, bu materyalin seyreltildiği dilüasyonlarda, ROS üretimin azaldığı görülmüştür. TheraCal PT ile muamele edilen hücrelerde seyreltilmemiş halde ROS artışı bir miktar gözlenirken seyreltilmiş dilüasyonlarında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır (194). Bu çalışmada, TheraCal LC ve yeni bir materyal olup rezin içerikli MTA içeren Harvard BioCal-Cap, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ROS üretiminde artışa neden olmadığı görülmüştür. Bu çalışmanın bulguları ile uyumlu sonuçlar gösteren bir çalışmada, Sanz ve arkadaşları dilüasyon oranlarının değişmesi ve materyalin seyreltilmesiyle, TheraCal LC'nin ROS üretiminde azalma eğilimde olduğunu belirlemişlerdir. Bunun yanı sıra hücre içi yüksek ROS artışı; hücresel DNA'nın, proteinlerin, lipidlerin ve zar yapısında bulunan proteinlerin oksidasyonuna yol açabilir ve sonuç olarak hücrelerin yapısal ve bütünlüğünü değiştirebilmektedir (225). Bu nedenle, uygun koşullar altında sergilediği yeterli ROS miktarı ve rejeneratif potansiyele sahip olan hDPSC'ler ile muamele edilen Harvard BioCal-Cap, TheraCal LC ve NeoPutty MTA'nın vital pulpa tedavi prosedürlerinde kullanımının daha da destekleneceği düşünülmektedir.

Kullanılan kuafaj materyallerinin kök hücreler üzerindeki osteojenik gen ekspresyonu; doku mühendisliği ve rejeneratif tıbbın ilerlemesine yardımcı olan moleküler mekanizmaların aydınlatılmasında oldukça önemlidir. Birçok çalışma, pulpa kuafaj materyalleri veya pulpotomi ajanlarının dental pulpa kök hücreleri üzerinde odontogenez/osteogenez ekspresyonunu araştırmıştır (189,226,227).

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), primer dizisi bilinen bir DNA bölgesinin in vitro ortamda çoğaltılmasını sağlayan ve kısa zamanda çok fazla sayıda DNA kopyasını oluşturan bir tekniktir. Polimeraz zincir reaksiyonu ile sadece DNA çoğaltılırken RNA hedef dizisinin çoğaltılması için tamamlayıcı (komplementer) deoksiribonükleik aside (cDNA) çevrilmesi gerekmektedir. Revers transkripsiyon, mRNA'nın cDNA'ya çevrildiği ve PCR'da kullanılmak üzere yeni sentezlenen DNA'nın çoğaltıldığı basamaktır (228).

Pulpaya yakın derin dentin çürük lezyonu varlığında veya mekanik travmaya bağlı pulpal yaralanmalarda, pulpada inflamatuvar reaksiyonlar başlayabilmektedir. Hafif veya orta dereceli inflamasyon bulguları, pulpa rejenerasyonu indüklerken, şiddetli veya kronik enflamasyon, pulpada geniş dönüşümsüz hasara neden olabilir.

Pulpa kuafaj materyalleri, doku inflamasyonu ve rejenerasyonu arasında dengeyi modüle edebilmektedir (229). Kalsiyum silikat esaslı kuafaj materyali ekstraktlarının (TheraCal ve Biodentin) inflamasyon bulguları başladığında, vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ve IL-6 ekspresyonunu uyarmak için pulpa fibroblastlarını indükleyebildiği rapor edilmiştir (230). Bununla birlikte bir başka çalışmada TheraCal, pulpa fibroblast proliferasyonunu azaltırken, pulpa fibroblastları tarafından sekresyonu yapılan IL-8'i indüklediği bildirilmiştir. Pulpada yer alan fibroblastların proliferasyonundaki azalma ile matriks olgunlaşması ve mineralizasyonu arasında karşılıklı bir ilişki bulunmaktadır. Bu sonuca göre, ekstraselüler matriksin hem proliferasyonun azalarak yavaşlaması hem de osteoblast fenotipinin gelişimine katkıda bulunduğu düşünülmektedir (201,231).

Kemik dokusu oluşumu (osteogenez), dentin dokusu rejenerasyonunda önemli bir rol oynamaktadır. Odontoblast ve osteoblastlar, dentin matriks proteini 1, fibronektin, kollajen tip I (Col1A1), alkalın fosfataz (ALP), osteonektin (ON/SPARC), osteopontin, kemik sialoproteini ve osteokalsin (OCN) gibi mineralize matriks proteinlerini eksprese etmektedir. Yapılan çalışmalar, dental pulpa kök hücrelerin, odontoblastlara farklılaşmasında yer alan biyokimyasal yolların, kemik dokusu mezenkimal kök hücrelerin, osteoblastlara farklılaştığı biyokimyasal yola benzer olduğunu göstermektedir (53,232). Bu çalışmada, yeni ve güncel kuafaj materyalleri ile muamele edilen insan dental pulpa kök hücreleri (hDPSC'ler), dentin mineralizasyonunda rol alan ve odontojenik farklılaşmayı indükleyen proteinlerden; ALP, OCN, SPARC (Osteonektin/ON) ve Col1A (kollajen tip I)'ın ekspresyon değerleri, gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-qPCR) analizi ile incelenmiştir.

Alkalın fosfataz (ALP), osteoblastların erken olgunlaşması sırasında eksprese edilen majör enzimlerden biridir ve mineral birikiminde önemli rol oynamaktadır (233). Bu çalışmada kuafaj materyalleri ile muamele edilmiş dental pulpa kök hücrelerinin ALP mRNA gen ekspresyonlarına 1., 7., ve 14. günlerde gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-qPCR) ile bakılmıştır. En yüksek ALP mRNA gen ekspresyonu 1. günden 14. güne kadar artan değerler ile Dycal grubunda gözlenirken, TheraCal LC ve NeoPutty MTA gruplarında kontrol grubuna göre 14. gün değerleri arasında anlamlı bir artış görülmemiştir. Harvard BioCal-Cap'ın ALP mRNA

ekspresyonu üzerine etkisi 7. gün artmışken 14. gün sonunda çok düşük olduğu görülmektedir. Diğer gruplarda 1. gün ALP mRNA ekspresyonu, kontrol grubuna göre düşükken, Dycal grubunun daha yüksek kalsiyum salınımı yapması ve lokal pH değerlerinde yükselmeye neden olması ALP ekspresyonunu artmasını sağladığını düşündürmektedir. Rodrigues ve arkadaşları 2017’de yaptıkları bir çalışmada, MTA Angelus ve MTA Plus’ın dental pulpa kök hücreler üzerinde, BMP-2, OC ve ALP’nin 1.ve 3. gün mRNA gen ekspresyonu değerlerine RT-qPCR tekniği ile bakılmıştır. Maruziyetin 1.gününde ALP ekspresyonu düşükken 3.gün artmaya başlamıştır (234). Bu çalışmanın sonuçlarına göre; NeoPutty MTA’nın ALP mRNA gen ekspresyonu seviyesinde 1. gün azalma ve 7. gün artışı ile Rodrigues ve ark. yaptığı çalışmanın bulgularını destekler niteliktedir. Rodrigues ve ark. yaptığı çalışmada MTA Plus’ın ALP ekspresyon seviyesi, MTA Angelus’a göre daha fazla bulunmuştur. Buna bağlı olarak farklı MTA marka ve ürünlerinin de ekspresyon seviyesinde farklılık yarattığı, yeni bir materyal olan ve hazır karıştırılmış macun kıvamında bulunan NeoPutty MTA’nın değerlendirilmesi için daha fazla çalışmaya ihtiyaç olduğunu sonucuna varılmıştır.

Lozano ve arkadaşlarının 2021 yılında yaptıkları bir çalışmada, TheraCal LC, TheraCal PT ve MTA Angelus’un, hDPSC’ler üzerinde 7.gün mRNA ekspresyon değerlerine bakılmıştır. TheraCal LC daha sonra RT-PCR analizi sonucunda çalışma dışı tutulmuştur. Vital pulpa tedavileri için kullanılan bu materyallerin, hDPSC’lerin osteo/odontoblastik farklılaşması üzerindeki potansiyel etkilerini değerlendirmek için ALP (Alkalen fosfataz), BSP (kemik sialoprotein, Col1A1 (kollajen tip I alfa I), DSPP (Dentin sialofosfoprotein), ON (SPARC, Osteonectin) ve RUNX2 genleri bu sürecin farklı fazlarının belirteçleri olarak kullanılmıştır. MTA Angelus tüm belirteçlerde kontrol grubuna göre ekspresyonda artış gösterirken, TheraCal PT, Col1A mRNA gen ekspresyonunda kontrol grubuna göre çok düşük düzeyde ekspresyon göstermiş, Osteonectin (ON/SPARC) mRNA ekspresyon artışı göstermemiş ve kontrol grubuna yakın sonuçlar elde edilmiştir (184). Lozano ve ark. çalışmasının aksine bu çalışmada, TheraCal LC’nin ALP mRNA gen ekspresyonu, kontrol grubu ile benzer sonuçlar göstermiş ve PCR aşamasında çalışma dışı bırakılmamıştır. Yine aynı şekilde Col1A ve Osteonectin (ON/SPARC) mRNA gen ekspresyonunda TheraCal LC, kontrol grubuna göre 1.gün azalma gözlenirken 7. ve 14. günlerde artış göstermiştir. Buna göre farklı iki TheraCal materyalinin kullanılması ve Lozano ve arkadaşlarının sitotoksikite bulgularına

bağlı olarak TheraCal LC'yi çalışmadan çıkartmaları, iki çalışma sonuçları arasındaki farklılığı oluşturan nedenler arasında sayılabilir. Aynı çalışmada MTA Angelus tüm belirteçlerde ekspresyonu artırırken, bu çalışmada kullanılan NeoPutty MTA, Col1A, ON (SPARC) ve ALP mRNA ekspresyonu, kontrol grubuna göre anlamlı bir farklılık göstermemiştir. Daha önce literatürde hakkında yapılan bir çalışma bulunmayan, rezin esaslı MTA olarak piyasaya sürülen Harvard BioCal-Cap materyalinin 14.gün sonunda ALP, ON (SPARC) ve Col1A ekspresyonunu indüklediği belirlenmiştir.

Bortoluzzi ve arkadaşlarının 2015'te yaptığı bir çalışmada, hDPSC'ler ile MTA Angelus, Biodentin ve TheraCal LC muamele edilmiş ve mineralizasyon belirteçlerinden ALP ve OCN'nin mRNA ekspresyon değerleri karşılaştırılmıştır. İkili karşılaştırmalarda house-keeping gen olarak kabul edilen GAPDH kullanılmıştır. 7. gün sonunda, MTA Angelus veya Biodentin ile muamele edilen hDPSC'ler üzerinde OCN ekspresyonunu önemli ölçüde artırdığı belirlenmiştir. MTA Angelus ve Biodentin'in ALP gen ekspresyonunu arttırdığı bulunmuş, ancak TheraCal LC grubunun ALP ve OCN gen ekspresyonu üzerinde kontrol grubuna göre anlamlı bir farklılık oluşturmadağı saptanmıştır (185). Bu çalışmada kullanılan NeoPutty MTA'nın kontrol grubuna göre önemli ölçüde artan 7. gün OCN ekspresyon değerlerinin incelenen çalışmanın bulguları ile uyumlu olduğu görülmüştür. TheraCal LC'nin ALP gen ekspresyonu bulguları 7.günde kontrol grubuna oranla düşük seviyelerde yer alırken 14.gün kontrol grubuna göre anlamlı bir farklılığın olmaması Bortoluzzi ve arkadaşlarının yaptığı çalışmadaki bulguları desteklemektedir. Bunu yanı sıra Bortoluzzi ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada kullanılan MTA Angelus'un aksine bu çalışmada kullanılan NeoPutty MTA ALP gen ekspresyon değerleri, kontrol grubu değerleri ile karşılaştırıldığında 7. ve 14. günlerde anlamlı bir farklılık oluşturmadağı görülmektedir. Bu çalışmanın sonuçları göz önünde bulundurulduğunda, mineralizasyon oluşumunu indükleyen belirteçler üzerinde TheraCal LC materyalinin kuafaj materyali olarak kullanıldığı pulpa dokusu üzerinde, sert doku oluşum hızını indüklemekte yetersiz kalacağı düşünülmektedir. Ancak tek bir hücre tipini içeren hücre kültürleri, doku ve organlardaki gibi hücre ve hücre-ekstraselüler matriks etkileşimleri tarafından üretilen parakrin ve ekzokrin sinyalizasyonları yeniden üretememektedir. Hücre kültür ortamı veya üç boyutlu kültür modellerinde, hücre davranışının mikro-çevresel modölatörleri yetersiz

kalmaktadır (235). Bu nedenle, in vitro çalışmalarda kaydedilen bulgular in vivo hayvan modelleriyle desteklenmelidir.

Vaskülogenez, vasküler sistem ve anjiyogenez gelişimine aracılık eden süreçtir. Kan damarlarının büyümesi ve doku rejenerasyonunda kritik öneme sahiptir. Çeşitli çalışmalar, endodontik biyomateryallerin vaskülarizasyon ve anjiyogenez üzerindeki etkisini incelemiş, VEGF gibi çeşitli anjiyogenez belirteçlerini araştırmıştır (53,236,237). VEGF protein ailesi hem vaskülarizasyonu hem de anjiyogenezi kontrol etmektedir. VEGF, mikrodamarlara yakın endotel hücrelerinin proliferasyonu, hücre göçü ve gen ifade modelinin değiştirildiği durumlarda uyarılmaktadır (238). Bu çalışmada odontojenik belirteçlerin yanı sıra vaskülogenez ve anjiyogeneze rol alan VEGF'in mRNA gen ekspresyonu incelenmiş, pulpa kuafaj materyallerinin rejenerasyon kapasiteleri karşılaştırılmıştır. Harvard BioCal-Cap, TheraCal LC ve NeoPutty MTA'da, VEGF regülasyonu düzenlenerek ekspresyon artışı gözlenirken, Dycal (kalsiyum hidroksit), VEGF ekspresyonunu regüle etmemiş kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük kalmıştır.

Youssef ve arkadaşlarının 2019'da yaptıkları bir çalışmada, dental pulpa kök hücreleri MTA, Ca (OH)₂, Biodentin ve Emdogain ile muamele edilmiştir. Osteojenik belirteçler (alkalin fosfataz ve osteopontin), odontojenik işaretleyiciler (dentin siyalofosfoprotein) ve anjiyojenik faktörün (vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF)) 7. ve 14.gün gen ekspresyon seviyeleri, gerçek zamanlı PCR ile ölçülmüştür. Mevcut çalışmada, 7.günde Emdogain ve Biodentin'in VEGF ekspresyonunu arttırdığı, 14.gün sonunda ise MTA, Emdogain ve Biodentin'in kontrol grubuna göre VEGF ekspresyonunu yukarı yönde regüle ettiği bildirilmiştir. Ca (OH)₂ ekspresyonu yukarı regüle etmeyen tek kuafaj materyali olmuştur (232). Bu çalışmada yeni bir MTA ürünü olarak kullanılan NeoPutty MTA'nın gösterdiği VEGF ekspresyon değerleri, Youssef ve arkadaşlarının bulgularıyla uyumlu sonuçlar gösterirken kalsiyum hidroksit içerikli kuafaj materyali olan Dycal'ın kontrol grubuna göre ekspresyonu regüle etmemesi yine aynı çalışmanın sonuçlarını destekler niteliktedir. Bu doktora tezinin sonuçları incelendiğinde, Dycal'ın anjiyogenez için uygun bir materyal olmadığı görülürken, literatürde daha önce yer almayan NeoPutty MTA, Harvard BioCal-Cap ve TheraCal LC'nin, VEGF ekspresyonunu indükleyerek doku rejenerasyon kapasitesini artırdığı düşünülmektedir.

Materyalin biyoyumluluğu vital pulpa tedavilerinin başarısını etkileyen en önemli faktörlerden biridir. Hücre morfolojisinde meydana gelen değişiklikler, hücre migrasyonu, adezyonu ve proliferasyonu, materyal biyoyumluluğunun önemli göstergeleri arasında yer alırken tedavi prognozunda önemli rol oynamaktadır (239). Bu çalışmada hücrelerin morfolojik değişimlerinin incelendiği SEM görüntüleme sonuçlarına göre Dycal materyali en sitotoksik materyal olurken hücrelerin küresel morfolojisini koruduğu görülmüştür. TheraCal LC, Harvard BioCal-Cap ve NeoPutty MTA ile muamele edilen DPSC'lerin iğsi yapıya dönüştüğü ve hücre adezyonunu desteklediği şeklinde yorumlanmıştır. Lozano ve arkadaşlarının NeoMTA Plus, NeoPutty MTA ve MTA Angelus'un DPSC'ler üzerindeki sitotoksikite ve biyoyumluluklarını karşılaştırdıkları bir çalışmada, üç farklı materyalin de hücre migrasyonu ve adezyonunu gerçekleştirdiği bildirilmiştir (195). Yapılan başka bir çalışmada, TheraCal PT, TheraCal LC ve MTA Angelus'un DPSC'ler üzerindeki morfolojik değişimleri SEM görüntüleme ile analiz edilmiştir. TheraCal LC numunelerinde hücre ölümünü kanıtlayan hücre kalıntılarına rastlanırken TheraCal PT'de hücrelerin yassılaşp uzamaya başladığı görülmüştür. MTA Angelus numunelerinde ise hücrelerin iğsi yapıya dönüşmeye başladığı şeklinde yorumlanmıştır (184). Bununla birlikte, bu testlerden elde edilen sonuçların istatistiksel olmayan, tanımlayıcı morfolojik gözlemler olduğu ve sonuç olarak araştırmacıların yorumuna bırakıldığı göz ardı edilmemelidir.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Çocuk diş hekimliğinde kullanılan pulpa kuafaj materyallerinin dental pulpa kök hücreleri (hDPSCs) üzerindeki in vitro osteojenik, odontojenik ve anjiyojenik etkilerinin değerlendirildiği, bununla birlikte sitotoksikite ve biyouyumluluklarını karşılaştırıldığı bu çalışmada şu sonuçlar elde edilmiştir.

1) MTS testi kullanılarak değerlendirilen hücre canlılığı sonuçlarına göre; 1.gün sonunda NeoPutty MTA, TheraCal LC ve Harvard BioCal-Cap'ın hücre canlılığı, negatif kontrol grubu değerleri ile karşılaştırıldığında anlamlı derecede yüksek bulunmuş, diğer günlerde ise aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır. Dycal materyalinin 1., 3., 5., 7. günlerde negatif kontrol grubuna göre hücre canlılığı değerlerinin daha düşük olduğu görülmüştür. 14. gün hücre canlılığı değerleri karşılaştırıldığında ise 4 farklı kuafaj materyali arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamamıştır.

2) İn vitro MTS testi hücre canlılığı 7. güne kadar olan sonuçlar incelendiğinde rezin esaslı MTA içeren Harvard BioCal-Cap ve hazır macun formunda bulunan ve yeni bir materyal NeoPutty MTA'nın sito-biyouyumlu olduğu görülmüştür. Bu çalışmada 7. gün (168. saat) hücre canlılığı MTS analizinden sonra 14. gün MTS analizi de yapılmıştır. Bu doktora tez çalışmasında yer alan materyallerin uzun dönem toksik etkilerini de inceleyebilmek ve karşılaştırma yapabilmek adına daha fazla in vitro ve in vivo çalışmaya ihtiyaç duyulduğu belirlenmiştir.

3) Annexin V/Propidyum İyodür (PI) boyaları kullanılarak yapılan flow sitometri analizine göre; Harvard BioCal-Cap, NeoPutty MTA ve TheraCal LC deney gruplarının Dycal deney grubu ile karşılaştırıldığında biyouyumluluklarının daha yüksek olduğu kaydedilmiştir.

4) Kontrol grubuna göre Dycal'da ROS üretimi artarken, Harvard BioCal-Cap, TheraCal LC ve NeoPutty MTA'da ROS artışı gözlenmemiştir.

5) En yüksek ALP mRNA gen ekspresyonu 1. günden 14. güne kadar artan değerler ile Dycal grubunda gözlenirken, TheraCal LC ve NeoPutty MTA grupları ile kontrol grubu değerleri karşılaştırıldığında 14. gün değerleri arasında anlamlı bir artış görülmemiştir. Harvard BioCal-Cap'ın ALP mRNA ekspresyonu üzerine etkisi 7. gün artmışken 14. gün sonunda çok düşük olduğu görülmektedir. Sonuç olarak,

mineralizasyonda etkin rol oynayan ALP enziminin mRNA ekspresyonunu en yüksek düzeyde artmasını sağlayan materyalin Dycal olduğu bulunmuştur.

6) Daha önce literatürde hakkında yapılan bir çalışma bulunmayan, rezin esaslı MTA olarak piyasaya sürülen Harvard BioCal-Cap materyalinin 14. gün sonunda ALP, ON (SPARC) ve Col1A ekspresyonunu indüklediği belirlenmiştir.

7) NeoPutty MTA'nın Col1A, ON (SPARC) ve ALP mRNA ekspresyonu, kontrol grubuna göre anlamlı bir farklılık göstermemiştir.

8) Farklı MTA marka ve ürünlerinin de ekspresyon seviyesinde farklılık yarattığı, yeni bir materyal olan ve hazır karıştırılmış macun kıvamında bulunan NeoPutty MTA'nın değerlendirilmesi için daha fazla çalışmaya ihtiyaç olduğunu sonucuna varılmıştır.

9) Bu çalışmanın sonuçları göz önünde bulundurulduğunda, mineralizasyon oluşumunu indükleyen belirteçler üzerinde Harvard BioCal-Cap materyalinin kuafaj materyali olarak kullanıldığı pulpa dokusu üzerinde, sert doku oluşum hızını indüklemekte yetersiz kalacağı düşünülmektedir.

10) Harvard BioCal-Cap, TheraCal LC ve NeoPutty MTA gruplarında VEGF mRNA ekspresyon artışı gözlenirken, Dycal, VEGF ekspresyonunu regüle etmemiş kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük kalmıştır. Dycal'ın anjiyogenez için uygun bir materyal olmadığı görülürken, literatürde daha önce yer almayan NeoPutty MTA, Harvard BioCal-Cap ve TheraCal LC'nin VEGF ekspresyonunu indükleyerek doku rejenerasyon kapasitesini artırdığını düşünülmektedir.

11) SEM görüntüleme sonuçlarına göre; Dycal deney grubunda hücreler küresel morfolojisini korurken DPSC'lerin materyal yüzeyine adezyonlarının zayıf olduğu, NeoPutty MTA'da ise pseudopodların olduğu ve küresel morfolojiden iğsi morfolojiye değişmeye başladığı görülmüştür. TheraCal LC ve Harvard BioCal-Cap grupları incelendiğinde hücrelerin iğsi morfoloji kazandığı ve materyal-hücre adezyonunun gerçekleştiği saptanmıştır. Bununla birlikte yapılan sitotoksikite ve biyouyumluluk testleri ile uyumlu görüntüler elde edildiği sonucuna varılmıştır.

12) Kullanılan kuafaj materyallerinin hücre kültürü ortamında pH seviyeleri, iyon salınımı ve konsantrasyonlarının değerlendirildiği kimyasal analizlere yer verilmemiş bununla birlikte tek bir konsantrasyon oranının tercih edilmesi bu

araştırmanın limitasyonları arasında yer almaktadır. Bu çalışmada kullanılan Harvard BioCal-Cap'ın DPSC'ler üzerinde hücre canlılığı-MTS testi, apoptoz-nekroz tayini, ROS analizi ve gen ekspresyonunun değerlendirildiği herhangi bir literatüre rastlanılmamış olup daha fazla in vitro ve in vivo çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.



KAYNAKLAR

1. Cortés, O., García, C., Pérez, L., Boj, J., & Alcaina, A. (2006). Pulp cell cultures obtained with two different methods for in vitro cytotoxicity tests. *European Archives of Paediatric Dentistry*, 1(2), 96–99. <https://doi.org/10.1007/BF03320822>
2. Cristina da Silva MODENA, K., Caroll CASAS-APAYCO, L., Teresa ATTA, M., Alberto de Souza COSTA, C., Hebling, J., Renata SIPERT, C., Fidela de Lima NAVARRO, M., & Ferreira SANTOS, C. (2009). CYTOTOXICITY AND BIOCOMPATIBILITY OF DIRECT AND INDIRECT PULP CAPPING MATERIALS. *Journal of Applied Oral Science*, 17(6), 544–554. www.fob.usp.br/jaos
3. Gandolfi, M. G., Siboni, F., & Prati, C. (2012). Chemical–physical properties of TheraCal, a novel light-curable MTA-like material for pulp capping. *International Endodontic Journal*, 45(6), 571–579. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.2012.02013.x>
4. Murray, P. E., Hafez, A. A., Smith, A. J., Windsor, L. J., & Cox, C. F. (2003). Histomorphometric analysis of odontoblast-like cell numbers and dentine bridge secretory activity following pulp exposure. *International Endodontic Journal*, 36(2). <https://doi.org/10.1046/j.1365-2591.2003.00632.x>
5. Hu, C.-C., Zhang, C., Qian, Q., & Tatum, N. B. (1998). Reparative dentin formation in rat molars after direct pulp capping with growth factors. *Journal of Endodontics*, 24(11). [https://doi.org/10.1016/S0099-2399\(98\)80166-0](https://doi.org/10.1016/S0099-2399(98)80166-0)
6. Hwas, M., & Sandrik, J. L. (1984). Acid and water solubility and strength of calcium hydroxide bases. *The Journal of the American Dental Association*, 108(1). <https://doi.org/10.14219/jada.archive.1984.0200>
7. Schmitt, D., Lee, J., & Bogen, G. (2001). Multifaceted use of ProRoot MTA root canal repair material. *Pediatric Dentistry*, 23(4), 326–330. <http://europemc.org/abstract/MED/11572491>
8. Liu, C., Huang, Y., Shen, W., & Cui, J. (2001). Kinetics of hydroxyapatite precipitation at pH 10 to 11. *Biomaterials*, 22(4), 301–306. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(00\)00166-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0142-9612(00)00166-6)
9. Petersen, B. E., Bowen, W. C., Patrene, K. D., Mars, W. M., Sullivan, A. K., Murase, N., Boggs, S. S., Greenberger, J. S., & Goff, J. P. (1999). Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science*, 284(5417), 1168–1170. <https://doi.org/10.1126/science.284.5417.1168>
10. Schmalz, G. (1994). Use of cell cultures for toxicity testing of dental materials—advantages and limitations. *Journal of Dentistry*, 22(SUPPL. 2), S6–S11. [https://doi.org/10.1016/0300-5712\(94\)90032-9](https://doi.org/10.1016/0300-5712(94)90032-9)
11. Todorovic, V., Markovic, D., Milosevic-Jovcic, N., Petakov, M., Balint, B., Colic, M., Milenkovic, A., Colak, I., Jokanovic, V., & Nikolic, N. (2008). Dental pulp stem cells: Potential significance in regenerative medicine. *Stomatoloski Glasnik Srbije*, 55(3), 170–179. <https://doi.org/10.2298/SGS0803170T>
12. Powers, J.M. and Sakaguchi, R.L. (2006) *Craig's Restorative Dental Materials*. 12th Edition, Mosby, Missouri, 386-393.
13. Powers, J.M., Sakaguchi, R.L. (2006). *Craig's restorative dental materials*. Mosby s:97- 125.
14. Tziafas, D., Smith, A. J., & Lesot, H. (2000). Designing new treatment strategies in vital pulp therapy. *Journal of Dentistry*, 28(2), 77–92. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0300-5712\(99\)00047-0](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0300-5712(99)00047-0)
15. Wataha, J. C. (2001). Principles of biocompatibility for dental practitioners. *Journal of Prosthetic Dentistry*, 86(2), 203–209. <https://doi.org/10.1067/mpr.2001.117056>
16. Yu, C., & Abbott, P. v. (2007). An overview of the dental pulp: Its functions and responses to injury. In *Australian Dental Journal* (Vol. 52, Issue 1 SUPPL., pp. S4–S6). <https://doi.org/10.1111/j.1834-7819.2007.tb00525.x>
17. Chmielewsky, F., About, I., & Chung, S.-H. (2016). Pulp Fibroblasts Control Nerve Regeneration through Complement Activation. *Journal of Dental Research*, 95(8), 913–922. <https://doi.org/10.1177/0022034516643065>
18. Mathieu, S., Jeanneau, C., Sheibat-Othman, N., Kalaji, N., Fessi, H., & About, I. (2013). Usefulness of Controlled Release of Growth Factors in Investigating the Early Events of Dentin-pulp Regeneration. *Journal of Endodontics*, 39(2), 228–235. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.joen.2012.11.007>
19. Fitzgerald, M., Chiego, D. J., & Heys, D. R. (1990). Autoradiographic analysis of odontoblast replacement following pulp exposure in primate teeth. *Archives of Oral Biology*, 35(9). [https://doi.org/10.1016/0003-9969\(90\)90093-P](https://doi.org/10.1016/0003-9969(90)90093-P)
20. Townbridge, H., Kim, S., & Suda, H. (2002). Structure and functions of the dentin and pulp complex In: Cohen S, Burns RC. *Pathways of the pulp*. St. Louis: CV Mosby Co, 8, 415.

21. Couve, E. (1986). Ultrastructural changes during the life cycle of human odontoblasts. *Archives of Oral Biology*, 31(10). [https://doi.org/10.1016/0003-9969\(86\)90093-2](https://doi.org/10.1016/0003-9969(86)90093-2)
22. Han, Seong S.; Avery, James K. (1965). "The fine structure of intercellular substances and rounded cells in the incisor pulp of the guinea pig This investigation was supported in part by a grant from the United States Public Health Service (D-1620)" *The Anatomical Record* 151(1): 41-57. <http://hdl.handle.net/2027.42/49800>
23. Baume L. J. (1980). The biology of pulp and dentine. A historic, terminologic-taxonomic, histologic-biochemical, embryonic and clinical survey. *Monographs in oral science*, 8, 1–220.
24. Bongenhielm, U., Hægerstrand, A., Theodorsson, E., & Fried, K. (1995). Effects of neuropeptides on growth of cultivated rat molar pulp fibroblasts. *Regulatory Peptides*, 60(2–3). [https://doi.org/10.1016/0167-0115\(95\)00115-8](https://doi.org/10.1016/0167-0115(95)00115-8)
25. Yamaguchi, M., Kojima, T., Kanekawa, M., Aihara, N., Nogimura, A., & Kasai, K. (2004). Neuropeptides stimulate production of interleukin-1beta, interleukin-6, and tumor necrosis factor- α in human dental pulp cells. *Inflammation Research*, 53(5). <https://doi.org/10.1007/s00011-003-1243-z>
26. Woodnutt, D. A., Wager-Miller, J., O'Neill, P. C., Bothwell, M., & Byers, M. R. (2000). Neurotrophin receptors and nerve growth factor are differentially expressed in adjacent nonneuronal cells of normal and injured tooth pulp. *Cell and Tissue Research*, 299(2). <https://doi.org/10.1007/s004419900129>
27. Sakurai, K., Okiji, T., & Suda, H. (1999). Co-increase of Nerve Fibers and HLA-DR and/or Factor-XIIIa-expressing Dendritic Cells in Dentinal Caries-affected Regions of the Human Dental Pulp: An Immunohistochemical Study. *Journal of Dental Research*, 78(10). <https://doi.org/10.1177/00220345990780100401>
28. Mjör, I. A., Sveen, O. B., & Heyeraas, K. J. (2001). Pulp-dentin biology in restorative dentistry. Part 1: normal structure and physiology. *Quintessence International (Berlin, Germany: 1985)*, 32(6), 427—446. <http://europepmc.org/abstract/MED/11491623>
29. Berggreen, E., Haug, S. R., Mkonyi, L. E., & Bletsa, A. (2009). Characterization of the dental lymphatic system and identification of cells immunopositive to specific lymphatic markers. *European Journal of Oral Sciences*, 117(1). <https://doi.org/10.1111/j.1600-0722.2008.00592.x>
30. Hahn, C.-L., Falkler, W. A., & Siegel, M. A. (1989). A study of T and B cells in pulpal pathosis. *Journal of Endodontics*, 15(1). [https://doi.org/10.1016/S0099-2399\(89\)80093-7](https://doi.org/10.1016/S0099-2399(89)80093-7)
31. Jontell, M., Okiji, T., Dahlgren, U., & Bergenholtz, G. (1998). Immune Defense Mechanisms of the Dental Pulp. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 9(2). <https://doi.org/10.1177/10454411980090020301>
32. Weissman, I. L., Anderson, D. J., & Gage, F. (2001). Stem and Progenitor Cells: Origins, Phenotypes, Lineage Commitments, and Transdifferentiations. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 17(1). <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.17.1.387>
33. Smith, A. G. (2001). Embryo-Derived Stem Cells: Of Mice and Men. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 17(1). <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.17.1.435>
34. Simara, P., Motl, J. A., & Kaufman, D. S. (2013). Pluripotent stem cells and gene therapy. *Translational Research*, 161(4). <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2013.01.001>
35. Bongso, A., & Lee, E. H. (2005). Their Definition, Classification and Sources. *Stem cells: from bench to bedside*. Chapter 1, 1-14. <http://www.worldscibooks.com/lifesci/5729.html>
36. Kansu, E. (2005). Kök hücre biyolojisi ve plastisitesinde güncel kavramlar. *Hacettepe Tıp Dergisi*, 36, 191-197.
37. Bongso, A., & Lee, E. H. (2005). *Stem cells: from bench to bedside..* <http://www.worldscibooks.com/lifesci/5729.html>
38. İnan, S., Özbilgin, K. (2009). Kök hücre biyolojisi. *Sağlıkta Birikim Dergisi*, 1, 11-23. (n.d.).
39. Zakrzewski, W., Dobrzyński, M., Szymonowicz, M., & Rybak, Z. (2019). Stem cells: past, present, and future. *Stem Cell Research & Therapy*, 10(1). <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1165-5>
40. Davila, J. C. (2004). Use and Application of Stem Cells in Toxicology. *Toxicological Sciences*, 79(2). <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfh100>
41. Xing, Y., Xiong, W., Zhu, L., Ōsawa, E., Hussin, S., & Dai, L. (2011). DNA Damage in Embryonic Stem Cells Caused by Nanodiamonds. *ACS Nano*, 5(3). <https://doi.org/10.1021/nn200279k>
42. Kapinas, K., Grandy, R., Ghule, P., Medina, R., Becker, K., Pardee, A., Zaidi, S. K., Lian, J., Stein, J., van Wijnen, A., & Stein, G. (2013). The abbreviated pluripotent cell cycle. *Journal of Cellular Physiology*, 228(1). <https://doi.org/10.1002/jcp.24104>

43. Vishwakarma, A., Sharpe, P., Songtao, S., & Ramalingam, M. (Eds.). (2014). Stem cell biology and tissue engineering in dental sciences. *Academic Press*.
44. Lanza, R., & Klimanskaya, I. (Eds.). (2011). Essential stem cell methods. *Academic Press*.
45. Friedenstein, A. J., Piatetzky-Shapiro, I. I., & Petrakova, K. V. (1966). Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *Journal of embryology and experimental morphology*, 16(3), 381–390.
46. Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., Moorman, M. A., Simonetti, D. W., Craig, S., & Marshak, D. R. (1999). Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. *Science*, 284(5411). <https://doi.org/10.1126/science.284.5411.143>
47. Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F. C., Krause, D. S., Deans, R. J., Keating, A., Prockop, D. J., & Horwitz, E. M. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4). <https://doi.org/10.1080/14653240600855905>
48. Modino, S. A. C., & Sharpe, P. T. (2005). Tissue engineering of teeth using adult stem cells. *Archives of Oral Biology*, 50(2). <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2005.01.002>
49. Harada, H., Toyono, T., Toyoshima, K., Yamasaki, M., Itoh, N., Kato, S., Sekine, K., & Ohuchi, H. (2002). FGF10 maintains stem cell compartment in developing mouse incisors. *Development*, 129(6). <https://doi.org/10.1242/dev.129.6.1533>
50. Harada, H., Ichimori, Y., Yokohama-Tamaki, T., Ohshima, H., Kawano, S., Katsube, K., & Wakisaka, S. (2006). Stratum intermedium lineage diverges from ameloblast lineage via Notch signaling. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 340(2). <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.12.053>
51. Oyar, P. (2015). Dental Kök Hücre Kaynakları ve Kemik Doku Rejenerasyonunda Kullanılma Potansiyelleri. *Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi*, 25(1). <https://doi.org/10.17567/dfd.77137>
52. Karaöz, E., Doğan, B. N., Aksoy, A., Gacar, G., Akyüz, S., Ayhan, S., Genç, Z. S., Yürüker, S., Duruksu, G., Demircan, P. Ç., & Sarıboyacı, A. E. (2010). Isolation and in vitro characterisation of dental pulp stem cells from natal teeth. *Histochemistry and Cell Biology*, 133(1). <https://doi.org/10.1007/s00418-009-0646-5>
53. Gronthos, S., Mankani, M., Brahimi, J., Robey, P. G., & Shi, S. (2000). Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(25). <https://doi.org/10.1073/pnas.240309797>
54. Stevens, A., Zuliani, T., Olejnik, C., LeRoy, H., Obriot, H., Kerr-Conte, J., Formstecher, P., Bailliez, Y., & Polakowska, R. R. (2008). Human Dental Pulp Stem Cells Differentiate into Neural Crest-Derived Melanocytes and Have Label-Retaining and Sphere-Forming Abilities. *Stem Cells and Development*, 17(6). <https://doi.org/10.1089/scd.2008.0012>
55. Yan, X., Qin, H., Qu, C., Tuan, R. S., Shi, S., & Huang, G. T.-J. (2010). iPS Cells Reprogrammed From Human Mesenchymal-Like Stem/Progenitor Cells of Dental Tissue Origin. *Stem Cells and Development*, 19(4). <https://doi.org/10.1089/scd.2009.0314>
56. Otaki, S., Ueshima, S., Shiraishi, K., Sugiyama, K., Hamada, S., Yorimoto, M., & Matsuo, O. (2007). Mesenchymal progenitor cells in adult human dental pulp and their ability to form bone when transplanted into immunocompromised mice. *Cell Biology International*, 31(10). <https://doi.org/10.1016/j.cellbi.2007.04.001>
57. d'Aquino, R., de Rosa, A., Lanza, V., Tirino, V., Laino, L., Graziano, A., Desiderio, V., Laino, G., & Papaccio, G. (2009). Human mandible bone defect repair by the grafting of dental pulp stem/progenitor cells and collagen sponge biocomplexes. *European Cells and Materials*, 18. <https://doi.org/10.22203/eCM.v018a07>
58. Huang, G. T.-J., Gronthos, S., & Shi, S. (2009). Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *Journal of Dental Research*, 88(9). <https://doi.org/10.1177/0022034509340867>
59. Gándia, C., Armiñan, A., García-Verdugo, J. M., Lledó, E., Ruiz, A., Miñana, M. D., Sanchez-Torrijos, J., Payá, R., Mirabet, V., Carbonell-Uberos, F., Llop, M., Montero, J. A., & Sepúlveda, P. (2008). Human Dental Pulp Stem Cells Improve Left Ventricular Function, Induce Angiogenesis, and Reduce Infarct Size in Rats with Acute Myocardial Infarction. *Stem Cells*, 26(3). <https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0484>
60. Gomes, J. Á. P., Galdes Monteiro, B., Melo, G. B., Smith, R. L., Cavenaghi Pereira da Silva, M., Lizier, N. F., Kerkis, A., Cerruti, H., & Kerkis, I. (2010). Corneal Reconstruction with Tissue-Engineered

- Cell Sheets Composed of Human Immature Dental Pulp Stem Cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 51(3). <https://doi.org/10.1167/iovs.09-4029>
61. Yao, S., Pan, F., Prpic, V., & Wise, G. E. (2008). Differentiation of Stem Cells in the Dental Follicle. *Journal of Dental Research*, 87(8). <https://doi.org/10.1177/154405910808700801>
 62. Mori, G., Ballini, A., Carbone, C., Oranger, A., Brunetti, G., di Benedetto, A., Rapone, B., Cantore, S., di Comite, M., Colucci, S., Grano, M., & Grassi, F. R. (2012). Osteogenic Differentiation of Dental Follicle Stem Cells. *International Journal of Medical Sciences*, 9(6). <https://doi.org/10.7150/ijms.4583>
 63. Sonoyama, W., Liu, Y., Fang, D., Yamaza, T., Seo, B.-M., Zhang, C., Liu, H., Gronthos, S., Wang, C.-Y., Shi, S., & Wang, S. (2006). Mesenchymal Stem Cell-Mediated Functional Tooth Regeneration in Swine. *PLoS ONE*, 1(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000079>
 64. Sonoyama, W., Liu, Y., Yamaza, T., Tuan, R. S., Wang, S., Shi, S., & Huang, G. T.-J. (2008). Characterization of the Apical Papilla and Its Residing Stem Cells from Human Immature Permanent Teeth: A Pilot Study. *Journal of Endodontics*, 34(2). <https://doi.org/10.1016/j.joen.2007.11.021>
 65. Seo, B.-M., Miura, M., Gronthos, S., Mark Bartold, P., Batouli, S., Brahimi, J., Young, M., Gehron Robey, P., Wang, C. Y., & Shi, S. (2004). Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *The Lancet*, 364(9429). [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)16627-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)16627-0)
 66. Estrela, C., Alencar, A. H. G. de, Kitten, G. T., Vencio, E. F., & Gava, E. (2011). Mesenchymal stem cells in the dental tissues: perspectives for tissue regeneration. *Brazilian Dental Journal*, 22(2). <https://doi.org/10.1590/S0103-64402011000200001>
 67. Miura, M., Gronthos, S., Zhao, M., Lu, B., Fisher, L. W., Robey, P. G., & Shi, S. (2003). SHED: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(10). <https://doi.org/10.1073/pnas.0937635100>
 68. Shi, S., Bartold, P., Miura, M., Seo, B., Robey, P., & Gronthos, S. (2005). The efficacy of mesenchymal stem cells to regenerate and repair dental structures. *Orthodontics and Craniofacial Research*, 8(3). <https://doi.org/10.1111/j.1601-6343.2005.00331.x>
 69. ÖZKAYA, Ç. A., TEZEL, H., & ERGÜCÜ, Z. (2012). Diş hekimliğinde kök hücre ve dental pulpa kök hücreleri / Stem cells in dentistry and dentalpulp stem cells. *Gazi Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi*, 29(2). <http://search/yayin/detay/141152>
 70. Yamankoç, G. & Aren, G. (2010). İNSAN DIŞLERİNİN DOKU MÜHENDİSLİĞİNDEKİ ÖNEMİ. *Journal of Istanbul University Faculty of Dentistry*, 44 (1), 33-38. <https://dergipark.org.tr/tr/pub/jiufd/issue/8838/110336>
 71. Trowbridge, H. O. (1981). Pathogenesis of pulpitis resulting from dental caries. *Journal of Endodontics*, 7(2). [https://doi.org/10.1016/S0099-2399\(81\)80242-7](https://doi.org/10.1016/S0099-2399(81)80242-7)
 72. Reeves, R., & Stanley, H. R. (1966). The relationship of bacterial penetration and pulpal pathosis in carious teeth. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology*, 22(1). [https://doi.org/10.1016/0030-4220\(66\)90143-5](https://doi.org/10.1016/0030-4220(66)90143-5)
 73. de Souza Costa, C. (2000). Current status of pulp capping with dentin adhesive systems: a review. *Dental Materials*, 16(3). [https://doi.org/10.1016/S0109-5641\(00\)00008-7](https://doi.org/10.1016/S0109-5641(00)00008-7)
 74. Kim, J. R., Nosrat, A., & Fouad, A. F. (2015). Interfacial characteristics of Biodentine and MTA with dentine in simulated body fluid. *Journal of Dentistry*, 43(2). <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2014.11.004>
 75. Lapinska, B., Klimek, L., Sokolowski, J., & Lukomska-Szymanska, M. (2018). Dentine Surface Morphology after Chlorhexidine Application—SEM Study. *Polymers*, 10(8). <https://doi.org/10.3390/polym10080905>
 76. Duncan, H. F., Galler, K. M., Tomson, P. L., Simon, S., El-Karim, I., Kundzina, R., Krastl, G., Dammaschke, T., Fransson, H., Markvart, M., Zehnder, M., & Bjørndal, L. (2019). European Society of Endodontology position statement: Management of deep caries and the exposed pulp. *International Endodontic Journal*, 52(7). <https://doi.org/10.1111/iej.13080>
 77. Hench, L. L. (2005). Bioceramics. *Journal of the American Ceramic Society*, 81(7). <https://doi.org/10.1111/j.1151-2916.1998.tb02540.x>
 78. Chailertvanitkul, P., Paphangkorakit, J., Sooksantisakoonchai, N., Pumas, N., Pairojamornyoot, W., Leela-apiradee, N., & Abbott, P. v. (2014). Randomized control trial comparing calcium hydroxide and mineral trioxide aggregate for partial pulpotomies in cariously exposed pulps of permanent molars. *International Endodontic Journal*, 47(9). <https://doi.org/10.1111/iej.12225>

79. Spångberg, L. S. W., & Haapasalo, M. (2002). Rationale and efficacy of root canal medicaments and root filling materials with emphasis on treatment outcome. *Endodontic Topics*, 2(1). <https://doi.org/10.1034/j.1601-1546.2002.20104.x>
80. Farhad, A., & Mohammadi, Z. (2005). Calcium hydroxide: a review. *International Dental Journal*, 55(5). <https://doi.org/10.1111/j.1875-595X.2005.tb00326.x>
81. REHMAN, K., SAUNDERS, W. P., FOYE, R. H., & SHARKEY, S. W. (1996). Calcium ion diffusion from calcium hydroxide-containing materials in endodontically-treated teeth: An in vitro study. *International Endodontic Journal*, 29(4). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.1996.tb01381.x>
82. Schröder, U. (1985). Effects of Calcium Hydroxide-containing Pulp-capping Agents on Pulp Cell Migration, Proliferation, and Differentiation. *Journal of Dental Research*, 64(4). <https://doi.org/10.1177/002203458506400407>
83. Alaçam, T. (2000). *Dentin ve pulpa tedavileri*. Endodonti, II. Baskı, Bölüm 6, 107, 157.
84. Dutta, A., & Saunders, W. P. (2014). Calcium silicate materials in endodontics. *Dental Update*, 41(8). <https://doi.org/10.12968/denu.2014.41.8.708>
85. Torabinejad, M., Hong, C., Lee, S., Monsef, M., & Pittford, T. (1995). Investigation of mineral trioxide aggregate for root-end filling in dogs. *Journal of Endodontics*, 21(12). [https://doi.org/10.1016/S0099-2399\(06\)81112-X](https://doi.org/10.1016/S0099-2399(06)81112-X)
86. Parirokh, M., & Torabinejad, M. (2010). Mineral Trioxide Aggregate: A Comprehensive Literature Review—Part III: Clinical Applications, Drawbacks, and Mechanism of Action. *Journal of Endodontics*, 36(3). <https://doi.org/10.1016/j.joen.2009.09.009>
87. Camilleri, J., Montesin, F., Brady, K., Sweeney, R., Curtis, R., & Ford, T. (2005). The constitution of mineral trioxide aggregate. *Dental Materials*, 21(4). <https://doi.org/10.1016/j.dental.2004.05.010>
88. Bozeman, T. B., Lemon, R. R., & Eleazer, P. D. (2006). Elemental Analysis of Crystal Precipitate from Gray and White MTA. *Journal of Endodontics*, 32(5). <https://doi.org/10.1016/j.joen.2005.08.009>
89. Torabinejad, M., & Chivian, N. (1999). Clinical applications of mineral trioxide aggregate. *Journal of Endodontics*, 25(3). [https://doi.org/10.1016/S0099-2399\(99\)80142-3](https://doi.org/10.1016/S0099-2399(99)80142-3)
90. Sarkar, N., Caicedo, R., Ritwik, P., Moiseyeva, R., & Kawashima, I. (2005). Physicochemical Basis of the Biologic Properties of Mineral Trioxide Aggregate. *Journal of Endodontics*, 31(2). <https://doi.org/10.1097/01.DON.0000133155.04468.41>
91. Andelin, W., Shabahang, S., Wright, K., & Torabinejad, M. (2003). Identification of Hard Tissue After Experimental Pulp Capping Using Dentin Sialoprotein (DSP) as a Marker. *Journal of Endodontics*, 29(10). <https://doi.org/10.1097/00004770-200310000-00008>
92. Torabinejad, M., Hong, C., McDonald, F., & Pittford, T. (1995). Physical and chemical properties of a new root-end filling material. *Journal of Endodontics*, 21(7). [https://doi.org/10.1016/S0099-2399\(06\)80967-2](https://doi.org/10.1016/S0099-2399(06)80967-2)
93. Camilleri, J. (2007). The physical properties of accelerated Portland cement for endodontic use. *International Endodontic Journal*, 0(0). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.2007.01330.x>
94. Kogan, P., He, J., Glickman, G. N., & Watanabe, I. (2006). The Effects of Various Additives on Setting Properties of MTA. *Journal of Endodontics*, 32(6). <https://doi.org/10.1016/j.joen.2005.08.006>
95. Gandolfi, M. G., Taddei, P., Siboni, F., Modena, E., Ciapetti, G., & Prati, C. (2011). Development of the foremost light-curable calcium-silicate MTA cement as root-end in oral surgery. Chemical–physical properties, bioactivity and biological behavior. *Dental Materials*, 27(7). <https://doi.org/10.1016/j.dental.2011.03.011>
96. Rajasekharan, S., Martens, L. C., Cauwels, R. G. E. C., Anthonappa, R. P., & Verbeeck, R. M. H. (2018). Correction to: Biodentine™ material characteristics and clinical applications: a 3 year literature review and update. *European Archives of Paediatric Dentistry*, 19(2). <https://doi.org/10.1007/s40368-018-0335-y>
97. Malkondu, Ö., Kazandağ, M. K., & Kazazoglu, E. (2014). A Review on Biodentine, a Contemporary Dentine Replacement and Repair Material. *BioMed Research International*. <https://doi.org/10.1155/2014/160951>
98. Darvell, B. W., & Wu, R. C. T. (2011). “MTA” - An Hydraulic Silicate Cement: Review update and setting reaction. *Dental Materials*, 27(5). <https://doi.org/10.1016/j.dental.2011.02.001>
99. Asgary, S., Jafar Eghbal, M., Parirokh, M., & Torabzadeh, H. (2006). Sealing Ability of Three Commercial Mineral Trioxide Aggregates and an Experimental Root-End Filling Material. In *IEJ* (Vol. 1, Issue 3).

100. Chang, J. W. W., Praisarnti, C., & Neelakantan, P. (2017). Increasing use of Bioceramics in endodontics: A narrative review. *Oral Health*. <http://hdl.handle.net/10722/242170>
101. Candeiro, G. T. de M., Correia, F. C., Duarte, M. A. H., Ribeiro-Siqueira, D. C., & Gavini, G. (2012). Evaluation of Radiopacity, pH, Release of Calcium Ions, and Flow of a Bioceramic Root Canal Sealer. *Journal of Endodontics*, 38(6). <https://doi.org/10.1016/j.joen.2012.02.029>
102. Monisha Singhal, C. P. Chaudhary, Rohit Anand, Nitin Singh, & Tanvi Sahni. (2015). RECENT ADVANCEMENTS OF INDIRECT PULP CAPPING IN PRIMARY TEETH: A REVIEW. *Journal of Advanced Medical and Dental Sciences Research* 3(5).
103. Hebling, J., Lessa, F. C. R., Nogueira, I., de Carvalho, R. M., & de Souza Costa, C. A. (2009). Cytotoxicity of resin-based light-cured liners. *American Journal of Dentistry*, 22 3, 137–142.
104. Dawood, A. E., Parashos, P., Wong, R. H. K., Reynolds, E. C., & Manton, D. J. (2017). Calcium silicate-based cements: composition, properties, and clinical applications. *Journal of Investigative and Clinical Dentistry*, 8(2). <https://doi.org/10.1111/jicd.12195>
105. Poggio, C., Arciola, C. R., Beltrami, R., Monaco, A., Dagna, A., Lombardini, M., & Visai, L. (2014). Cytocompatibility and Antibacterial Properties of Capping Materials. *The Scientific World Journal*. <https://doi.org/10.1155/2014/181945>
106. el Meligy, O. A., Saber, A. M., & Alaki, S. M. (2021). Recent Advances in Indirect Pulp Treatment Materials for Primary Teeth: A Literature Review. *International Journal of Clinical Pediatric Dentistry*, 14(6). <https://doi.org/10.5005/jp-journals-10005-2073>
107. Chang, S.-W., Lee, S.-Y., Kum, K.-Y., & Kim, E.-C. (2014). Effects of ProRoot MTA, Bioaggregate, and Micromega MTA on Odontoblastic Differentiation in Human Dental Pulp Cells. *Journal of Endodontics*, 40(1). <https://doi.org/10.1016/j.joen.2013.09.036>
108. Yuan, Z., Peng, B., Jiang, H., Bian, Z., & Yan, P. (2010). Effect of Bioaggregate on Mineral-associated Gene Expression in Osteoblast Cells. *Journal of Endodontics*, 36(7). <https://doi.org/10.1016/j.joen.2010.03.025>
109. Jang, Y.-E., Lee, B.-N., Koh, J.-T., Park, Y.-J., Joo, N.-E., Chang, H.-S., Hwang, I.-N., Oh, W.-M., & Hwang, Y.-C. (2014). Cytotoxicity and physical properties of tricalcium silicate-based endodontic materials. *Restorative Dentistry & Endodontics*, 39(2). <https://doi.org/10.5395/rde.2014.39.2.89>
110. Asgary, S., Shahabi, S., Jafarzadeh, T., Amini, S., & Kheirieh, S. (2008). The Properties of a New Endodontic Material. *Journal of Endodontics*, 34(8). <https://doi.org/10.1016/j.joen.2008.05.006>
111. Samiee, M., Eghbal, M. J., Parirokh, M., Abbas, F. M., & Asgary, S. (2010). Repair of furcal perforation using a new endodontic cement. *Clinical Oral Investigations*, 14(6). <https://doi.org/10.1007/s00784-009-0351-8>
112. Asgary, S., Eghbal, M. J., Parirokh, M., Ghanavati, F., & Rahimi, H. (2008). A comparative study of histologic response to different pulp capping materials and a novel endodontic cement. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 106(4). <https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2008.06.006>
113. Ghazvini, S. A., Abdo Tabrizi, M., Kobarfard, F., Baghban, A. A., & Asgary, S. (2009). Ion release and pH of a new endodontic cement, MTA and Portland cement. In *Iranian Endodontic Journal* (Vol. 4, Issue 2).
114. Utneja, S., Nawal, R. R., Talwar, S., & Verma, M. (2015). Current perspectives of bio-ceramic technology in endodontics: calcium enriched mixture cement- review of its composition, properties and applications. *Restorative Dentistry & Endodontics*, 40(1). <https://doi.org/10.5395/rde.2015.40.1.1>
115. Schmalz, G., & Bindeslev, D. A. (2009). Biocompatibility of Dental Materials. In G. Schmalz & D. A. Bindeslev (Eds.), *Basis Aspects* (pp. 1–12). Springer.
116. Maizumi, H. (1962). Die Wirkung verschiedener Vitalerhaltungs-und Wurzelkanalfüllmittel auf Gewebekulturen. *Dtsch Zahnärztl Z*, 17, 1628-1635.
117. Hanks, C. T., Wataha, J. C., & Sun, Z. (1996). In vitro models of biocompatibility: A review. *Dental Materials*, 12(3). [https://doi.org/10.1016/S0109-5641\(96\)80020-0](https://doi.org/10.1016/S0109-5641(96)80020-0)
118. Tuncer, D. S. & Demirci, P. D. M. (2011). DENTAL MATERYALLERDE BIYOUYUMLULUK DEĞERLENDİRMELERİ. *Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi*, 2011 (2), 141-149. <https://dergipark.org.tr/tr/pub/ataunidf/issue/2476/31684>
119. Candan Ç., Bilgiç A., (2006). Klinik Viroloji Laboratuvarında Uzmanlık Öğrencisine Verilen Hücre Kültürü Eğitim Programı: Bir Model, *İnfeksiyon Dergisi (Turkish Journal of Infection)*. 20 (3): 231-241.

120. Arenholt-Bindslev, D., & Bleeg, H. (1990). Characterization of two types of human oral fibroblast with a potential application to cellular toxicity studies: tooth pulp fibroblasts and buccal mucosa fibroblasts. *International Endodontic Journal*, 23(2). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.1990.tb00844.x>
121. Schmalz, G., Schuster, U., Nuetzel, K., & Schweikl, H. (1999). An in vitro pulp chamber with three-dimensional cell cultures. *Journal of Endodontics*, 25(1). [https://doi.org/10.1016/S0099-2399\(99\)80394-X](https://doi.org/10.1016/S0099-2399(99)80394-X)
122. Schmalz, G. (1994). Use of cell cultures for toxicity testing of dental materials-advantages and limitations. *Journal of Dentistry*, 22. [https://doi.org/10.1016/0300-5712\(94\)90032-9](https://doi.org/10.1016/0300-5712(94)90032-9)
123. Schuster, U., Schmalz, G., Thonemann, B., Mendel, N., & Metzl, C. (2001). Cytotoxicity Testing with Three-Dimensional Cultures of Transfected Pulp-Derived Cells. *Journal of Endodontics*, 27(4). <https://doi.org/10.1097/00004770-200104000-00004>
124. Freshney, R. I. (2015). Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications. John Wiley & Sons.
125. Jenkins, N. (2007). *Methods in Biotechnology, Volume 8: Animal cell biotechnology Totawa NJ. Humana Press p*, 239, 252. (n.d.).
126. Moharamzadeh, K., Brooki, I. M., & Van Noort, R. (2009). Biocompatibility of resin-based dental materials. In *Materials* (Vol. 2, Issue 2, pp. 514–548). <https://doi.org/10.3390/ma2020514>
127. Babich, H., Reisbaum, A. G., & Zuckerbraun, H. L. (2000). In vitro response of human gingival epithelial S-G cells to resveratrol. *Toxicology Letters*, 114(1–3). [https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(99\)00288-X](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(99)00288-X)
128. Riss, T. L., Moravec, R. A., Niles, A. L., Duellman, S., Benink, H. A., Worzella, T. J., & Minor, L. (2013). *Cell Viability Assays. In S. Markossian (Eds.) et. al., Assay Guidance Manual. Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences.*
129. Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1–2). [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)
130. Denizot, F., & Lang, R. (1986). Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *Journal of immunological methods*, 89(2), 271–277.
131. Goodwin, C. J., Holt, S. J., Downes, S., & Marshall, N. J. (1995). Microculture tetrazolium assays: a comparison between two new tetrazolium salts, XTT and MTS. *Journal of Immunological Methods*, 179(1). [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(94\)00277-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(94)00277-4)
132. Berridge, M. V., Herst, P. M., & Tan, A. S. (2005). *Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction.* [https://doi.org/10.1016/S1387-2656\(05\)11004-7](https://doi.org/10.1016/S1387-2656(05)11004-7)
133. Elmore, S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*, 35(4). <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>
134. Güleş, Ö., & Ülker, E. R. E. N. (2008). Apoptozun belirlenmesinde kullanılan yöntemler. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 19(2), 73–78.
135. Searle, J., Kerr, J. F., & Bishop, C. J. (1982). Necrosis and apoptosis: distinct modes of cell death with fundamentally different significance. *Pathology annual*, 17 Pt 2, 229–259.
136. Overbeeke, R., Steffens-Nakken, H., Vermes, I., Reutelingsperger, C., & Haanen, C. (1998). Early features of apoptosis detected by four different flow cytometry assays. *Apoptosis: an international journal on programmed cell death*, 3(2), 115–121. <https://doi.org/10.1023/a:1009649025439>
137. Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. (1999) *Free Radicals in Biology and Medicine. In: Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C., Eds., Free Radicals in Biology and Medicine, 3rd Edition, Oxford University Press, Oxford*, 1–25.
138. Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39(1). <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.07.001>
139. Fang, Y.-Z., Yang, S., & Wu, G. (2002). Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*, 18(10). [https://doi.org/10.1016/S0899-9007\(02\)00916-4](https://doi.org/10.1016/S0899-9007(02)00916-4)
140. Bagchi, K. & Puri, S. (1998). Free radicals and antioxidants in health and disease: a review. *EMHJ-Eastern Mediterranean Health Journal*, 4 (2), 350–360, 1998 <https://apps.who.int/iris/handle/10665/118217>.
141. Cadenas, E. (1989). BIOCHEMISTRY OF OXYGEN TOXICITY. *Annual Review of Biochemistry*, 58(1). <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.58.070189.000455>

142. Nagendrappa, G. (2005). An appreciation of free radical chemistry 3. Free radicals in diseases and health. *Resonance*, 10(4). <https://doi.org/10.1007/BF02834649>
143. Pham-Huy, L. A., He, H., & Pham-Huy, C. (2008). Free radicals, antioxidants in disease and health. *International journal of biomedical science : IJBS*, 4(2), 89–96.
144. Das Sarma, A., Mallick, A. R., & Ghosh, A. K. (2010). Free Radicals and Their Role in Different Clinical Conditions: An Overview 2. In *International Journal of Pharma Sciences and Research (IJPSR)* (Vol. 1, Issue 3).
145. Sen, S., Chakraborty, R., De, B., Sridhar, C., & Reddy, Y. S. R. (2010). FREE RADICALS, ANTIOXIDANTS, DISEASES AND PHYTOMEDICINES: CURRENT STATUS AND FUTURE PROSPECT. In *Article in International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research* (Vol. 553, Issue 1). <https://www.researchgate.net/publication/261912585>
146. Lander, H. M. (1997). An essential role for free radicals and derived species in signal transduction. *The FASEB Journal*, 11(2). <https://doi.org/10.1096/fasebj.11.2.9039953>
147. Dröge, W. (2002). Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiological Reviews*, 82(1). <https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2001>
148. Devasagayam, T. P., Tilak, J. C., Boloor, K. K., Sane, K. S., Ghaskadbi, S. S., & Lele, R. D. (2004). Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. *The Journal of the Association of Physicians of India*, 52, 794–804.
149. Kuraoka, I., Robins, P., Masutani, C., Hanaoka, F., Gasparutto, D., Cadet, J., Wood, R. D., & Lindahl, T. (2001). Oxygen Free Radical Damage to DNA. *Journal of Biological Chemistry*, 276(52). <https://doi.org/10.1074/jbc.M107779200>
150. Devi, K., Dey, K. K., Singh, S., Mishra, S. K., Modi, M. K., & Sen, P. (2019). Identification and validation of plant miRNA from NGS data—an experimental approach. *Briefings in Functional Genomics*, 18(1). <https://doi.org/10.1093/bfpg/ely034>
151. Mullis, K. B. (1994). The Polymerase Chain Reaction (Nobel Lecture). *Angewandte Chemie International Edition in English*, 33(12). <https://doi.org/10.1002/anie.199412091>
152. Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., & Erlich, H. A. (1988). Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. *Science*, 239(4839). <https://doi.org/10.1126/science.2448875>
153. Scharf, S. J., Horn, G. T., & Erlich, H. A. (1986). Direct Cloning and Sequence Analysis of Enzymatically Amplified Genomic Sequences. *Science*, 233(4768). <https://doi.org/10.1126/science.3461561>
154. Erlich, H. A., Gelfand, D., & Sninsky, J. J. (1991). Recent Advances in the Polymerase Chain Reaction. *Science*, 252(5013). <https://doi.org/10.1126/science.2047872>
155. Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M. W., Shipley, G. L., Vandesompele, J., & Wittwer, C. T. (2009). The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical Chemistry*, 55(4). <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>
156. Kubista, M., Andrade, J. M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjöback, R., Sjögreen, B., Strömbom, L., Ståhlberg, A., & Zoric, N. (2006). The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine*, 27(2–3). <https://doi.org/10.1016/j.mam.2005.12.007>
157. Wang, X. (2003). A PCR primer bank for quantitative gene expression analysis. *Nucleic Acids Research*, 31(24). <https://doi.org/10.1093/nar/gng154>
158. Sambrook, J., & Russell, D. W. (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual (3rd ed.)*. Cold Spring Harbor, N.Y: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
159. Lemma, S., Avnet, S., Salerno, M., Chano, T., & Baldini, N. (2016). Identification and Validation of Housekeeping Genes for Gene Expression Analysis of Cancer Stem Cells. *PLOS ONE*, 11(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149481>
160. Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., & Speleman, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*, 3(7). <https://doi.org/10.1186/gb-2002-3-7-research0034>
161. Risso, D., Ngai, J., Speed, T. P., & Dudoit, S. (2014). Normalization of RNA-seq data using factor analysis of control genes or samples. *Nature Biotechnology*, 32(9). <https://doi.org/10.1038/nbt.2931>
162. Freeman, W. M., Walker, S. J., & Vrana, K. E. (1999). Quantitative RT-PCR: Pitfalls and Potential. *BioTechniques*, 26(1). <https://doi.org/10.2144/99261rv01>

163. Ginzinger, D. G. (2002). Gene quantification using real-time quantitative PCR. *Experimental Hematology*, 30(6). [https://doi.org/10.1016/S0301-472X\(02\)00806-8](https://doi.org/10.1016/S0301-472X(02)00806-8)
164. STRING 11.5 (August 2021). Erişim:20/01/2023. <https://string-db.org/>
165. Quality guidelines for endodontic treatment: consensus report of the European Society of Endodontology. (2006). *International Endodontic Journal*, 39(12). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.2006.01180.x>
166. Schwendicke, F., Brouwer, F., Schwendicke, A., & Paris, S. (2016). Different materials for direct pulp capping: systematic review and meta-analysis and trial sequential analysis. *Clinical Oral Investigations*, 20(6). <https://doi.org/10.1007/s00784-016-1802-7>
167. Garrocho-Rangel, A., Quintana-Guevara, K., Vázquez-Viera, R., Arvizu-Rivera, J. M., Flores-Reyes, H., Escobar-García, D. M., & Pozos-Guillén, A. (2017). Bioactive Tricalcium Silicate-based Dentin Substitute as an Indirect Pulp Capping Material for Primary Teeth: A 12-month Follow-up. *Pediatric dentistry*, 39(5), 377–382.
168. Schmalz, G. (1994). Use of cell cultures for toxicity testing of dental materials—advantages and limitations. *Journal of Dentistry*, 22. [https://doi.org/10.1016/0300-5712\(94\)90032-9](https://doi.org/10.1016/0300-5712(94)90032-9)
169. Kisby, L. (2016). Vital Pulp Therapy in Primary Teeth: An Update. *Dentistry today*, 35 5, 112-3.
170. Rodas-Junco, B. A., & Villicaña, C. (2017). Dental Pulp Stem Cells: Current Advances in Isolation, Expansion and Preservation. In *Tissue Engineering and Regenerative Medicine* (Vol. 14, Issue 4, pp. 333–347). Korean Tissue Engineering and Regenerative Medicine Society. <https://doi.org/10.1007/s13770-017-0036-3>
171. d'Aquino, R., Papaccio, G., Laino, G., & Graziano, A. (2008). Dental Pulp Stem Cells: A Promising Tool for Bone Regeneration. *Stem Cell Reviews*, 4(1). <https://doi.org/10.1007/s12015-008-9013-5>
172. Kızıltan B., (2004), Günümüzde kullanılan iki tip bağlayıcı ajanın fibroblast hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerinin incelenmesi, (Tez Danışmanı:PROF. DR. FİGEN SEYMEN).
173. Perry, B. C., Zhou, D., Wu, X., Yang, F.-C., Byers, M. A., Chu, T.-M. G., Hockema, J. J., Woods, E. J., & Goebel, W. S. (2008). Collection, Cryopreservation, and Characterization of Human Dental Pulp-Derived Mesenchymal Stem Cells for Banking and Clinical Use. *Tissue Engineering Part C: Methods*, 14(2). <https://doi.org/10.1089/ten.tec.2008.0031>
174. Spath, L., Rotilio, V., Alessandrini, M., Gambarà, G., De Angelis, L., Mancini, M., Mitsiadis, T. A., Vivarelli, E., Naro, F., Filippini, A., & Papaccio, G. (2009). Explant-derived human dental pulp stem cells enhance differentiation and proliferation potentials. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 14(6b). <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2009.00848.x>
175. Takeda-Kawaguchi, T., Sugiyama, K., Chikusa, S., Iida, K., Aoki, H., Tamaoki, N., Hatakeyama, D., Kunisada, T., Shibata, T., Fusaki, N., & Tezuka, K. I. (2014). Derivation of ipscs after culture of human dental pulp cells under defined conditions. *PLoS ONE*, 9(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115392>
176. Karamzadeh, R., Eslaminejad, M. B., & Aflatoonian, R. (2012). Isolation, Characterization and Comparative Differentiation of Human Dental Pulp Stem Cells Derived from Permanent Teeth by Using Two Different Methods. *Journal of Visualized Experiments*, 69. <https://doi.org/10.3791/4372>
177. Huang, G. T.-J., Sonoyama, W., Chen, J., & Park, S. H. (2006). In vitro characterization of human dental pulp cells: various isolation methods and culturing environments. *Cell and Tissue Research*, 324(2). <https://doi.org/10.1007/s00441-005-0117-9>
178. Hilken, P., Gervois, P., Fanton, Y., Vanormelingen, J., Martens, W., Struys, T., Politis, C., Lambrichts, I., & Bronckaers, A. (2013). Effect of isolation methodology on stem cell properties and multilineage differentiation potential of human dental pulp stem cells. *Cell and Tissue Research*, 353(1). <https://doi.org/10.1007/s00441-013-1630-x>
179. Tsanova-Tosheva, D., Dimitrova, I., & Kouzmanova, Y. (2021, August 13). Analysis of the Organic Content in Two Hybrid Calcium-Silicate Cements. *2021 International Symposium on Biomedical Engineering and Computational Biology*. <https://doi.org/10.1145/3502060.3502276>
180. Endod. 2013;39:743–7. 12. NuSmile. Available at: [https://www.nusmile.com/NeoPutty/ Technical-Support](https://www.nusmile.com/NeoPutty/Technical-Support). Accessed on 01 October 2021. (n.d.).
181. Sun, Q., Gustin, J. W., Tian, F., Sidow, S. J., Bergeron, B. E., Ma, J., & Tay, F. R. (2021). Effects of pre-mixed hydraulic calcium silicate putties on osteogenic differentiation of human dental pulp stem cells in vitro. *Journal of Dentistry*, 108. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2021.103653>
182. Rodríguez-Lozano, F. J., Lozano, A., López-García, S., García-Bernal, D., Sanz, J. L., Guerrero-Gironés, J., Llena, C., Forner, L., & Melo, M. (2022). Biomineralization potential and biological properties

- of a new tantalum oxide (Ta₂O₅)–containing calcium silicate cement. *Clinical Oral Investigations*, 26(2). <https://doi.org/10.1007/s00784-021-04117-x>
183. Widbiller, M., Lindner, S. R., Buchalla, W., Eidt, A., Hiller, K.-A., Schmalz, G., & Galler, K. M. (2016). Three-dimensional culture of dental pulp stem cells in direct contact to tricalcium silicate cements. *Clinical Oral Investigations*, 20(2). <https://doi.org/10.1007/s00784-015-1515-3>
 184. Rodríguez-Lozano, F. J., López-García, S., García-Bernal, D., Sanz, J. L., Lozano, A., Pecci-Lloret, M. P., Melo, M., López-Ginés, C., & Forner, L. (2021). Cytocompatibility and bioactive properties of the new dual-curing resin-modified calcium silicate-based material for vital pulp therapy. *Clinical Oral Investigations*, 25(8). <https://doi.org/10.1007/s00784-021-03811-0>
 185. Bortoluzzi, E. A., Niu, L., Palani, C. D., El-Awady, A. R., Hammond, B. D., Pei, D., Tian, F., Cutler, C. W., Pashley, D. H., & Tay, F. R. (2015). Cytotoxicity and osteogenic potential of silicate calcium cements as potential protective materials for pulpal revascularization. *Dental Materials*, 31(12). <https://doi.org/10.1016/j.dental.2015.09.020>
 186. Saw, T. Y., Cao, T., Yap, A. U. J., & Lee Ng, M. M. (2005). Tooth slice organ culture and established cell line culture models for cytotoxicity assessment of dental materials. *Toxicology in Vitro*, 19(1). <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2004.08.006>
 187. ISO 10993 part 5, 1999. International Standard 10993 “Biological evaluation of medical devices Part 5: Tests for cytotoxicity: In-vitro methods.” *International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland*.
 188. Cao, T., Saw, T. Y., Heng, B. C., Liu, H., Yap, A. U. J., & Ng, M. L. (2005). Comparison of different test models for the assessment of cytotoxicity of composite resins. *Journal of Applied Toxicology*, 25(2). <https://doi.org/10.1002/jat.1041>
 189. Ajlan, S. A., Ashri, N. Y., Aldahmash, A. M., & Alnbaheen, M. S. (2015). Osteogenic differentiation of dental pulp stem cells under the influence of three different materials. *BMC Oral Health*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/s12903-015-0113-8>
 190. Khanna-Jain R, Mannerström B, Vuorinen A, Sándor GK, Suuronen R, Miettinen S., (2012). Osteogenic differentiation of human dental pulp stem cells on β-tricalcium phosphate/poly (l-lactic acid/caprolactone) three-dimensional scaffolds. *Journal of Tissue Engineering*. 3(1). <https://doi.org/10.1177/2041731412467998>
 191. Galluzzi, L., Aaronson, S. A., Abrams, J., Alnemri, E. S., Andrews, D. W., Baehrecke, E. H., Bazan, N. G., Blagosklonny, M. V, Blomgren, K., Borner, C., Bredesen, D. E., Brenner, C., Castedo, M., Cidlowski, J. A., Ciechanover, A., Cohen, G. M., De Laurenzi, V., De Maria, R., Deshmukh, M., ... Kroemer, G. (2009). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes. *Cell Death & Differentiation*, 16(8). <https://doi.org/10.1038/cdd.2009.44>
 192. Cannella, V., Altomare, R., Chiaramonte, G., Di Bella, S., Mira, F., Russotto, L., Pisano, P., & Guercio, A. (2019). Cytotoxicity Evaluation of Endodontic Pins on L929 Cell Line. *BioMed Research International*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/3469525>
 193. Küden, C., Karakaş, S. N., & Batmaz, S. G. (2022). Comparative chemical properties, bioactivity, and cytotoxicity of resin-modified calcium silicate–based pulp capping materials on human dental pulp stem cells. *Clinical Oral Investigations*, 26(11). <https://doi.org/10.1007/s00784-022-04713-5>
 194. Sanz, J. L., Soler-Doria, A., López-García, S., García-Bernal, D., Rodríguez-Lozano, F. J., Lozano, A., Llana, C., Forner, L., Guerrero-Gironés, J., & Melo, M. (2021). Comparative Biological Properties and Mineralization Potential of 3 Endodontic Materials for Vital Pulp Therapy: Theracal PT, Theracal LC, and Biodentine on Human Dental Pulp Stem Cells. *Journal of Endodontics*, 47(12). <https://doi.org/10.1016/j.joen.2021.08.001>
 195. Lozano-Guillén, A., López-García, S., Rodríguez-Lozano, F. J., Sanz, J. L., Lozano, A., Llana, C., & Forner, L. (2022). Comparative cytocompatibility of the new calcium silicate-based cement NeoPutty versus NeoMTA Plus and MTA on human dental pulp cells: an in vitro study. *Clinical Oral Investigations*, 26(12). <https://doi.org/10.1007/s00784-022-04682-9>
 196. Sun, Q., Meng, M., Steed, J. N., Sidow, S. J., Bergeron, B. E., Niu, L., Ma, J., & Tay, F. R. (2021). Manoeuvrability and biocompatibility of endodontic tricalcium silicate-based putties. *Journal of Dentistry*, 104. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2020.103530>
 197. Kim, Y., Lee, D., Song, D., Kim, H.-M., & Kim, S.-Y. (2020). Biocompatibility and Bioactivity of Set Direct Pulp Capping Materials on Human Dental Pulp Stem Cells. *Materials*, 13(18). <https://doi.org/10.3390/ma13183925>

198. Min, K.-S., Chang, H.-S., Bae, J.-M., Park, S.-H., Hong, C.-U., & Kim, E.-C. (2007). The Induction of Heme Oxygenase-1 Modulates Bismuth Oxide-induced Cytotoxicity in Human Dental Pulp Cells. *Journal of Endodontics*, 33(11). <https://doi.org/10.1016/j.joen.2007.07.012>
199. Chen L, Shen H, Suh BL,(2013) Bioactive dental restorative materials: a review. *American Journal of Dentistry.*, Aug;26(4):219-227. PMID: 24693633.
200. Lee, H., Shin, Y., Kim, S.-O., Lee, H.-S., Choi, H.-J., & Song, J. S. (2015). Comparative Study of Pulpal Responses to Pulpotomy with ProRoot MTA, RetroMTA, and TheraCal in Dogs' Teeth. *Journal of Endodontics*, 41(8). <https://doi.org/10.1016/j.joen.2015.04.007>
201. Jeanneau, C., Laurent, P., Rombouts, C., Giraud, T., & About, I. (2017). Light-cured Tricalcium Silicate Toxicity to the Dental Pulp. *Journal of Endodontics*, 43(12). <https://doi.org/10.1016/j.joen.2017.07.010>
202. Bakhtiar, H., Nekoofar, M. H., Aminishakib, P., Abedi, F., Naghi Moosavi, F., Esnaashari, E., Azizi, A., Esmailian, S., Ellini, M. R., Mesgarzadeh, V., Sezavar, M., & About, I. (2017). Human Pulp Responses to Partial Pulpotomy Treatment with TheraCal as Compared with Biodentine and ProRoot MTA: A Clinical Trial. *Journal of Endodontics*, 43(11). <https://doi.org/10.1016/j.joen.2017.06.025>
203. Nilsen, B. W., Jensen, E., Örtengren, U., & Michelsen, V. B. (2017). Analysis of organic components in resin-modified pulp capping materials: critical considerations. *European Journal of Oral Sciences*, 125(3). <https://doi.org/10.1111/eos.12347>
204. Federal Register (USA),(2016), "TheraCal LC safety data sheet," vol. 77, pp. 1–7. (n.d.).
205. Valente, C. D. S. D. (2022). Comportamento celular em materiais de restauração em lesões não cariosas (Doctoral dissertation).
206. Eliaçık B., Seymen F., (2021) İki tip bağlayıcı ajanın monomer salınımlarının pulpa fibroblast hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerinin değerlendirilmesi. *Medical Research Reports*. 4(1): 11-28.
207. Arandi, N. Z., & Rabi, T. (2018). TheraCal LC: From Biochemical and Bioactive Properties to Clinical Applications. *International Journal of Dentistry*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/3484653>
208. López-García, S., Pecci-Lloret, M. P., Pecci-Lloret, M. R., Oñate-Sánchez, R. E., García-Bernal, D., Castelo-Baz, P., Rodríguez-Lozano, F. J., & Guerrero-Gironés, J. (2019). In Vitro Evaluation of the Biological Effects of ACTIVA Kids BioACTIVE Restorative, Ionolux, and Riva Light Cure on Human Dental Pulp Stem Cells. *Materials*, 12(22). <https://doi.org/10.3390/ma12223694>
209. Vallittu, P. K., & Ekstrand, K. (1999). In vitro cytotoxicity of fibre-polymethyl methacrylate composite used in dentures. *Journal of Oral Rehabilitation*, 26(8). <https://doi.org/10.1046/j.1365-2842.1999.00431.x>
210. Dahl, O. E., Garvik, L. J., & Lyberg, T. (1994). Toxic effects of methylmethacrylate monomer on leukocytes and endothelial cells in vitro. *Acta Orthopaedica Scandinavica*, 65(2). <https://doi.org/10.3109/17453679408995423>
211. Camilleri, J., Montesin, F. E., Papaioannou, S., McDonald, F., & Pitt Ford, T. R. (2004). Biocompatibility of two commercial forms of mineral trioxide aggregate. *International Endodontic Journal*, 37(10). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.2004.00859.x>
212. Marczuk-Kolada, G., Luczaj-Cepowicz, E., Pawinska, M., & Holownia, A. (2017). Evaluation of the cytotoxicity of selected conventional glass ionomer cements on human gingival fibroblasts. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, 26(7). <https://doi.org/10.17219/acem/64944>
213. Wei, W., Qi, Y., Nikonov, S. Y., Niu, L., Messer, R. L. W., Mao, J., Primus, C. M., Pashley, D. H., & Tay, F. R. (2012). Effects of an Experimental Calcium Aluminosilicate Cement on the Viability of Murine Odontoblast-like Cells. *Journal of Endodontics*, 38(7). <https://doi.org/10.1016/j.joen.2012.03.020>
214. Marqués-Gallego, P., den Dulk, H., Backendorf, C., Brouwer, J., Reedijk, J., & Burke, J. F. (2010). Accurate non-invasive image-based cytotoxicity assays for cultured cells. *BMC Biotechnology*, 10(1). <https://doi.org/10.1186/1472-6750-10-43>
215. Zhou, H., Shen, Y., Wang, Z., Li, L., Zheng, Y., Häkkinen, L., & Haapasalo, M. (2013). In Vitro Cytotoxicity Evaluation of a Novel Root Repair Material. *Journal of Endodontics*, 39(4). <https://doi.org/10.1016/j.joen.2012.11.026>
216. Diaz, D., Prieto, A., Reyes, E., Barcenilla, H., Monserrat, J., & Alvarez-Mon, M. (2008). Flow Cytometry Enumeration of Apoptotic Cancer Cells by Apoptotic Rate. In *Apoptosis and Cancer*. Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-339-4_3
217. Kanev, M., Muranlı, F. G. (2016). Flow sitometri ve kullanım alanları. *Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 20(1), 33-38.

218. Dou, L., Yan, Q., & Yang, D. (2020). Effect of five dental pulp capping agents on cell proliferation, viability, apoptosis and mineralization of human dental pulp cells. *Experimental and Therapeutic Medicine*. <https://doi.org/10.3892/etm.2020.8444>
219. Tsai, C.-L., Ke, M.-C., Chen, Y.-H., Kuo, H.-K., Yu, H.-J., Chen, C.-T., Tseng, Y.-C., Chuang, P.-C., & Wu, P.-C. (2018). Mineral trioxide aggregate affects cell viability and induces apoptosis of stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *BMC Pharmacology and Toxicology*, 19(1). <https://doi.org/10.1186/s40360-018-0214-5>
220. Saidon, J., He, J., Zhu, Q., Safavi, K., & Spångberg, L. S. W. (2003). Cell and tissue reactions to mineral trioxide aggregate and portland cement. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 95(4). <https://doi.org/10.1067/moe.2003.20>
221. Goldberg, M., Six, N., Decup, F., Lasfargues, J. J., Salih, E., Tompkins, K., & Veis, A. (2003). Bioactive molecules and the future of pulp therapy. *American journal of dentistry*, 16(1), 66–76.
222. Camargo, S. E. A., Camargo, C. H. R., Hiller, K.-A., Rode, S. M., Schweikl, H., & Schmalz, G. (2009). Cytotoxicity and genotoxicity of pulp capping materials in two cell lines. *International Endodontic Journal*, 42(3). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.2008.01506.x>
223. Schweikl, H., Spagnuolo, G., & Schmalz, G. (2006). Genetic and Cellular Toxicology of Dental Resin Monomers. *Journal of Dental Research*, 85(10). <https://doi.org/10.1177/154405910608501001>
224. Rezende, T. M. B., Vieira, L. Q., Cardoso, F. P., Oliveira, R. R., de Oliveira Mendes, S. T., Jorge, M. L. R., & Ribeiro Sobrinho, A. P. (2007). The effect of mineral trioxide aggregate on phagocytic activity and production of reactive oxygen, nitrogen species and arginase activity by M1 and M2 macrophages. *International Endodontic Journal*, 40(8). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.2007.01255.x>
225. Zhang, J., Xie, Y., Fan, Q., & Wang, C. (2021). Effects of karanjin on dimethylhydrazine induced colon carcinoma and aberrant crypt foci are facilitated by alteration of the p53/Bcl2/BAX pathway for apoptosis. *Biotechnic & Histochemistry*, 96(3). <https://doi.org/10.1080/10520295.2020.1781258>
226. Wang, Y., Zhao, Y., & Ge, L. (2014). Effects of the enamel matrix derivative on the proliferation and odontogenic differentiation of human dental pulp cells. *Journal of Dentistry*, 42(1). <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2013.10.020>
227. Lee, S.-K., Lee, S.-K., Lee, S.-I., Park, J.-H., Jang, J.-H., Kim, H.-W., & Kim, E.-C. (2010). Effect of Calcium Phosphate Cements on Growth and Odontoblastic Differentiation in Human Dental Pulp Cells. *Journal of Endodontics*, 36(9). <https://doi.org/10.1016/j.joen.2010.04.027>
228. Kahya, S., Buyukcangaz, E., & Tayfun CARLI, K. (2013). Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Optimizasyonu. In *Vet. Med* (Vol. 32).
229. Giraud, T., Jeanneau, C., Rombouts, C., Bakhtiar, H., Laurent, P., & About, I. (2019). Pulp capping materials modulate the balance between inflammation and regeneration. *Dental Materials*, 35(1). <https://doi.org/10.1016/j.dental.2018.09.008>
230. Giraud, T., Jeanneau, C., Bergmann, M., Laurent, P., & About, I. (2018). Tricalcium Silicate Capping Materials Modulate Pulp Healing and Inflammatory Activity In Vitro. *Journal of Endodontics*, 44(11). <https://doi.org/10.1016/j.joen.2018.06.009>
231. Stein, G. S., Lian, J. B., & Owen, T. A. (1990). Relationship of cell growth to the regulation of tissue-specific gene expression during osteoblast differentiation. *The FASEB Journal*, 4(13). <https://doi.org/10.1096/fasebj.4.13.2210157>
232. Youssef, A.-R., Emara, R., Taher, M. M., Al-Allaf, F. A., Almalki, M., Almasri, M. A., & Siddiqui, S. S. (2019). Effects of mineral trioxide aggregate, calcium hydroxide, biodentine and Emdogain on osteogenesis, Odontogenesis, angiogenesis and cell viability of dental pulp stem cells. *BMC Oral Health*, 19(1). <https://doi.org/10.1186/s12903-019-0827-0>
233. Lee, H.-S., Jung, E.-Y., Bae, S. H., Kwon, K. H., Kim, J.-M., & Suh, H. J. (2011). Stimulation of osteoblastic differentiation and mineralization in MC3T3-E1 cells by yeast hydrolysate. *Phytotherapy Research*, 25(5). <https://doi.org/10.1002/ptr.3328>
234. Rodrigues, E. M., Cornélio, A. L. G., Mestieri, L. B., Fuentes, A. S. C., Salles, L. P., Rossa-Junior, C., Faria, G., Guerreiro-Tanomaru, J. M., & Tanomaru-Filho, M. (2017). Human dental pulp cells response to mineral trioxide aggregate (MTA) and MTA Plus: cytotoxicity and gene expression analysis. *International Endodontic Journal*, 50(8). <https://doi.org/10.1111/iej.12683>
235. Astashkina, A., Mann, B., & Grainger, D. W. (2012). A critical evaluation of in vitro cell culture models for high-throughput drug screening and toxicity. *Pharmacology & Therapeutics*, 134(1). <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2012.01.001>

236. Banchs, F., & Trope, M. (2004). Revascularization of Immature Permanent Teeth With Apical Periodontitis: New Treatment Protocol? *Journal of Endodontics*, 30(4). <https://doi.org/10.1097/00004770-200404000-00003>
237. Gronthos, S., Brahimi, J., Li, W., Fisher, L. W., Cherman, N., Boyde, A., DenBesten, P., Robey, P. G., & Shi, S. (2002). Stem Cell Properties of Human Dental Pulp Stem Cells. *Journal of Dental Research*, 81(8). <https://doi.org/10.1177/154405910208100806>
238. Brown, L. F., Detmar, M., Claffey, K., Nagy, J. A., Feng, D., Dvorak, A. M., & Dvorak, H. F. (1997). Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: A multifunctional angiogenic cytokine. https://doi.org/10.1007/978-3-0348-9006-9_10
239. Akbulut, M. B., Uyar Arpacı, P., & Ünverdi Eldeniz, A. (2016). 'Effects of novel root repair materials on attachment and morphological behaviour of periodontal ligament fibroblasts: Scanning electron microscopy observation.' *Microscopy Research and Technique*, 79(12). <https://doi.org/10.1002/jemt.22780>



EKLER

EK-1.Etik Kurul Onayı

Evrak Tarih ve Sayısı: 31.12.2021-90645



T.C.
SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
Hamidiye Bilimsel Araştırmalar Etik Kurulu

Sayı : E-46418926-050.99--90645
Konu : Araştırma Projesi Değerlendirme Raporu
(21/772)

31.12.2021

Sayın Dr.Öğr.yesi Bahar Başak KIZILTAN ELİAÇIK

Kurulumuza değerlendirilmek üzere sunulan, Dr.Öğr.yesi Bahar Başak KIZILTAN ELİAÇIK'ın sorumlu araştırmacı, Banu Çiçek TEZ'in yardımcı araştırmacı olduğu 21/772 kayıt numaralı "**Günümüzde Direkt ve/veya İndirekt Kuafaj Tedavisinde Kullanılan Materyallerin Dental Pulpa Kök Hücreleri zerindeki Sitotoksitesisi ve Biyouyumluluğunun İncelenmesi**" başlıklı proje nerisi kurulumuzun 24.12.2021 tarihli toplantısında değerlendirilmiş ve etik açıdan uygun bulunmuştur. İlgili kurul kararı Ek'te sunulmuştur.

Bilgilerini rica ederim.

Prof. Dr. Fatih GÜLTEKİN
Başkan

Ek:Kurul Kararı (1 Sayfa)

Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

Belge Doğrulama Kodu : *BSCB8V04U4* Pin Kodu : 41052 Belge Takip Adresi : <https://www.turkiye.gov.tr/sbu-ebys>
Adres: Mekteb-i Tıbbiye-i Şahane Karapınar, Tıbbiye Cad. No:38 Seliyye
Telefon: 0216 346 36 38 Faks: 0216 346 36 40 Bilgi için: Ali CEYLAN
Web: <http://sbu.edu.tr> Unvanı: Memur
Kep Adresi: sbu@sbu01.kep.tr



Bu belge,güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.



T.C.
SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
HAMİDİYE BİLİMSEL ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

Toplantı Tarihi : 24.12.2021
Toplantı Sayısı : 2021/39
Karar Sayısı : 39/4

Kurulumuza değerlendirilmek üzere sunulan, Dr.Öğr.Üyesi Bahar Başak KIZILTAN ELLAÇIK'ın sorumlu araştırmacı, Banu Çiçek TEZ'in yardımcı araştırmacı olduğu 21/772 kayıt numaralı " *Günümüzde Direkt ve/veya İndirekt Kuafaj Tedavisinde Kullanılan Materyallerin Dental Pulpa Kök Hücreleri Üzerindeki Sitotoksitesi ve Biyouyumluluğunun İncelenmesi*" başlıklı proje önerisi kurulumuzun 24.12.2021 tarihli toplantısında değerlendirilmiş ve etik açıdan uygun bulunmuştur.

Aslı Gibidir
e-imzalıdır
Prof. Dr. Fatih GÜLTEKİN
Başkan

Doç. Dr. Selda RIZALAR Etik Kurul Üyesi	Doç. Dr. Erhan ALABAY Etik Kurul Üyesi
Doç. Dr. Papatya KELEŞ Etik Kurul Üyesi	Doç. Dr. Yasemin AYDIN KARTAL Etik Kurul Üyesi
Dr. Öğr. Üyesi Banu BAYRAM Etik Kurul Üyesi	Dr. Öğr. Üyesi Eray Metin GÜLER Etik Kurul Üyesi
Dr. Öğr. Üyesi Merve KOLCU Etik Kurul Üyesi	Dr. Öğr. Üyesi Gamze TEMİZ Etik Kurul Üyesi
Doç. Dr. Muzaffer AKDOĞAN Etik Kurul Üyesi	

27.12.2021 Memur

Ali CEYLAN

EK-2.Bilgilendirilmiş Onam Formu

Sayın Katılımcı,

Bu araştırma, Sağlık Bilimleri Üniversitesi Hamidiye Diş Hekimliği Fakültesi Çocuk Diş Hekimliği Ana Bilim Dalı doktora öğrencisi Banu Çiçek TEZ'in doktora tezi kapsamında Doç. Dr. Bahar Başak KIZILTAN ELİAÇIK danışmanlığında yürütülecek olan bilimsel bir çalışmadır. Bu çalışmada yer almayı kabul etmeden önce, araştırmanın ne amaçla yapılmak istendiğini anlamanız ve kararınızı bu bilgilendirme çerçevesinde özgürce vermeniz gerekmektedir.

Aşağıdaki bilgileri lütfen dikkatlice okuyunuz, sorularınız olursa sorunuz ve açık yanıtlar isteyiniz.

Bu doktora tez çalışmasında, yeni ve güncel kuafaj materyallerinin (Harvard BioCal®-CAP, NuSmile Neo Putty MTA0.65 gram Starter Kit, TheraCal LC(Bisco Inc, Schamburg, IL, ABD), Dycal (Dentsply) dental pulpa kök hücreleri üzerinde; canlılık değerlerinin analiz edildiği MTS test yöntemi, apoptoz ve nekroz tayinin yapıldığı Annexin V-PI analizi, hücre karakterizasyonu, hücre içi serbest radikal yoğunluğunun bakıldığı ROS analizi, ALP, OCN, Col1A, VEGF, SPARC (Osteonektin)'in bakıldığı Real Time PCR gen ekspresyon değerleri ve hücre morfolojideki değişikliklerin saptandığı SEM görüntüleme yöntemi kullanılarak sitotoksikite ve biyouyumluluklarının karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Bu çalışmada, dental pulpa kök hücre kaynağı olarak kemik ve/veya yumuşak doku retansiyonlu 3. Büyük azı dişleri kullanılacaktır. Sultan Abdülhamit Han Eğitim ve Araştırma Hastanesi Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi Kliniği'ne üçüncü büyük azı dişi/dişlerinin çekimi için başvuran hastaların gönüllülüğü esas alınarak çekilen dişleri toplanacak ve bu çalışmada kullanılacaktır. Bu çalışma kapsamında, toplanan dişler uygun saklama koşullarında saklanarak kök hücre kaynağı olarak kullanılacaktır. Toplanan dişlerden ideal kriterlere uygun olan 3.büyük azı dişi seçilerek araştırmaya dahil edilecektir. Bu araştırma için gönüllü olan hastalardan 3.büyük azı dişleri haricinde herhangi bir veri isteğinde bulunulmayacaktır.

Araştırmaya dahil olan gönüllülerin, çekilmiş dişleri kullanılacağından gönüllü için herhangi bir risk söz konusu değildir, atık materyal olarak geçmektedir. Gönüllüler,

araştırmaya katılmayı kabul etmemeleri ya da araştırmadan ayrılmaları durumunda herhangi bir olumsuz sonuçla karşı karşıya kalmayacaklardır. “Bu araştırmada yer almak tümüyle sizin isteğinize bağlıdır. Araştırmada yer almayı reddedebilirsiniz ya da başladıktan sonra yarıda bırakabilirsiniz. Bu araştırmanın sonuçları bilimsel amaçlarla kullanılacaktır. Sizden elde edilen tüm bilgiler gizli tutulacak, araştırma yayınlandığında da varsa kimlik bilgilerinizin gizliliği korunacaktır.”

☐ ‘Yukarıda yer alan ve araştırmaya başlanmadan önce gönüllülere verilmesi gereken bilgileri içeren metni okudum ve sözlü olarak dinledim. Eksik kaldığını düşündüğüm konularda sorularımı araştırmacılara sordum ve doyurucu yanıtlar aldım.’

☐ ‘Yazılı ve sözlü olarak tarafıma sunulan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anladığımı kanıslındayım. Çalışmaya katılmayı isteyip istemediğim konusunda karar vermem için yeterince zaman tanındı.’

‘Bu koşullar altında, araştırma kapsamında elde edilen şahsıma ait çekilmiş dişin/dişlerin bilimsel amaçlarla kullanılmasını, gizlilik kurallarına uyulmak kaydıyla sunulmasını ve üzerinde çalışılarak sonuçların yayınlanmasını, hiçbir baskı ve zorlama altında kalmaksızın, kendi özgür irademle kabul ettiğimi beyan ederim.

Gönüllü Katılımcı

Araştırmacı

İmza

İmza

