



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

**FARKLI PULPA KUAF AJ
MATERYALLERİNİN TOKSİK
ETKİLERİNİN MORFOLOJİK VE
MOLEKÜLER YÖNTEMLER
KULLANILARAK ZEBRA BALIĞI
(*DANIO RERIO*) ÜZERİNDE
BELİRLENMESİ**

MELTEM KARAHAN

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

**ÇOCUK DİŞ HEKİMLİĞİ ANA BİLİM DALI
ÇOCUK DİŞ HEKİMLİĞİ DOKTORA PROGRAMI**

**DOKTORA TEZİ
OCAK/2024**

İTHAF

“Desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen aileme ithaf ediyorum.”

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimime başladığım ilk günden itibaren bana inanan, bir bilim insanı olma yolunda bilgi birikimi ve tecrübeleriyle akademik hayatıma yön veren, pes etmek üzere olduğum her anda beni daima motive eden, her zaman sevgisini ve desteğini hissettiğim, öğrencisi olmaktan gurur duyduğum, en büyük şansım çok değerli danışman hocam Sayın Doç. Dr. Bahar Başak KIZILTAN ELİAÇIK'a,

Doktora eğitimim boyunca bana yol gösteren ve emek veren Sayın hocam Prof. Dr. Günseli GÜVEN POLAT'a; değerli hocalarım Doç. Dr. Barış KARABULUT, Dr. Öğr. Üyesi Şükriye TÜRKOĞLU KAYACI ve Dr. Öğr. Üyesi Cafer ATAŞ'a; tez çalışmam boyunca tez izleme komitesinde yer alan Doç. Dr. Sibel DİKİCİER'e,

Doktora tezimin Dokuz Eylül Üniversitesi İzmir Uluslararası Biyotıp ve Genom Merkezi Özhan-Gelişim ve Rejenerasyon Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmesi için imkan sağlayan, misafir araştırmacısı olmaktan gurur duyduğum, bilgisiyle bana yol gösteren Sayın Prof. Dr. Hatice Güneş ÖZHAN'a; aynı laboratuvarda araştırma yapmaktan mutluluk duyduğum, ufkumu genişleten ve beni asla yarı yolda bırakmayan Öğr. Gör. Dr. Evin İŞCAN'a; yardımlarını esirgemeyen yüksek lisans öğrencisi Umut ÇAĞIRAL'a,

Doktora hayatımın bana kattığı, tanımaktan mutluluk duyduğum, hayatımın birçok güzel anısında yer alan canım kıdemlim Banu Çiçek TEZ'e; tüm zorlukları beraber atlattığımız, bu yolda birlikte ilerlediğimiz eş kıdemim Zeynep SOLMAZGÜL'e; destekleriyle yanımda olan ismini sayamadığım tüm asistan arkadaşlarıma,

Fakülteye ilk başladığım günden beri beni hiç yalnız bırakmayan ve hayatımda her zaman iyi ki var dediğim canım dostum Mizgin Nur ŞEK'e,

Karşılıksız sevgi ve emeklerini esirgemeyen, başarılarımın yegane kaynağı; sevgili annem Melike KARAHAN, babam Niyazi KARAHAN, kardeşlerim Kaan ve Kerem KARAHAN'a,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu doktora tezi çalışması, bilimsel araştırmalar projesi kapsamında Sağlık Bilimleri Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeleri Birimi tarafından 2022/119 numaralı proje ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

İTHAF.....	iv
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
TABLolar LİSTESİ.....	ix
RESİMLER LİSTESİ	x
ŞEKİLLER LİSTESİ	xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR	xv
ÖZET	xvii
ABSTRACT	xix
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. VİTAL PULPA TEDAVİLERİ.....	3
2.1.1 İndirekt Pulpa Kuafajı.....	5
2.1.2 Direkt Pulpa Kuafajı	6
2.1.3. Pulpotomi.....	8
2.2. VİTAL PULPA TEDAVİLERİNDE KULLANILAN MATERYALLER.....	9
2.2.1. Çinko Oksit Ojenol (ZOE).....	10
2.2.2. Adeziv Sistemler	10
2.2.3. Cam İyonomer/ Resin Modifiye Cam İyonomer Simanlar	12
2.2.4. Kalsiyum Hidroksit.....	13
2.2.5. Mineral Trioksit Agregat (MTA).....	14
2.2.6. Biodentine	16
2.2.7. Biyoseramik Esaslı Patlar	18
2.2.8. Bioaggregate	19
2.2.9. Resin ile Modifiye Edilmiş Kalsiyum Silikatlar.....	20
2.3. TOKSİSİTE VE BİYOUYUMLULUK	21
2.3.1. In Silico Toksisite Modeli	22
2.3.2. In Vitro Toksisite Modeli	22
2.3.3. In Vivo Toksisite Modeli.....	23
2.4. MODEL ORGANİZMA OLARAK ZEBRA BALIĞI	25
2.4.1. Zebra Balığının Üreme, Büyüme ve Gelişimi	27
2.4.2. Toksisite Çalışmalarında Zebra Balığının Kullanımı	28
2.4.3. Zebra Balığı Kullanılarak Yapılan Diş Hekimliği Çalışmaları	29
2.5. APOPTOZUN BELİRLENMESİ.....	31

3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	33
3.1. GEREÇLER.....	33
3.1.1. Kullanılan Kuafaj Materyalleri.....	33
3.1.2. Kullanılan Sarf Malzemeleri.....	33
3.1.3. Kullanılan Cihazlar	34
3.1.4. Kullanılan Kimyasal Materyaller.....	35
3.1.5. E3 Ortamı İçeriği	35
3.2. TEST SOLÜSYONLARININ HAZIRLANMASI.....	35
3.3. DENEYDE KULLANILACAK EMBRİYO SAYISININ BELİRLENMESİ.....	42
3.4. ZEBRA BALIKLARININ İDAME ETTİRİLMESİ VE EMBRİYO ELDESİ	42
3.5. EMBRİYONİK TOKSİSİTE VE MORTALİTENİN BELİRLENMESİ	45
3.5.1. Sağ Kalım Oranı	45
3.5.2. Koryondan Çıkış Oranı.....	47
3.5.3. Malformasyonlar.....	48
3.6. APOPTOZUN BELİRLENMESİ.....	49
3.6.1. Akridin Oranj Boyama Yöntemi.....	49
3.6.2. Cleaved Caspase-3 ile Whole-Mount İmmün Boyama Yöntemi	51
3.7. İSTATİSTİKSEL ANALİZ.....	54
4. BULGULAR.....	55
4.1. EMBRİYO SAĞ KALIMLARININ BELİRLENMESİ VE ANALİZ SONUÇLARI	55
4.1.1. Farklı Dozlarda Oxford ActiveCal PC Materyali Uygulanan Embriyoların Sağ Kalım Oranlarının Belirli Zamanlarda Kontrol Grubu ile Karşılaştırmalı Analizi	56
4.1.2. Farklı Dozlarda Biodentine Materyali Uygulanan Embriyoların Sağ Kalım Oranlarının Belirli Zamanlarda Kontrol Grubu ile Karşılaştırmalı Analizi	61
4.1.3. Farklı Dozlarda Harvard BioCal- CAP Materyali Uygulanan Embriyoların Sağ Kalım Oranlarının Belirli Zamanlarda Kontrol Grubu ile Karşılaştırmalı Analizi	65
4.1.4. Farklı Dozlarda MTA Angelus Materyali Uygulanan Embriyoların Sağ Kalım Oranlarının Belirli Zamanlarda Kontrol Grubu ile Karşılaştırmalı Analizi	70
4.2. KORYONDAN ÇIKIŞ ORANLARININ BELİRLENMESİ VE ANALİZ SONUÇLARI	74
4.2.1. Farklı Dozlarda Oxford ActiveCal PC Materyali Uygulanan Embriyoların Koryondan Çıkış Oranlarının Belirli Zamanlarda Kontrol Grubu ile Karşılaştırmalı Analizi.....	74
4.2.2. Farklı Dozlarda Biodentine Materyali Uygulanan Embriyoların Koryondan Çıkış Oranlarının Belirli Zamanlarda Kontrol Grubu ile Karşılaştırmalı Analizi	76
4.2.3. Farklı Dozlarda Harvard BioCal- CAP Materyali Uygulanan Embriyoların Koryondan Çıkış Oranlarının Belirli Zamanlarda Kontrol Grubu ile Karşılaştırmalı Analizi.....	77

4.2.4. Farklı Dozlarda MTA Angelus Materyali Uygulanan Embriyoların Koryondan Çıkış Oranlarının Belirli Zamanlarda Kontrol Grubu ile Karşılaştırmalı Analizi	79
4.3. MALFORMASYON GÖSTEREN EMBRİYO/ LARVALARIN GÖRÜNTÜLENMESİ	80
4.4. APOPTOZUN BELİRLENMESİ VE ANALİZ SONUÇLARI.....	83
4.4.1. Akridin Oranj ile Boyama Yöntemi Analiz Sonuçları.....	83
4.4.1.1 Oxford ActiveCal PC materyali uygulanan embriyolarda akridin oranj ile boyama yöntemi analiz sonuçları	83
4.4.1.2 Biodentine materyali uygulanan embriyolarda akridin oranj ile boyama yöntemi analiz sonuçları.....	84
4.4.1.3 Harvard BioCal-CAP materyali uygulanan embriyolarda akridin oranj ile boyama yöntemi analiz sonuçları	86
4.4.1.4 MTA Angelus materyali uygulanan embriyolarda akridin oranj ile boyama yöntemi analiz sonuçları.....	87
4.4.2 Cleaved Caspase- 3 ile Whole- Mount Immün Boyama Yöntemi Analiz Sonuçları	88
5. TARTIŞMA	91
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	109
KAYNAKLAR	113
EK	139

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 3.1: Çalışmada kullanılan materyallerin kullanım amacı, üretici firma, kompozisyon sertleşme tipi ve süresi.....	37
Tablo 3.2: Belirlenen dozlar için kullanılan test solüsyonu ve E3 miktarları.....	40



RESİMLER LİSTESİ

Resim 3.1: Çalışmada kullanılan pulpa kuafaj materyalleri; Oxford ActiveCal PC (Oxford Scientific, Elmshorn, Almanya) (A), Biodentine (Septodont, Fransa) (B), Harvard BioCal-CAP (Harvard Dental International GmbH, Almanya) (C), MTA Angelus (Angelus, Brezilya) (D).....	36
Resim 3.2: 1 g kuafaj materyali ve 50 ml E3 solüsyonu içeren steril falkon tüpler	38
Resim 3.3: Tüplerin santrifüj cihazına konulması ve santrifüj edilmesi.....	39
Resim 3.4: Tüplerin filtrelenmesi (A), Filtre edildikten sonra tüplerin görüntüsü (B).....	39
Resim 3.5: Pipet ve pipet uçları kullanılarak her bir doz için 2 ml ‘lik Eppendorf tüplerin içerisine materyallerin hazırlanması	40
Resim 3.6: 2 ml eppendorf tüplerde hazırlanan test solüsyonların içerisinde embriyo bulunan hücre kültürü plakalarına konulması.....	41
Resim 3.7: Erkek ve dişi sağlıklı zebra balıkların bulunduğu akvaryumlar	43
Resim 3.8: Erkek ve dişi zebra balıklarının tanklarda bekletilmesi (A), Bariyerin kaldırılması ve balıkların yumurta vermeye başlaması (B)	44
Resim 3.9: Embriyoların stereomikroskop altında incelenmesi	44
Resim 3.10: 6 kuyucuklu hücre kültürü plakalarının materyallere göre hazırlanması ve embriyoların dağıtılması	45
Resim 3.11: Embriyoların stereomikroskop altında incelenmesi ve görüntülerin kaydedilmesi	46
Resim 3.12: 28°C sıcaklığa ayarlanmış inkübatör	47
Resim 3.13: Embriyoların stereomikroskop altında incelenmesi ve görüntülerin kaydedilmesi	48
Resim 3.14: -20°C’de saklanmış 1 ml akridin oranj (Acridine orange C014 10 mg/mL, 1 mL, ABP Biosciences, ABD)	49
Resim 3.15: Akridin oranj boyası konulmuş hücre kültürü plakaları	50
Resim 3.16: Boyama sonrası kullanılan floresan mikroskop.....	51

Resim 3.17: Whole- mount immün boyama sonrası kullanılan lazerli konfokal mikroskop	53
Resim 4.1: Kontrol grubunda bulunan embriyoların zamana göre görüntüleri; 0. saat (A), 24. saat (B), 48. saat (C), 72. saat (D), 96. saat (E), 120. saat (F).....	55
Resim 4.2: Oxford ActiveCal PC materyali uygulanan embriyoların 24. saatte farklı dozlara göre görüntüleri; X dozu (A), X/2 dozu (B), X/4 dozu (C), X/8 dozu (D), X/16 dozu (E), X/32 dozu (F).....	57
Resim 4.3: Oxford ActiveCal PC materyali uygulanan embriyoların 48. saatte farklı dozlara göre görüntüleri; X/2 dozu (A), X/4 dozu (B), X/8 dozu (C), X/16 dozu (D), X/32 dozu (E)	58
Resim 4.4: Oxford ActiveCal PC materyali uygulanan embriyoların 72. saatte farklı dozlara göre görüntüleri; X/2 dozu (A), X/4 dozu (B), X/8 dozu (C), X/16 dozu (D), X/32 dozu (E)	59
Resim 4.5: Oxford ActiveCal PC materyali uygulanan embriyoların 96. saatte farklı dozlara göre görüntüleri; X/2 dozu (A), X/4 dozu (B), X/8 dozu (C), X/16 dozu (D), X/32 dozu (E)	60
Resim 4.6: Oxford ActiveCal PC materyali uygulanan embriyoların 120. saatte farklı dozlara göre görüntüleri; X/2 dozu (A), X/4 dozu (B), X/8 dozu (C), X/16 dozu (D), X/32 dozu (E)	61
Resim 4.7: Biodentine materyali uygulanan embriyoların 24. saatte farklı dozlara göre görüntüleri; X dozu (A), X/2 dozu (B), X/4 dozu (C), X/8 dozu (D), X/16 dozu (E), X/32 dozu (F).....	62
Resim 4.8: Biodentine materyali uygulanan embriyoların 48. saatte farklı dozlara göre görüntüleri; X/8 dozu (A), X/16 dozu (B), X/32 dozu (C)	63
Resim 4.9: Biodentine materyali uygulanan embriyoların 72. saatte farklı dozlara göre görüntüleri; X/8 dozu (A), X/16 dozu (B), X/32 dozu (C)	63
Resim 4.10: Biodentine materyali uygulanan embriyoların 96. saatte farklı dozlara göre görüntüleri; X/16 dozu (A), X/32 dozu (B)	64
Resim 4.11: Biodentine materyali uygulanan embriyoların 120. saatte farklı dozlara göre görüntüleri; X/16 dozu (A), X/32 dozu (B)	64

Resim 4.12: Harvard BioCal- CAP materyali uygulanan embriyoların 24. saatte farklı dozlara göre görüntüleri; X dozu (A), X/2 dozu (B), X/4 dozu (C), X/8 dozu (D), X/16 dozu (E), X/32 dozu (F).....	66
Resim 4.13: Harvard BioCal- CAP materyali uygulanan embriyoların 48. saatte farklı dozlara göre görüntüleri; X/2 dozu (A), X/4 dozu (B), X/8 dozu (C), X/16 dozu (D), X/32 dozu (E)	67
Resim 4.14: Harvard BioCal- CAP materyali uygulanan embriyoların 72. saatte farklı dozlara göre görüntüleri; X/2 dozu (A), X/4 dozu (B), X/8 dozu (C), X/16 dozu (D), X/32 dozu (E)	68
Resim 4.15: Harvard BioCal- CAP materyali uygulanan embriyoların 96. saatte farklı dozlara göre görüntüleri; X/2 dozu (A), X/4 dozu (B), X/8 dozu (C), X/16 dozu (D), X/32 dozu (E)	69
Resim 4.16: Harvard BioCal- CAP materyali uygulanan embriyoların 120. saatte farklı dozlara göre görüntüleri; X/2 dozu (A), X/4 dozu (B), X/8 dozu (C), X/16 dozu (D), X/32 dozu (E)	70
Resim 4.17: MTA Angelus materyali uygulanan embriyoların 24. saatte farklı dozlara göre görüntüleri; X dozu (A), X/2 dozu (B), X/4 dozu (C), X/8 dozu (D), X/16 dozu (E), X/32 dozu (F).....	71
Resim 4.18: MTA Angelus materyali uygulanan embriyoların 48. saatte farklı dozlara göre görüntüleri; X/8 dozu (A), X/16 dozu (B), X/32 dozu (C)	72
Resim 4.19: MTA Angelus materyali uygulanan embriyoların 72. saatte farklı dozlara göre görüntüleri; X/8 dozu (A), X/16 dozu (B), X/32 dozu (C)	72
Resim 4.20: MTA Angelus materyali uygulanan embriyoların 96. saatte farklı dozlara göre görüntüleri; X/8 dozu (A), X/16 dozu (B), X/32 dozu (C)	73
Resim 4.21: MTA Angelus materyali uygulanan embriyoların 120. saatte farklı dozlara göre görüntüleri; X/8 dozu (A), X/16 dozu (B), X/32 dozu (C)	73
Resim 4.22: Kontrol grubu (A), Malformasyon gösteren canlı embriyo örnekleri (B), (C), (D); OE: omurga eğriliği, KÖ: karın ödemi, KD: kuyruk deformasyonu, YKÖ: yolk kesesi ödemi, PKÖ: perikardiyal ödem, KA: kafa anomalisi, GA: göz anomalisi, BK: boy kısalığı.	81

Resim 4.23: 72. saatte ciddi malformasyon gösteren embriyo örnekleri; Oxford ActiveCal PC X/8 deney grubunda bulunan ve ciddi malformasyon gösteren bir zebra balığı embriyosu (A), Biodentine X/8 deney grubunda bulunan ve ciddi malformasyon gösteren bir zebra balığı embriyosu (B), Harvard BioCal- CAP X/8 deney grubunda bulunan ve ciddi malformasyon gösteren bir zebra balığı embriyosu (C), MTA Angelus X/8 deney grubunda bulunan ve ciddi malformasyon gösteren bir zebra balığı embriyosu (D)	82
Resim 4.24: Kontrol grubu ve Oxford ActiveCal PC materyali uygulanan embriyoların farklı dozlara göre floresan mikroskop görüntüleri; Kontrol grubu (A), X/4 dozu (B), X/8 dozu (C), X/16 dozu (D), X/32 dozu (E)	83
Resim 4.25: Kontrol grubu ve Biodentin materyali uygulanan embriyoların farklı dozlara göre floresan mikroskop görüntüleri; Kontrol grubu (A), X/32 dozu (B)	85
Resim 4.26: Kontrol grubu ve Harvard BioCal-CAP materyali uygulanan embriyoların farklı dozlara göre floresan mikroskop görüntüleri; Kontrol grubu (A), X/2 dozu (B), X/4 dozu (C), X/8 dozu (D), X/16 dozu (E), X/32 dozu (F)	86
Resim 4.27: Kontrol grubu ve MTA Angelus materyali uygulanan embriyoların farklı dozlara göre floresan mikroskop görüntüleri; Kontrol grubu (A), X/8 dozu (B), X/16 dozu (C), X/32 dozu (D)	87
Resim 4.28: Kontrol grubu, Harvard BioCal-CAP ve MTA Angelus materyaline maruz kalan zebra balığı embriyolarının Cleaved Caspase- 3 ve Cleaved Caspase- 3+ DAPI uygulaması sonrası lazerli konfokal mikroskop görüntüleri; Cleaved Caspase- 3 kontrol grubu (A), Cleaved Caspase- 3 Harvard BioCal-CAP X/8 grubu (B), Cleaved Caspase- 3 MTA Angelus X/8 grubu (C), Cleaved Caspase- 3+ DAPI kontrol grubu (D), Cleaved Caspase- 3 + DAPI Harvard BioCal-CAP X/8 grubu (E), Cleaved Caspase- 3 + DAPI MTA Angelus X/8 grubu (F)	89

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 3.1: Altı kuyulu hücre kültürü plaklarının test solüsyonlarına göre işaretlenmesi	41
Şekil 3.2: Zebra balığı larvalarından alınan kesitlerin şematik görseli	53
Şekil 4.1: Farklı dozlarda Oxford ActiveCal PC materyali uygulanan embriyoların sağ kalım oranlarının belirli zamanlarda kontrol grubu ile karşılaştırmalı analizi	56
Şekil 4.2: Farklı dozlarda Biodentine materyali uygulanan embriyoların sağ kalım oranlarının belirli zamanlarda kontrol grubu ile karşılaştırmalı analizi	61
Şekil 4.3: Farklı dozlarda Harvard BioCal- CAP materyali uygulanan embriyoların sağ kalım oranlarının belirli zamanlarda kontrol grubu ile karşılaştırmalı analizi	65
Şekil 4.4: Farklı dozlarda MTA Angelus materyali uygulanan embriyoların sağ kalım oranlarının belirli zamanlarda kontrol grubu ile karşılaştırmalı analizi	70
Şekil 4.5: Farklı dozlarda Oxford ActiveCal PC materyali uygulanan embriyoların koryondan çıkış oranlarının belirli zamanlarda kontrol grubu ile karşılaştırmalı analizi....	74
Şekil 4.6: Farklı dozlarda Biodentine materyali uygulanan embriyoların koryondan çıkış oranlarının belirli zamanlarda kontrol grubu ile karşılaştırmalı analizi	76
Şekil 4.7: Farklı dozlarda Harvard BioCal- CAP materyali uygulanan embriyoların koryondan çıkış oranlarının belirli zamanlarda kontrol grubu ile karşılaştırmalı analizi....	77
Şekil 4.8: Farklı dozlarda MTA Angelus materyali uygulanan embriyoların koryondan çıkış oranlarının belirli zamanlarda kontrol grubu ile karşılaştırmalı analizi	79
Şekil 4.9: Oxford ActiveCal PC materyali uygulanan embriyolarda apoptozun floresan yoğunluğu ile belirlenmesi	84
Şekil 4.10: Biodentine materyali uygulanan embriyolarda apoptozun floresan yoğunluğu ile belirlenmesi.....	85
Şekil 4.11: Harvard BioCal-CAP materyali uygulanan embriyolarda apoptozun floresan yoğunluğu ile belirlenmesi	86
Şekil 4.12: MTA Angelus materyali uygulanan embriyolarda apoptozun floresan yoğunluğu ile belirlenmesi.....	88
Şekil 4.13: Harvard BioCal-CAP ve MTA Angelus materyali uygulanan embriyolarda apoptozun Cleaved Caspase-3 yöntemi ile ölçülen floresan yoğunluğu ile belirlenmesi....	90

SİMGELER VE KISALTMALAR

ADM	: Adrenomedüllin
AO	: Akridin Oranj
Bis- GMA	: Bisfenolglisidil Metakrilat
BMP	: Kemik Morfojenik Protein
BSA	: Sığır Serum Albümini
Ca	: Kalsiyum
CaCl₂	: Kalsiyum Klorür
CIS	: Cam Iyonomer Siman
DAPI	: 4',6-diamidino-2-phenylindole
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
dsDNA	: Çift Sarmallı Deoksiribo Nükleik Asit
<i>E. faecalis</i>	: <i>Enterococcus faecalis</i>
GS	: Keçi Serum
IGF	: İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü
KCl	: Potasyum Klorür
MetOH	: Metanolde %40 Tetrabütilamonyum Hidroksit
MgSO₄	: Magnezyum Sülfat
MTA	: Mineral Trioksit Aggregat
NaCl	: Sodyum Klorür
NIH	: Ulusal Sağlık Enstitüleri
OH	: Hidroksil
<i>P. gingivalis</i>	: <i>Porphyromonas gingivalis</i>
PBS	: Fosfat Tamponlu Salin
PFA	: Paraformaldehit

rcf	: Göreceli Santrifüj Kuvveti
RM CIS	: Rezin ile Modifiye Edilmiş Cam İyonomer Siman
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
RRM	: Kök Onarım Malzemesi
<i>S. mutans</i>	: <i>Streptococcus mutans</i>
TGF β	: Dönüştürücü Büyüme Faktörü Beta
VAST	: Omurgalı Otomatik Tarama Teknolojisi
VEGF	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
VPT	: Vital Pulpa Tedavisi
ZOE	: Çinko Oksit Ojenol

FARKLI PULPA KUAF AJ MATERYALLERİNİN TOKSİK ETKİLERİNİN MORFOLOJİK VE MOLEKÜLER YÖNTEMLER KULLANILARAK ZEBRA BALIĞI (*DANIO RERIO*) ÜZERİNDE BELİRLENMESİ

ÖZET

Amaç: Bu çalışmanın amacı, pulpa kuafaj tedavisinde kullanılan MTA Angelus (Angelus, Brezilya), Biodentine (Septodont, Fransa), Oxford ActiveCal PC (Oxford Scientific, Elmshorn, Almanya) ve Harvard BioCal-CAP (Harvard Dental International GmbH, Almanya) materyallerinin in vivo zebra balığı modeli üzerinde sitotoksik etkilerini ve biyouyumluluklarını incelemektir.

Gereç ve Yöntem: Zebra balığı embriyoları, farklı dozlarda seyreltilmiş kuafaj materyallerine maruz bırakılmıştır. 24, 48, 72, 96 ve 120. saatlerde tüm deney grupları stereomikroskop altında değerlendirilerek sağ kalım ve koryondan çıkış oranları kaydedilmiştir. Apoptoz belirlenmesi için akrinin oran ve Cleaved Caspase-3 yöntemleri kullanılmıştır. Floresan ve konfokal mikroskop görüntülemeleri yapılarak GraphPad Prism 8.0.2. (GraphPad Prism, San Diego, CA) programı ile analiz edilmiştir. Bulgularının karşılaştırılmalı analizi için İki Yönlü Anova analizi kullanılmıştır.

Bulgular: 120. saatte sağ kalım oranları değerlendirildiğinde MTA Angelus ve Biodentine'in sadece düşük dozlarında sağ kalım oranının yüksek olduğu görülmüştür. Bununla birlikte Oxford ActiveCal PC ve Harvard BioCal-CAP'in yüksek dozlarında sağ kalım oranları kontrol grubu ile benzer bulunmuştur. Koryondan çıkış sonuçları incelendiğinde tüm materyallerin yüksek dozlarında gecikme olduğu belirlenmiş, düşük dozlarda ise kontrol grubu ile benzerlik gösterdiği saptanmıştır. Akrinin oran ile yapılan apoptoz analizinde Oxford ActiveCal PC ve MTA Angelus'un tüm dozlarının apoptozu indüklediği görülmüş Harvard BioCal-CAP ve Biodentine'in ise en düşük dozlarında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunamamıştır. Cleaved Caspase-3 yöntemi ile bu apoptoz sonuçları doğrulanmıştır.

Sonuç: Tüm materyallerin artan dozlarında zebra balığı embriyoları üzerinde toksik etkili olduğu ve embriyoların koryondan çıkışını geciktirdiği gözlenmiştir. Apopitoz sonuçları göz önünde bulundurulduğunda rezin ile modifiye edilmiş kalsiyum silikat esaslı materyaller (Oxford ActiveCal PC ve Harvard BioCal-CAP) geleneksel kalsiyum silikatlara (MTA Angelus ve Biodentine) kıyasla daha biyoyumlu bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: Biyoyumluluk, n Vivo, Pulpa Kuafajı, Toksisite, Zebra Balığı.



INVESTIGATION OF TOXIC EFFECTS OF DIFFERENT PULP CAPPING MATERIALS ON ZEBRAFISH (*DANIO RERIO*) USING MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR METHODS

ABSTRACT

Aim: This study aimed to investigate the cytotoxic effects and biocompatibility of MTA Angelus (Angelus, Brazil), Biodentine (Septodont, France), Oxford ActiveCal PC (Oxford Scientific, Elmshorn, Germany) and Harvard BioCal-CAP (Harvard Dental International GmbH, Germany) used in pulp capping treatment on the in vivo zebrafish model.

Materials and Methods: The zebrafish embryos were exposed to various dilutions of pulp capping materials. Survival and hatching rates were recorded by evaluating all experimental groups under a stereomicroscope at 24, 48, 72, 96, and 120 hours. Acridine orange and Cleaved Caspase-3 methods were employed to determine apoptosis. Fluorescent and confocal microscopy images were captured and analyzed using GraphPad Prism 8.0.2 software (GraphPad Prism, San Diego, CA). Two-way ANOVA analysis was utilized for comparative analysis of the findings.

Results: At the assessment of survival rates at 120 hours, MTA Angelus and Biodentine exhibited high survival rates only at low doses. Oxford ActiveCal PC and Harvard BioCal-CAP demonstrated survival rates similar to the control group even at high doses. Hatching results revealed a delay at high doses for all materials, while at low doses, a resemblance to the control group was observed. In the analysis of apoptosis using acridine orange, Oxford ActiveCal PC and MTA Angelus induced apoptosis at all doses, while Harvard BioCal-CAP and Biodentine did not show statistically significant differences at their lowest doses. These apoptosis results were confirmed using the Cleaved Caspase-3 method.

Conclusion: Zebrafish embryos are adversely affected by increasing doses of all materials, causing toxicity and delaying the hatching of embryos. In consideration of the apoptosis results, resin-modified calcium silicate materials, Oxford ActiveCal PC and Harvard BioCal-CAP, have been found to be more biocompatible compared to traditional calcium silicates such as MTA Angelus and Biodentine.

Key Words: Biocompatibility, In Vivo, Pulp Capping, Toxicity, Zebrafish.



1. GİRİŞ VE AMAÇ

Vital pulpa tedavisi (VPT), pulpaya yaklaşan veya pulpayı içeren derin çürük lezyonlarında, travma ya da mekanik nedenlerle pulpa dokusunun ekspozu durumunda dişlerin bütünlüğünü, sağlığını ve pulpal canlılığı korumak için uygulanan farklı tedavi stratejilerine verilen genel addır (1). VPT apeksogenezin devamı için immatür daimî dişlerin tedavisinde temel olarak direkt ve indirekt pulpa kuafajı, parsiyel ve tam pulpotomi gibi pulpotomi prosedürlerini içermektedir (2). VPT yöntemlerinden biri olan direkt/indirekt pulpa kuafajının temel amacı pulpa dokusunun bütünlüğünü korumaktır. İdeal bir direkt/indirekt pulpa kuafaj materyali nekroza yol açabilecek inflamatuvar pulpal yanıtı neden olmamalı ve uygulandığı bölgede reperatif dentin oluşumunu sağlamalıdır (3).

Bu amaçla indirekt ve direkt pulpa kuafajında kullanılan birçok materyal mevcuttur. Bunlarda biri uzun yıllardır altın standart olarak kabul edilen kalsiyum hidroksittir. Bu materyal çok iyi antibakteriyel özelliğe sahiptir ve pulpal iyileşmeyi sağlamaktadır. Çinko oksit öjenol, cam iyonomer siman, adeziv rezinler, trikalsiyum ve dikalsiyum silikatlar gibi diğer kuafaj materyallerinin de pulpanın iyileşmesini hızlandırdığı bilinmektedir (4). Trikalsiyum ve dikalsiyum silikatların kalsiyum hidroksit ile karşılaştırıldığında daimi dişlerin çürük ile ekspoz olmuş pulpalarında güvenilir ve uzun vadeli sonuçlar gösterdiği bildirilmiştir (5–7). Bu materyaller, ekspoz olmuş pulpanın üzerine uygulandığında bakteriyel mikrosızıntıyı önleme (8,9), Ca ve OH iyon salınımı, yüksek alkalinite, apatit oluşumunun uyarılması, biyoyumluluk ve bakterisidal etki gibi birçok özelliğe sahiptir (10,11). Ca ve OH iyonlarının salınımı sayesinde hücre farklılaşması ve çoğalması, yara iyileşmesi, doku onarımını ve sert doku mineralizasyonu (dentin köprüsü oluşumu) gerçekleşmektedir (7,12).

Geçmişten günümüze dental pulpa ile doğrudan temas halinde olmayan rezin bazlı materyaller dental restorasyonlarda başarıyla kullanılmaktadır (13). Resin ile modifiye edilmiş kalsiyum hidroksit ve kalsiyum silikatlar; daha yüksek mekanik dayanıma, daha iyi ve daha kolay kullanıma, daha hassas yerleştirilme ve anında ışıkla sertleştirilebilme özelliğine sahiptir. Bu avantajların yanı sıra dental restoratif materyallerin polimerizasyonu sonrasında oluşan artık monomerlerin sitotoksik etki gösterdiği bilinmektedir (14).

Bu nedenle, pulpa ile doğrudan temas halinde olan kalsiyum silikatların ve rezin ile modifiye edilmiş kalsiyum silikatların sitotoksiteleri ve biyouyumluluklarının araştırılması önem kazanmaktadır (13).

Son dönemde yapılan çalışmalarda, vital pulpa tedavilerinin önemi vurgulanmaktadır. Bu tedavilerin başarısı, pulpa üzerine uygulanacak materyallerle doğrudan ilişkilidir. Bu amaç doğrultusunda yeni materyaller geliştirilmektedir. Ancak özellikle rezin ile modifiye edilmiş kalsiyum silikatlar başta olmak üzere bu alanda yapılacak bilimsel çalışmalara ihtiyaç olduğu görülmektedir. Bu doktora tez çalışması, literatürdeki bu boşluğu doldurmayı hedeflemektedir.

ISO standartları, diş hekimliğinde kullanılan materyallerin biyouyumluluğu ile ilgili bölümler içermektedir. Bu standartlara göre dentin ve pulpa ile doğrudan temas halinde olan dental materyallerin biyouyumluluğunun değerlendirilmesi amacıyla maymunlar, köpekler veya gelincikler gibi memelilerin veya özel amaçlar için diğer türlerin kullanılabileceği belirtilmektedir (4). Günümüzde sitotoksite çalışmalarında, genetik ve fizyolojik olarak insan ile benzerlik göstermesi nedeni zebra balığı tercih edilmeye başlamıştır. Özellikle dental materyallerin zebra balığı ve insan üzerindeki etkileri birbirleriyle ilişkilendirilebilmektedir (15,16). Özetle, insanlar ve zebra balığı arasındaki hücresel, yapısal ve biyokimyasal benzerliklerin, kimyasal ve diğer maddelerin insan toplulukları üzerindeki olası etkilerin hızlı bir şekilde tahmin edilmesini sağlayacağı belirtilmektedir. Gelecekte zebra balığı kullanılarak yapılan araştırmaların birçok avantajı nedeni ile sayısının artacağı düşünülmektedir (17).

Bu doktora tez çalışmasının amacı, direkt ve indirekt pulpa kuafaj materyali olarak kullanılan geleneksel (MTA Angelus (Angelus, Brezilya), (Biodentine (Septodont, Fransa)) kalsiyum silikatların piyasaya yeni sürülen rezin ile modifiye edilmiş kalsiyum silikat materyallerinin [(Oxford ActiveCal PC (Oxford Scientific, Elmshorn, Almanya), Harvard BioCal-CAP (Harvard Dental International GmbH, Almanya)] sitotoksik etkilerini ve biyouyumluluklarını karşılaştırılarak incelemektir. Bu tez çalışmasında, birçok bilim dalının çalışmalarında sıklıkla kullanılmasına karşın diş hekimliği çalışmalarında kullanımı yaygınlaşmamış bir model organizma olan in vivo zebra balığı modeli kullanılmıştır. Bu tez çalışması ile diş hekimliğinde sitotoksite çalışmalarına yeni bir bakış açısı getirilerek in vivo çalışmaların kalite ve kantitesinin artırılması hedeflenmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. VİTAL PULPA TEDAVİLERİ

Pulpa, dentin duvarları içinde yer alan, vasküler bir yapıya ve innervasyona sahip bir dokudur. Pulpa, içerisinde bulunan büyüme faktörleri, sitokinler ve odontoblastlar sayesinde dış uyaranlara yanıt verebilmekte, diş dokularının beslenmesini ve mineralizasyonunu sağlamakta, nöronal duyarlılığı iyileştirebilmektedir (18). Dentin ise pulpa içinde bulunan odontoblastlar tarafından üretilen hayati ve hücrel bir dokudur. Bu nedenle dentin ve pulpa bir kompleks olarak birlikte düşünülmelidir (19).

Dentin-pulpa kompleksi, mikroorganizmaların ve mikrobiyal ürünlerin difüzyonunu azaltmak için birkaç savunma mekanizması geliştirmektedir. Bu mekanizmalar, dentin tübüllerinin sklerozunu ve tersiyer dentinin oluşumunu içerir (20). Çürük lezyonunun ilerlemesi sırasında dentin demineralize olurken dentin-pulpa kompleksinden ise TGF β , ADM ve IGF-1/-2 dahil olmak üzere bir dizi büyüme faktörü salınır (21–24). Bu büyüme faktörleri, pulpa onarımı ve rejenerasyonunda yer alan süreçleri hızlandırarak pulpal yanıt üzerinde olumlu bir etkiye sahip olabilmektedir (25,26). Devam eden araştırmalar, dentinde bulunan farklı büyüme faktörlerinin etkisini göstermektedir (27). Dentin-pulpa kompleksi, geri dönüşümsüz pulpitis semptomları gösteren dişlerde de rejeneratif potansiyel göstermektedir. Bu yüzden pulpitis sınıflandırmasının gözden geçirilmesi gerektiği düşünülmektedir (28). Çürüğün ilerlemesi sırasında pulpada inflamasyon meydana gelmeden önce odontoblastlarda dejeneratif değişiklikler meydana gelir (29). Bu değişiklikler, çürüğe temas eden hücrelerin alttaki hücreden zengin tabakada bulunan odontoprogenitör hücrelerle yer değiştirmesine yol açabilir. Bu mezenkimal hücrelerin odontoblast benzeri hücrelere farklılaşması, çürük lezyonun genişliğine bağlı olarak reperatif dentin üretimini sağlamaktadır (30).

Çürükle enfekte olmuş dentin ve pulpada gerçekleşen biyolojik iyileşme süreçleri göz önüne alınarak vital pulpa tedavisine ilişkin yeni bir anlayış ortaya çıkmıştır (31). Vital pulpa tedavisi (VPT); derin dentin çürüğü, travma, restoratif prosedürler veya iatrojenik sebeplerden etkilenen pulpa dokusunu korumayı ve vitaliteyi sürdürmeyi amaçlayan bir tedavi yöntemi olarak tanımlanmaktadır (32).

Bu tedavi yöntemi özellikle apikal kök gelişimi tamamlanmamış genç erişkin dişlerde önemlidir. Pulpa dokusunun iyileşme kapasitesinin, yaşlı hastalara kıyasla yüksek olması nedeniyle VPT'nin sadece genç hastalarda yapılması önerilmiştir (32,33). Ancak hasta yaşının yanında kök apeksinin durumunun da VPT'nin sonucu üzerinde etkisi olduğu düşünülmektedir. Bu tedavinin mikrobiyal kontaminasyon engellenebilirse pulpa dokusunun doğuştan gelen onarım kapasitesi sayesinde yaşlı hastalarda da başarılı bir şekilde uygulanarak pulpa dokusunun korunabileceği söylenmektedir (34).

VPT üzerine yapılan son klinik araştırmalar, yeni tedavi protokolleri geliştirmek için seçenekler sunmaktadır (27,34,35). Bu tür tedavi yöntemlerinin iki önemli avantajı vardır: birincisi, pulpa dokusu ve dolayısıyla fizyolojik ve savunma fonksiyonlarının devamının sağlanması; ikincisi, diş dokusu bütünlüğünün korunmasıdır. Aynı zamanda kısmen etkilenmiş pulpadan gelen biyolojik bir bağışıklık tepkisi, apikal bölgenin enfeksiyonunu önleyerek iyileşmeyi sağlayabilir (34). Vital pulpa tedavilerinin sonuçlarının geleneksel kök kanal tedavisiyle karşılaştırılabilir olduğu gösterilmiştir (36).

VPT'nin başarısını etkileyen birçok faktör mevcuttur. Pulpa canlılığının sürdürülmesi için yeterli kan akımının varlığı önemlidir (30). Bunun yanı sıra, VPT'nin başarısı için sağlıklı bir periodonsiyum gereklidir. Orta ve şiddetli periodontal hastalığı olan dişler tedavi için uygun bulunmamaktadır (37). Aynı zamanda, ideal bir koronal sızdırmazlığın sağlanabildiği dişlere VPT uygulanması önerilmektedir. VPT'nin prognozu, koronal sızdırmazlığın yetersiz olduğu ve bunu takiben bakteriyel mikrosızıntı olan vakalarda önemli ölçüde azalmaktadır (38). VPT'de en önemli konulardan biri de pulpa dokusunun durumudur. Duyarlılık ve ağrı testi gibi klinik belirti ve semptomlar pulpa durumunu tam olarak yansıtmamaktadır (39,40). Klinik semptomlar değerlendirilerek yapılan vital pulpa tedavilerinin oldukça başarılı olduğu gösterilmiştir (41–43). Pulpadaki kanamanın derecesi inflamatuvar durumun iyi bir göstergesi olabilir (41). Durdurulması zor olan ve artan kanama, enflamatuvar yanıtın pulpa dokusuna yayıldığını ve tedavi prosedürünün, direkt pulpa kuafajından parsiyel pulpotomiye değiştirilmesi gerektiğini düşündürmelidir (32).

Özetle, tedavi öncesi ve sırasında karşılaşılan klinik bulgularla birlikte, potansiyel olarak pulpa ve diş dokusunu korumak için vital tedaviler tercih edilebilir. Pulpa biyolojisi ve pulpanın dentine bağlı biyoaktif büyüme faktörlerinin salınmasına tepkisi konusundaki gelişmeler, pulpanın önemli rejeneratif yeteneğe sahip olduğunu ve inflamasyonun pulpanın iyileşme tepkisinin normal bir parçası olduğunu açıkça ortaya koymaktadır (44).

2.1.1 İndirekt Pulpa Kuafajı

İndirekt pulpa kuafajı, pulpanın ekspozunu önlemek için pulpaya yakın etkilenmiş dentine biyouyumlu bir materyalin uygulandığı prosedür olarak tanımlanır (2). Bu tedavi yönteminin amacı primer odontoblastları korumak ve pulpa-dentin birleşiminde reaksiyoner dentini oluşumunu desteklemektir (45,46). Ancak dentin-pulpa kompleksindeki çürüğün yayılımına bağlı olarak bazı primer odontoblastlar yıkıma uğrayabilir ve reaksiyoner dentin ile reperatif dentin oluşur (46). Biyoaktif kuafaj materyalleri odontoblastları reaksiyoner ve reperatif dentin oluşturmaları için uyararak mevcut dentinin remineralizasyonunu desteklemekte ve dentin-pulpa kompleksini korumaktadır (47).

Derin dentin çürüklerinde dişteki çürüğün tamamen uzaklaştırılması veya çürüğün bir kısmının bırakılarak pulpa ekspozunun önlenmesi şeklinde iki seçenek mevcuttur (47). Yapılan bir çalışmada, hekimlerin sadece %17'si pulpa ekspozunu önlemek için kalan çürüğü yerinde bırakacaklarını ve diş restore edeceklerini bildirmiştir (48,49). Bununla birlikte, indirekt pulpa kuafajının başarısı tartışmalıdır. Yapılan birkaç çalışma, çürüğün kısmen veya tamamen temizlendiği ve restorasyonun tamamlandığı dişleri karşılaştırmıştır. Her iki gruptaki dişlerin de eşit başarıya sahip olduğu gösterilmiştir (50–52).

Ek olarak, parsiyel çürük temizleme, pulpanın ekspoz olma olasılığını önemli ölçüde azaltır (53,54). Yakın tarihli bir sistematik incelemenin sonuçlarına göre, pulpanın ekspoz olma riskini azaltmanın yanı sıra postoperatif pulpa semptomlarını da azalttığı bildirilmektedir (55). Ancak kavitede bırakılabilecek dentin miktarı tartışmalı olduğundan iyi bir marjinal adezyon elde edebilmek için periferdeki çürük dentini tamamen uzaklaştırmak ve pulpaya yakın alandaki çürükleri de olabildiğince uzaklaştırmak gerekmektedir (56).

Parsiyel çürük temizleme, derin çürüklü dişlerde tamamen çürüğün temizlenmesi ile karşılaştırıldığında, pulpa ekspoz riskini %98 oranında azaltmaktadır. Çürüğün parsiyel olarak uzaklaştırılmasının belirti, semptom, pulpitis oluşumu veya restorasyonun uzun ömürlülüğü açısından herhangi bir dezavantajının bulunmadığı; sızdırmaz bir restorasyon varlığında başarı için çürüğün tamamen temizlenmesinin gerekli olmadığı bildirilmektedir (57,58).

Geleneksel olarak, kalsiyum hidroksit, alkali pH'ı ve pulpa-dentin remineralizasyonunu indükleyen biyoyumlu özellikleri nedeniyle indirekt pulpa kuafajında tercih edilmektedir. Bununla birlikte, uzun süreli çözünürlüğü ve dentine adezyonu ile ilgili endişeler sebebiyle rezin modifiye cam iyonomer simanlar gibi bazı adeziv materyaller de önerilmiştir (59).

Mickenausch ve arkadaşları, sistemik bir derlemede, derin kavitelere kalsiyum hidroksit ve rezin modifiye cam iyonomer simanın pulpa üzerindeki etkisini değerlendirmiş ve iki materyal arasında önemli bir fark bulamamışlardır (60). Ayrıca Hayashi ve arkadaşları, tannin-florür preparatı ile birleştirilmiş antimikrobiyaller ve polikarboksilat siman gibi diğer materyallerin kaide olarak kullanılabileceğini, bu materyallerin karyojenik bakterileri azaltabildiğini ve remineralizasyonu kalsiyum hidroksit kadar etkili bir şekilde teşvik edebildiğini bildirmiştir (56).

2.1.2 Direkt Pulpa Kuafajı

Çürük, travma, mekanik nedenler veya dişin preparasyonu sırasında pulpa ekspoz olabilmektedir. Doğrudan açığa çıkan pulpa dokusunun üzerine biyoyumlu bir materyalin yerleştirildiği direkt pulpa kuafajı, pulpa iyileşmesini desteklemekte ve onarıcı dentin oluşumunu sağlamaktadır. Başarılı bir direkt pulpa kuafajı daha invaziv, kapsamlı ve pahalı tedavi ihtiyacını ortadan kaldırmaktadır. Direkt pulpa kuafajının başarısını etkileyen birçok faktör bulunmaktadır (47).

Pulpanın ekspoz olduğu bölgede primer odontoblastlar zarar görerek enflamasyon başlamaktadır. Bu nedenle, reperatif dentini üretmek için altta bulunan enfekte olmamış vital pulpada progenitör/kök hücrelerin toplanması ve farklılaşması gerekmektedir (46).

Dentin matrisinden salınan dönüştürücü büyüme faktörleri (TGF) ve hücre dışı matris molekülleri gibi büyüme faktörleri, progenitör/kök hücrelerin odontoblast benzeri hücrelere farklılaşmasını sağlayabilmektedir. Ayrıca, kalsiyum hidroksit ve MTA gibi pulpa kuafaj materyalleri dentin matrisinden büyüme faktörlerinin salınmasını sağlayarak reperatif dentin oluşumunu indüklemektedir (61).

Direkt pulpa kuafajının yalnızca yakın zamanda mekanik veya travmatik olarak pulpası ekspoz olan dişlerde yapılması önerilmiştir (62). Yapılan bir araştırmada, ekspoz pulpaya sahip daimî dişlere uygulanan vital pulpa tedavileri gözden geçirilmiştir(34). Direkt pulpa kuafajının başarı oranı, takip süresine bağlı olarak %87,5 ila %95,4 olarak bulunmuştur. Literatürde iatrojenik pulpa ekspozu sonrası uygulanan tedavi sonuçlarıyla ilgili bildirilen değerler %70 ila %98 arasında değişmektedir. Bu durumda ikisi arasında fark görülmemektedir (63).

Direkt pulpa kuafajında mikroorganizmaların önemli rol aldığı bilinmektedir. Kalan bakterilerden kaynaklanan enfeksiyonlar veya dolgu marjinde meydana gelen sızıntı sebebiyle tedavi başarısız olabilir. Bu nedenle, rubber dam ve aseptik tedavinin yanı sıra iyi bir restorasyon ile kavite hemen restore edilmelidir (62–64).

Bazı çalışmalar, çürük nedeniyle pulpanın ekspoz olduğu durumlarda direkt pulpa kuafajının başarısının daha düşük olduğunu göstermiştir (62,65). Çürüğün pulpaya penetrasyonu bakteriyel invazyona yol açarak pulpal inflamasyona neden olur. Bu durumda, önceden var olan enflamasyonun mevcut olmadığı mekanik bir maruziyete kıyasla pulpal yanıt ve iyileşme daha az olmaktadır (66–69). Aynı zamanda asemptomatik olan ve hiçbir klinik veya radyolojik patoloji belirtisi göstermeyen dişler direkt pulpa kuafajına daha olumlu bir yanıt vermektedir (65). Pulpa kuafajı sırasında kalıcı restorasyonun iyi ve sızdırmaz bir şekilde yerleştirilmesi klinik başarı için çok önemlidir (54,57,64,65,70–73). Bunun yanında pulpa kuafaj ajanının yerleştirilmesinden önce pulpal kanamanın kontrol altına alınması direkt pulpa kuafajının başarısını etkileyen önemli faktörlerden biridir (37,41,74).

Kanama kontrolü, ekspoz pulpa üzerine bir solüsyona batırılmış pamuk pelet yerleştirilerek yapılmaktadır (75). Aynı zamanda steril bir pamuk peletle mekanik basınç uygulanması gibi çeşitli seçenekler mevcuttur. Buna ek olarak, dezenfeksiyon protokollerine de ana prensip olarak uyulmalıdır (76).

Salin, %0,12 ila %5,25 arasında değişen konsantrasyonlarda sodyum hipoklorit, hidrojen peroksit, ferrik sülfat ve klorheksidin dahil olmak üzere çeşitli solüsyonlar kullanılabilir. Salin veya kalsiyum hidroksit çözeltileri, sitotoksikite testlerinde pulpayla en biyouyumlu bulunan solüsyonlardır (75).

In-vivo çalışmalar, salinin en hafif pulpal yanıt gösterdiğini ve çoğu çalışmada kullanılan solüsyon olduğunu belirtmektedir. Sodyum hipoklorit, artmış pulpal inflamatuvar yanıt göstermekle birlikte antibakteriyel özelliklere sahip olma ve iyi derecede kanama kontrolü sağlama avantajlarına sahiptir (77–81). Ayrıca pıhtıyı ve dentin talaşlarını giderebilen, kavite arayüzünü dezenfekte edebilen ve dentin köprüsü oluşumuna yardımcı olan bir ajan olarak önerilmiştir (82). Birçok çalışmada ve klinik raporlarda da etkin olarak kullanılmıştır (77–81).

Klorheksidin, antibakteriyel bir ajan olmasına rağmen kanama kontrolünde sodyum hipoklorit kadar etkili bulunmamaktadır. Ölçü almak ve doku retraksiyonu için kullanılan diğer hemostatik ajanlar ile ilgili literatür sınırlıdır. Yapılan az sayıda çalışmada, ferrik sülfatın pulpa kanamasını kontrol etmek için daha yaygın olarak kullanılan diğer solüsyonlarla karşılaştırıldığında pulpa yanıtında önemli bir fark olmadığı ancak işlem sonrasında ağrıda önemli ölçüde artış gösterdiği bildirilmiştir (77–81).

Bazı çalışmalarda yaş, cinsiyet, diş, spontan ağrı varlığı, ekspoz alanın büyüklüğü ve kanamanın tedavinin başarı oranı üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir. Bahsedilen faktörlerin başarı oranı üzerinde anlamlı bir etkisi olmadığı bulunmuştur (41).

2.1.3. Pulpotomi

Pulpotomi, sadece etkilenmiş koronal pulpanın çıkarıldığı ve kök pulpasının korunduğu, pulpektomiyi önlemek ve dişin canlılığını devam ettirmek amacıyla uygulanan bir tedavidir (83). Pulpotomi tedavisinde, koronal pulpa çıkarıldıktan sonra dentin köprüsü oluşumunu sağlamak ve kalan kök pulpasının sağlığını korumak için kök kanal ağızlarına kalsiyum hidroksit veya MTA gibi biyouyumlu bir materyal uygulanmaktadır (84,85). Bu tedavi sonucunda oluşan dentin köprüsünün kalsifikasyonu zayıftır ve gözenekli bir yapısı vardır (86,87). Doğru teşhis ve tedavi planı ile uygulanan pulpotomi tedavisi, immatür daimi dişlerde apikal kapanmayı ve kök gelişimini sağlamaktadır (88).

Biyomateryaller ve pulpa biyolojisi ile ilgili son araştırmalar, geri dönüşümsüz pulpitis teşhisi konulmuş ve pulpotomi tedavisi uygulanan daimi dişlerde başarı oranlarının arttığını göstermektedir (35). Yapılan bir sistematik derlemede, pulpotomi başarı oranının daimi dişlerde %90'dan yüksek olduğu bildirilmiştir (34).

Cvek ve arkadaşları, travma veya iatrojenik sebeplerle ekspoz olan maymun pulpalarında inflamatuvar reaksiyonlarının derinliğini inceledikleri bir çalışmada; inflamasyonun, 48. saatte pulpaya doğru 1,5 mm- 2 mm, 168. saatten sonra ise 0,8 mm- 2,2 mm'ye kadar yayıldığını bildirmiştir. Bu nedenle, pulpa üzerine uygulanacak materyalin etkili olabilmesi için, ekspoz yerinin yaklaşık 2 mm altında bulunan pulpa dokusu ile temas halinde olması gerektiği bildirilmiştir (89). 1987 yılında Fuks ve arkadaşlarının farklı tip ve şiddette travmatik yaralanmalara sahip 63 diş pulpotomi uyguladıkları bir çalışmada ise, %94 başarı oranı gösterilmiştir (90).

Başarısı kanıtlanmasına rağmen, pulpotomi, koronal kısımda kaybedilen dentin-pulpa kompleksinin yenilenmesini sağlamamaktadır (83).

2.2. VİTAL PULPA TEDAVİLERİNDE KULLANILAN MATERYALLER

Literatürde pulpa tedavilerinde birçok materyalin kullanımı önerilmiştir. Ancak herhangi bir materyalin diğerine üstünlüğü tartışmalıdır (47).

İdeal pulpa kuafaj materyallerinin sahip olması gereken özellikler şunlardır;

- Reperatif dentin oluşumunu teşvik etmeli
- Pulpa vitalitesini korumalı
- Bakterisidal veya bakteriyostatik olmalı
- Dentin ve diğer restoratif materyallere iyi bir şekilde bağlanmalı
- Final restorasyonun yerleştirilmesi sırasında gösterilen kuvvete ve çiğneme kuvvetlerine dirençli olmalı
- Florür salmalı
- Steril olmalı
- Radyopak olmalı
- Bakteriyel sızdırmazlığı sağlamalı (91).

2.2.1. Çinko Oksit Ojenol (ZOE)

Çinko oksit ojenol (ZOE), sedatif ve palyatif özellikleri nedeniyle pulpal ağrı durumlarında diş hekimliğinde en sık kullanılan materyallerden biridir (92–95). Bakteriyel membran proteinlerine etki eden bir antimikrobiyal materyallerdir (96) ve uzun yıllardır kaide, siman ve geçici restoratif materyal olarak kullanılmaktadır (97–100).

Restoratif prosedürlerde kaide olarak kullanıldığında ısı yalıtımı sağlamaktadır. Ayrıca süt dişlerinde kanal dolum ve periodontal tedavilerde antimikrobiyal yara kapatma materyali olarak kullanılmaktadır. Genellikle derin kaviteye yerleştirildiklerinde hafif bir pulpa tepkisine yol açmaktadır. Direkt ekspoz pulpa üzerine yerleştirildiğinde kalsifik onarımın olmadığı kalıcı bir kronik enflamasyon yaygın olarak rapor edilmiştir (92).

Bununla birlikte, ojenol kronik bir inflamatuvar tepkiye neden olduğundan ve aynı zamanda diş pulpasının savunmasında bağışıklık tepkisini inhibe ettiğinden, direkt pulpa üzerine uygulandığında çeşitli toksik etkiler bildirilmiştir (92–95).

ZOE, sitotoksik konsantrasyonlarda ojenolü serbest bırakmaktadır (100–103). Ojenolün sitotoksitesisi dolayısıyla direkt pulpa kuafajında kullanımı tartışmalıdır (97–99,103). Ojenolün çok düşük konsantrasyonlarının bile insan pulpa fibroblastlarında yüksek toksisiteye neden olduğu bildirilmiştir (104).

ZOE ayrıca yüksek düzeyde arayüzey sızıntısı göstermektedir (105). ZOE'nin ojenol salımına bağlı olarak biyolojik bir örtme kabiliyetine sahip olduğu ve bu nedenle sızıntının önemli olmadığı söylenmektedir. Ancak ojenol salımının zamanla önemli ölçüde düştüğü ve ZOE'nin bakteriler üzerindeki etkinliğinin ağızda kaldığı süre uzadıkça azaldığı tahmin edilmektedir (100).

2.2.2. Adeziv Sistemler

Dentine adezyon sağlayabilen adeziv sistemlerin pulpayı bakteri kontaminasyonundan koruyabileceği düşünülmüştür (106) ve yaklaşık 27 yıl önce direkt pulpa kuafajı ajanı olarak kullanılmak üzere adeziv sistemler önerilmiştir (107). Ancak adeziv sistemlerin tüm bileşenlerinin pulpa hücreleri için sitotoksik olduğu gösterilmiştir (108).

Toksisite, hem çok bileşenli hem de tek bileşenli adeziv sistemlerinde görülmektedir. Adezivlerin içerisindeki çeşitli bileşenlerin toksik etkileri, pulpayla temasının süresi ile orantılı olarak artmaktadır (109). Ayrıca adeziv içerisinde bulunan bileşenlerin polimerize olmadığında polimerize olduğundan daha toksik olduğu bildirilmiştir (108,110).

Ratlar üzerinde yapılan çalışmalarda, adeziv uygulaması ile pulpa iyileşmesi bildirilmiştir ve pulpa kuafajında adezivlerin kullanılmasına olan ilgi artmıştır (111–113). Köpekler üzerinde yapılan bazı çalışmalarda ise kalsiyum hidroksit ile karşılaştırıldığında adezivlerle pulpa kuafajının daha düşük iyileşme gösterdiği bildirilmiştir (114,115). Primatlar üzerinde yapılan birkaç çalışmada pulpanın mekanik olarak ekspoz olduğu durumlarda kontamine olmamış pulpaya yerleştirilen adeziv sistemlerin kalsiyum hidroksitle karşılaştırılabilir düzeyde iyileşme sağladığı bildirilmektedir (116–121).

İnsanlar üzerinde yapılan direkt pulpa kuafajı çalışmalarının sonuçları hayvan çalışmaları ile benzer sonuçlar göstermemektedir. Kalsiyum hidroksit ile adezivlerin karşılaştırıldığı birkaç klinik çalışmada; kalsiyum hidroksitin etch-and-rinse veya self-etch sistem olmasına bakılmaksızın adeziv sistemlere kıyasla önemli ölçüde daha iyi pulpa onarımı sağladığı bildirilmektedir (122–126). Ancak bakterilerle kontamine olmuş mekanik pulpa ekspozunun sonuçları incelendiğinde adeziv uygulanan pulpanın kalsiyum hidroksit uygulanan gruplara kıyasla zayıf pulpal iyileşme bildirilmiştir (127,128). Bu materyaller pulpa inflamasyonu ve sert doku oluşumu açısından MTA ile karşılaştırıldığında olumlu yanıt göstermemiştir (129). Tüm MTA örneklerinde yeni bir dentin köprüsü oluşumu gözlenirken, adeziv materyal içeren grupta pulpal nekroz ve enflamasyonla birlikte sadece çok az sert doku birikimi gözlenmiştir (130,131).

İnsanlar üzerinde yapılan çalışmalarda adeziv sistemlerin başarısız bulunmasının birkaç nedeni vardır. Birincisi adezivlerin pulpa hücreleri üzerindeki direkt sitotoksik etkileridir (108). Ayrıca adezivlerin etch ve primer bileşenleri vazodilatör etki göstererek pulpadaki kanamanın artmasına neden olmaktadır. Bu kanama, komşu dentin dokusunu etkiler ve adezyonu bozar (81,123,132). Pulpa kuafajı bölgesindeki artan nem, adezivin polimerizasyonunu azaltır (133). Son olarak, rezin bileşenleri, pulpanın bağışıklık yanıtını azaltarak pulpanın bakteriyel kontaminasyona karşı savunma yeteneğinin de düşmesine neden olur (134).

Yapılan bir çalışmada, adeziv sistemlerin düşük pulpa iyileşmesine ve bakteri yokluğunda bile kronik enflamasyona neden olduğu bildirilmektedir. Ayrıca pulpa kuafajında kullanılan adeziv sistemlerin çürükten etkilenmiş pulpanın iyileşme kapasitesini de azaltacağı söylenmektedir (82).

2.2.3. Cam İyonomer/ Rezin Modifiye Cam İyonomer Simanlar

Cam iyonomer simanlar, asit bazlı simanlardır ve zayıf polimerik asitlerin bazik cam tozu ile reaksiyonunun ürünüdür (135). Rezin modifiye cam iyonomer simanlar (RMCIS) ise bir rezin monomerinin dahil edilmesiyle modifiye edilen ve kısmen bir asit/baz reaksiyonu ve kısmen de fotokimyasal polimerizasyon yoluyla sertleşen cam iyonomerlerdir (136). Bu materyal, sadece asit/baz reaksiyonu ile sertleşen önceki nesil cam iyonomerlerde görülen su dengesindeki problemlerin üstesinden gelmek için tanıtılmıştır (137). Derin kavitelere ince sağlam dentin tabakası kalan dişlerde indirekt pulpa kuafajı amacıyla kullanıldığında başarılı bulunmaktadır (138). Bununla birlikte, direkt pulpa kuafajında pulpa dokusu ile doğrudan temas edecek şekilde yerleştirildiğinde düşük başarı oranı sergilemiştir (139). Ayrıca orta ila yoğun derecede inflamatuvar yanıt ve dolayısıyla geniş bir nekrotik alanın oluşmasına neden olduğu ve dentin köprüsü oluşumuna katkı sağlamadığı bilinmektedir (140).

Cam iyonomerin diş yapısına kimyasal olarak bağlanma yeteneği nedeniyle, potansiyel olarak toksik maddelerin dentinden pulpaya difüzyonunu önleyebilmektedir. Cam iyonomer ayrıca bakteriyel sızdırmazlığı da sağlamaktadır. Bu nedenle, pulpaya direkt olarak kullanımı önerilmemesine rağmen pulpaya yakın alanlarda kullanıldığında iyi bir biyouyumluluk göstermektedir (138,141–143).

CIS/ RMCIS doğrudan hücre temasında sitotoksiktir. Ancak sitotoksitesinin ZOE'ye oranla daha az olduğu bildirilmektedir. Geleneksel formülasyonların rezin ile modifiye edilmiş formülasyonlardan genellikle daha az toksisite gösterdiği söylenmektedir (97,102,144,145).

Rezin modifiye cam iyonomer ve kalsiyum hidroksit kullanılarak yapılan bir klinik çalışmada, rezin modifiye cam iyonomer kullanılan dişlerde kronik enflamasyon görüldüğü, daha az dentin köprüsü oluşumu ve pulpal iyileşme gözlemlendiği bildirilmiştir (140).

2.2.4. Kalsiyum Hidroksit

Kalsiyum hidroksit, diş hekimliğine 1921'de tanıtılmıştır ve onlarca yıldır pulpa kuafajı materyallerinin "altın standardı" olarak kabul edilmektedir (65). Kalsiyum hidroksitin altın standart olmasını sağlayan birçok özelliği vardır. Kalsiyum hidroksitin ilk etkisinin, hidroksil iyonlarının neden olduğu kimyasal hasardan kaynaklanan yüzeysel üç katmanlı nekroz gelişimi olduğuna inanılmaktadır. Ayrıca bu nekroz bölgesi pulpanın irritasyonunu sağlayarak savunma mekanizmasını ve onarımı uyarmaktadır. Onarım süreci, irrite eden ajanı ortadan kaldırmak için vasküler ve inflamatuvar hücre migrasyonu ve proliferasyonu ile başlar. Bu adımı daha sonra mezenkimal ve endotelyal pulpa hücrelerinin migrasyonu ve proliferasyonu ile kolajen oluşumu izler. Ardından odontoblast farklılaşması meydana gelir ve pulpa kuafaj materyalinin altında tersiyer dentin oluşumu gerçekleşir (146). Ayrıca, kalsiyum hidroksit, antibakteriyel özelliklere sahiptir (147). Bu özellikleri sayesinde pulpa dokusuna gelecek zararı ortadan kaldırmaktadır (148).

Kalsiyum hidroksitin direkt pulpa kuafaj ajanı olarak uzun vadeli bir klinik başarı geçmişi vardır (41,149,150). Yapılan bir çalışma, kalsiyum hidroksit ile bir saatlik temastan sonra pulpa enfeksiyonlarıyla ilişkili mikroorganizmalarda %100 azalma bildirmektedir (151). Yapılan bir klinik çalışmada ise mineral trioksit agregat (MTA) ile kalsiyum hidroksit karşılaştırılmıştır. 6 ay sonra, başarı oranını ve yeni oluşan dentinin ortalama kalınlığı iki grupta benzer bulunmuştur (87).

Kalsiyum hidroksitin bazı dezavantajları da mevcuttur. Kendi kendine sertleşen formülasyonlar yüksek çözünürlüğe sahiptir (152) ve doğal adezyon özelliği bulunmamaktadır. Bu nedenle zayıf bir sızdırmazlık sağlar (153). Diğer bir dezavantajı ise pulpa kuafaj alanlarının altında oluşan tersiyer dentinde "tünel defektleri" olarak adlandırılan görünüme neden olmasıdır (154,155). Tünel defekti, defekt içinde fibroblastlar ve kılcal damarların bulunabildiği, tersiyer dentinden ekspoz pulpa bölgesine kadar ulaşan bir açıklık olarak tanımlanmaktadır (154). Bununla birlikte, bazı araştırmacılar, oluşan dentin köprüsü kalınlaştıkça (156) tersiyer dentinin kalitesinin arttığını ve çoğunlukla tünel defektlerinin pulpa ile ilişkili olmadığını söylemektedir (115).

Kalsiyum hidroksit ile direkt pulpa kuafajının araştırıldığı klinik çalışmalarda, tünel defektlerinin yaygın bir bulgu olmadığı görülmektedir. Bununla birlikte tünel defektlerini bildiren çalışmaların sayısı tünel defektlerinin bulunmadığını bildiren çalışmalara göre daha azdır (81,123,125,126,149).

Geleneksel pH değeri yüksek kalsiyum hidroksitin pulpa dokusunda irritasyona neden olduğuna ve bunun da bazı bilinmeyen mekanizmalarla onarımı uyardığına inanılmaktadır (157). Son yıllarda bu “bilinmeyen mekanizma” biyoaktif moleküllerin salınmasıyla açıklanmaktadır. Dentinogenez sırasında dentin matrisine çeşitli proteinlerin katıldığı bilinmektedir. Pulpa kuafajında özellikle önemli olan bu proteinlerden en az ikisinin, Kemik Morfojenik Protein (BMP) ve TGF- β 1, pulpa onarımını uyarma yeteneği gösterilmiştir (158–160). Ayrıca, kalsiyum hidroksit bu proteinlerin dentinde çözünebilmesini ve bu biyoaktif moleküllerin pulpa kuafajının ardından pulpa onarımında önemli bir aracı olarak salınmasını sağlamaktadır (157,158).

2.2.5. Mineral Trioksit Agregat (MTA)

MTA literatüre ilk kez 1990larda deneysel bir kalsiyum silikat esaslı materyal olarak girmiştir (161). MTA'nın pulpa kuafajı, pulpotomi, perforatif kök rezorpsiyon defektleri, cerrahi retrograd dolgu, kök ve pulpa odası perforasyonları ve revaskülarizasyon vakalarında kullanımı önerilmiştir (162). MTA'nın, sert doku oluşumu için indüktif ve iletken özellik gösteren biyouyumlu bir materyal olduğu bildirilmiştir (163). Bakterisidaldır, sement benzeri sert doku oluşumunu ve kemik rejenerasyonunu uyarır (140).

Sıvısı ile karıştırılarak hazırlanmamış MTA tozu, trikalsiyum silikat, dikalsiyum silikat ve trikalsiyum alüminat formundaki kalsiyum oksittir. Bu formulasyona radyopaklık için bizmut oksit eklenir (164,165).

MTA, bir oksit karışımından ziyade bir silikat çimentosu olarak kabul edilir (166). MTA'nın su ile birincil reaksiyonu sonucu kalsiyum hidroksit oluşmaktadır (166–168). Aynı zamanda MTA'nın antibakteriyel ve biyouyumluluk özellikleri, yüksek pH, radyoopasite ve biyoaktif dentin matriks proteinlerinin salınmasına yardımcı olma yeteneği dahil olmak üzere birçok avantajı vardır.

Potansiyel etki mekanizması kalsiyum hidroksite benzemektedir (167–172). MTA beyaz ve gri olmak üzere iki rengi bulunmaktadır. Gri renk, içeriğindeki demirden kaynaklanmaktadır (173). Diğer bir önemli fark ise MTA dış yapısına bir miktar sızdırmazlık sağlamaktadır (174).

MTA'nın birkaç dezavantajı bulunmaktadır. Suda 78 gün bekletilen MTA, %24 oranında yüksek çözünürlük göstermiştir (167,168). Ayrıca gri MTA formülasyonunda bulunan demir, dişlerde renklenmeye neden olmaktadır (172). MTA'nın diğer bir önemli dezavantajı, yaklaşık 2 saat 45 dakikalık bir sertleşme süresine sahip olmasıdır (169,170). Bu nedenle MTA ile pulpa kuafajı yapılan dişlerde iki yöntem kullanılmaktadır. Birinci yöntem, MTA'nın sertleşmesini sağlamak için geçici bir restorasyon yerleştirmek ve sertleşme tamamlandıktan sonra kalıcı restorasyonun yapılmasıdır. İkinci yöntem ise MTA'yı korumak için aynı seansta hızlı sertleşen bir kaide kullanıldıktan sonra kalıcı restorasyonun tamamlanmasıdır (13).

Toz ve likit içeren MTA'nın kullanımı, çoğu pratisyenin kullanımı kolay bulduğu kalsiyum hidroksitin baz-katalizör formülasyonlarından çok farklıdır. Kalsiyum hidroksitin bu macun-macun formülasyonları ile karşılaştırıldığında, MTA çok pahalıdır. Bir gram MTA tozunun maliyeti yaklaşık olarak 24 gram kalsiyum hidroksit baz/katalizör formülasyonu ile eşdeğerdir. Bu da MTA'yı kullanım başına çok daha az maliyetli hale getirmektedir (47).

Bunun yanında MTA ile kalsiyum hidroksitin direkt pulpa kuafajında kullanıldığı hayvan çalışmalarında, genellikle MTA ile daha iyi pulpa iyileşmesi olduğu bildirilmektedir (175–179).

Literatürde MTA ile kalsiyum hidroksitin karşılaştırıldığı klinik çalışmalarda ise hayvan çalışmalarından farklı sonuçlar bildirilmektedir. MTA ile kalsiyum hidroksitin direkt pulpa kuafajı ajanı olarak uygulandığı bazı çalışmalarda, iki materyalin benzer sonuçlar gösterdiği bildirilmiştir (180–183). Bununla birlikte, kalsiyum hidroksit ve MTA ile pulpa kuafajı yapılan dişlerin karşılaştırıldığı çalışmalarda, MTA'nın üstün performans gösterdiği; MTA'nın, kalsiyum hidroksite göre sızdırmazlık sağlama yeteneğinin daha iyi olduğu bildirilmiştir (77,184). MTA'nın kontrol grubu olmadan pulpa kuafaj ajanı olarak kullanıldığı bazı klinik çalışmalarda, altı aydan dört yıla kadar değişen dönemlerde başarısının iyi olduğu gösterilmektedir (80,185,186).

MTA'nın başarısı, kalsiyum hidroksit için bir rezervuar görevi görmesinden ve/veya ekspoz pulpa bölgesinde sızdırmazlık sağlama yeteneğinden kaynaklanmaktadır. MTA'nın kalsiyum hidroksitten daha iyi sızdırmazlık sağladığı bilinmesine rağmen, her iki pulpa kuafaj materyalinin üzerinde kaide olarak bir cam iyonomer veya rezin ile modifiye edilmiş cam iyonomer kullanılmalıdır (47).

Direkt pulpa kuafaj ajanı olarak kalsiyum hidroksit ve MTA'nın karşılaştırıldığı bir çalışmada, dişler çekilerek histolojik olarak değerlendirme yapılmıştır. MTA'nın daha kalın bir dentin köprüsü oluşturduğu, daha az inflamasyon ve hiperemiye sebep olduğu gösterilmiştir. İstatistiksel analiz için çok az sayıda örnek olduğundan MTA'nın kalsiyum hidroksite olan üstünlüğü ile ilgili daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulduğu belirtilmiştir (172).

MTA ile direkt pulpa kuafajı yapılan ve ortalama yaklaşık dört yıl boyunca takip edilen kırk dokuz dişin incelendiği bir klinik çalışmada, MTA'nın %98 başarı gösterdiği bildirilmiştir. Ancak, pulpa sağlığının veya hastalığının gerçek durumunu değerlendirmek için hiçbir histolojik analiz yapılmamıştır (80).

2.2.6. Biodentine

Biodentine (BD; Septodont, Saint- Maur-des-Fosses, Fransa), Septodont tarafından geliştirilmiş bir materyaldir. Kalsiyum silikat esaslı bir portland çimentosudur (187). İçeriğinde su yerine modifiye polikarboksilat içeren kalsiyum klorür solüsyonu bulunmaktadır. Toz kısmı ise trikalsiyum silikat, dikalsiyum silikat, kalsiyum oksit, kalsiyum karbonat ve radyoopasite sağlayan zirkonyum oksitten oluşmaktadır. Sıvısındaki her iki madde de sertleşme sürelerinin kısılmasını (10-12 dakika) sağlamaktadır. Kalsiyum klorür, hidrasyon reaksiyonunu hızlandırmaktadır. Polikarboksilat ise uygun kıvam için gerekli su miktarını azaltır ve bu da karışımın kolay uygulanabilmesini sağlamaktadır. Tozdaki kalsiyum karbonat, hidrasyonu artıran ve daha hızlı sertleşmeyi sağlayan bir çekirdeklenme bölgesi görevi görmektedir. Daha büyük spesifik yüzey alanlarına sahip tozdaki daha ince parçacıklar da kısa sertleşme süresine katkıda bulunmaktadır (188). Direkt posterior restorasyonlarda, furkal perforasyonlarda, retrograd dolgularda ve pulpa kuafajında kullanıma uygun biyoaktif ve biyouyumlu bir materyaldir (187). Materyal bir amalgamatör kullanılarak 30 saniye boyunca hazırlanır ve daha sonra bir taşıyıcı yardımıyla kaviteye uygulanır (189).

Biodentine, kalsiyum hidroksit ve MTA'ya benzer özelliklere sahiptir (190). Tersiyer dentin oluşumunu uyarır. Pulpa dokusu ile direkt temas halinde reperatif dentin oluşumunu uyardığı bildirilmektedir (191,192). TGF- β 1 salarak ve odontoblastları uyarak pulpa iyileşmesini ve mineralizasyonunu destekler (193,194). Biodentine ayrıca dentin köprüsünün mineralizasyonu sürecinde önemli bir rol oynayan silisyum iyonlarını da serbest bırakır (194). Biodentine ile dentin köprüsünün oluşumunun pulpal inflamatuvar yanıt olmaksızın MTA'ninkine benzer olduğu gösterilmiştir. Bunun nedeni, proinflamatuvar maddelerin salgılanmasını engelleyen ve inflamatuvar hücrelerin toplanmasını azaltan antiinflamatuvar etkidir (195).

Nowicka ve arkadaşları, Biodentine ve MTA'nın homojen, kalsiyum hidroksitin ise daha gözenekli bir reperatif dentin oluşumunu indüklediğini bildirmiştir. Kalsiyum silikatların kalsiyum hidroksite kıyasla doku onarım etkinliğinin daha yüksek olduğu sonucuna ulaşmıştır (196).

Biodentine'in gelişmiş mekanik özellikler gösterdiği ve iyi bir marjinal sızdırmazlık oluşturabildiği bildirilmektedir. Nowicka ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, MTA ve Biodentine'nin pulpa üzerindeki etkileri karşılaştırılmıştır. MTA'nın Biodentine'e kıyasla uygulanması teknik olarak daha zordur ve sertleşmesi uzun sürmektedir. Ayrıca, Biodentine'in klinik ortamda benzer etkinlik gösterdiği ve MTA'nın yerine kullanılabilecek ideal bir materyal olduğu söylenmektedir (187).

2018 yılında yapılan 15 vakalık bir seride, Biodentine'in etkinliği 12 ila 24 aylık takip ile değerlendirilmiştir. Takip süresi boyunca 15 vakanın hepsinin asemptomatik olduğu sonucuna ulaşarak Biodentine'in vital pulpa tedavi materyali olarak kullanılabileceği bildirilmiştir (197).

Biodentine ve MTA'nın vital pulpa tedavisinde kullanımı sonrasında sonuçlarını değerlendiren bir prospektif randomize klinik çalışmada, her iki materyal arasında hiçbir istatistiksel fark kaydedilmemiştir. Bu sonuçlara göre hem direkt hem de indirekt pulpa kuafajında trikalsiyum silikat materyallerinin kullanımı önerilmektedir (198).

Biodentine materyali, ideal sertleşme süresi ve restoratif özellikleri nedeniyle pulpa kuafaj ajanı olarak büyük bir potansiyele sahiptir. Bununla birlikte, çalışmalar, Biodentine'in etkinliğini kontrol etmek için uzun vadeli klinik araştırmaların hala gerekli olduğunu düşündürmektedir (194).

2.2.7. Biyoseramik Esaslı Patlar

Biyoseramikler, çeşitli kimyasal işlemlerle hem in situ hem de in vivo olarak elde edilen biyouyumlu seramik bileşiklerdir. Biyolojik hidroksiapatit ile benzerliklerinden dolayı biyouyumluluk sergilerler. Hidrasyon sırasında, insan vücudunda rejeneratif yanıtı tetikleme yeteneğine sahip farklı bileşikler üretirler. Kemik ile teması sonrasında, osteokondüktif bir etki oluşturarak arayüzde kemik oluşumunu başlatmaktadır. Biyoseramiklerin intrinsik bir osteoindüktif kapasitesi vardır ve çevre dokudaki kemikte iyileşme süreci mevcudiyetinde osteoindüktif maddeleri absorbe etme yetenekleri kanıtlanmıştır (199).

Biyoseramikler, aynı zamanda antibakteriyel özelliğe sahiptir ve bakteri adezyonunu önleyen 1-3 nm çapında nanokristaller içeren gözenekli tozlar oluşturur (200). Eklem veya doku replasmanları gibi ortopedik tedavilerde ve biyouyumluluğu artırmak için metal implantların kaplanması yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca, kalsiyum fosfat içeren materyaller gibi poröz seramikler kemik grefti olarak kullanılmaktadır (201).

IRoot BP Plus (Innovative Bioceramix, Vancouver, Kanada), EndoSequence Kök Onarım Malzemesi Putty (ERRM) (Brasseler, Savannah, GA, ABD) ve TotalFill RRM Putty (FKG, La- Chaux-de-Fonds, İsviçre) başta olmak üzere piyasaya birçok biyoseramik sürülmüştür. IRoot BP, ana bileşimi trikalsiyum silikat, bikalsiyum silikat ve kalsiyum fosfat olan yeni geliştirilmiş kalsiyum silikat bazlı biyoaktif bir seramiktir (202).

Endosequence, sertleşme sonrasında hidroksiapatit oluşturan, radyoopak, büzülme göstermeyen hidrofilik bir kalsiyum silikat materyalidir. Sertleşme reaksiyonu aynı zamanda hidrasyon reaksiyonudur. İçeriğindeki monokalsiyum fosfat, hidroksiapatit oluşumundan sorumludur. Ayrıca, radyoopasite vermesi için zirkonyum oksit ve tantalum oksit içermektedir (203,204). Endosequence kök onarım materyali, başlıca karyojenik bakteriler olan *S. mutans* ve *Lactobasillere* karşı MTA ile benzer antibakteriyel özellikler göstermektedir (205).

iRoot BP Plus'ın pulpa dokusuyla iyi bir biyouyumluluğa sahip olduğu ve reperatif dentin köprüsü oluşumunu indüklediği gösterilmiştir; bu nedenle vital pulpa tedavisinde pulpa kuafaj materyali olarak kullanılabilir (206). İnsan dental pulpa hücreleri ile yapılan bir in vitro çalışmada, iRoot BP Plus'ın mineralizasyonu ve gen ekspresyonu ile ilişkili odontoblastik farklılaşmayı indüklediği gösterilmiştir (207).

ERRM ve ProRoot MTA'nın dental pulpa hücrelerinin farklılaşması üzerindeki etkisinin karşılaştırıldığı bir çalışmada, vasküler endotelial büyüme faktörünün (VEGF) canlı dental pulpa hücresi yüzdesi, proliferasyon oranları ve sekresyonunun her iki materyalde benzer olduğu gösterilmiştir. ERRM'nin diğer pulpa kuafaj materyallerine uygun bir alternatif olarak değerlendirilebileceği sonucuna varılmıştır (208).

2.2.8. Bioaggregate

2006 yılında piyasaya sürülen BioAggregate; trikalsiyum silikat, dikalsiyum silikat, tantal pentoksit, kalsiyum dihidrojen fosfat ve amorf silikon oksitten oluşur. MTA ile karşılaştırıldığında, alüminyum gibi zararlı bileşen salınımı yapmamaktadır. Ayrıca bizmut oksit yerine radyopaklık göstermesi için tantal pentoksit içermektedir (209). İçeriğindeki kalsiyum fosfat, kalsiyum silikatın hidrasyonu sonucu oluşan kalsiyum hidroksitin bir kısmı ile reaksiyona girer ve reaksiyon sırasında hidroksiapatit ve su oluşur. Bu şekilde üretilen su, hidrasyon reaksiyon hızını değiştirir. Silikon oksit ise kalsiyum hidroksit ile reaksiyona girerek sertleşme süresini uzatır. Sertleşme süresi, optimum toz/sıvı oranında (1 g/0,38 mL su) 4 saat olarak belirlenmiştir (210).

Son çalışmalar BioAggregate'nin biyouyumluluk, sızdırmazlık yeteneği yanında antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğunu ortaya koymuştur (211–213). Bioaggregate'nin antibakteriyel etkisinin kalsiyum hidroksite benzer olduğu ancak çinko oksit ojenol simandan daha düşük olduğu bildirilmiştir (210).

Diğer çalışmalar, BioAggregate'nin MTA'ya kıyasla daha yüksek kırılma direncine ve asidik dirence, daha yüksek push-out bağlanma gücüne ve daha düşük mikrosertliğe sahip olduğunu göstermiştir (214–216). Buna ek olarak, simüle edilmiş doku sıvısına bırakılan BioAggregate ve MTA'nın apatit kristallerinin çökmesini indüklediği gözlenmiştir. Bu sonuçlar, her iki materyalin biyoaktif kapasitesini göstermektedir (217).

Aynı zamanda, BioAggregate, osteoblast hücrelerinde ve insan periodontal ligament fibroblastlarında osteoblastla ilişkili genlerin ekspresyonunu artırarak osteokondüktif bir özellik sergilemektedir (218,219). Geleneksel MTA'nın osteoklast farklılaşmasına neden olduğu ve osteoklastların işlevini azalttığı bildirilmiştir (220–222). Ancak, BioAggregate'ın osteoklastlar üzerindeki etkisi hakkında daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır (223).

2.2.9. Rezin ile Modifiye Edilmiş Kalsiyum Silikatlar

Geleneksel kalsiyum silikatların dezavantajları göz önünde bulundurularak ışıkla sertleşen rezin ile modifiye edilmiş kalsiyum silikat bazlı materyaller geliştirilmiştir (224). Geleneksel MTA ile karşılaştırıldığında, rezin ile modifiye edilmiş ışıkla sertleşen materyallerin birçok avantajı vardır. Bunlardan bazıları anında ışık polimerizasyonu, malzemelerin yıkanarak dağılmaması ve üstün fiziksel özellikler sayılabilir (225). Ancak rezin ile modifiye edilmiş ışıkla sertleşen MTA simanının, rezin içermeyen kalsiyum silikatlardan daha fazla sitotoksik özellik gösterdiği bildirilmiştir (226).

TheraCal LC (Bisco, Schaumburg, IL, ABD), kalsiyum oksit, kalsiyum silikat partikülleri (tip III Portland çimentosu), stronsiyum camı, füme silika, baryum sülfat, baryum zirkonat, Bis-GMA ve polietilen glikol dimetakrilat içeren ışıkla sertleşen, rezin ile modifiye edilmiş kalsiyum silikat esaslı bir materyaldir (227). Hem polimerizasyon hem de hidrasyon reaksiyonu ile sertleşir, bu da kullanımını kolaylaştırır. Ayrıca Biodentin ile karşılaştırıldığında kompozit rezinlere daha yüksek bağlanma gücü avantajına sahiptir (228). Bununla birlikte, biyolojik özellikleri tartışmalıdır (229–231). Kalsiyum hidroksit oluşumunun ve sızdırmanın çok az düzeyde olduğu ve çok az hidrasyona neden olduğu bildirilmektedir (227). İnflamatuvar yanıtın MTA Angelus'a göre daha yoğun olduğu ancak bu materyalin mineralizasyonu uyarmadığı gösterilmiştir (232).

Son zamanlarda, vital pulpa tedavisi için yeni bir rezin ile modifiye edilmiş kalsiyum silikat materyal olan Theracal PT (Bisco, Inc., Schamburg, IL, ABD) piyasaya sürülmüştür. Üretici, pulpotomi için kullanımını önermekte ve MTA'ya göre uygulamasının ve kullanımının daha kolay olduğunu belirtmektedir. Ayrıca, dentin-pulpa kompleksini koruyarak pulpal canlılığı sürdürdüğünü iddia etmişlerdir (231). Hidrofiliktir ve çift polimerizasyon reaksiyonu ile sertleşir. Bununla birlikte, piyasaya yeni sunulması nedeniyle, bu materyal üzerinde sadece birkaç çalışma yapılmıştır (231,233).

Hem TheraCal LC hem de rezin ile modifiye edilmiş kalsiyum hidroksitin mürin odontoblast hücreleri ve insan dental pulpa kök hücreleri için Biodentine, MTA Angelus ve ProRoot MTA gibi rezin içermeyen kalsiyum silikatlardan daha sitotoksik olduğu gösterilmiştir. Ancak bu sitotoksitenin, laboratuvarında numune hazırlama sırasında TheraCal LC test numunelerinin yüzeyindeki oksijen inhibisyon tabakasındaki polimerize olmayan monomerlerden kaynaklanıyor olabileceği belirtilmiştir (226,234). Bazı çalışmalar, polimerize olmayan monomerlerin/rezinlerin pulpa hücreleri için toksik olduğunu, polimerize olmuş rezinlerin ise toksik etki göstermediğini ortaya koymuştur (134,235,236). Bununla birlikte, pulpa kuafaj materyalleri dişlerin içine yerleştirildiğinden, oksijen inhibisyon tabakasının klinik açıdan önemli olmadığı belirtilmiştir (13).

Theracal LC'ye benzer olarak son zamanlarda Harvard Bio-Cal CAP (Harvard Dental International GmbH, Almanya) ve Oxford ActiveCal PC (Oxford Scientific, Almanya) isimli iki ürün daha piyasaya sürülmüştür. Ancak geliştirilmiş bu MTA/kalsiyum silikat materyalleri ile ilgili çalışmalar yetersizdir. Direkt pulpa kuafajında kullanım için bu yeni materyalleri değerlendirmek için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır.

2.3. TOKSİSİTE VE BİYUYUMLULUK

Biyoyumluluk, implante edilen biyomateryaller ve ilişkili doku arasındaki etkileşim olarak tanımlanabilir (237).

Toksiste "bir maddenin (toksin veya zehir) insanlara veya hayvanlara zarar verebilme derecesi" olarak tanımlanabilir (238). Bu tanım, esas olarak ilaç toksisitesinin ölçülmesinde kullanılan birçok farklı yaklaşımın temelini oluşturmaktadır (239).

Biyoyumluluk ve sitotoksiste testleri, kullanılan materyalin çevredeki hücreyi veya dokuyu nasıl etkilediğini ve materyalin mekanizmasını anlamak için önemlidir. İyi biyoyumluluğa sahip materyaller, çevre hücreler ve dokular üzerinde belirgin ve sürekli toksik etkilere neden olmamalıdır (231,240) .

Maddelerin insan organizması üzerindeki zararlı etkilerini ölçmek için toksiste modelleri geliştirilmiştir. Şu anda, klinik öncesi araştırmalarda in silico, in vivo ve in vitro modeller olmak üzere üç ana toksiste modeli bulunmaktadır (241). Mevcut ilaç veya malzemelerin onay süreci bu kategorilere göre yönetilmektedir (242).

2.3.1. In Silico Toksisite Modeli

In silico, bilgisayarda veya bilgisayar simülasyonu yoluyla gerçekleştirilen test modelidir (242). Bu toksisite modeli temel olarak ilaçların vücutla nasıl etkileşime girdiğini tahmin etmek için kullanılır. Testlerin kısa sürmesi ve maliyetlerin düşük olması in silico toksisite modellerinin başlıca avantajlarıdır (242). Farklı yaklaşımlara sahip birçok in silico toksisite modeli mevcuttur ve buna bağlı olarak birçok sınıflandırılmaları vardır (243).

In silico toksisite modellerinde simülasyon bilgisayar tarafından gerçekleştirildiğinden verilen bir girdiyi bir çıktıya dönüştürmek için bir algoritma oluşturulur (244). Bununla birlikte, insan vücudundaki biyokimyasal ve fizyolojik süreçler hakkındaki bilgiler yetersizdir (245). Bu nedenle de ilaç toksisitesini tahmin etmek için etkili algoritmaların geliştirilemediği bildirilmektedir (246).

2.3.2. In Vitro Toksisite Modeli

In vitro testler, belirli bir organizmanın belirli bir bölümünü (örneğin organ, doku veya hücre) kontrollü bir ortamda incelemek için kullanılır. İn vitro toksisite modellerinin avantajları; zaman ve maliyetin azaltılması ve hedef organizmanın hücre veya dokularını temsil edebilmesidir (242). Bununla birlikte, mevcut in vitro hücre bazlı toksisite modellerinin çoğu, organizmanın bir veya daha fazla özelliğini kaybedecek kadar basitleştirildikleri için hedef organizmayı doğru bir şekilde temsil etmemektedir. Organların in vitro hücre bazlı toksisite modellerinin çoğu, hedef organ için karakteristik olan çeşitli hücre hatlarını içermemektedir. Bu nedenle, bir madde belirli bir hücre hattında toksisiteye neden olmasa bile, hedef organ içindeki diğer hücre hatları için toksik olabilmektedir. Ayrıca, bir madde tek bir hücre hattında toksisiteye neden olsa bile, tüm organ için toksik olmayabilir. Organdaki diğer hücreler bu dengeyi sağlayabilmektedir (247). İnsan organizmasındaki tüm süreçler birbiriyle bağlantılıdır. Ancak in vitro toksisite modelleri belirli hücresel yollarda yer alan biyomoleküllere odaklanmaktadır. DNA seviyesindeki onarım mekanizmaları da dahil olmak üzere hücrelerin kendi kendini onarma yeteneği göz ardı edileceğinden sadece belirli bir hücre bozukluğuna odaklanan in vitro toksisite araştırmaları yeterli olmayabilir (248).

Çeşitli hücreler fizyolojik ritme göre eşzamanlı olarak organ işlevine ve homeostaza katkıda bulunur. Fizyolojik ritim değişirse, bir organın verdiği yanıt önemli ölçüde değişebilir (249).

In vitro toksisite modelleriyle yapılan deneylerin çoğu sınırlı bir zaman dilimi içinde gerçekleştirilir ve sürekli olarak izlenmek yerine önceden tanımlanmış bir sürenin ardından sonlandırılır. Bu nedenle, bir madde belirli bir anda bir hücre için toksisiteye neden olarak kendi kendini onarabilir ve genel olarak toksik olmayan etkilerle sonuçlanabilir. Bir organizmanın homeostazı akut olarak yüksek bir maruziyetten sonra bile geri kazanılabilir (248). İn vitro çalışmalar, insan vücudunu taklit etmediğinden hayvan veya insan çalışmalarına kıyasla doğru sonuç elde etme konusunda zayıftır (250).

2.3.3. In Vivo Toksisite Modeli

Etik kaygılar nedeniyle insanlar üzerinde araştırma yapılmasına izin verilmediği veya yeni bir malzeme, cihaz veya ilacın insan sağlığı açısından bilinmeyen riskleri olduğu durumlarda hayvan testleri önem kazanmaktadır (251).

İn vivo testler, canlı organizmaları model olarak kullanan deneyleri ifade eder. İn vivo modellerin en büyük avantajları, ilaçların canlı organizmalardaki fizyolojik ve biyokimyasal reaksiyonlar üzerindeki etkilerinin araştırılabilmesi ve bu organizmaların geniş ve koordineli veri tabanlarının bulunmasıdır (242). Uygun şekilde değerlendirildiği takdirde, laboratuvar hayvanlarında gözlemlenen herhangi bir bileşiğin etkisinin insanlar için de geçerli olduğu varsayılmaktadır (239).

Bu nedenle, insanlarda klinik denemelerden önce uygun hayvan modellerinin kullanılması, araştırmalarda önemli bir yere sahiptir. Diş hekimliğinde, laboratuvar deneylerinin ardından yeni tedavi seçeneklerinin, kök hücre tedavilerinin, ilaçların, materyallerin, irrigantların, dezenfektanların, aletlerin ve cihazların klinik deneylerinden önce hayvan testleri yapılmaktadır. Bu aynı zamanda pulpa hastalıklarının biyolojik mekanizmalarının, doku iyileşmesi ve rejenerasyon potansiyellerinin araştırılması için de gereklidir. Hayvan deneyleri, yeni klinik tekniklerin, biyomateriyallerin veya rejeneratif tedavilerin güvenliğini, biyoyumluluğunu ve toksikolojisini doğrulamak için çok önemli bir rol oynamaktadır (252).

Sıçanlar ve fareler de dahil olmak üzere kemirgenler, diş hekimliği araştırmalarında en yaygın kullanılan hayvan türleri olarak görünmektedir. Köpekler, kediler, gelincikler, kobaylar, tavşanlar, koyunlar, mini domuzlar ve hatta primatlar gibi daha büyük hayvanlar da geçmişte hayvan testlerinde kullanılmıştır. Ancak, evcil hayvan türleri üzerinde yapılan hayvan testlerine yönelik kamuoyu tepkisi nedeniyle bu hayvanların kullanıldığı çalışmalar günümüzde nadirdir ve primat araştırmalarına bazı yasaklar getirilmiştir. Ayrıca, hayvanlarla yapılan testler pahalıdır ve ulusal hayvan refahı yönergelerine uymak zaman ve çaba gerektirir (253).

İn vivo toksisite modeli, tüm fizyolojik reaksiyonlar ve biyokimyasal etkileşimler dahil olmak üzere bir organizmayı bütün olarak kullanan ve organizmadaki ilaç dağılımı ile ilacın hedef olmayan organlarla olası etkileşimleri hakkında bilgi sağlayan tek modeldir. Bu nedenle, ilaç toksisitesini test etmek için oldukça uygun bulunmaktadır. Bununla birlikte, özellikle insan ve diğer hayvan organizmaları arasında var olan önemli biyolojik farklılıklar göz önünde bulundurulduğunda, mevcut in vivo toksisite modellerinde bazı sınırlamalar vardır. Bu farklılıklar moleküler düzeyden hücresel ve organ düzeyine kadar gözlemlenmektedir (254,255). Ayrıca, herhangi bir ölçekteki küçük farklılıklar, tek nokta mutasyonları veya aseptik koşullar gibi organizmalarda önemli değişikliklere neden olabilir (256). İn vivo modellerle ilaç toksisitesini tahmin etmedeki herhangi bir başarısızlık, büyük olasılıkla hayvanlar ve insanlar arasındaki bu farklılıklardan kaynaklanmaktadır (246).

Hayvanlar üzerinde yapılan çalışmaların çoğu, yüksek maliyetler nedeniyle kısa bir zaman aralığında gerçekleştirilmektedir ve bu nedenle test materyallerine yanıt olarak gelişen kronik enflamatuvar reaksiyonları, sistemik hastalıkları veya tümörleri tespitinde yetersiz kalabilmektedir. Tüm bunlara rağmen, hayvan araştırmaları günümüzde tartışmalı bir bilim alanı olarak kabul edilmektedir (257). Bazı hayvan çalışmaları üzerinde yapılan bir inceleme, çoğunun kötü tasarlanmış deneylere sahip olduğunu ortaya koymuş ve hem etik hem de bilimsel kaygıları artırmıştır (258).

2.4. MODEL ORGANİZMA OLARAK ZEBRA BALIĞI

Biyomedikal araştırmalar, insanlar ve alt omurgalılar arasında korunan biyolojik süreçleri incelemek için model organizmalar ile yapılmaktadır (259). Materyal veya ilaçların toksik etkileri kemirgen çalışmaları yoluyla güvenilir bir şekilde elde edilse de bunlar pahalı, zaman alıcı ve yasalarla kısıtlıdır. Genler, reseptörler ve moleküler süreçler aynı filumdaki hayvanlar arasında benzerdir. Ancak daha karmaşık yapıdaki hayvanları anlamak için farklı türlerle çalışmalar yapılmaktadır. Model omurgasız organizmalara örnek olarak meyve sineği ve nematod solucanı, model omurgalılara örnek olarak ise medaka (japon pirinç balığı), zebra balığı, kurbağa, civciv, fare ve sıçan verilebilir. Özellikle, tüm omurgalı embriyolarının morfolojisinde önemli benzerlikler olduğundan bu omurgalıların erken yaşam evrelerindeki gen programlaması ve gelişimi de yüksek oranda korunmaktadır (260). Buna ek olarak, kimyasallar anne vücudundan memelilerin embriyo ve fetüsüne transplasental transferi olduğu gibi (261) yumurtlamadan önce dışıdan balık, amfibi ve kuş yumurtalarına aktarılır. Böylece kimyasalların aktarıldığı yumurta, embriyonik gelişim açısından takip edilebilmektedir (260).

Diğer modellere göre üstünlüğü bilinen zebra balığı (262), deneysel bir model olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Toksikolojik, genetik ve davranışsal çalışmaların yanı sıra yeni terapötik ajanların test edilmesi, çeşitli insan hastalıklarının evrim mekanizmasının anlaşılması, normal ve patolojik koşullar altında gelişimin izlenmesi için önemli bir modeldir (259).

Zebra balığı (*Danio rerio*), Güneydoğu Asya'ya özgü bir tatlı su balığıdır (263). İlk olarak Francis Hamilton tarafından "Ganj nehri ve dallarında bulunan bir balık türü" olarak tanımlanan zebra balığı, başlangıçta akvaryum hobicileri için popüler bir tür olmuştur (263). Model organizma olarak günümüzdeki kullanımı, omurgalıların embriyolojisinin incelenmesi için moleküler genetiğin kullanılmasında öncü olan George Streisinger'in (264) ve sinir sisteminin hücre farklılaşması ve organizasyonunun ayrıntılı tanımlarını yayınlayan Kimmel'in (265–267) çalışmalarıyla ortaya çıkmıştır.

Zebra balığının bir omurgalı model organizma olarak potansiyelini ilk kez 1960ların sonunda fark eden George Streisinger, jinogenetik yöntemlerle zebra balığı üzerinde maternal genomlardan resesif fenotipleri tanımlamak için kullanımını açıklayan ilk makaleyi yayınlamıştır (264). Bu makaleyle birlikte, zebra balığı, gelişimin ileri genetik çalışmaları için popüler hale gelmeye başlamıştır (268–270).

Zebra balığı, 1990larda gelişimsel olarak önemli genleri tanımlamak için büyük ölçekli bir genetik tarama için kullanılan ilk omurgalı olmuştur. Bu araştırmalar ile çoklu gelişimsel süreçleri etkileyen binlerce mutasyon tespit edilmiştir. Yapılan daha ileri karakterizasyonlar, zebra balığı fenotiplerinin çoğunun iki türdeki ortolog genlerdeki değişiklikler nedeniyle insan hastalıklarına benzediğini ortaya koymuştur. Zebra balığının insan hastalıkları için bir model organizma olma potansiyeli fark edilmiştir. Bunun sonucunda Ulusal Sağlık Enstitüleri 1997 yılında Trans-NIH Zebra Balığı Koordinasyon Komitesi'ni kurmuştur (271).

Orijinal zebra balığı genetik haritası (272) genişletilmiş (273) ve bunu insan hastalıklarının çeşitli zebra balığı modelleri takip etmiştir (274–276). Modelin daha da geliştirilmesi ileri ve geri genetik yaklaşımları, genetik manipülasyonu ve transgenezi kolaylaştırmıştır (277,278). 2000li yılların başında Sanger Enstitüsü Zebra Balığı Genom Dizileme Projesi'ni başlatmıştır (279). Buna ek olarak, Zebra Balığı Bilgi Ağı (<https://zfin.org/>) (280) ve vahşi tip, mutant ve transgenik zebra balığı soylarının yanı sıra zebra balığı araştırmaları hakkında bilgi için merkezi bir depo olan Zebra Balığı Uluslararası Kaynak Merkezi kurulmuştur. CRISPR/Cas9 sistemi (281–283) ve omurgalı otomatik tarama teknolojisi (VAST) (284–286) gibi otomatik tarama platformları kullanılarak genom düzenlemedeki ilerlemeler de dahil olmak üzere zebra balığı için yeni araçlar geliştirilmeye devam etmektedir. Bu, zebra balığının bugün ve gelecekte önemli bir omurgalı model organizma olarak kalmasını sağlayacaktır (287).

Zebra balığı günümüzde gelişimsel biyoloji çalışmaları için en iyi omurgalı modellerinden biri olarak kabul edilmektedir. Akciğerler, prostat ve meme bezleri gibi organların eksikliği de dahil olmak üzere memelilerden anatomik ve histolojik olarak farklı olmasına rağmen omurgalı vücut planının genel yönlerini ve bileşenlerini anatomik, moleküler ve fizyolojik seviyelerde korumaktadır (279,288,289). Buna ek olarak, zebra balığı genomu insan genlerinin %70'inin ve insan hastalıklarıyla ilişkili olanların %80'inden fazlasının homologlarına sahiptir. Bu da omurgasızların kullanıldığı çalışmalara kıyasla bu türün biyomedikal araştırma alanlarında daha ilgi çekici hale gelmesini sağlamaktadır (279).

Zebra balıklarının hayat döngüsünün laboratuvar farelerine göre daha kısa sürede tamamlanması, farelerle yapılan deneylerin aynılarının bu balık türüyle de yapılabilmesi ve özellikle teratojenik testlerde daha fazla neslin takip edilebilmesi diğer bir tercih nedeni olmuştur (290). Farelerde embriyo gelişimi anne vücudu içinde olduğu için araştırmacıya embriyoyu en başından takip etme şansını vermemektedir. Zebra balığı embriyoları ise anne vücudu dışında geliştiği için döllenmeden itibaren zigotun gelişimi takip edilebilmektedir (291).

Toksikoloji araştırmalarında zebra balığının tercih edilmesinin diğer bir nedeni ise uygulanan testin kısa oluşu ve sonuçların oldukça hassas oluşudur (292). Optik netlikleri, kolay gelişimsel evrelemeye, mutajenez taraması sırasında fenotipik özelliklerin tanımlanmasına ve toksisite testi ile toksisitenin değerlendirilmesine olanak tanır (293,294).

Çeşitli organların ve embriyonik gelişimin bir stereomikroskop yardımıyla görselleştirilebilmesi zebra balığının ana avantajlarından biridir. Embriyonun büyük boyutu ve şeffaflığı, cerrahi bir müdahaleye veya ölüm sonrası incelemeye gerek olmadan daha az invaziv gerçek zamanlı tekniklerin kullanılmasına izin vermektedir (295). Transgenlerin zebra balığına enjeksiyonu sitoplazmaya enjeksiyonla gerçekleştirilebilirken kemirgen embriyosunda bu işlem pronükleuslarında yapılmaktadır. Bu nedenle bu tür bir prosedürde hem ekipmanın ucuz olması hem de tekniğin uygulanmasının daha kolay olması açısından zebra balığı tercih edilebilmektedir (296).

2.4.1. Zebra Balığının Üreme, Büyüme ve Gelişimi

Zebra balıkları, kontrol edilebilir bir aydınlık-karanlık döngüsü ile 28,5°C'de tutulan amaca yönelik olarak inşa edilmiş aquakültür sistemlerinde barındırılmaktadır. Boyutları küçüktür ve düşük maliyetlidir. Bu sebeple üretimi ve bakımı kolaydır (297). Zebra balıkları oldukça doğurgandır ve hamile bir dişi doğal yumurtlama yoluyla her hafta yüzlerce yumurta üretebilir. Döllenme ve embriyo gelişiminin her ikisi de dışının dışında gerçekleşir. Embriyonik gelişim hızlıdır, tek hücreli zigot 24 saat içinde klasik omurgalı vücut planına sahip hareketli, şeffaf bir embriyoya dönüşmektedir (297). Zebra balığı embriyosu hızlı bir şekilde gelişir, tüm ana organların primordiaları döllenme sonrası 36 saat içinde ortaya çıkar. 28,5°C'de muhafaza edildiğinde, morfogenezin büyük kısmı döllenmeden 3 gün sonra tamamlanır ve embriyo koruyucu koryondan çıkar.

Bu, embriyonik aşamadan larva aşamasına geçişi işaret etmektedir. Larva zebra balığı büyümeye devam eder. Beyin, kalp ve böbrekler gibi organlarının çoğu döllenme sonrası 5. günde işlevlerine başlamaktadır. Döllenmeden 5 ila 6 gün sonra arasında sindirim sistemi ve ağız işlevsel hale gelmektedir. Embriyonik ve erken larva evreleri boyunca hayvanı besleyen yumurta kesesi hızla tükenerek 7. günde tamamen emilir (297). Zebra balığı, yetişkin özelliklerinin çoğunu geliştirdiğinde juvenil; yaşayabilir gametler üretilip üreyebildiğinde ise yetişkin olarak kabul edilir (297,298).

2.4.2. Toksisite Çalışmalarında Zebra Balığının Kullanımı

Memeliler, gelişimsel toksisite değerlendirmesi için altın standart olarak kabul edilse de; zebra balığı in-vivo kimyasal toksisite için giderek daha fazla kullanılmaktadır. Küçük boyutları, yüksek doğurganlıkları, embriyoların optik şeffaflıkları, hızlı embriyonik gelişimleri ve düşük bakım maliyetleri göz önüne alındığında uygun bir alternatif olarak kullanımı yaygınlaşmaktadır (259). Zebra balığının toksikolojik bir model (299,300) olarak kullanılmasının diğer disiplinler için de sayısız avantajı vardır. Bu durum, yakın geçmişte bu organizmayı kullanan yayınların sayısındaki artıştan da anlaşılmaktadır. 1990ların başında zebra balığı ile ilgili yılda 100'den az yayın bildirilmiştir. Bu sayı 21. yüzyılın başında yaklaşık 1000'e yükselmiştir. 2005 yılında yayınlanan bir derlemede, zebra balıkları ile ilgili her yıl ortalama 3500 yayının yayınlandığı bildirilmiştir (260).

Zebra balığının kullanıldığı toksisite çalışmalarının türleri şunlardır;

- Üreme toksisitesi
- Gelişimsel toksisite
- Akut toksisite
- Nörotoksisite
- Kardiyotoksisite
- Oküler toksisite
- Endokrin sistem bozuklukları
- Nörodavranışsal toksisite
- Vasküler toksisite
- Karsinojenite

Çalışmalar arasında akut, subkronik ve kronik toksisite çalışmalarının yanı sıra hedef organ toksisitesinin mekanizmaları üzerine hipoteze dayalı çalışmalar da yer almaktadır (260).

2.4.3. Zebra Balığı Kullanılarak Yapılan Diş Hekimliği Çalışmaları

Diş hekimliği alanında yapılan çalışmaların büyük çoğunluğu genetik ve kraniyofasiyal gelişimle ilgilidir. Birçok araştırmacı, sendromik olmayan dudak ve damak yarıklarında spesifik genlerin rolünü araştırmıştır (301–305). Diş gelişimi bozukluklarının (306–310) yanı sıra diğer kraniyofasiyal malformasyonlar ve sendromlar da kapsamlı bir şekilde incelenmiştir (311–314).

Dudak ve/veya damak yarığının çok faktörlü doğası nedeniyle, hayvan modelleri bu insan fenotipinin tüm spektrumunu anlamak için kullanılabilir (315). Zebra balığı mutantları, bu karmaşık hastalık için yeni aday genlerin tanımlanmasında ve çevresel faktörlerin test edilmesinde önemli bir yere sahiptir. Ayrıca etiyolojinin anlaşılmasına ve bu çok faktörlü bozukluk için potansiyel terapötik yaklaşımların keşfedilmesine katkıda bulunabilir (315).

Hamilelik sırasında ilaç kullanımı kraniyofasiyal malformasyonlara yol açabilmektedir. Valproik asit adı verilen anti-epileptik ve duygudurum dengeleyicinin kullanımı sıklıkla kraniyofasiyal teratojenite ile ilişkilendirilir (316). Gebuijs ve arkadaşları (315), valproik asidin zebra balığı larva kafasında kıkırdak ve kemik oluşumu üzerindeki etkilerini araştırmış ve ilacın nöral krest hücrelerinin işlevini bozarak kıkırdak ve kemik oluşumunda kusurlara yol açtığı sonucuna varmıştır. Zebra balığı, genetik ve çevresel faktörlerin yanı sıra bunların kraniyofasiyal malformasyonlarla etkileşimini araştırmak için iyi bir modeldir (316).

Bulaşıcı hastalıkları incelemek için de zebra balığı kullanılabilir. Hücresel düzeyde noninvaziv görüntüleme yapılabilir. Larva zebra balığı şeffaftır ve enjeksiyondan sonra floresan etiketli mikroorganizmaların izlenebilmesine olanak tanımaktadır (317). *Candida albicans* gibi patojenlerin bulaşıcı hastalıklarda yeni terapötikler geliştirmek için etki mekanizmasının anlaşılması gereklidir ve bu nedenle zebra balığı modeliyle yaygın olarak çalışılmaktadır (318–321).

Aynı zamanda fırsatçı bir patojen olan Gram-pozitif *Enterococcus faecalis* sıklıkla hastane enfeksiyonlarından sorumludur ve kök kanalı enfeksiyonlarından izole edilen en yaygın bakterilerden biridir (322). Yakın zamanda yapılan iki çalışmada bu bakteri izole edilerek karakterize edilmiş ve terapötik potansiyele sahip bakteriyofajlar zebra balıkları üzerinde test edilmiştir. Antibiyotik dirençli *E. faecalis* enfeksiyonlarının tedavisinde zebra balığı üzerinde denenen bu fajların kullanılabileceği düşünülmektedir (322,323).

Porphyromonas gingivalis, şiddetli periodontitis için anahtar oral patojen olarak kabul edilen gram-negatif bir anaerobdur (324). Kardiyovasküler hastalık, ateroskleroz ve diyabet gibi sistemik hastalıklar periodontitis ile ilişkilendirilmiştir (325). Widziolek ve arkadaşları, sistemik patojenite mekanizmalarını inceleyerek zebra balığının hem konağın *P. gingivalis* enfeksiyonuna verdiği yanıtı hem de bakteriyel virülansı incelemek için uygun bir model olduğu sonucuna varmışlardır (326).

Zebra balığı ayrıca kimyasal toksisiteyi değerlendirmek için giderek daha fazla kullanılmaktadır. Zhao ve arkadaşları, diş hekimliğinde yaygın olarak kullanılan ancak henüz sistematik olarak in vivo değerlendirilmemiş bir restorasyon tekniği olan metal destekli porselen kronları oluşturan çeşitli metal alaşımlarının zebra balığının embriyonik ve larval gelişimi üzerindeki etkilerini değerlendirmiştir (327).

Alifui-Segbaya ve arkadaşları, diş hekimliğinde üç boyutlu protez tabanları, splint, sınırlayıcılar, cerrahi kılavuzlar ve teşhis modelleri için kullanılan üç tip metakrilatın (E-Denture, E-Guard ve Dental SG) zebra balığının ilk gelişimi üzerindeki toksikolojik ve teratojenik etkilerini incelemişlerdir (328).

Hsieh ve arkadaşları ise elektrolize suyun embriyonik zebra balığı üzerinde in-vivo toksisitesini ve *Streptococcus mutans*'a karşı antimikrobiyal etkinliğini doğrulamıştır (329).

Bu çalışmalara göre, zebra balığı çalışmalarının diş hekimliğinde mevcut biyolojik değerlendirme testlerine eklenebilecek güvenilir bir toksikolojik tarama aracı olabileceği bildirilmiştir (327–329). Bugüne kadar zebra balığı üzerinde yapılan çalışmaların çoğu, zebra balığı ve kemirgen toksisitesi arasındaki korelasyonun yüksek olduğu ve bu nedenle kemirgenlerde ve diğer hayvanlarda toksisite testlerine uygun bir alternatif olduğu sonucuna varılmaktadır (330).

2.5. APOPTOZUN BELİRLENMESİ

Apoptozis, organizmanın sahip olduğu hasarlı hücreleri ve farklılaşmadan sonra gerekli olmayan hücreleri ortadan kaldırarak organizmayı koruyan yerleşik bir hücre ölüm programıdır. Apoptoz, normal biyolojik süreçlerde gerçekleşebilmektedir. Ayrıca patogeneizde hücre büyümesi ve farklılaşması gibi çok çeşitli fizyolojik durumlarda indüklenir (331–335).

Apoptozun kolayca analiz edilebilmesi, moleküler hücre biyolojisi çalışmalarında ve farklı tedavilerin veya durumların göreceli toksisitesinin değerlendirilmesinde önemlidir (336). Zebra balığı, in vivo olarak apoptozun araştırılması için yararlı bir deneysel model hayvandır (337). Yapılan çalışmalar ile stres kaynaklı ve gelişimsel apoptoz, zebra balığı embriyoları kullanılarak karakterize edilmiştir (338–340).

Zebra balığı ve gelişmekte olan embriyoları; omurgalı genetiği, gelişimi ve davranışındaki sorunları incelemek, insan genetik hastalığını modellemek ve çevresel toksisite analizleri için oldukça çok yönlü bir sistemdir (336,341–343). Diğer hayvanlarda olduğu gibi, zebra balığı embriyolarında da programlanmış hücre ölümü, organ gelişiminin homeostazisini korur ve morfolojiyi oluşturmak için fazla hücreleri uzaklaştırır. Apoptoz; dorsal nöral tüp, retina, mercek, kornea, iç kulak, notokord, kuyruk, yüzgeçler gibi birçok bölgede izlenebilir. Bu organlar ve dokular embriyogenezin erken aşamalarında hızla gelişmektedir. Aynı zamanda hücre farklılaşması ve çoğalması dolayısıyla da apoptoz için karmaşık mekanizmalar sergilemektedir (344–347).

Bununla birlikte apoptotik hücrelerin zebra balığı embriyolarında in vivo olarak görüntülenmesini sağlayan çeşitli deneysel protokoller geliştirilmiştir. En yaygın kullanılan tekniklerden biri, dsDNA'ya bağlandığında yeşil floresan yayan ve nekrotik hücrelerden ziyade apoptotik hücreleri seçici olarak boyayan bir nükleik asit interkalasyon boyası olan akridin oranjın (AO) kullanımıdır (347,348). Büyük embriyo gruplarında AO boyamasının hızlı bir şekilde ölçülmesini sağlayan bir görüntüleme protokolü açıklanmaktadır. Zebra balığı embriyoları hücre biyolojisi ve çevresel toksisite analizleri için çok uygun bir modeldir.

İstatistiksel olarak anlamlı sayıda embriyoda apoptoz seviyelerini analiz edebilecek basit bir yöntem olan ve dansitometrik tekniklere dayanan göreceli apoptoz düzeylerinin hızlı ve büyük ölçekli analizi için bir "grup floresan" yöntemi önerilmiştir (336). AO boyaması embriyodan embriyoya önemli ölçüde değişkenlik gösterdiğinden ve istatistiksel titizliği sağlamak için çok sayıda embriyo analiz edilmesi gerektiğinden, bu yaklaşım çok önemlidir (349).

Kaspazlar, programlanmış hücre ölümü ve inflamasyonda anahtar rol oynayan bir sistein proteaz ailesidir (350). Çok hücreli organizmalarda, makromoleküler sinyal kompleksleri yoluyla aktif olmayan prokaspazlar bir araya gelmektedir. Bunların yakınlığının neden olduğu otoaktivasyon ve proteolitik işlevler kaspazları aktive etmektedir. Kaspazlar tarafından kontrol edilen moleküler yollar, ökaryotlarda evrimsel olarak korunmaktadır. Kaspazlar ilk olarak inflamasyonda ve apoptotik hücre ölümünde tanımlanmıştır. Apoptozu indükleyerek veya inflamatuvar hücre ölümünü gerçekleştirerek temel hücresel süreçleri düzenlemek üzere gelişmişlerdir (351).

Hücre ölümünün programlı olarak yürütülmesi sonucunda kaspazlar aktifleşir. Hücre ölümleri, ilgili spesifik kaspazlar tarafından belirlenir (351). Bunların arasında kaspaz-3, birçok önemli hücresel proteinin spesifik bölünmesini katalize eden ve sıklıkla aktive olan bir ölüm proteazıdır. Apoptoz için gereklidir. İncelenen tüm hücre tiplerinde apoptotik kromatin yoğunlaşması ve DNA parçalanmasında bir aracı rolü vardır. Bu nedenle; kaspaz-3, hücrenin parçalanması ve apoptotik cisimciklerin oluşumu ile ilişkili belirli süreçlerde görülmektedir. Aynı zamanda hücre canlılığının kaybedilme aşamasında veya öncesinde de işlev görebilir (352).

Programlanmış hücre ölümü, inflamasyon ve doğuştan gelen bağışıklık tepkilerinin düzenlenmesinde kaspazların rolü araştırılmaktadır. Kaspazların rolünün bilinmesi; kanserin, otoinflamatuvar ve bulaşıcı hastalıkların tedavisi için gereken terapötik yaklaşımların geliştirilmesi için önemlidir (353).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu tez çalışması, İzmir Biyotıp ve Genom Merkezi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından 09/03/2022 tarihinde 2022-010 protokol numarası ile etik açıdan uygun görülmüştür (EK). Proje, 6550 sayılı Kanun kapsamında Türkiye'nin ilk Tematik Araştırma Merkezi olarak faaliyet gösteren İzmir Biyotıp ve Genom Merkezi'nin bünyesinde yer alan Vivaryum- Zebrabalığı Birimi'nde yürütülmüştür.

3.1. GEREÇLER

3.1.1. Kullanılan Kuafaj Materyalleri

- Oxford ActiveCal PC, Oxford Scientific, Elmshorn, Almanya
- Harvard BioCal-CAP, Harvard Dental International GmbH, Almanya
- MTA Angelus, Angelus, Brezilya
- Biodentine, Septodont, Fransa

3.1.2. Kullanılan Sarf Malzemeleri

- Pastör Pipeti PE 3 ml, ISOLAB Laborgeräte GmbH, Almanya
- 90 x 17 mm Petri Kutusu, ISOLAB Laborgeräte GmbH, Almanya
- Vidalı Kapaklı 50 ml Santrifüj Tüpü, ISOLAB Laborgeräte GmbH, Almanya
- Pipet, Bio-Rad Laboratories, Inc., Amerika
- 20- 200 µL pipet uçları, Eppendorf Otomatik Pipet Setleri, Eppendorf SE, Almanya
- 100-1000 µL pipet uçları, Eppendorf Otomatik Pipet Setleri, Eppendorf SE, Almanya
- 2 ml kapaklı Eppendorf tüpler, CLEAR-LOCK Microtubes 2 ml CLEARLine Kapaklı Eppendorf Tüpü, BIOSIGMA S.p.A., İtalya
- Düz kuyulu 3 ml hücre kültürü plakları, ISOLAB Laborgeräte GmbH, Almanya

- Minisart filter 16534K pore size 0,2 µm, Sartorius Company GmbH, Almanya
- Paraformaldehyde Emprove 1 kg (Paraformaldehit) CAS: 30525-89-4, Merck, Almanya
- PBS Solüsyonu (PBS Buffer) 1 L pH: 7,2, Gündüz Kimya, Türkiye
- Tetrabutylammonium Hydroxide %40 (METOH) 972.06P.0100, ISOLAB Laborgeräte GmbH, Almanya
- %0,05 Tween-20, Ataman Kimya, Türkiye
- Dimetil Sülfoksit (DMSO), 1L, Ataman Kimya, Türkiye
- Keçi serumu %10, 500 mL Thermo Fisher Scientific, ABD
- Sığır serum albümini %7,5, 100 mL, Thermo Fisher Scientific, ABD

3.1.3. Kullanılan Cihazlar

- ZEISS Stemi 508 Stereo Mikroskop, ZEISS Group, Almanya
- Olympus SZX7 Stereo Mikroskop, Olympus Corporation, Japonya
- Stabilitherm Incubator LV42589161, Thermo Fisher Scientific, ABD
- Sartorius Entris 2202- 1S Hassas Terazî, Sartorius Company GmbH, Almanya
- Thermo Scientific Safe 2020 Class II Biyolojik Güvenlik Kabini, Thermo Electron LED GmbH, Almanya
- Memmert UNB 400 Etüv, Memmert GmbH, Almanya
- Eppendorf Centrifuge 5702 R Santrifüj Cihazı, Eppendorf SE, Almanya
- Olympus SZX16, Olympus Corporation, Japonya
- Zeiss LSM880 Lazerli Konfokal Mikroskop, ZEISS Group, Almanya

3.1.4. Kullanılan Kimyasal Materyaller

- Acridine orange C014 10 mg/ mL, 1 ml, ABP Biosciences, ABD
- Cleaved Caspase-3 (Asp175) (5A1E) Rabbit mAb #9664 Cell Signaling Technology, ABD
- Fluorescein (FITC) AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L), Vector Laboratories, ABD
- Triton X-100 f 1 L, 0,1%, 108603, Merck, Almanya
- Tricaine methanesulfonate, Sigma- Aldrich, Merck Millipore, Almanya
- DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole), Thermo Fisher Scientific, ABD

3.1.5. E3 Ortamı İçeriği

- 5mM NaCl, 0,17 mM KCl, 0,33 mM CaCl₂, 0,33 mM MgSO₄, and 0,1% Metilen Mavisi

3.2. TEST SOLÜSYONLARININ HAZIRLANMASI

Ticari olarak temin edilebilen dört dental materyal, Oxford ActiveCal PC, Harvard BioCal-CAP, MTA Angelus ve Biodentine, bu çalışmada kullanıldı (Resim 3.1). Bu ürünler üreticinin talimatlarına göre hazırlandı. Materyallerin kullanım amacı, üretici firma, kompozisyon sertleşme tipi ve süresi ile ilgili bilgiler Tablo 3.1'de gösterilmektedir.

A)



B)



C)



D)

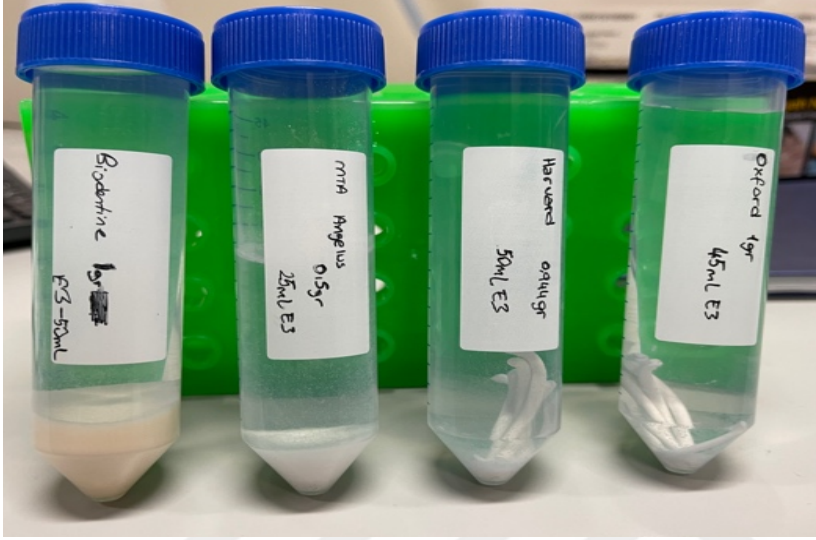


Resim 3.1: Çalışmada kullanılan pulpa kuafaj materyalleri; Oxford ActiveCal PC (Oxford Scientific, Elmshorn, Almanya) (A), Biodentine (Septodont, Fransa) (B), Harvard BioCal-CAP (Harvard Dental International GmbH, Almanya) (C), MTA Angelus (Angelus, Brezilya) (D)

Tablo 3.1: Çalışmada kullanılan materyallerin kullanım amacı, üretici firma, kompozisyon sertleşme tipi ve süresi

Materyal	Kullanım Amacı	Üretici Firma	Kompozisyon	Sertleşme Tipi	Sertleşme Süresi
Biodentine	Bioaktif Dentin Tamir Materyali	Septodont, Saint-Maur- des Fosses Cedex, Fransa	Toz: Trikalsiyum silikat tozu Likit: Hızlandırıcı olarak kalsiyum klorid ve yardımcı maddeler	Kendiliğinden sertleşir.	12 dakika
MTA Angelus	Endodontik Tamir Simanı	Angelus Indústria De Produtos Odontológicos Ltda., Londrina Parana, Brezilya	Toz: Trikalsiyum Silikat, Dikalsiyum Silikat, Trikalsiyum Alüminat, Tetrakalsiyum Aluminoferrit, Bizmut Oksit, Demir Oksit, Kalsiyum karbonat, Magnezyum oksit, Kalsiyum oksit, Kristalin silika Likit: Distile su	Kendiliğinden sertleşir.	15 dakika
Harvard BioCal-CAP	Direkt ve İndirekt Pulpa Kuafajı için Biyoaktif, Işıklı Sertleşen Rezin ile Modifiye Edilmiş MTA simanı	Harvard Dental International GmbH, Margaretenstraße 2-4, 15366 Hoppegarten, Almanya	Mineral oksit türleri ve metakrilatların karışımı	en az 1000mW/cm ² ışık yoğunluğuna sahip bir polimerizasyon ünitesi (dalga boyu aralığı 400-500 nm) kullanarak ışık ile sertleşir.	40 saniye
Oxford ActiveCal PC	Işıklı Sertleşen Rezin ile Güçlendirilmiş MTA Pulpa Kuafaj Materyali	First Scientific Dental Materials GmbH, 25335 Elmshorn, Almanya	Üretici firma tarafından paylaşılan bilgi kitapçığında MTA doldurucuları (filler) içerdiği ve rezin ile güçlendirilmiş olduğu bilgisi dışında bir bilgi paylaşılmamıştır.	en az 1000mW/cm ² ışık yoğunluğuna sahip bir polimerizasyon ünitesi (dalga boyu aralığı 400-500 nm) kullanarak ışık ile sertleşir.	40 saniye

Üretici talimatlarına göre hazırlanan materyaller, hassas terazi ile ölçüldü. İçerisinde zebra balığı embriyolarının canlılıklarını sürdürebilmek için gerekli olan maddelerden oluşan E3 kontrol medyumunu bulanan 50 ml steril falkon tüplere her materyalden 1 g konuldu (Resim 3.2).



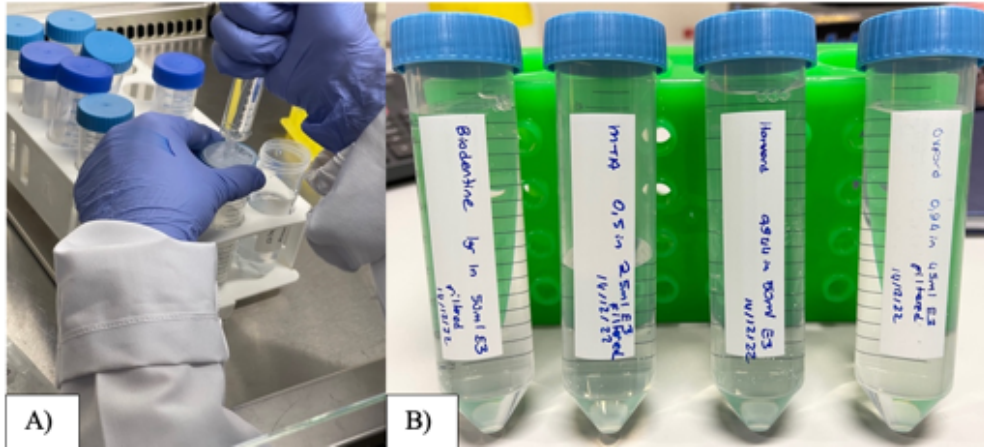
Resim 3.2: 1 g kuafaj materyali ve 50 ml E3 solüsyonu içeren steril falkon tüpler

İçerisinde 1 g materyal bulunan bu tüpler, 15 dakika boyunca ultraviyole altında steril edildi. Tüpler daha sonra 24 saat boyunca 37°C'ye ayarlanmış etüvde bekletildi. 24 saat sonunda her bir tüp 1 dakika boyunca 0.4x1000 rcf'de santrifüj edilerek içerisindeki partiküllerin çökmesi sağlandı (354) (Resim 3.3).



Resim 3.3: Tüplerin santrifüj cihazına konulması ve santrifüj edilmesi

Tüpler, büyük partiküllerin ayrıştırılması için 0,2 μm 'lik filtreler kullanılarak filtre edildi (354) (Şekil 3.4).



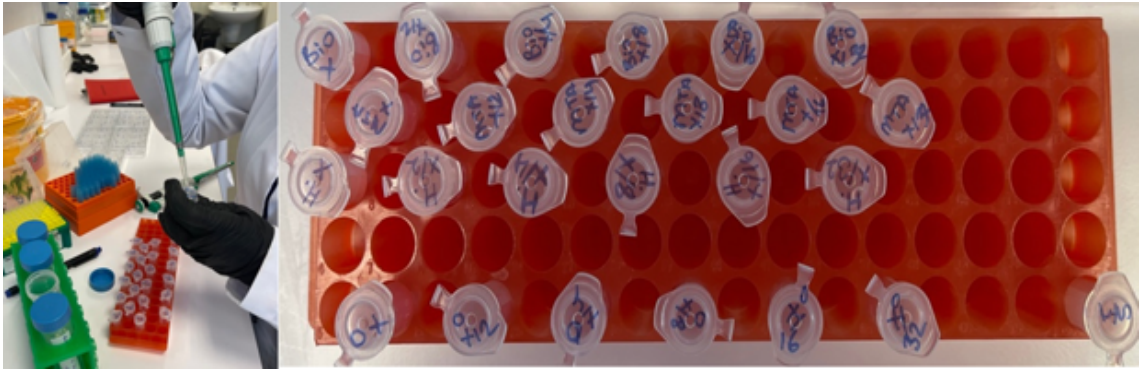
Resim 3.4: Tüplerin filtrelenmesi (A), Filtre edildikten sonra tüplerin görüntüsü (B)

Bu aşamadan sonra doz hesaplamaları yapıldı. Oxford ActiveCal PC, Harvard BioCal- CAP, MTA Angelus ve Biodentin materyalleri, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 ve 1:32 oranlarında seyreltilmek üzere toplam 6 doz belirlendi. Tablo 3.2'de x, x/2, x/4, x/8, x/16 ve x/32 dozları için kullanılacak test solüsyonu ve E3 miktarları belirtilmiştir.

Tablo 3.2: Belirlenen dozlar için kullanılan test solüsyonu ve E3 miktarları

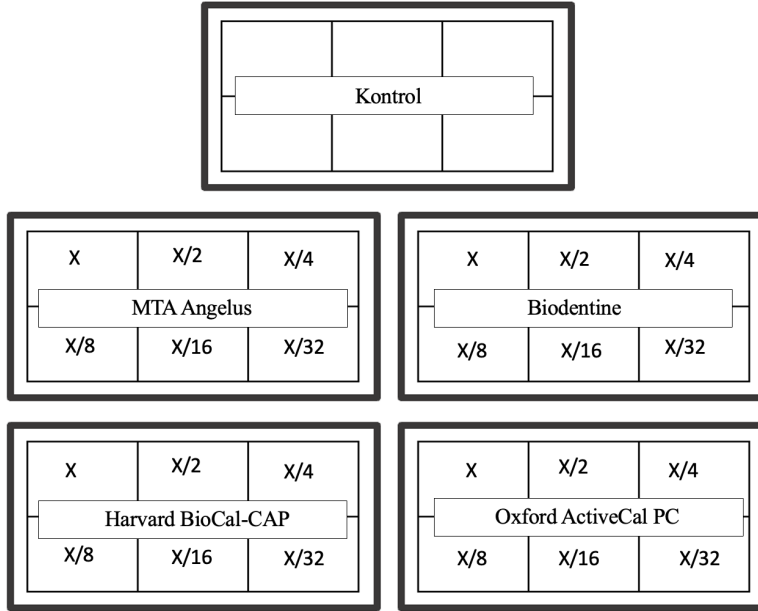
Dozlar	Test Solüsyonu	E3
Kontrol	-	2 ml
x	2 ml	-
x/ 2	1 ml	1 ml
x/ 4	0,5 ml	1,5 ml
x/ 8	0,25 ml	1,75 ml
x/ 16	0,125 ml	1,875 ml
x/ 32	0,0675 ml	1,9325 ml

Her materyal, daha sonra zebra balığı embriyolarının bulunduğu ortamlara konulmak üzere Tablo 3.2’de belirtilen dozlarda, 2 ml kapaklı Eppendorf tüplere 100-1000 μ L, 20-200 μ L’lik pipetler ve 20-200 μ L ve 100-1000 μ L pipet uçları kullanılarak transfer edildi (Resim 3.5).

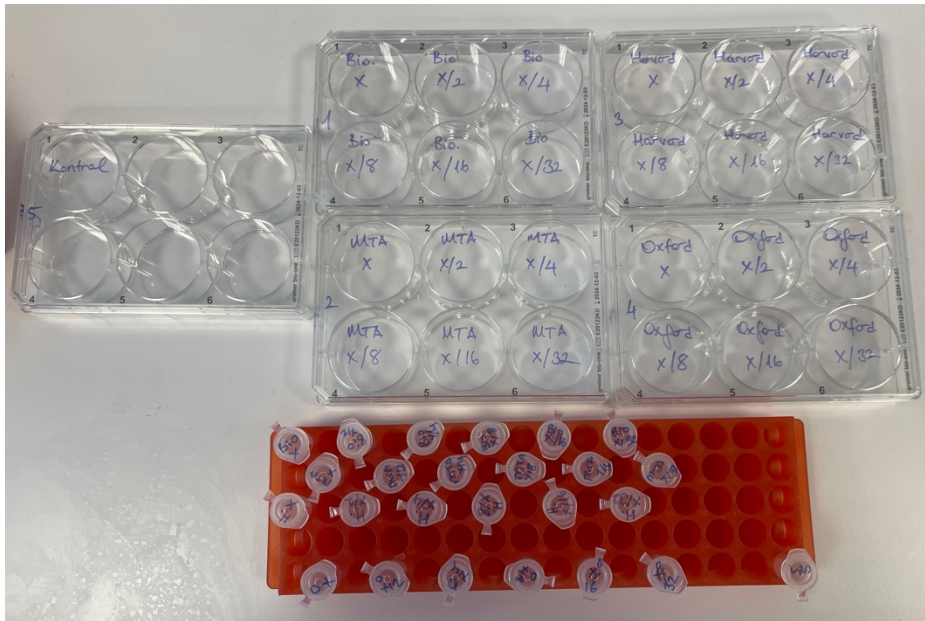


Resim 3.5: Pipet ve pipet uçları kullanılarak her bir doz için 2 ml ‘lik Eppendorf tüplerin içerisine materyallerin hazırlanması

Tablo 3.2’de belirtilen dozlarda 2 ml eppendorf tüplere hazırlanan Oxford ActiveCal PC, Harvard BioCal- CAP, MTA Angelus ve Biodentine test solüsyonları altı kuyulu hücre kültürü plaklarına konuldu (Şekil 3.1, Resim 3.6).



Şekil 3.1: Altı kuyulu hücre kültürü plaklarının test solüsyonlarına göre işaretlenmesi



Resim 3.6: 2 ml eppendorf tüplerde hazırlanan test solüsyonların içerisinde embriyo bulunan hücre kültürü plakalarına konulması

3.3. DENEYDE KULLANILACAK EMBRİYO SAYISININ BELİRLENMESİ

Deney grupları belirlenirken istatistiksel önemi sağlayacak minimum sayı dikkate alındı. Bu araştırmada örneklem büyüklüğünün hesaplanmasında G*Power 3.1.9 programı kullanıldı. Orta düzey etki büyüklüğü ($f=0.25$), %95 istatistiksel güç ve 0,05 hata payı için çalışmaya dahil edilmesi gereken minimum örneklem sayısı her bir alt grup için 30 embriyo olmak üzere her bir grup için toplam 180 embriyo olarak belirlendi.

3.4. ZEBRA BALIKLARININ İDAME ETTİRİLMESİ VE EMBRİYO ELDESİ

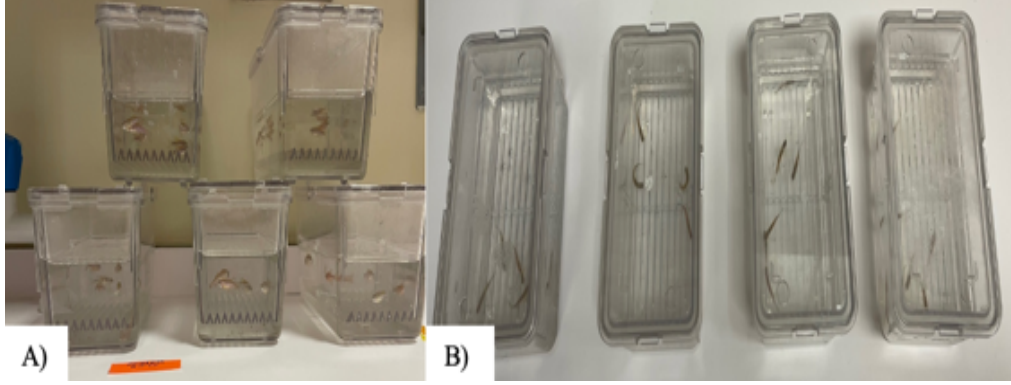
Deneyler, İzmir Biyotıp ve Genom Merkezi, Zebra Balığı Birimi'nden temin edilen wildtype AB zebra balıkları embriyoları kullanılarak yürütüldü.

25×30×18,5 cm (yükseklik, en, boy) ebadında stok akvaryumlarda erkek ve dişi bir arada stoklanmış 5 aylık sağlıklı zebra balıkları alınarak 14:10 saat ışık karanlık periyodu ve 28°C sıcaklığı olan cam akvaryumlarda 7 gün boyunca ortam koşullarına adapte edildi (Resim 3.7). Bu esnada balıklar günde 2 kez Artemia salina ile beslendi. Tank temizliğine özen gösterildi. İki günde bir suyun yarı yarıya değiştirilmesi sağlandı.



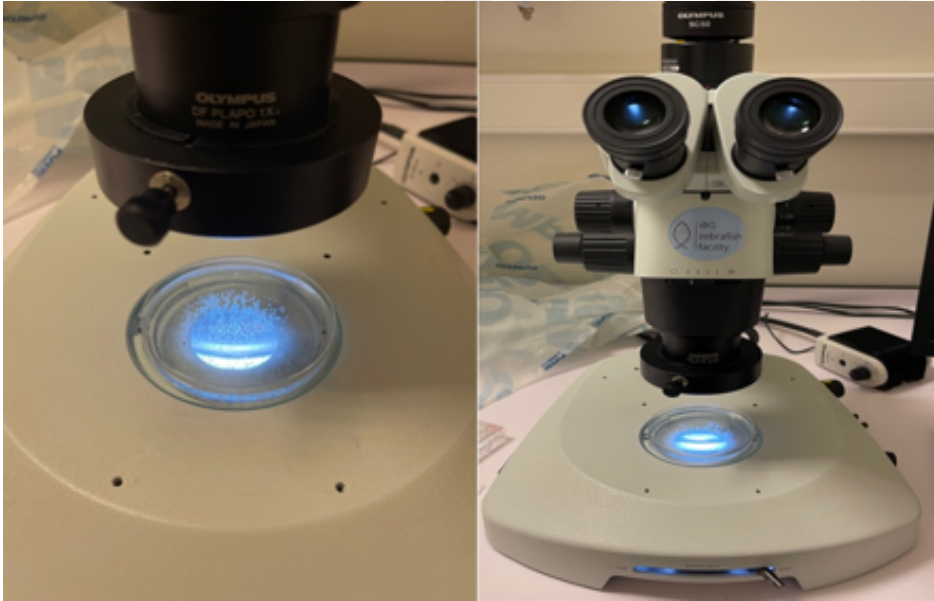
Resim 3.7: Erkek ve dişi sağlıklı zebra balıkların bulunduğu akvaryumlar

Çiftleşme akvaryumu olarak 7 tank alınarak sağlıklı zebra balıklardan her bir tankta 3 dişi ve 2 erkek olmak üzere toplamda 21 dişi ve 14 erkek zebra balığı aralarında bariyer olacak şekilde bir gece bekletilip ertesi gün aralarındaki bariyer uzaklaştırılarak balıklar çiftleşmeye bırakıldı. Bariyer kaldırıldıktan yaklaşık 2 saat sonra balıklar yumurta vermeye başladı (Resim 3.8) ve 0. saatteki embriyolar deney için kullanılmak üzere toplandı.



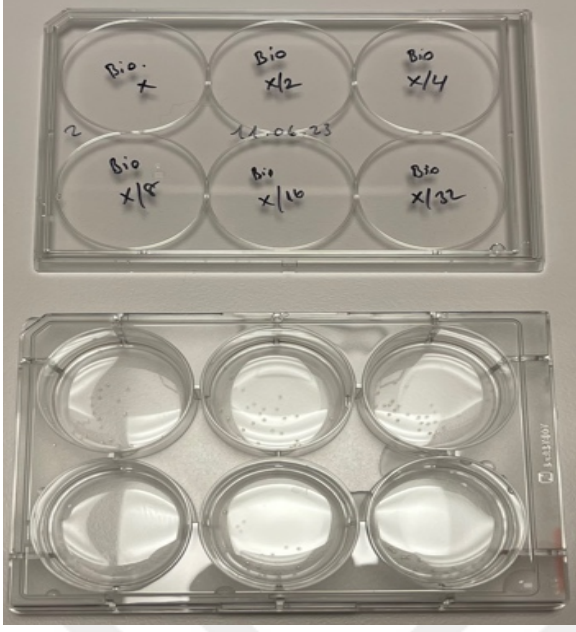
Resim 3.8: Erkek ve dişi zebra balıklarının tanklarda bekletilmesi (A), Bariyerin kaldırılması ve balıkların yumurta vermeye başlaması (B)

Embriyolar iyice yıkanarak 10 cm²'lik steril petride E3 ortamının içerisine alındı. Ölü embriyolar stereomikroskop altında steril pasteur pipetler kullanılarak ortamdan uzaklaştırıldı (Resim 3.9).



Resim 3.9: Embriyoların stereomikroskop altında incelenmesi

Embriyolar daha sonra 2 ml E3 ortamının içinde, her bir materyalin alt deney grupları ve kontrol grubu n=30 embriyo olacak şekilde 6 kuyucuklu steril hücre kültürü kaplarına alınarak (Resim 3.10) 28°C sıcaklığa ayarlanmış inkübatörde inkübe edildi.



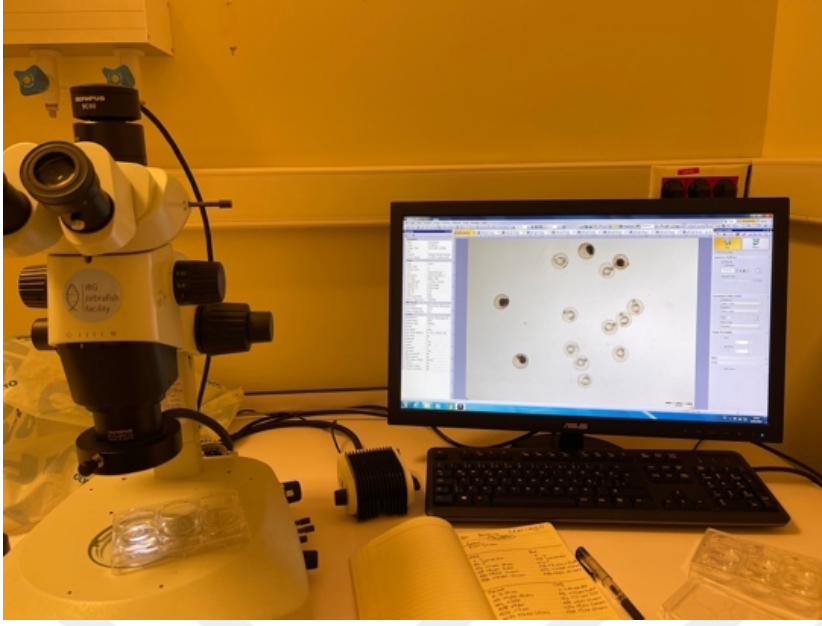
Resim 3.10: 6 kuyucuklu hücre kültürü plakalarının materyallere göre hazırlanması ve embriyoların dağıtılması

3.5. EMBRİYONİK TOKSİSİTE VE MORTALİTENİN BELİRLENMESİ

Tablo 3.2’de belirtilen dozlarda 2 ml eppendorf tüplere hazırlanan Oxford ActiveCal PC, Harvard BioCal- CAP, MTA Angelus ve Biodentin test solüsyonları altı kuyulu hücre kültürü plaklarına konuldu. Stereo mikroskop altında incelenerek kontrol grubunda 30 embriyo ve her bir deney grubunun alt grupları için 30’ar embriyodan bir deney grubu için toplam 180 embriyo olacak şekilde altı kuyucuklu hücre kültürü plakalarına ayrılan embriyolar embriyonik toksisite ve mortalitenin belirlenmesi için test solüsyonları ile şartlandırılmış ortamda büyümeye tabi tutuldu.

3.5.1. Sağ Kalım Oranı

Test solüsyonları ile şartlandırılmış ortamda büyümeye tabi tutulan zebra balığı embriyoları; 0, 24, 48, 72, 96 ve 120. saatlerde stereo mikroskop kullanılarak incelendi ve mikroskop altında Olympus cellSens Entry programı (Olympus cellSens Entry Imaging Software, Olympus LS, Japonya) ile görüntülenerek görüntüler kaydedildi (Resim 3.11).



Resim 3.11: Embriyoların stereomikroskop altında incelenmesi ve görüntülerin kaydedilmesi

Mortalite kriteri olarak embriyo koagülasyonu, kalp atışının olmayışı, somit gelişmede başarısızlık kabul edildi. Bu kriterler göz önünde bulundurularak ölü kabul edilen embriyolar görüntülenme işleminin ardından toplanarak ortamdan uzaklaştırıldı.

Ölü sayıları; 24, 48, 72, 96 ve 120. saatlerde hem manuel olarak hem de dijital ortamda kaydedildi. Test solüsyonuna tabi tutulan embriyolar, 28°C sıcaklığa ayarlanmış inkübatörde inkübe edildi (Resim 3.12).

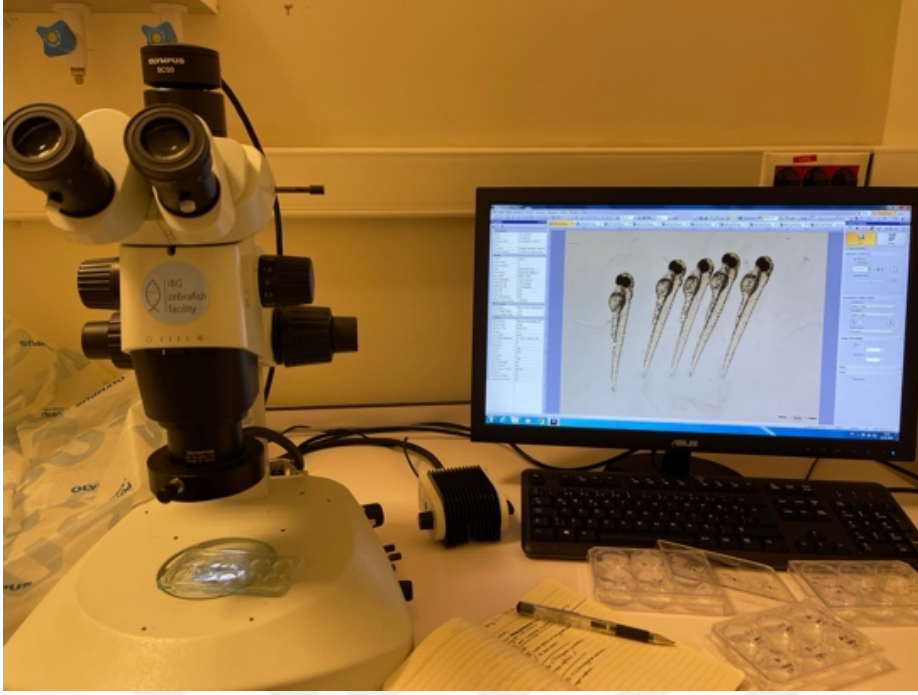


Resim 3.12: 28°C sıcaklığa ayarlanmış inkübatör

Hücre kültürü plakalarında bulunan solüsyonlar her 24 saatte bir hazırlanan taze solüsyonlar ile değiştirildi. Deney 3 kez tekrarlandı.

3.5.2. Koryondan Çıkış Oranı

Test solüsyonları ile şartlandırılmış ortamda büyümeye tabi tutulan zebra balığı embriyoları; 0, 24, 48, 72, 96 ve 120. saatlerde stereo mikroskop kullanılarak incelendi ve mikroskop altında Olympus cellSens Entry programı (Olympus cellSens Entry Imaging Software, Olympus LS, Japonya) ile görüntülendi (Resim 3.13)



Resim 3.13: Embriyoların stereomikroskop altında incelenmesi ve görüntülerin kaydedilmesi

Koryondan çıkan canlı larvaların sayıları 0, 24, 48, 72, 96 ve 120. saatlerde manuel olarak hem de dijital ortamda kaydedildi. Test solüsyonuna tabi tutulan embriyolar, 28°C sıcaklığa ayarlanmış inkübatörde inkübe edildi. Hücre kültürü plakalarında bulunan solüsyonlar her 24 saatte bir hazırlanan taze solüsyonlar ile değiştirildi. Deney 3 kez tekrarlandı.

3.5.3. Malformasyonlar

Test solüsyonuna tabi tutulan embriyolar, 28°C sıcaklığa ayarlanmış inkübatörde inkübe edildi. Hücre kültürü plakalarında bulunan solüsyonlar her 24 saatte bir hazırlanan taze solüsyonlar ile değiştirildi.

48, 72, 96 ve 120. saatlerde embriyoların kalp ödemi, vitellüs kesesi ödemi, vertebra deformasyonu ve kuyruk anomalisi, kuyruğun olmayışı, aksiyal malformasyonlar gibi vücut anomalileri incelenerek malformasyon gösteren canlı embriyolar belirlendi.

Test solüsyonları ile şartlandırılmış ortamda büyümeye tabi tutulan zebra balığı embriyoları; 48, 72, 96 ve 120. saatlerde stereo mikroskop kullanılarak incelendi ve mikroskop altında Olympus cellSens Entry programı (Olympus cellSens Entry Imaging Software, Olympus LS, Japonya) ile görüntülendi. Deney 3 kez tekrarlandı.

3.6. APOPTOZUN BELİRLENMESİ

3.6.1. Akridin Oranj Boyama Yöntemi

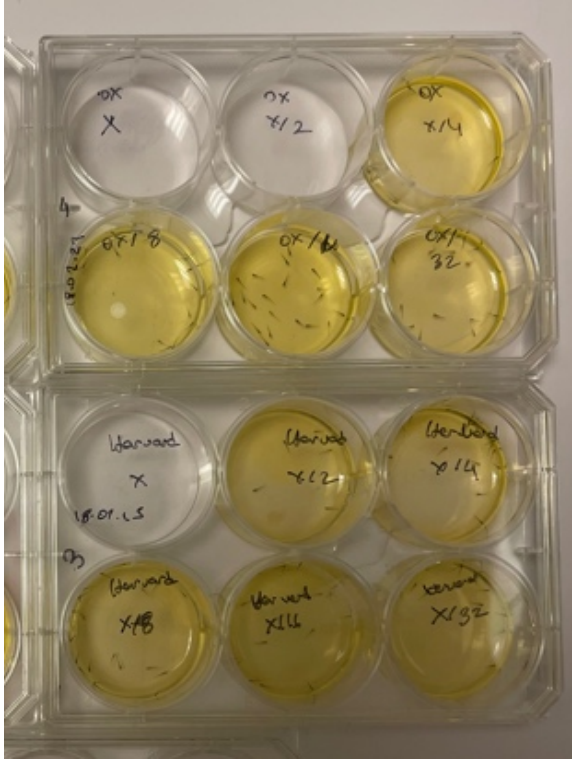
Programlanmış hücre ölümünün (apoptozis) canlı embriyolarda belirlenmesinde, elektrostatik çekim aracılığıyla DNA ve RNA ile etkileşime giren bir metakromatik boya olan Akridin Oranj (AO) kullanılmaktadır. Normal, sağlıklı hücelere AO boyası geçemezken, plazma membranı hasar görmüş nekrotik veya apoptotik hücelere geçebilmektedir (336).

24, 48, 72, 96 ve 120. saatlerde sağ kalım ve koryondan çıkış deneylerinde izlenen prosedürler gerçekleştirildi. 120. saatte canlı embriyoların bulunduğu toksik olmayan en etkili dozlar üzerinden apoptoz deneylerine başlandı. -20°C’de saklanmış 1 ml akridin oranj boyası (Resim 3.14) 10 mg/mL olacak şekilde DMSO (dimetil sülfoksit) çözeltisinde çözdürüldü.



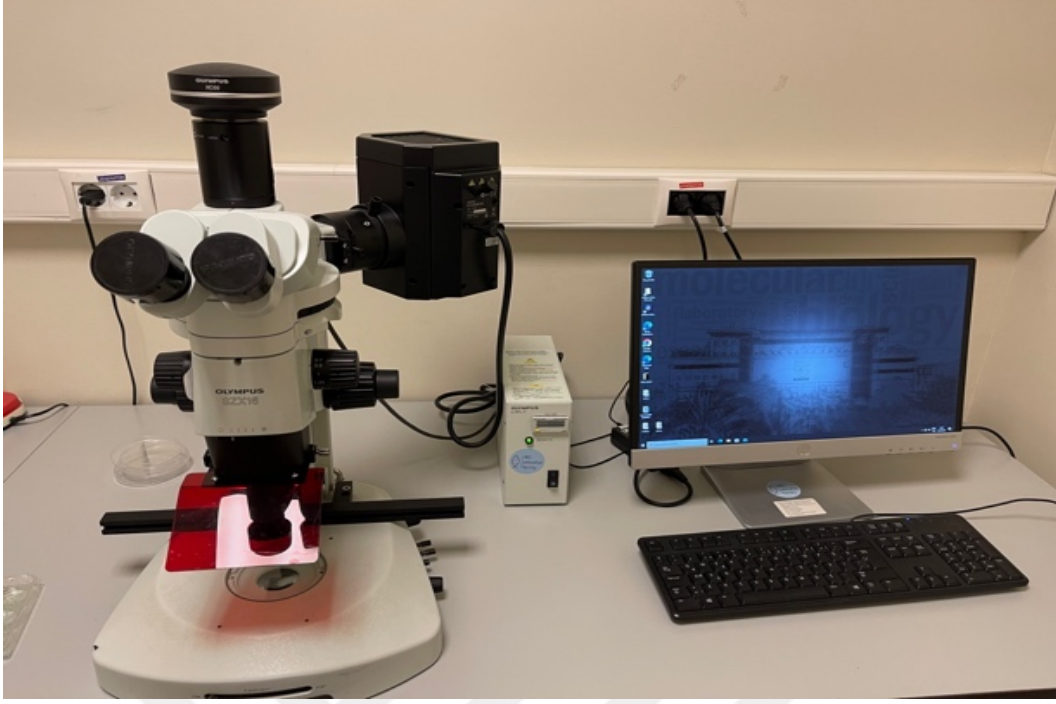
Resim 3.14: -20°C’de saklanmış 1 ml akridin oranj (Acridine orange C014 10 mg/mL, 1 mL, ABP Biosciences, ABD)

Kontrol grubundan 10 adet embriyo negatif kontrol olarak ayrıldı. Test solüsyonlarına maruz kalmış embriyoların bulunduğu her bir kuyucuğa 2 µL akridin oranj koyuldu. Kontrol grubunda ve diğer tüm alt gruplarda en fazla 10 embriyo olacak şekilde embriyolar akridin oranj boyası ile 60 dakika karanlık bir ortamda inkübasyona bırakıldı (Resim 3.15).



Resim 3.15: Akridin oranj boyası konulmuş hücre kültürü plakaları

İnkübasyon sonrası embriyolar 3 kez E3 ile yıkandı. Akridin oranj boyası ile boyanmış embriyolar floresan mikroskopta incelendi ve Olympus cellSens Entry programı (Olympus cellSens Entry Imaging Software, Olympus LS, Japonya) ile görüntüler kaydedildi (Resim 3.16). Deney 3 kez tekrarlandı.



Resim 3.16: Boyama sonrası kullanılan floresan mikroskop

3.6.2. Cleaved Caspase-3 ile Whole-Mount İmmün Boyama Yöntemi

Kaspazlar, DNA tamiri ve replikasyonu için gerekli enzimleri inaktive etmekte, hücre iskeletinde bulunan proteinleri kesmekte ve hücre zarının tomurcuklanmasına neden olmaktadır (355–357). Sadece apoptotik hücrelerde oluşan aktif kaspaz-3, immunohistokimyasal boyama metoduyla belirlenmektedir (358,359).

Whole-Mount immünfloresan tekniği aşağıdaki prosedürler takip edilerek 3 gün süreyle uygulandı.

İlk gün larvaların geçirgenliği ve birincil antikor inkübasyonu yapıldı. İkinci gün yıkama ve ikincil antikor inkübasyonu yapıldı. Üçüncü gün; yıkama yapıldı, larvalar sabitlendi ve gömme ortamında saklandı (360).

1. Gün:

Kimyasallarla muamele edilmiş larvalar yüksek doz Tricaine Metansülfonat ile muamele edildi ve yüzde 4'lük paraformaldehit (PFA) ile eppendorf tüpleri içerisinde bir gün fikse edildi.

Fiksasyonun ardından deneye başlanana dek %100 MetOH içerisinde -20°C'de saklandı. Larvalar, fosfat tamponlu salin (PBS) ve %0,1 Triton-X-100'de seyreltilmiş %75, %50, %25 MetOH konsantrasyonları ile yeniden seyreltildi.

4 kere PBS- %0,1 Triton-X-100 solüsyonuyla, 1 kere saf suyla 5'er dakika olmak üzere yıkamalar yapıldı.

Tüpler, fiksasyon ve geçirgenlik adımlarında yatay olarak yerleştirildi.

Saf su, soğuk asetonla değiştirildi ve -20°C'de 7 dakika inkübe edildi.

PBS- %0,1 Triton-X-100 solüsyonunda 2 kez 10'ar dakika yıkandı.

50 mL PBS; 0,5 g sığır serum albümini (BSA); 0,5 mL DMSO; 250 µL %10 Triton; 750 µL keçi serumu (GS: (15 µL/1 mL) kullanılarak PBDX_GS bloklama tamponu elde edildi. Larvalar, oda sıcaklığında 1 saat boyunca PBDX_GS bloklama tamponu çözeltisiyle inkübe edildi.

PBDX_GS uzaklaştırıldı ve zebra balığı larvalarında kaspaz antijenlerine bağlanan GS solüsyonu içeren 40 µL birincil antikor (Cleaved caspase-3, (5A1E) CST, rabbit) dilüsyonu eklendi (1:100).

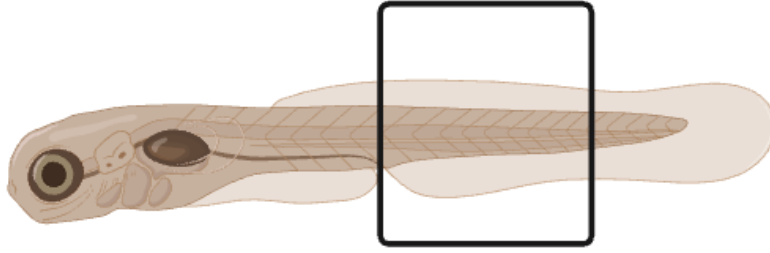
2. Gün:

Birincil antikor uzaklaştırıldı ve PBS- %0,1 Triton-X-100'de 2 kez 10'ar dakika yıkama yapıldı. %0,05 Tween-20 içeren PBS (PBS-T)'de 30 dakika boyunca 4 kere yıkandı. Sonraki adımlar karanlıkta gerçekleştirildi. Tüpleri ışıktan korumak için alüminyum folyo kullanıldı. PBS-T uzaklaştırıldı. Birincil antikora spesifik olarak bağlanan ve dolaylı olarak tespit eden, antikorun floresan boyamada sinyalini yükselten PBDX_GS'de seyreltilmiş 100 µL ikincil antikor (Fluorescein (FITC) AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) dilüsyonu (1:400) eklendi. Daha sonra DNA'yı işaretleyerek çekirdek sayısının değerlendirilmesini sağlayan floresan bir boya olan DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) (1:200) koyuldu. Oda sıcaklığında 1 saat ve ardından gece boyunca 4 °C'de inkübe edildi.

3. Gün:

İkincil antikor dilüsyonu uzaklaştırıldı ve PBS-T ile 4 kere 15'er dakika yıkama yapıldı. %4 PFA'da oda sıcaklığında 20 dakika süreyle muamele edildi. PBS-T ile 1 kere 5 dakika yıkama yapıldı.

PBS-T uzaklaştırıldı ve her bir tüpe 1 damla %80 gliserol eklendi. Gömme işlemi hemen gerçekleştirildi ve lamin üzerine yerleştirilen larvalar %80 gliserol içerisinde +4°C’de karanlıkta saklandı. Her bir koşul için 5’er larvadan kesitler alındı (Şekil 3.2).



Şekil 3.2: Zebra balığı larvalarından alınan kesitlerin şematik görseli

Ardından lazerli konfokal mikroskop ile 25x büyütmede görüntülendi (Resim 3.17). Cleaved-Caspase-3 pozitif olan hücreler ImageJ programı ile analiz edildi.



Resim 3.17: Whole- mount immün boyama sonrası kullanılan lazerli konfokal mikroskop

3.7. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

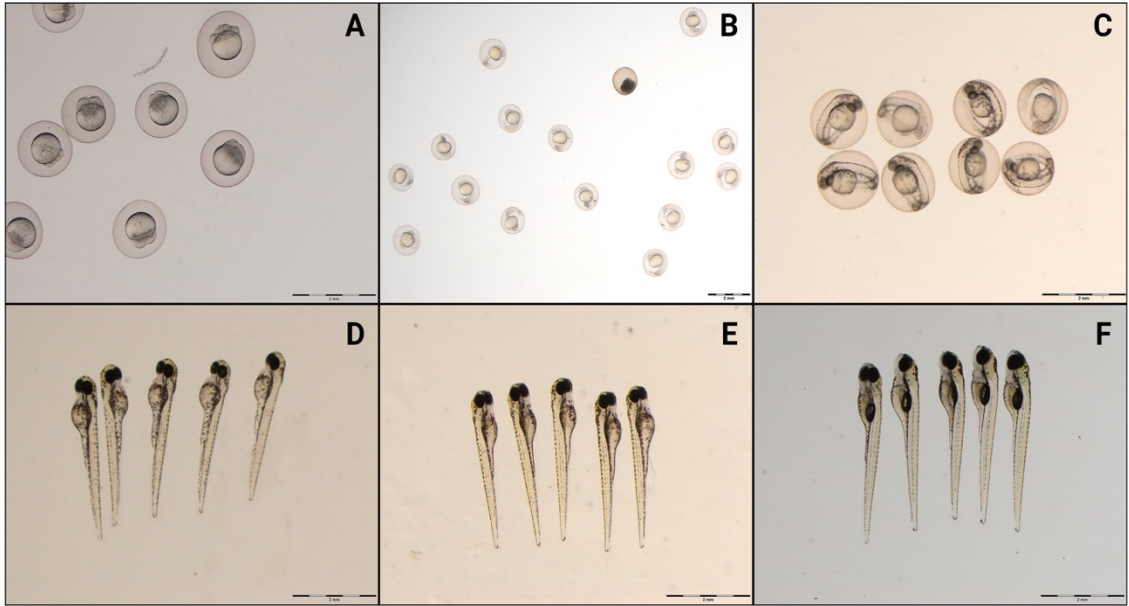
Tez çalışmasının sonuçları, deney grupları arasındaki anlamlılığı belirtmek için kullanılan ‘‘GraphPad Prism 8.0.2.’’ (GraphPad Prism, San Diego, CA) programı ile gerçekleştirilmiştir. embriyo sağ kalımlarının belirlenmesi, koryondan çıkış oranlarının değerlendirilmesi ve apoptoz bulgularının karşılaştırılmalı analizi için İki Yönlü Anova analizi 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

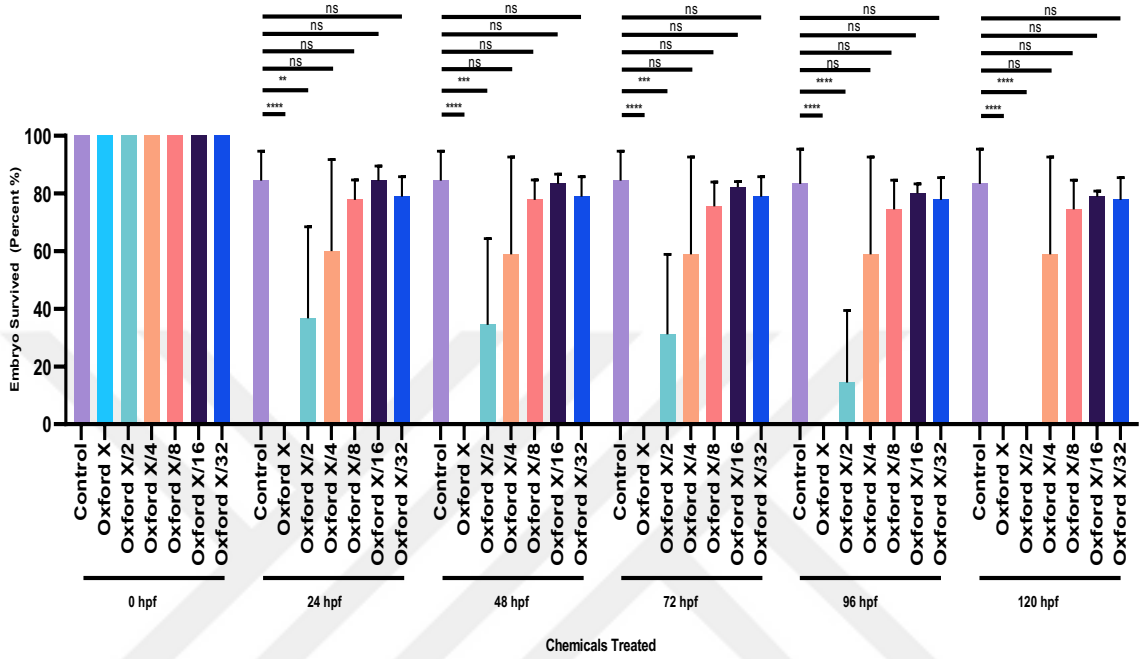
4.1. EMBRİYO SAĞ KALIMLARININ BELİRLENMESİ VE ANALİZ SONUÇLARI

Oxford ActiveCal PC (Oxford Scientific, Elmshorn, Almanya), Harvard BioCal-CAP (Harvard Dental International GmbH, Almanya), MTA Angelus (Angelus, Brezilya) ve Biodentin (Septodont, Fransa) içeren test solüsyonları ile şartlandırılmış ortamda büyümeye tabi tutulan zebra balığı embriyoları; 0, 24, 48, 72, 96 ve 120. saatlerde stereo mikroskop (Olympus SZX7 Stereo Mikroskop, Olympus Corporation, Japonya) ile incelenerek ölü sayıları manuel ve dijital olarak kaydedilmiştir. Materyal uygulanan embriyoların sağ kalımlarının zamana göre kontrol grubu ile karşılaştırmalı olarak analiz edilmiştir. Kontrol grubunda bulunan embriyoların zaman göre görüntüleri Resim 4.1’de görülmektedir.



Resim 4.1: Kontrol grubunda bulunan embriyoların zamana göre görüntüleri; 0. saat (A), 24. saat (B), 48. saat (C), 72. saat (D), 96. saat (E), 120. saat (F)

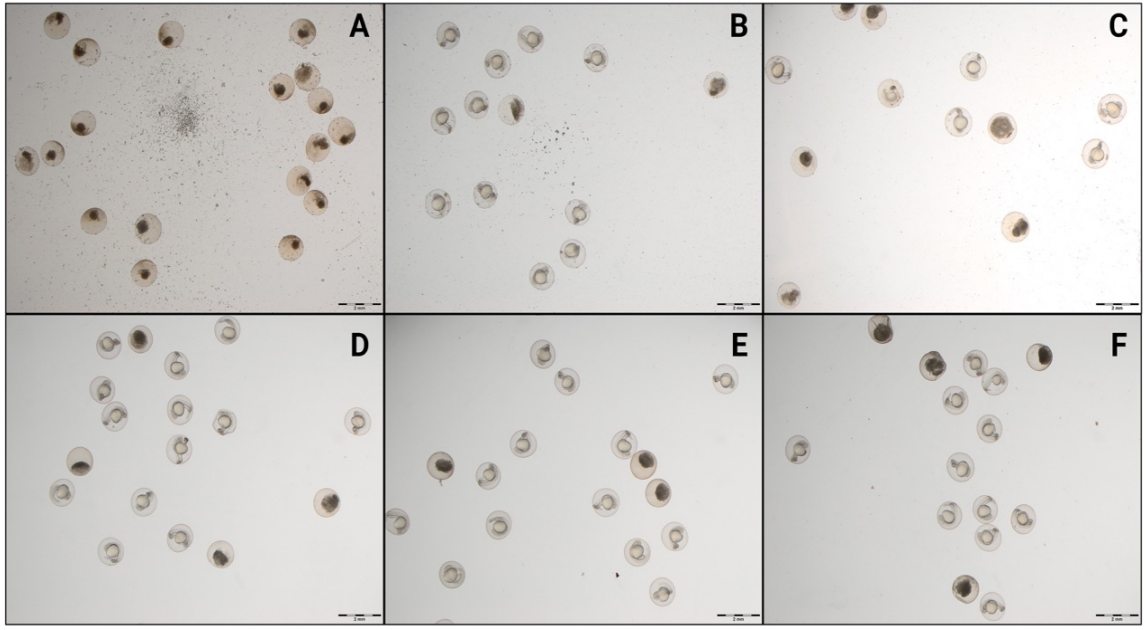
4.1.1. Farklı Dozlarda Oxford ActiveCal PC Materyali Uygulanan Embriyoların Sağ Kalım Oranlarının Belirli Zamanlarda Kontrol Grubu ile Karşılaştırmalı Analizi



Şekil 4.1: Farklı dozlarda Oxford ActiveCal PC materyali uygulanan embriyoların sağ kalım oranlarının belirli zamanlarda kontrol grubu ile karşılaştırmalı analizi

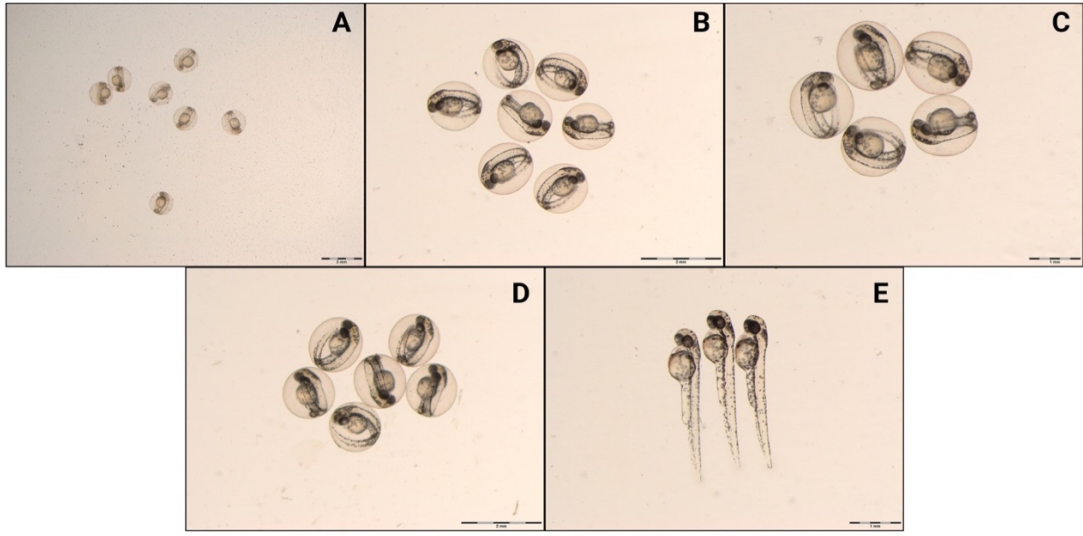
İstatistiksel anlamlılıkta kullanılan sembollerden; $p > 0,05$ (ns) istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamasını, $p \leq 0,05$ () sınırda anlamlılığın bulunmasını, $p \leq 0,01$ (**) istatistiksel anlamlılığı, $p \leq 0,001$ (***) istatistiksel anlamlılığın yüksek düzeyde olduğunu ve $p \leq 0,0001$ (****) istatistiksel anlamlılığın çok yüksek düzey olduğunu ifade etmektedir.*

24. saat: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında Oxford ActiveCal PC materyalinin X dozunda ($p \leq 0,0001$ (****)) istatistiksel anlamlılığın çok yüksek düzeyde olduğu belirlenmiştir. X/2 dozu ($p \leq 0,01$ (**)) istatistiksel olarak anlamlı bulunmuşken X/4, X/8, X/16 ve X/32 dozlarında ise ($p > 0,05$ (ns)) istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunamamıştır (Şekil 4.1). Oxford ActiveCal PC materyali uygulanan embriyoların 24. saatte farklı dozlara göre görüntüleri Resim 4.2’de görülmektedir.



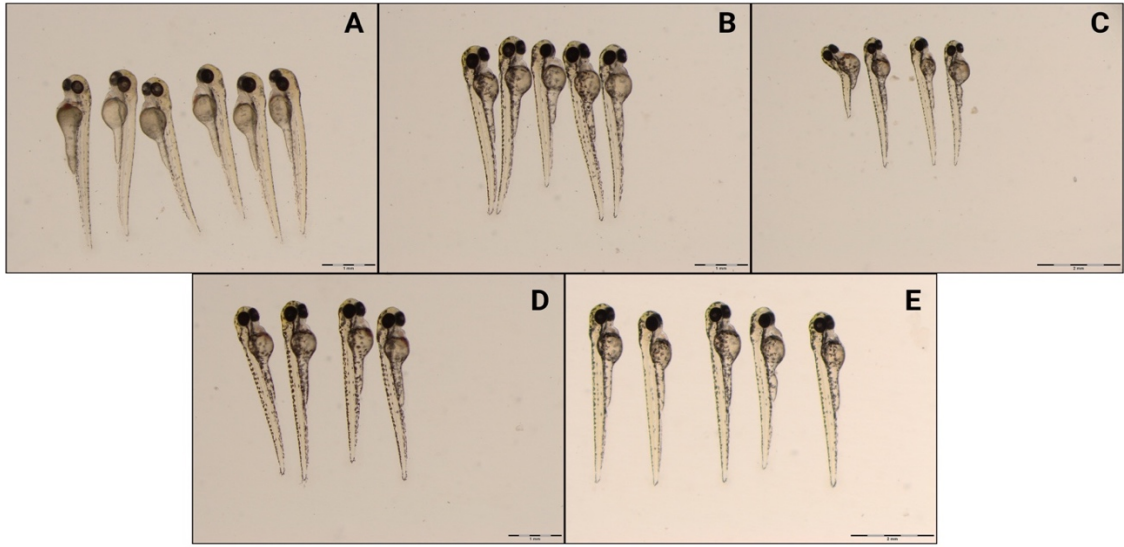
Resim 4.2: Oxford ActiveCal PC materyali uygulanan embriyoların 24. saatte farklı dozlara göre görüntüleri; X dozu (A), X/2 dozu (B), X/4 dozu (C), X/8 dozu (D), X/16 dozu (E), X/32 dozu (F)

48. saat: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında Oxford ActiveCal PC materyalinin X dozunda ($p \leq 0,0001(****)$) istatistiksel anlamlılığın çok yüksek düzeyde olduğu belirlenirken X/2 dozunun ($p \leq 0,001(***)$) istatistiksel anlamlılığın yüksek düzeyde olduğu bulunmuştur. X/4, X/8, X/16 ve X/32 dozlarında ise ($p > 0,05(ns)$) istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunamamıştır (Şekil 4.1). Oxford ActiveCal PC materyali uygulanan embriyoların 48. saatte farklı dozlara göre görüntüleri Resim 4.3'te görülmektedir.



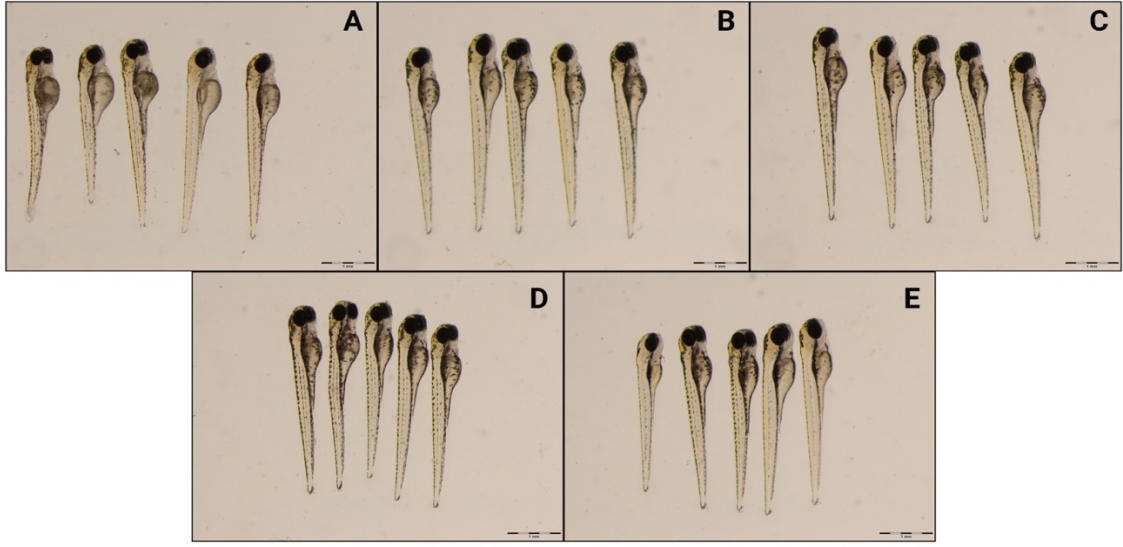
Resim 4.3: Oxford ActiveCal PC materyali uygulanan embriyoların 48. saatte farklı dozlara göre görüntüleri; X/2 doz (A), X/4 doz (B), X/8 doz (C), X/16 doz (D), X/32 doz (E)

72. saat: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında Oxford ActiveCal PC materyalinin X dozunda ($p \leq 0,0001$ (****)) istatistiksel anlamlılığın çok yüksek düzeyde olduğu belirlenirken X/2 dozunun ($p \leq 0,001$ (***) istatistiksel anlamlılığın yüksek düzeyde olduğu bulunmuştur. X/4, X/8, X/16 ve X/32 dozlarında ise ($p > 0,05$ (ns)) istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunamamıştır (Şekil 4.1). Oxford ActiveCal PC materyali uygulanan embriyoların 72. saatte farklı dozlara göre görüntüleri Resim 4.4'te görülmektedir.



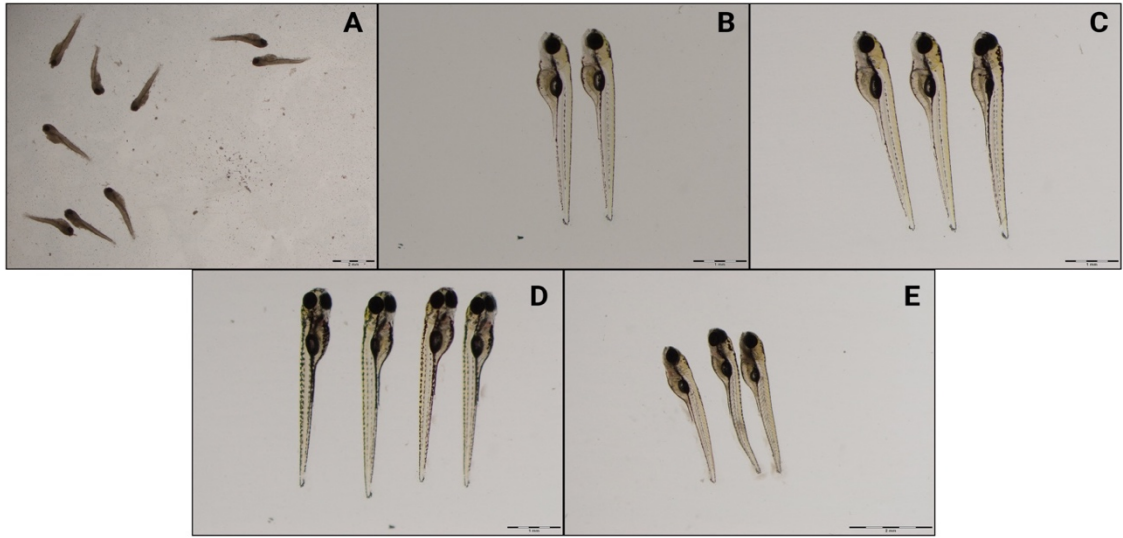
Resim 4.4: Oxford ActiveCal PC materyali uygulanan embriyoların 72. saatte farklı dozlara göre görüntüleri; X/2 dozu (A), X/4 dozu (B), X/8 dozu (C), X/16 dozu (D), X/32 dozu (E)

96. saat: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında Oxford ActiveCal PC materyalinin X ve X/2 dozlarında ($p \leq 0,0001$ (****)) istatistiksel anlamlılığın çok yüksek düzeyde olduğu belirlenmiştir. X/4, X/8, X/16 ve X/32 dozlarında ise ($p > 0,05$ (ns)) istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunamamıştır (Şekil 4.1). Oxford ActiveCal PC materyali uygulanan embriyoların 96. saatte farklı dozlara göre görüntüleri Resim 4.5'te görülmektedir.



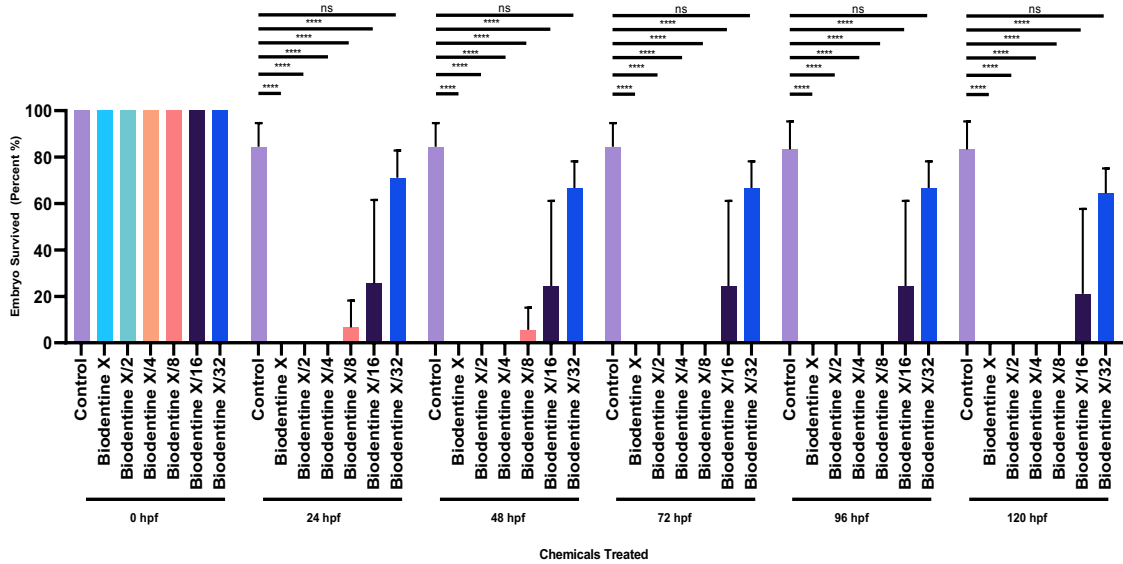
Resim 4.5: Oxford ActiveCal PC materyali uygulanan embriyoların 96. saatte farklı dozlara göre görüntüleri; X/2 dozu (A), X/4 dozu (B), X/8 dozu (C), X/16 dozu (D), X/32 dozu (E)

120. saat: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında Oxford ActiveCal PC materyalinin X ve X/2 dozlarında ($p \leq 0,0001$ (****)) istatistiksel anlamlılığın çok yüksek düzeyde olduğu belirlenmiştir. X/4, X/8, X/16 ve X/32 dozlarında ise ($p > 0,05$ (ns)) istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunamamıştır (Şekil 4.1). Oxford ActiveCal PC materyali uygulanan embriyoların 120. saatte farklı dozlara göre görüntüleri Resim 4.6’da görülmektedir.



Resim 4.6: Oxford ActiveCal PC materyali uygulanan embriyoların 120. saatte farklı dozlara göre görüntüleri; X/2 dozu (A), X/4 dozu (B), X/8 dozu (C), X/16 dozu (D), X/32 dozu (E)

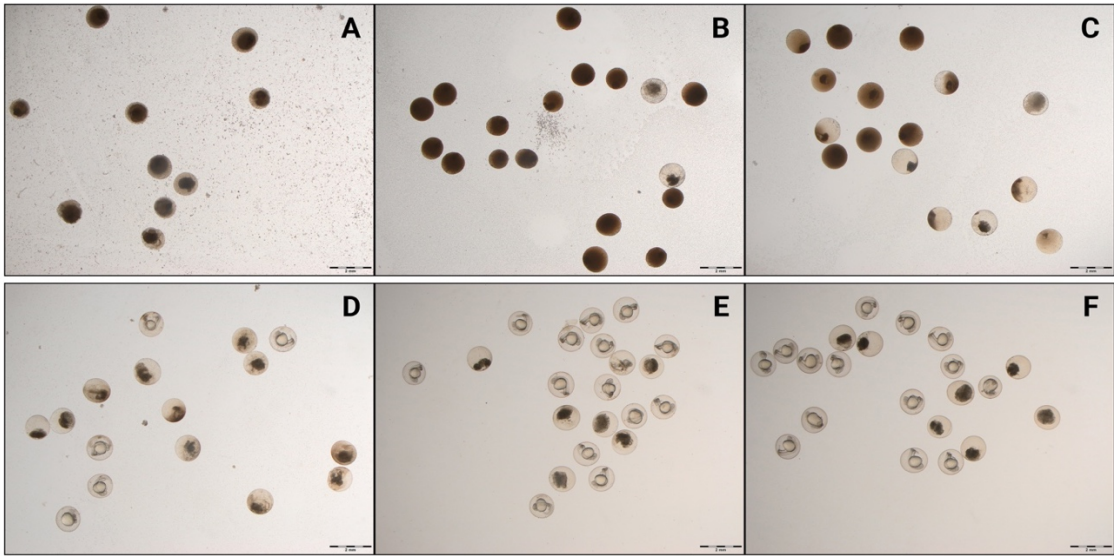
4.1.2. Farklı Dozlarda Biodentine Materyali Uygulanan Embriyoların Sağ Kalım Oranlarının Belirli Zamanlarda Kontrol Grubu ile Karşılaştırmalı Analizi



Şekil 4.2: Farklı dozlarda Biodentine materyali uygulanan embriyoların sağ kalım oranlarının belirli zamanlarda kontrol grubu ile karşılaştırmalı analizi

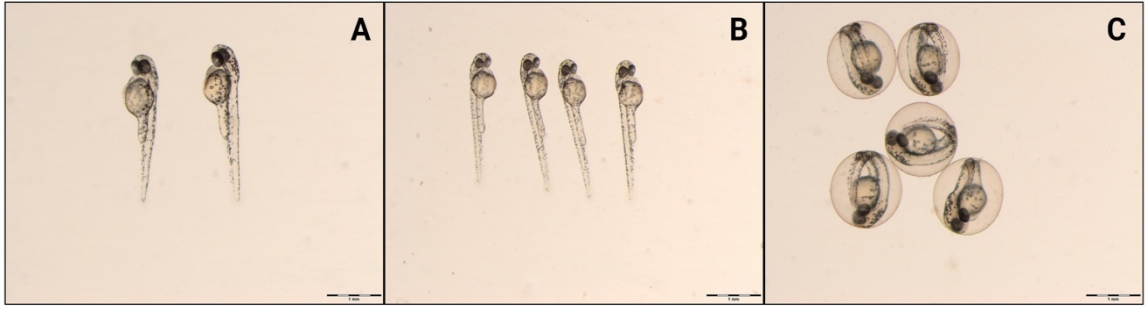
İstatistiksel anlamlılıkta kullanılan sembollerden; $p > 0.05$ (ns) istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamasını, $p \leq 0,05$ () sınırda anlamlılığın bulunmasını, $p \leq 0,01$ (**) istatistiksel anlamlılığı, $p \leq 0,001$ (***) istatistiksel anlamlılığın yüksek düzeyde olduğunu ve $p \leq 0,0001$ (****) istatistiksel anlamlılığın çok yüksek düzey olduğunu ifade etmektedir.*

24. saat: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında Biodentine materyalinin X, X/2, X/4, X/8 ve X/16 dozlarında ($p \leq 0,0001$ (****)) istatistiksel anlamlılığın çok yüksek düzeyde olduğu belirlenmiş olup X/32 dozunda ($p > 0,05$ (ns)) istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunamamıştır (Şekil 4.2). Biodentine materyali uygulanan embriyoların 24. saatte farklı dozlara göre görüntüleri Resim 4.7’de görülmektedir.



Resim 4.7: Biodentine materyali uygulanan embriyoların 24. saatte farklı dozlara göre görüntüleri; X dozu (A), X/2 dozu (B), X/4 dozu (C), X/8 dozu (D), X/16 dozu (E), X/32 dozu (F)

48. saat: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında Biodentine materyalinin X, X/2, X/4, X/8 ve X/16 dozlarında ($p \leq 0,0001$ (****)) istatistiksel anlamlılığın çok yüksek düzeyde olduğu belirlenmiş olup X/32 dozunda ($p > 0,05$ (ns)) istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunamamıştır (Şekil 4.2). Biodentine materyali uygulanan embriyoların 48. saatte farklı dozlara göre görüntüleri Resim 4.8’de görülmektedir.



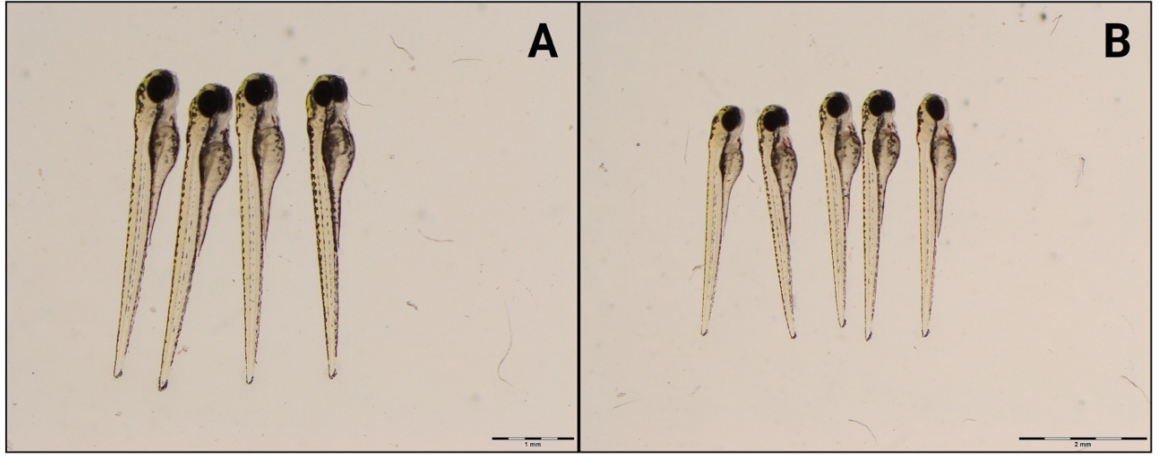
Resim 4.8: Biodentine materyali uygulanan embriyoların 48. saatte farklı dozlara göre görüntüleri; X/8 dozu (A), X/16 dozu (B), X/32 dozu (C)

72. saat: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında Biodentine materyalinin X, X/2, X/4, X/8 ve X/16 dozlarında ($p \leq 0,0001$ (****)) istatistiksel anlamlılığın çok yüksek düzeyde olduğu belirlenmiş olup X/32 dozunda ($p > 0,05$ (ns)) istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunamamıştır (Şekil 4.2). Biodentine materyali uygulanan embriyoların 72. saatte farklı dozlara göre görüntüleri Resim 4.9’da görülmektedir.



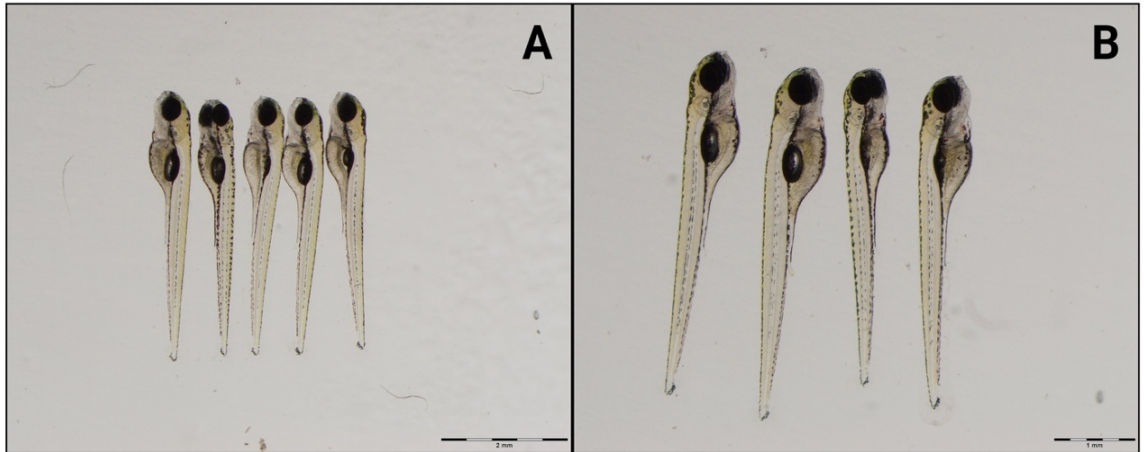
Resim 4.9: Biodentine materyali uygulanan embriyoların 72. saatte farklı dozlara göre görüntüleri; X/8 dozu (A), X/16 dozu (B), X/32 dozu (C)

96. saat: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında Biodentine materyalinin X, X/2, X/4, X/8 ve X/16 dozlarında ($p \leq 0,0001$ (****)) istatistiksel anlamlılığın çok yüksek düzeyde olduğu belirlenmiş olup X/32 dozunda ($p > 0,05$ (ns)) istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunamamıştır (Şekil 4.2). Biodentine materyali uygulanan embriyoların 96. saatte farklı dozlara göre görüntüleri Resim 4.10’da görülmektedir.



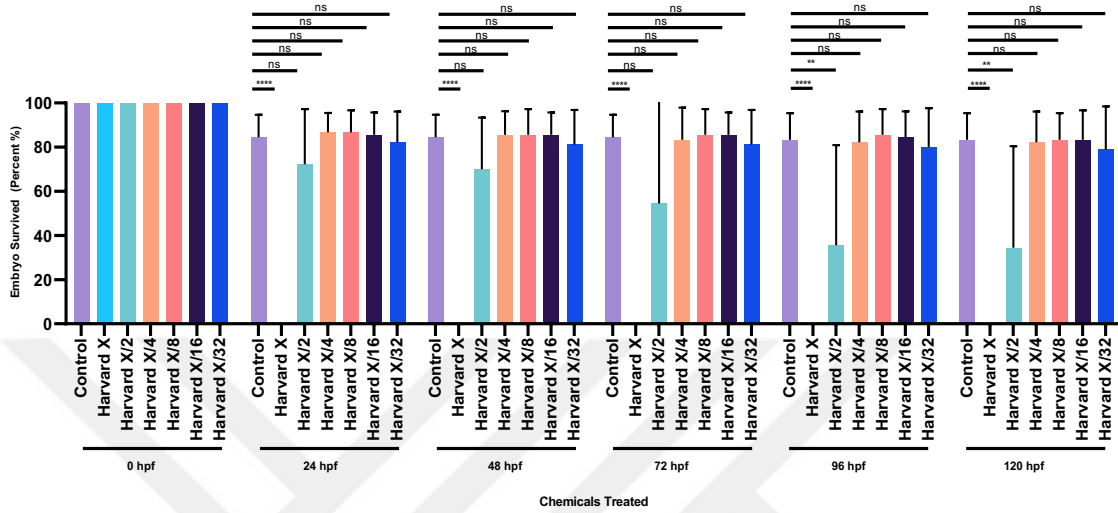
Resim 4.10: Biodentine materyali uygulanan embriyoların 96. saatte farklı dozlara göre görüntüleri; X/16 dozu (A), X/32 dozu (B)

120. saat: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında Biodentine materyalinin X, X/2, X/4, X/8 ve X/16 dozlarında ($p \leq 0,0001$ (****)) istatistiksel anlamlılığın çok yüksek düzeyde olduğu belirlenmiş olup X/32 dozunda ($p > 0,05$ (ns)) istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunamamıştır (Şekil 4.2). Biodentine materyali uygulanan embriyoların 120. saatte farklı dozlara göre görüntüleri Resim 4.11’de görülmektedir.



Resim 4.11: Biodentine materyali uygulanan embriyoların 120. saatte farklı dozlara göre görüntüleri; X/16 dozu (A), X/32 dozu (B)

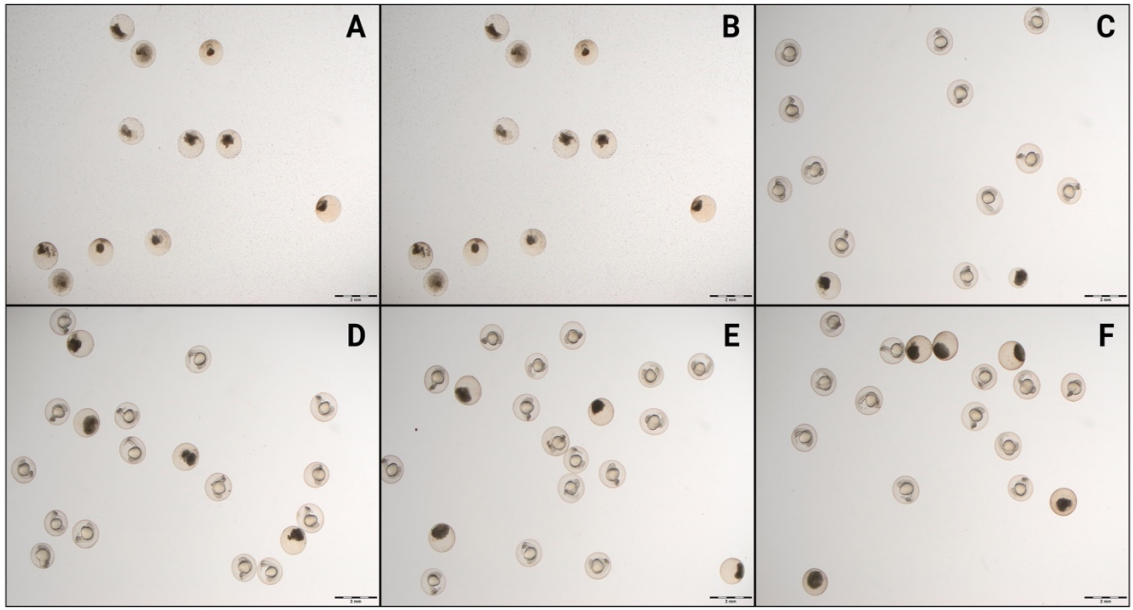
4.1.3. Farklı Dozlarda Harvard BioCal- CAP Materyali Uygulanan Embriyoların Sağ Kalım Oranlarının Belirli Zamanlarda Kontrol Grubu ile Karşılaştırmalı Analizi



Şekil 4.3: Farklı dozlarda Harvard BioCal- CAP materyali uygulanan embriyoların sağ kalım oranlarının belirli zamanlarda kontrol grubu ile karşılaştırmalı analizi

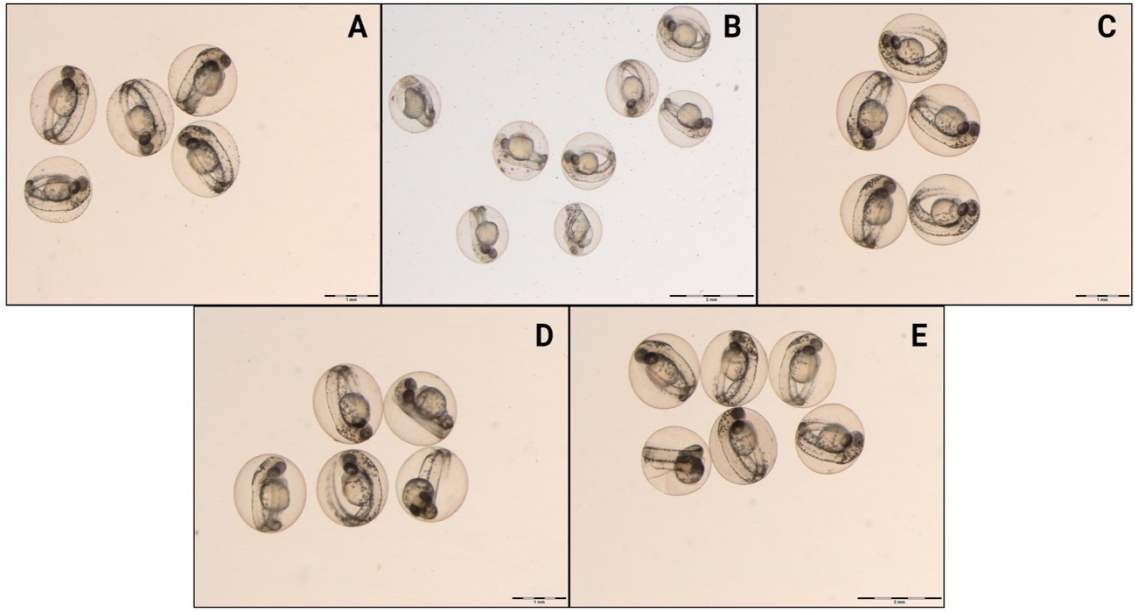
İstatistiksel anlamlılıkta kullanılan sembollerden; $p > 0,05$ (ns) istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamasını, $p \leq 0,05$ () sınırda anlamlılığın bulunmasını, $p \leq 0,01$ (**) istatistiksel anlamlılığı, $p \leq 0,001$ (***) istatistiksel anlamlılığın yüksek düzeyde olduğunu ve $p \leq 0,0001$ (****) istatistiksel anlamlılığın çok yüksek düzey olduğunu ifade etmektedir.*

24. saat: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında Harvard BioCal- CAP materyalinin X dozunun ($p \leq 0,0001$ (****)) istatistiksel anlamlılığın çok yüksek düzey olduğu belirlenmiştir. X/2, X/4, X/8, X/16 ve X/32 dozlarında ise ($p > 0,05$ (ns)) istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunamamıştır (Şekil 4.3). Harvard BioCal- CAP materyali uygulanan embriyoların 24. saatte farklı dozlara göre görüntüleri Resim 4.12’de gösterilmektedir.



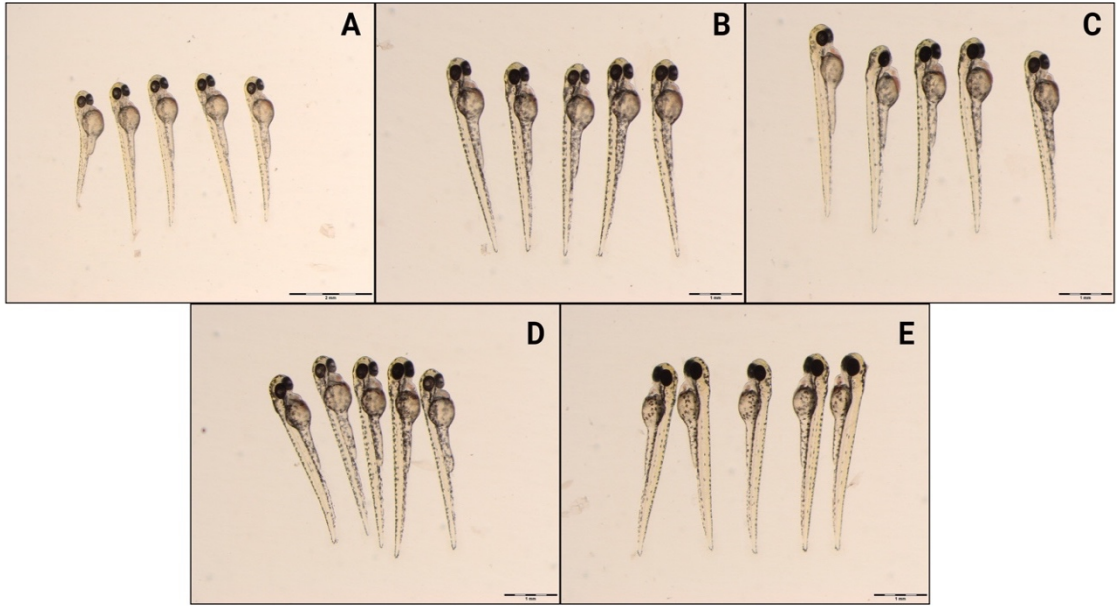
Resim 4.12: Harward BioCal- CAP materyali uygulanan embriyoların 24. saatte farklı dozlara göre görüntüleri; X dozu (A), X/2 dozu (B), X/4 dozu (C), X/8 dozu (D), X/16 dozu (E), X/32 dozu (F)

48. saat: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında Harward BioCal- CAP materyalinin X dozunun ($p \leq 0,0001$ (****)) istatistiksel anlamlılığın çok yüksek düzey olduğu belirlenmiştir. X/2, X/4, X/8, X/16 ve X/32 dozlarında ise ($p > 0,05$ (ns)) istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunamamıştır (Şekil 4.3). Harward BioCal- CAP materyali uygulanan embriyoların 48. saatte farklı dozlara göre görüntüleri Resim 4.13'te gösterilmektedir.



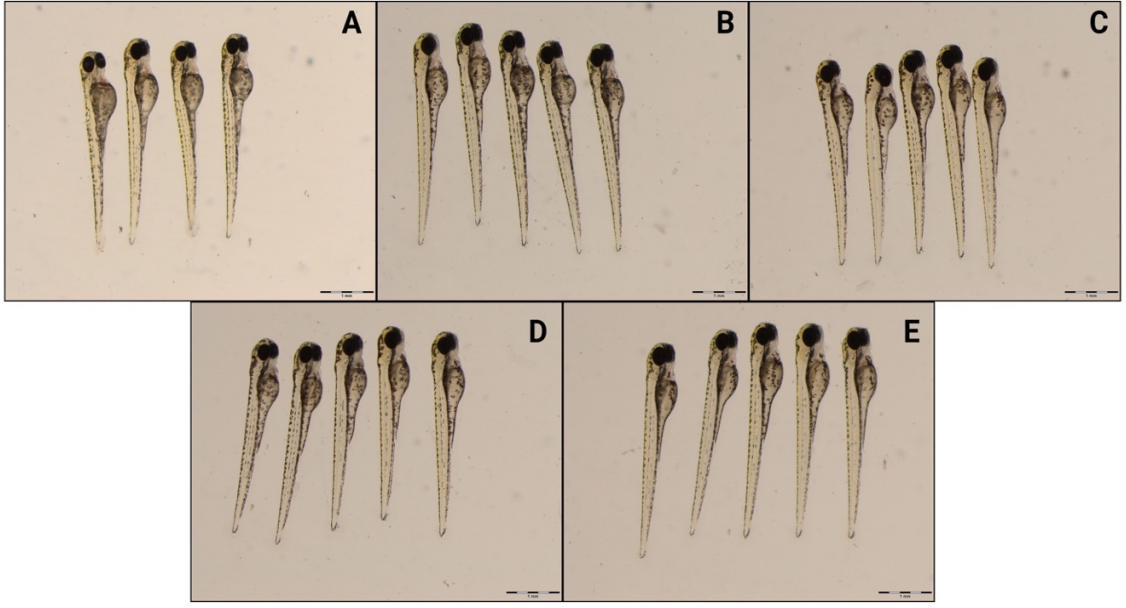
Resim 4.13: Harward BioCal- CAP materyali uygulanan embriyoların 48. saatte farklı dozlara göre görüntüleri; X/2 dozu (A), X/4 dozu (B), X/8 dozu (C), X/16 dozu (D), X/32 dozu (E)

72. saat: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında Harward BioCal- CAP materyalinin X dozunun ($p \leq 0,0001$ (****)) istatistiksel anlamlılığın çok yüksek düzey olduğu belirlenmiştir. X/2, X/4, X/8, X/16 ve X/32 dozlarında ise ($p > 0,05$ (ns)) istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunamamıştır (Şekil 4.3). Harward BioCal- CAP materyali uygulanan embriyoların 72. saatte farklı dozlara göre görüntüleri Resim 4.14'te gösterilmektedir.



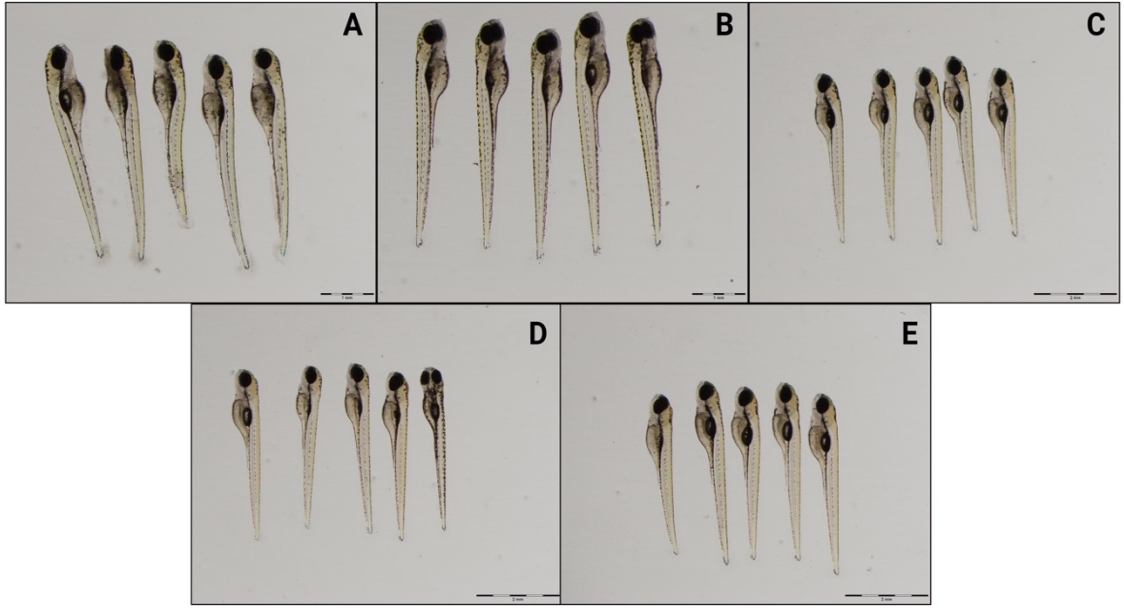
Resim 4.14: Harvard BioCal- CAP materyali uygulanan embriyoların 72. saatte farklı dozlara göre görüntüleri; X/2 dozu (A), X/4 dozu (B), X/8 dozu (C), X/16 dozu (D), X/32 dozu (E)

96. saat: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında Harvard BioCal- CAP materyalinin X dozunun ($p \leq 0,0001$ (****)) istatistiksel anlamlılığın çok yüksek düzey; X/2 dozunun ise ($p \leq 0,01$ (**)) istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir. X/4, X/8, X/16 ve X/32 dozlarında ise ($p > 0,05$ (ns)) istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunamamıştır (Şekil 4.3). Harvard BioCal- CAP materyali uygulanan embriyoların 96. saatte farklı dozlara göre görüntüleri Resim 4.15’te gösterilmektedir.



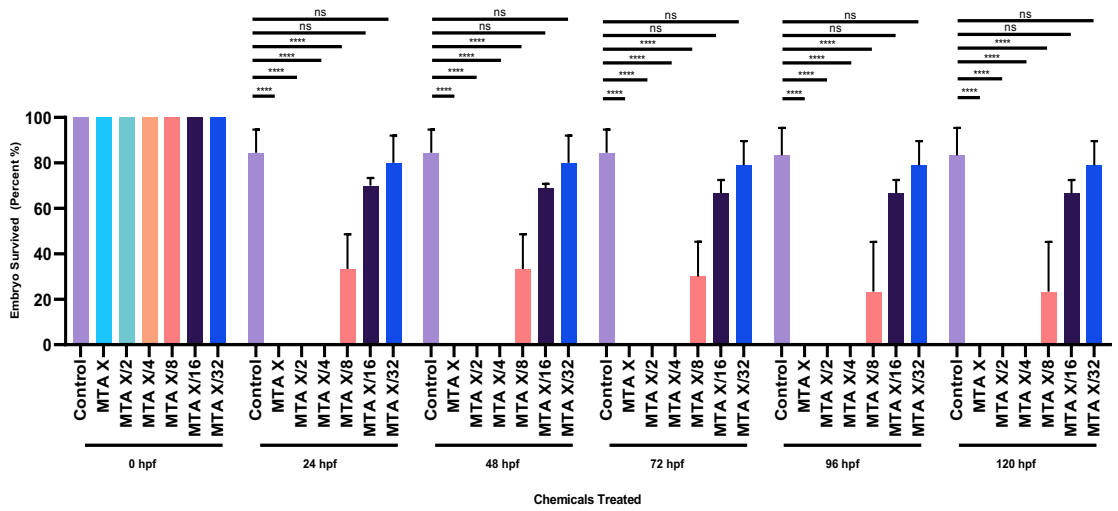
Resim 4.15: Harvard BioCal- CAP materyali uygulanan embriyoların 96. saatte farklı dozlara göre görüntüleri; X/2 dozu (A), X/4 dozu (B), X/8 dozu (C), X/16 dozu (D), X/32 dozu (E)

120. saat: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında Harvard BioCal- CAP materyalinin X dozunun ($p \leq 0,0001$ (****)) istatistiksel anlamlılığın çok yüksek düzey; X/2 dozunun ise ($p \leq 0,01$ (**)) istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir. X/4, X/8, X/16 ve X/32 dozlarında ise ($p > 0,05$ (ns)) istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunamamıştır (Şekil 4.3). Harvard BioCal- CAP materyali uygulanan embriyoların 120. saatte farklı dozlara göre görüntüleri Resim 4.16’da gösterilmektedir.



Resim 4.16: Harvard BioCal- CAP materyali uygulanan embriyoların 120. saatte farklı dozlara göre görüntüleri; X/2 dozu (A), X/4 dozu (B), X/8 dozu (C), X/16 dozu (D), X/32 dozu (E)

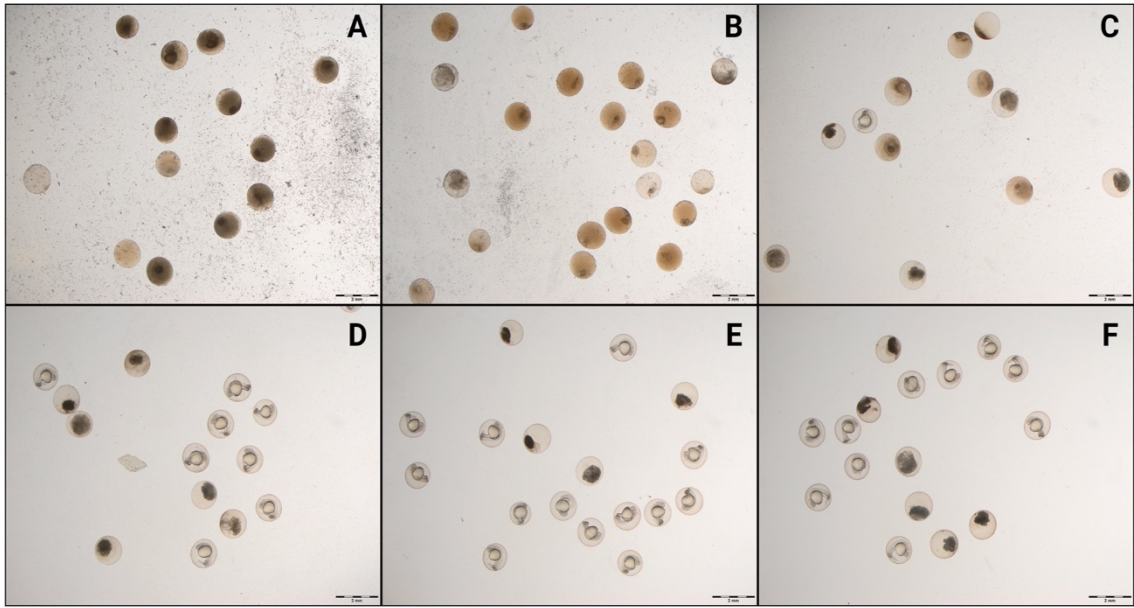
4.1.4. Farklı Dozlarda MTA Angelus Materyali Uygulanan Embriyoların Sağ Kalım Oranlarının Belirli Zamanlarda Kontrol Grubu ile Karşılaştırmalı Analizi



Şekil 4.4: Farklı dozlarda MTA Angelus materyali uygulanan embriyoların sağ kalım oranlarının belirli zamanlarda kontrol grubu ile karşılaştırmalı analizi

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.*

24. saat: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında MTA Angelus materyalinin X, X/2, X/4, X/8 dozlarında ($p \leq 0.0001$ (****)) istatistiksel anlamlılığın çok yüksek düzey olduğu belirlenirken X/16 ve X/32 dozlarında ($p > 0.05$ (ns)) istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunamamıştır (Şekil 4.4). MTA Angelus materyali uygulanan embriyoların 24. saatte farklı dozlara göre görüntüleri Resim 4.17’de gösterilmektedir.



Resim 4.17: MTA Angelus materyali uygulanan embriyoların 24. saatte farklı dozlara göre görüntüleri; X dozu (A), X/2 dozu (B), X/4 dozu (C), X/8 dozu (D), X/16 dozu (E), X/32 dozu (F)

48. saat: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında MTA Angelus materyalinin X, X/2, X/4, X/8 dozlarında ($p \leq 0.0001$ (****)) istatistiksel anlamlılığın çok yüksek düzey olduğu belirlenirken X/16 ve X/32 dozlarında ($p > 0.05$ (ns)) istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunamamıştır (Şekil 4.4). MTA Angelus materyali uygulanan embriyoların 48. saatte farklı dozlara göre görüntüleri Resim 4.18’de gösterilmektedir.



Resim 4.18: MTA Angelus materyali uygulanan embriyoların 48. saatte farklı dozlara göre görüntüleri; X/8 dozu (A), X/16 dozu (B), X/32 dozu (C)

72. saat: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında MTA Angelus materyalinin X, X/2, X/4, X/8 dozlarında ($p \leq 0,0001$ (****)) istatistiksel anlamlılığın çok yüksek düzey olduğu belirlenirken X/16 ve X/32 dozlarında ($p > 0,05$ (ns)) istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunamamıştır (Şekil 4.4). MTA Angelus materyali uygulanan embriyoların 72. saatte farklı dozlara göre görüntüleri Resim 4.19’da gösterilmektedir.



Resim 4.19: MTA Angelus materyali uygulanan embriyoların 72. saatte farklı dozlara göre görüntüleri; X/8 dozu (A), X/16 dozu (B), X/32 dozu (C)

96. saat: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında MTA Angelus materyalinin X, X/2, X/4, X/8 dozlarında ($p \leq 0,0001$ (****)) istatistiksel anlamlılığın çok yüksek düzey olduğu belirlenirken X/16 ve X/32 dozlarında ($p > 0,05$ (ns)) istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunamamıştır (Şekil 4.4). MTA Angelus materyali uygulanan embriyoların 96. saatte farklı dozlara göre görüntüleri Resim 4.20’de gösterilmektedir.



Resim 4.20: MTA Angelus materyali uygulanan embriyoların 96. saatte farklı dozlara göre görüntüleri; X/8 dozu (A), X/16 dozu (B), X/32 dozu (C)

120. saat: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında MTA Angelus materyalinin X, X/2, X/4, X/8 dozlarında ($p \leq 0,0001$ (****)) istatistiksel anlamlılığın çok yüksek düzey olduğu belirlenirken X/16 ve X/32 dozlarında ($p > 0,05$ (ns)) istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunamamıştır (Şekil 4.4). MTA Angelus materyali uygulanan embriyoların 120. saatte farklı dozlara göre görüntüleri Resim 4.21’de gösterilmektedir.

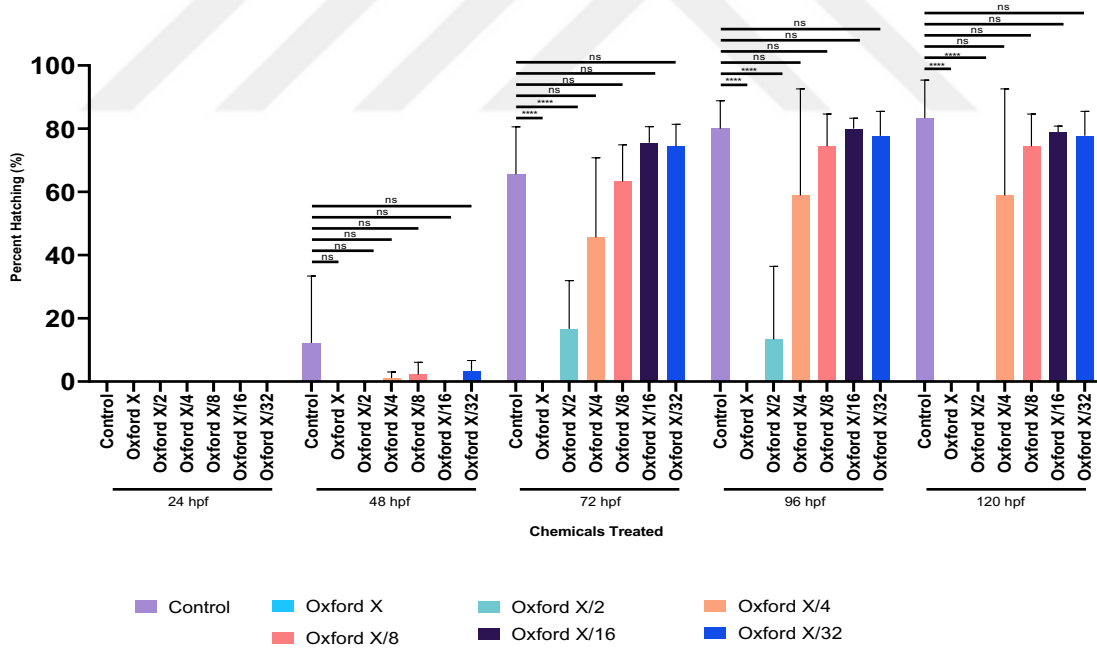


Resim 4.21: MTA Angelus materyali uygulanan embriyoların 120. saatte farklı dozlara göre görüntüleri; X/8 dozu (A), X/16 dozu (B), X/32 dozu (C)

4.2. KORYONDAN ÇIKIŞ ORANLARININ BELİRLENMESİ VE ANALİZ SONUÇLARI

Oxford ActiveCal PC (Oxford Scientific, Elmshorn, Almanya), Harvard BioCal-CAP (Harvard Dental Internationl GmbH, Almanya), MTA Angelus (Angelus, Brezilya) ve Biodentin (Septodont, Fransa) içeren test solüsyonları ile şartlandırılmış ortamda büyümeye tabi tutulan zebra balığı embriyoları; 24, 48, 72, 96 ve 120. saatlerde stereo mikroskop (Olympus SZX7 Stereo Mikroskop, Olympus Corporation, Japonya) ile incelenerek ölü sayıları manuel ve dijital olarak kaydedilmiştir. Materyal uygulanan embriyoların koryondan çıkış oranlarının zamana göre kontrol grubu ile karşılaştırmalı olarak analiz edilmiştir.

4.2.1. Farklı Dozlarda Oxford ActiveCal PC Materyali Uygulanan Embriyoların Koryondan Çıkış Oranlarının Belirli Zamanlarda Kontrol Grubu ile Karşılaştırmalı Analizi



Şekil 4.5: Farklı dozlarda Oxford ActiveCal PC materyali uygulanan embriyoların koryondan çıkış oranlarının belirli zamanlarda kontrol grubu ile karşılaştırmalı analizi

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.*

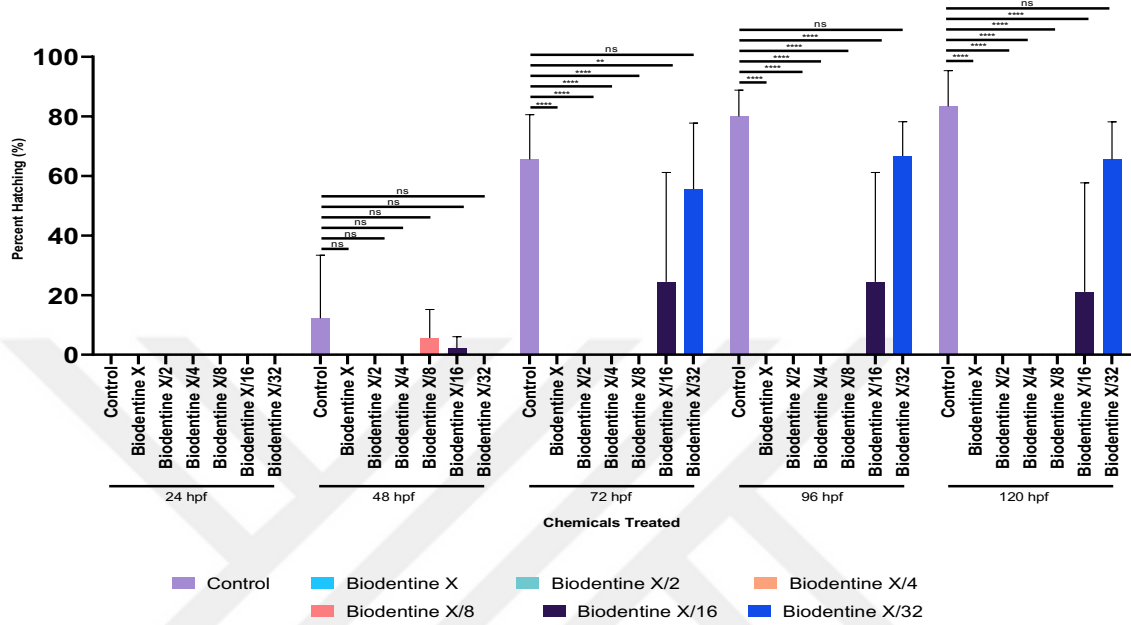
48. saat: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında Oxford ActiveCal PC materyalinin tüm dozlarında ($p > 0,05(ns)$) istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunamamıştır (Şekil 4.5).

72. saat: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında Oxford ActiveCal PC materyalinin X ve X/2 dozlarında ($p \leq 0,0001(****)$) istatistiksel anlamlılığın çok yüksek düzey olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte X/4, X/8, X/16 ve X/32 dozlarında ($p > 0,05(ns)$) istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunamamıştır (Şekil 4.5).

96. saat: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında Oxford ActiveCal PC materyalinin X ve X/2 dozlarında ($p \leq 0,0001(****)$) istatistiksel anlamlılığın çok yüksek düzey olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte X/4, X/8, X/16 ve X/32 dozlarında ($p > 0,05(ns)$) istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunamamıştır (Şekil 4.5).

120. saat: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında Oxford ActiveCal PC materyalinin X ve X/2 dozlarında ($p \leq 0,0001(****)$) istatistiksel anlamlılığın çok yüksek düzey olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte X/4, X/8, X/16 ve X/32 dozlarında ($p > 0,05(ns)$) istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunamamıştır (Şekil 4.5).

4.2.2. Farklı Dozlarda Biodentine Materyali Uygulanan Embriyoların Koryondan Çıkış Oranlarının Belirli Zamanlarda Kontrol Grubu ile Karşılaştırmalı Analizi



Şekil 4.6: Farklı dozlarda Biodentine materyali uygulanan embriyoların koryondan çıkış oranlarının belirli zamanlarda kontrol grubu ile karşılaştırmalı analizi

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.*

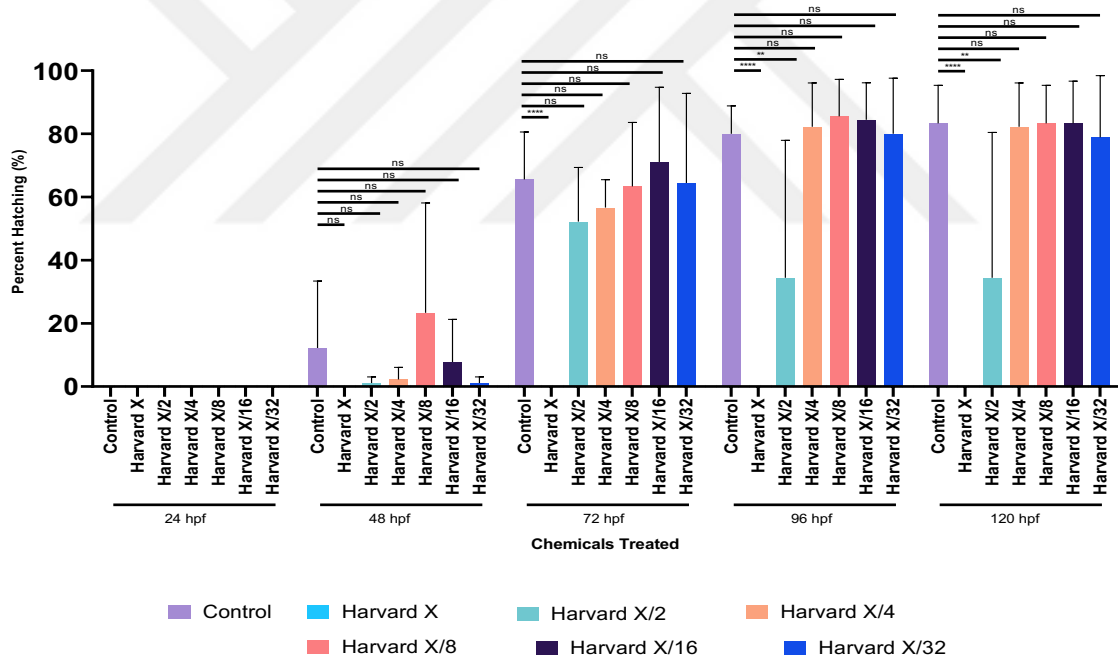
48. saat: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında Biodentine materyalinin tüm dozlarında ($p > 0,05$ (ns)) istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunamamıştır (Şekil 4.6).

72. saat: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında Biodentine materyalinin X, X/2, X/4 ve X/8 dozlarında ($p \leq 0,0001$ (****)) istatistiksel anlamlılığın çok yüksek düzeyde olduğu X/16 dozunun ise ($p \leq 0,01$ (**)) istatistiksel anlamlılık gösterdiği belirlenmiştir. Bununla birlikte X/32 dozunda ($p > 0,05$ (ns)) istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunamamıştır (Şekil 4.6).

96. saat: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında Biodentine materyalinin X, X/2, X/4, X/8 ve X/16 dozlarında ($p \leq 0,0001$ (****)) istatistiksel anlamlılığın çok yüksek düzeyde olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte X/32 dozunda ($p > 0,05$ (ns)) istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunamamıştır (Şekil 4.6).

120. saat: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında Biodentine materyalinin X, X/2, X/4, X/8 ve X/16 dozlarında ($p \leq 0,0001$ (****)) istatistiksel anlamlılığın çok yüksek düzeyde olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte X/32 dozunda ($p > 0,05$ (ns)) istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunamamıştır (Şekil 4.6).

4.2.3. Farklı Dozlarda Harvard BioCal- CAP Materyali Uygulanan Embriyoların Koryondan Çıkış Oranlarının Belirli Zamanlarda Kontrol Grubu ile Karşılaştırmalı Analizi



Şekil 4.7: Farklı dozlarda Harvard BioCal- CAP materyali uygulanan embriyoların koryondan çıkış oranlarının belirli zamanlarda kontrol grubu ile karşılaştırmalı analizi

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.*

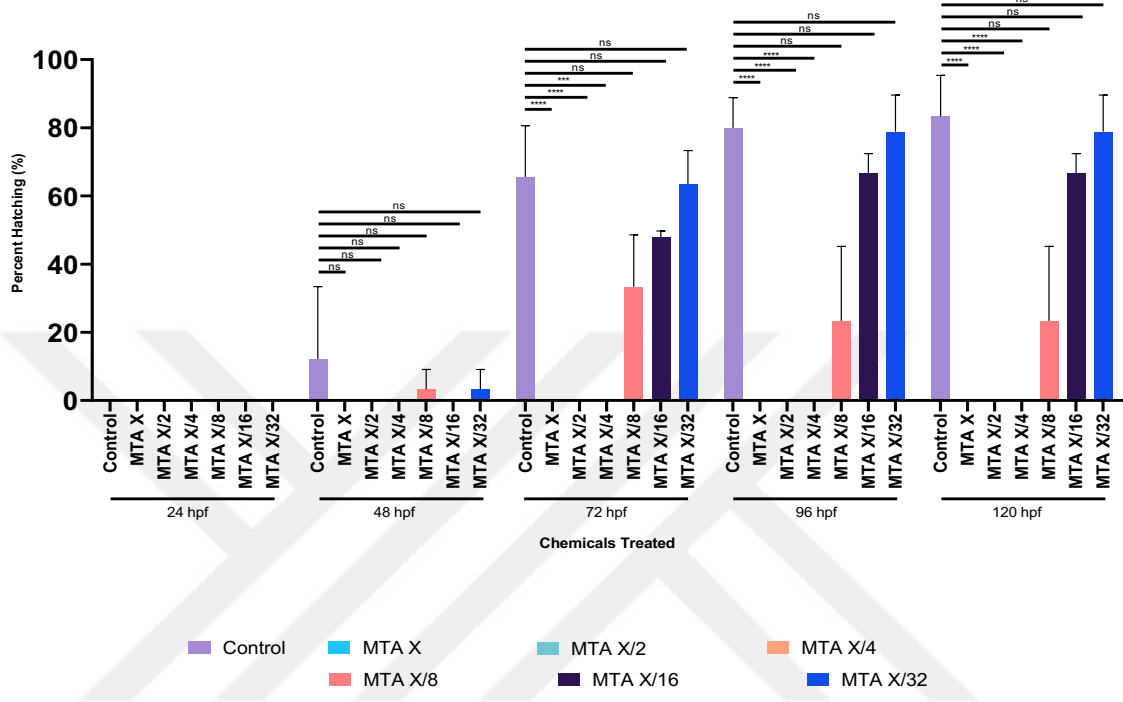
48. saat: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında Harvard BioCal-CAP materyalinin tüm dozlarında ($p > 0,05$ (ns)) istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunamamıştır (Şekil 4.7).

72. saat: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında Harvard BioCal-CAP materyalinin X dozunda ($p \leq 0,0001$ (****)) istatistiksel anlamlılığın çok yüksek düzey olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte X/2, X/4, X/8, X/16 ve X/32 dozlarında ($p > 0,05$ (ns)) istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunamamıştır (Şekil 4.7).

96. saat: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında Harvard BioCal-CAP materyalinin X dozunda ($p \leq 0,0001$ (****)) istatistiksel anlamlılığın çok yüksek düzey olduğu; X/2 dozunun ise ($p \leq 0,01$ (**)) istatistiksel anlamlılık gösterdiği belirlenmiştir. X/4, X/8, X/16 ve X/32 dozlarında ($p > 0,05$ (ns)) istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunamamıştır (Şekil 4.7).

120. saat: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında Harvard BioCal-CAP materyalinin X dozunda ($p \leq 0,0001$ (****)) istatistiksel anlamlılığın çok yüksek düzey olduğu; X/2 dozunun ise ($p \leq 0,01$ (**)) istatistiksel anlamlılık gösterdiği belirlenmiştir. X/4, X/8, X/16 ve X/32 dozlarında ($p > 0,05$ (ns)) istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunamamıştır (Şekil 4.7).

4.2.4. Farklı Dozlarda MTA Angelus Materyali Uygulanan Embriyoların Koryondan Çıkış Oranlarının Belirli Zamanlarda Kontrol Grubu ile Karşılaştırmalı Analizi



Şekil 4.8: Farklı dozlarda MTA Angelus materyali uygulanan embriyoların koryondan çıkış oranlarının belirli zamanlarda kontrol grubu ile karşılaştırmalı analizi

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.*

48. saat: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında MTA Angelus materyalinin tüm dozlarında ($p > 0,05$ (ns)) istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunamamıştır (Şekil 4.8).

72. saat: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında MTA Angelus materyalinin X ve X/2 dozlarında ($p \leq 0,0001$ (****)) istatistiksel anlamlılığın çok yüksek düzey; X/4 dozunun ise ($p \leq 0,001$ (***) istatistiksel anlamlılığının yüksek düzeyde olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte X/8, X/16 ve X/32 dozlarında ($p > 0,05$ (ns)) istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunamamıştır (Şekil 4.8).

96. saat: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında MTA Angelus materyalinin X, X/2 ve X/4 dozlarında ($p \leq 0,0001$ (****)) istatistiksel anlamlılığın çok yüksek düzey olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte X/8, X/16 ve X/32 dozlarında ($p > 0,05$ (ns)) istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunamamıştır (Şekil 4.8).

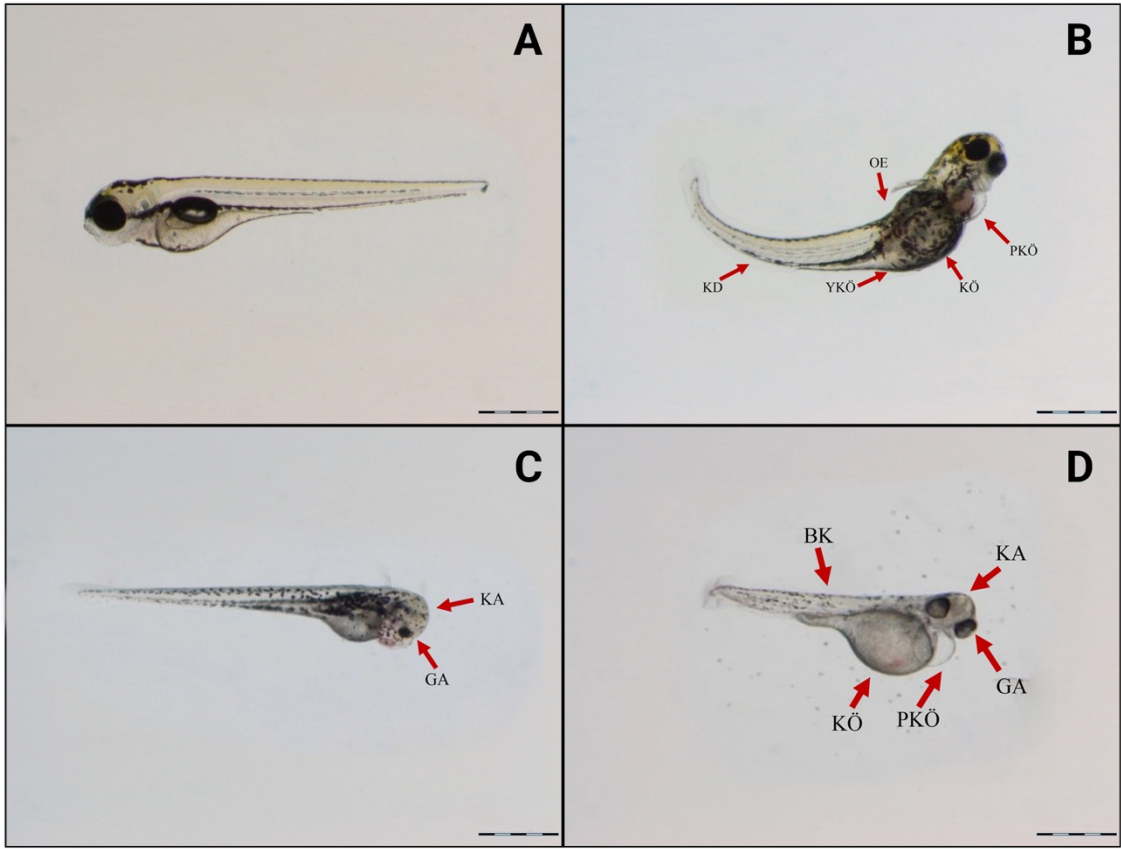
120. saat: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında MTA Angelus materyalinin X, X/2 ve X/4 dozlarında ($p \leq 0,0001$ (****)) istatistiksel anlamlılığın çok yüksek düzey olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte X/8, X/16 ve X/32 dozlarında ($p > 0,05$ (ns)) istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunamamıştır (Şekil 4.8).

4.3. MALFORMASYON GÖSTEREN EMBRİYO/ LARVALARIN GÖRÜNTÜLENMESİ

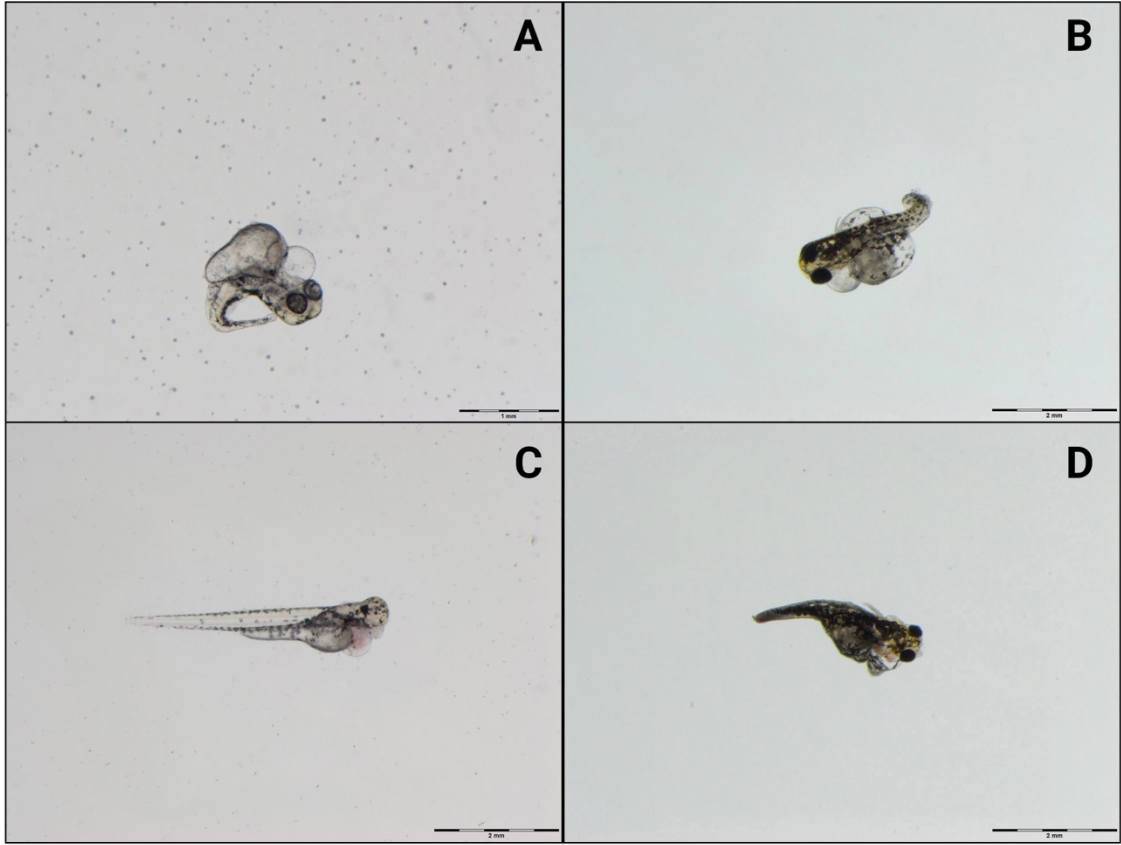
Test solüsyonları ile şartlandırılmış ortamda büyümeye tabi tutulan zebra balığı embriyoları; 0, 24, 48, 72, 96 ve 120. saatlerde stereo mikroskop (Olympus SZX7 Stereo Mikroskop, Olympus Corporation, Japonya) kullanılarak incelenmiş ve mikroskop altında Olympus cellSens Entry programı (Olympus cellSens Entry Imaging Software, Olympus LS, Japonya) ile görüntülenmiştir.

Kalp ödemi, vitellüs kesesi ödemi, vertebra deformasyonu ve kuyruk anomalisi, kuyruğun olmayışı, aksiyal malformasyonlar gibi vücut anomalilerini içeren malformasyonlar incelenerek malformasyon gösteren embriyo/ larvaların görüntüleri kaydedilmiştir.

Oxford ActiveCal PC (Oxford Scientific, Elmshorn, Almanya), Harvard BioCal-CAP (Harvard Dental International GmbH, Almanya), MTA Angelus (Angelus, Brezilya) ve Biodentine (Septodont, Fransa) maruz bırakılan zebra balığı embriyo/ larvalarında 48, 72 ve 96. saatlerde malformasyonlar gözlenmiştir. Bu malformasyonlar; vertebra deformasyonları, karın ödemi, yolk kesesi ödemi, kalp ödemi, göz, baş ve kuyruk anomalileri, aksiyal deformasyonlar şeklinde sayılabilmektedir (Resim 4.22).



Resim 4.22: Kontrol grubu (A), Malformasyon gösteren canlı embriyo örnekleri (B), (C), (D); OE: omurga eğriliği, KÖ: karın ödemi, KD: kuyruk deformasyonu, YKÖ: yolk kesesi ödemi, PKÖ: perikardiyal ödem, KA: kafa anomalisi, GA: göz anomalisi, BK: boy kısalığı.



Resim 4.23: 72. saatte ciddi malformasyon gösteren embriyo örnekleri; Oxford ActiveCal PC X/8 deney grubunda bulunan ve ciddi malformasyon gösteren bir zebra balığı embriyosu (A), Biodentine X/8 deney grubunda bulunan ve ciddi malformasyon gösteren bir zebra balığı embriyosu (B), Harvard BioCal- CAP X/8 deney grubunda bulunan ve ciddi malformasyon gösteren bir zebra balığı embriyosu (C), MTA Angelus X/8 deney grubunda bulunan ve ciddi malformasyon gösteren bir zebra balığı embriyosu (D)

Materyallerin yüksek konsantrasyonlarda malformasyonlara yol açtığı görülmüş ve bu canlıların hareket kabiliyetlerinde bozukluklar tespit edilmiştir. Materyallerin düşük konsantrasyonlarında malformasyon bulgusu izlenmemiştir. En belirgin görülen malformasyon perikardiyal ödem olmakla beraber omurga eğriliği, bükülmüş kuyruk, pigment eksikliği, gelişme geriliği yaygın olarak görülen diğer malformasyonlardır. Ciddi malformasyon gösteren embriyo/larvaların bir sonraki deney saatine kadar canlılığını yitirdiği görülmüştür (Resim 4.23). Malformasyon gösteren embriyolar bir sonraki deney saatinde ölü olarak tespit edildiğinden ve istatistiksel olarak anlamlı sayıda malformasyon bulgusu görülmediğinden dolayı analiz yapılmamıştır.

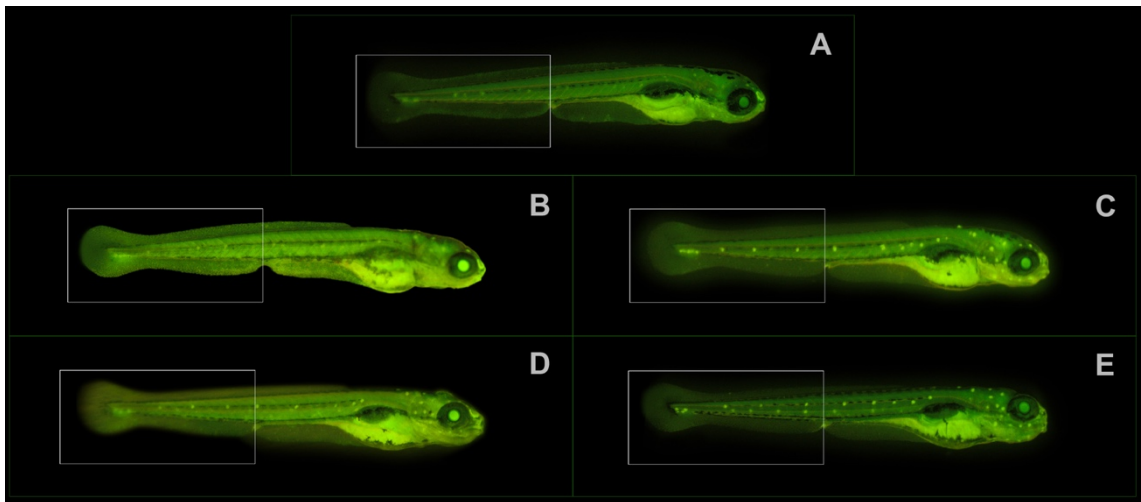
4.4. APOPTOZUN BELİRLENMESİ VE ANALİZ SONUÇLARI

4.4.1. Akridin Oranj ile Boyama Yöntemi Analiz Sonuçları

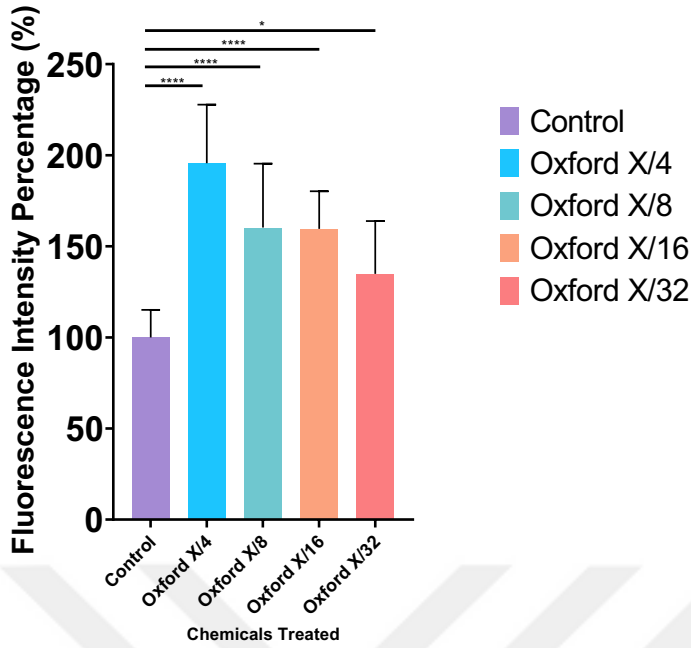
120. saatte canlı embriyoların bulunduğu toksik olmayan en etkili dozlar üzerinden apoptoz deneylerine başlanmıştır. Canlı kalan tüm deney grupları apoptoz deneylerine dahil edilmiştir. Akridin oranj boyası ile boyanmış embriyolar floresan mikroskopta (Olympus SZX16, Olympus Corporation, Japonya) incelenmiş ve Olympus cellSens Entry programı (Olympus cellSens Entry Imaging Software, Olympus LS, Japonya) ile görüntüler kaydedilmiştir.

Veriler, ImageJ programı ile analiz edilmiştir. Kontrol floresans yoğunluğu = %100 dikkate alınarak normalleştirilmiştir. Entegre/Birleşik Yoğunluk, "IntDen" (Alan ve Ortalama Gri Değerinin çarpımı) ve "RawIntDen" (görüntüdeki veya seçimdeki piksellerin değerlerinin toplamı) olmak üzere iki değer görüntülenmesi ve hesaplanması ile elde edilmiştir (361).

4.4.1.1 Oxford ActiveCal PC materyali uygulanan embriyolarda akridin oranj ile boyama yöntemi analiz sonuçları: 120. saatte Oxford ActiveCal PC materyalinin x/4, x/8, x/16 ve X/32 dozlarında canlı embriyolar görülmüştür. Bu deney grupları apoptoz deneylerine dahil edilmiştir (Resim 4.24).



Resim 4.24: Kontrol grubu ve Oxford ActiveCal PC materyali uygulanan embriyoların farklı dozlara göre floresan mikroskop görüntüleri; Kontrol grubu (A), X/4 dozu (B), X/8 dozu (C), X/16 dozu (D), X/32 dozu (E)

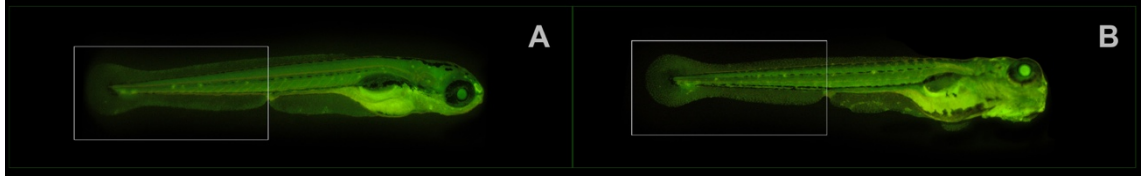


Şekil 4.9: Oxford ActiveCal PC materyali uygulanan embriyolarda apoptozun floresan yoğunluğu ile belirlenmesi

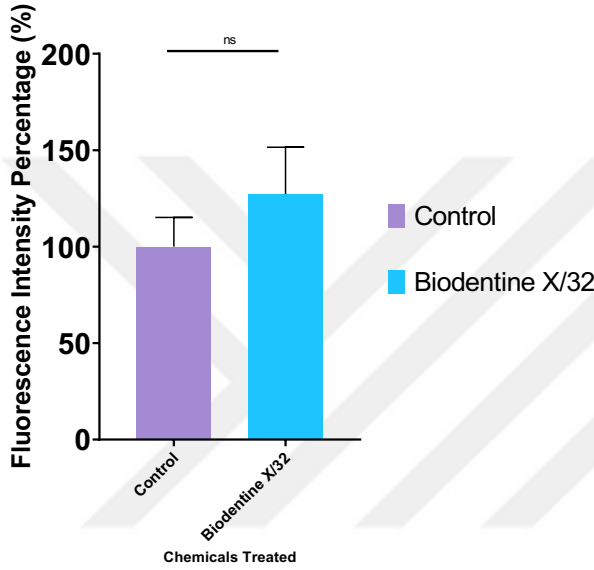
İstatistiksel anlamlılıkta kullanılan sembollerden; $p > 0,05$ (ns) istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamasını, $p \leq 0,05$ () sınırda anlamlılığın bulunmasını, $p \leq 0,01$ (**) istatistiksel anlamlılığı, $p \leq 0,001$ (***) istatistiksel anlamlılığın yüksek düzeyde olduğunu ve $p \leq 0,0001$ (****) istatistiksel anlamlılığın çok yüksek düzey olduğunu ifade etmektedir.*

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında X/4, X/8 ve X/16 dozlarında $p \leq 0,0001$ (****) istatistiksel anlamlılığın çok yüksek düzey olduğu; X/32 dozunda ise ($p \leq 0,05$ (*)) sınırda anlamlılığın bulunduğu belirlenmiştir (Şekil 4.9).

4.4.1.2 Biodentine materyali uygulanan embriyolarda akridin oranj ile boyama yöntemi analiz sonuçları: 120. saatte Biodentine materyalinin X/32 dozunda canlı embriyolar görülmüştür. Bu deney grupları apoptoz deneylerine dahil edilmiştir. X/16 dozunda canlı kalan embriyo sayısı çok düşük olduğu için AO analizine eklenmemiştir (Resim 4.25).



Resim 4.25: Kontrol grubu ve Biodentine materyali uygulanan embriyoların farklı dozlara göre floresan mikroskop görüntüleri; Kontrol grubu (A), X/32 dozu (B)

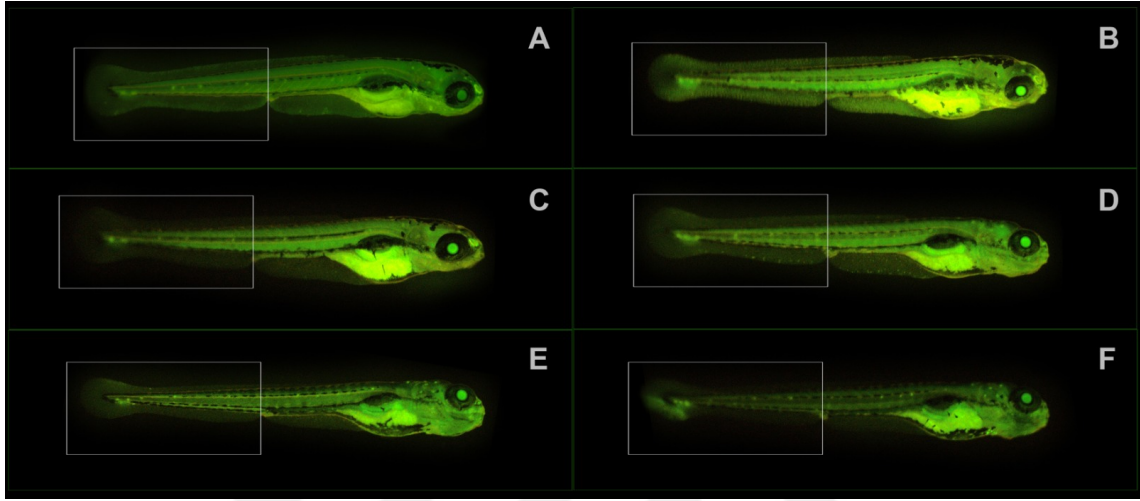


Şekil 4.10: Biodentine materyali uygulanan embriyolarda apoptozun floresan yoğunluğu ile belirlenmesi

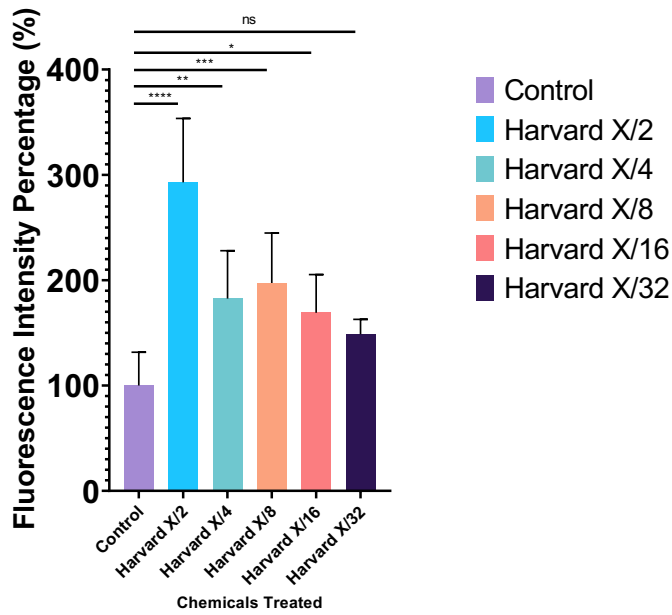
İstatistiksel anlamlılıkta kullanılan sembollerden; $p > 0,05$ (ns) istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamasını, $p \leq 0,05$ () sınırda anlamlılığın bulunmasını, $p \leq 0,01$ (**) istatistiksel anlamlılığı, $p \leq 0,001$ (***) istatistiksel anlamlılığın yüksek düzeyde olduğunu ve $p \leq 0,0001$ (****) istatistiksel anlamlılığın çok yüksek düzey olduğunu ifade etmektedir.*

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında X/32 dozunda ($p > 0,05$ (ns)) istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunamamıştır (Şekil 4.10).

4.4.1.3 Harvard BioCal-CAP materyali uygulanan embriyolarda akrinin oranj ile boyama yöntemi analiz sonuçları: 120. saatte Harvard BioCal-CAP materyalinin X/2, X/4, X/8, X/16 ve X/32 dozlarında canlı embriyolar görülmüştür. Bu deney grupları apoptoz deneylerine dahil edilmiştir (Resim 4.26).



Resim 4.26: Kontrol grubu ve Harvard BioCal-CAP materyali uygulanan embriyoların farklı dozlara göre floresan mikroskop görüntüleri; Kontrol grubu (A), X/2 dozu (B), X/4 dozu (C), X/8 dozu (D), X/16 dozu (E), X/32 dozu (F)

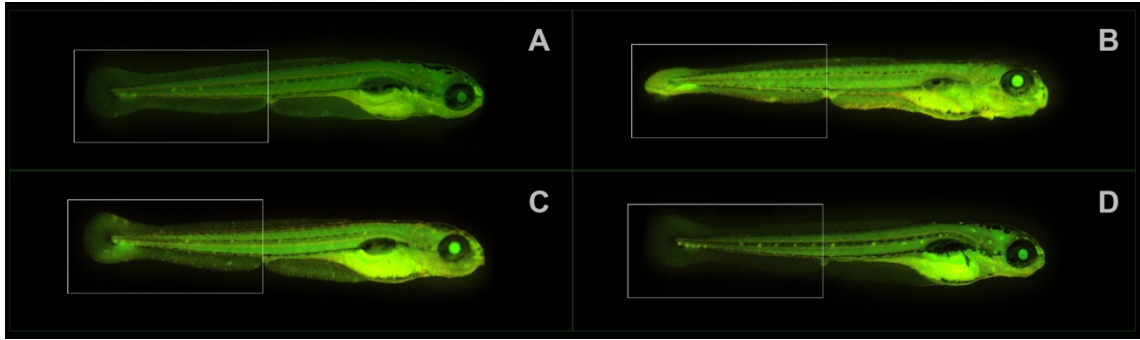


Şekil 4.11: Harvard BioCal-CAP materyali uygulanan embriyolarda apoptozun floresan yoğunluğu ile belirlenmesi

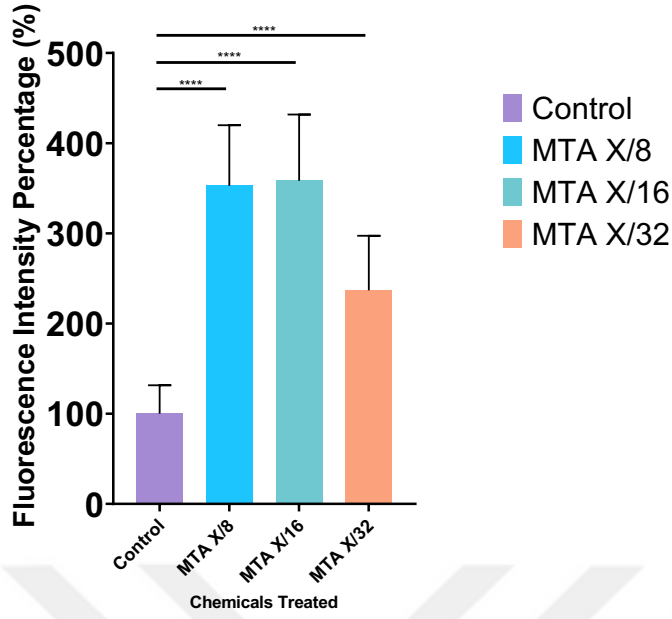
İstatistiksel anlamlılıkta kullanılan sembollerden; $p > 0,05$ (ns) istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamasını, $p \leq 0,05$ () sınırda anlamlılığın bulunmasını, $p \leq 0,01$ (**) istatistiksel anlamlılığı, $p \leq 0,001$ (***) istatistiksel anlamlılığın yüksek düzeyde olduğunu ve $p \leq 0,0001$ (****) istatistiksel anlamlılığın çok yüksek düzey olduğunu ifade etmektedir.*

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında X/2 dozunda ($p \leq 0,0001$ (****)) istatistiksel anlamlılığın çok yüksek düzey; X/4 dozunun ($p \leq 0,01$ (**)) istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülürken X/8 dozunda ($p \leq 0,001$ (***) istatistiksel anlamlılığın yüksek düzeyde olduğu ve X/16 dozunda ($p \leq 0,05$ (*)) sınırda anlamlılığın bulunduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte X/32 dozunda ($p > 0,05$ (ns)) istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunamamıştır (Şekil 4.11).

4.4.1.4 MTA Angelus materyali uygulanan embriyolarda akridin oranj ile boyama yöntemi analiz sonuçları: 120. saatte MTA Angelus materyalinin X/8, X/16 ve X/32 dozlarında canlı embriyolar görülmüştür. Bu deney grupları apopitoz deneylerine dahil edilmiştir (Resim 4.27).



Resim 4.27: Kontrol grubu ve MTA Angelus materyali uygulanan embriyoların farklı dozlara göre floresan mikroskop görüntüleri; Kontrol grubu (A), X/8 dozu (B), X/16 dozu (C), X/32 dozu (D)



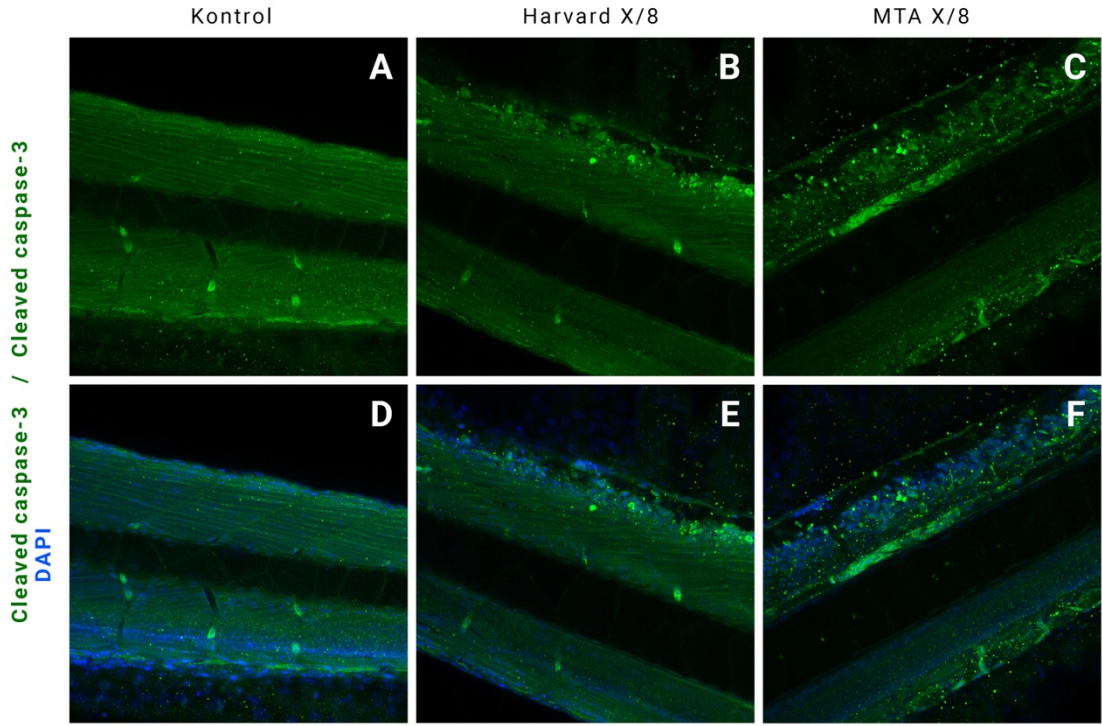
Şekil 4.12: MTA Angelus materyali uygulanan embriyolarda apoptozun floresan yoğunluğu ile belirlenmesi

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.*

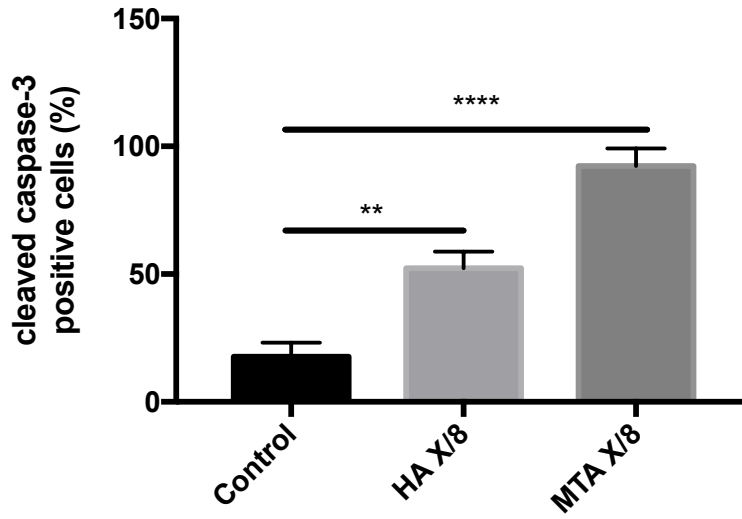
Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında X/8, X/16 ve X/32 dozlarında ($p \leq 0,0001(****)$) istatistiksel anlamlılığın çok yüksek düzeyde olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.12).

4.4.2 Cleaved Caspase- 3 ile Whole- Mount Immün Boyama Yöntemi Analiz Sonuçları

Akridin oranj ile yapılan apoptoz sonuçlarını doğrulamak için sadece bir rezin ile modifiye edilmiş kalsiyum silikat ve bir geleneksel kalsiyum silikat kullanılması planlanmıştır. Bu amaçla, materyallerden rezin ile modifiye edilmiş kalsiyum silikat olan Harvard BioCal-CAP ve geleneksel kalsiyum silikat olan MTA Angelus'un X/8 koşullarında deney yapılmıştır (Resim 4.28). Veriler, ImageJ programı ile analiz edilmiştir (361).



Resim 4.28: Kontrol grubu, Harvard BioCal-CAP ve MTA Angelus materyaline maruz kalan zebra balığı embriyolarının Cleaved Caspase- 3 ve Cleaved Caspase- 3+ DAPI uygulaması sonrası lazerli konfokal mikroskop görüntüleri; Cleaved Caspase- 3 kontrol grubu (A), Cleaved Caspase- 3 Harvard BioCal-CAP X/8 grubu (B), Cleaved Caspase- 3 MTA Angelus X/8 grubu (C), Cleaved Caspase- 3+ DAPI kontrol grubu (D), Cleaved Caspase- 3 + DAPI Harvard BioCal-CAP X/8 grubu (E), Cleaved Caspase- 3 + DAPI MTA Angelus X/8 grubu (F)



Şekil 4.13: Harvard BioCal-CAP ve MTA Angelus materyali uygulanan embriyolarda apoptozun Cleaved Caspase-3 yöntemi ile ölçülen floresan yoğunluğu ile belirlenmesi

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.*

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında Harvard BioCal-CAP X/8 grubunun ($p \leq 0,01$ (**)) istatistiksel olarak anlamlı olduğu, MTA X/8 grubunda ise ($p \leq 0,0001$ (****)) istatistiksel anlamlılığın çok yüksek düzey olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.13). Bu deney sonuçlarına göre apoptoz için gerçekleştirilen akridin oranj boyama sonuçları doğrulanmaktadır.

5. TARTIŞMA

Modern diş hekimliğinde, vital pulpa tedavileri kök kanal tedavisi ile kıyaslandığında daha etkili ve akılcı bir alternatif olarak düşünülmektedir (362). Bu konservatif yöntemin temel amacı, yumuşak doku onarım sürecini desteklemek, pulpayı korumak veya etkilenmiş pulpa dokusunu uzaklaştırmaktır. Bu nedenle, VPT, immatür dişlerin gelişiminin devam etmesini sağlamaktadır (363). Sağlıklı pulpadaki odontoblastlar bir savunma mekanizmasına sahiptir ve dişin ömrü boyunca çeşitli biyolojik ve patolojik uyaranlara yanıt olarak sekonder, tersiyer ve peritübüler dentin üreterek normal diş fonksiyonunun devam etmesini sağlamaktadır (364). Aynı zamanda, vital pulpa dokusunun varlığı, propriyosepsiyonu ve oklüzal kuvvetlerin dağıtılmasını sağlamaktadır (365). Bununla birlikte, geleneksel kök kanal tedavisi uygulanan dişler, vital dişlere göre daha düşük sağ kalım göstermekte ve kök kırıklarına karşı daha fazla duyarlılık sergilemektedir (366). Tüm bunlar göz önüne alındığında, VPT, pulpa dokusunun korunması, onarımının sağlanması ve dişin uzun süre ağızda tutulmasına katkıda bulunmaktadır. Bu tez çalışmasında, vital pulpa tedavilerden biri olan pulpa kuafajı üzerinde durulmuştur.

Yeni tanıtılan kalsiyum silikat esaslı materyaller ve gelişmiş tedavi stratejileri kullanılarak sağlıklı pulpa dokusunun korunması mümkündür. Günümüzde MTA gibi birçok kalsiyum silikat esaslı materyal, VPT'de sıklıkla kullanılan kalsiyum hidroksitin yerine geçebilecek alternatifler olarak kabul edilmektedir. Bu materyallerin pulpa canlılığının korunması, sert doku bariyerlerinin oluşması ve olgunlaşmamış daimi dişlerde fizyolojik gelişimin devam etmesini sağlamak gibi birçok özelliği mevcuttur. Biyoaktif ve biyoindüktif bu materyallerin kullanımı tedavi seçenekleri üzerinde önemli bir etkiye sahip olabilmektedir (363). Bu tez çalışmasında dört farklı kalsiyum silikat esaslı materyal incelenmiştir.

MTA, kalsiyum silikat esaslı bir biyoseramiktir. Pulpa kuafajı, rejenerasyon ve kök perforasyonu onarımı gibi endodontik uygulamalarda kullanılmakta olup günümüzde endodontide altın standart olarak kabul edilmektedir (250). Yapılan bir randomize klinik çalışmada çürükle ekspoz olmuş dişlere uygulanan direkt pulpa kuafajında kalsiyum hidroksite kıyasla daha iyi klinik performans gösterdiği bildirilmiştir (367).

MTA ve kalsiyum hidroksit uygulamasının uzun vadeli sonuçlarının incelendiği bir başka çalışmada, klinik ve radyografik olarak MTA'nın başarısı daha yüksek bulunmuştur (368). Bu sebeple, bu tez çalışmasında, kalsiyum hidroksit yerine günümüzde altın standart olarak kabul edilen MTA'nın araştırılmasına karar verilmiştir.

MTA'nın piyasaya sürülmesi, malzeme bilimi tarihinde büyük bir atılım olarak kabul edilmiştir. Bununla birlikte, bu materyalin zor manipülasyon, yavaş sertleşme süresi ve yüksek maliyet gibi sınırlamalara sahip olması dünya çapındaki araştırmacıları alternatifler aramaya zorlamıştır. Bu dezavantajlar göz önünde bulundurularak 2010 yılında Biodentine adlı yeni bir biyoseramik materyal piyasaya sürülmüştür (369). Daha kolay manipülasyon, düşük maliyet ve daha hızlı sertleşme, MTA ile karşılaştırıldığında bu malzemenin en büyük avantajlarıdır. Yüksek biyouyumluluk ve biyoaktivite göstermesine rağmen MTA ve Biodentine'in karşılaştırıldığı birçok çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır (370). Bu tez çalışmasında, toz ve likit formunda bulunan kalsiyum silikat esaslı materyallerden MTA'nın yanı sıra MTA'ya alternatif olarak kullanılabileceği düşünülen ve birçok avantaja sahip olan Biodentine de araştırılmıştır.

MTA'nın fiziksel-mekanik özelliklerini geliştirirken biyolojik faydalarını da korumaya çalışan TheraCal LC gibi ışıkla sertleşen yeni rezin ile modifiye edilmiş kalsiyum silikat esaslı materyaller geliştirilmektedir. TheraCal LC (BISCO Inc.), restoratif materyallerin altında pulpa kuafaj ajanı ve kaide olarak kullanılan rezin ile modifiye edilmiş, ışıkla sertleşen, kalsiyum silikat bazlı yeni bir materyaldir (371,372). Işıkla sertleşen kalsiyum silikatların, özellikle uzun vadede değerlendirildiğinde, direkt pulpa kuafaj ajanı olarak sınırlı bir klinik performans gösterdiği söylenmekle beraber (373) kalsiyum hidroksit ile karşılaştırıldığında süt dişlerinden elde edilmiş kök hücreler (SHED) üzerinde canlılığı daha iyi koruduğu ve proliferasyonu teşvik ettiği bildirilmiştir (374).

Rezin ile modifiye edilmiş kalsiyum silikat olan TheraCal LC ve geleneksel kalsiyum silikat olan Biodentine'nin, sitotoksitesinin ve osteojenik özelliklerinin insan pulpası kök hücrelerinde araştırıldığı bir çalışmada, in vivo hayvan modellerinde yapılacak çalışmalara ihtiyaç olduğu belirtilmiştir (234).

TheraCal LC'nin yanı sıra piyasaya rezin esaslı birkaç kalsiyum silikat tanıtılmıştır. Bu materyallerden biri olan Harvard BioCal- CAP (Harvard Dental International GmbH, Almanya) 2019 yılında piyasaya sürülen, ışıkla sertleşen, rezin ile modifiye edilmiş kalsiyum silikat esaslı materyaldir (375).

Rezin ile modifiye edilmiş ve ışıkla sertleşen bu materyallerin, monomer içeriklerinin biyouyumluluklarını etkilediği bilinmektedir. Monomer salınımının en aza indirgenmesi önemli noktalardan biridir. Dişe uygulanan adeziv sistemlerin ve rezin kompozitlerin polimerize olmamış monomerleri, dentin sıvısı yoluyla pulpaya yayılabilmektedir (376). Ayrıca, rezin içerikli materyallerin Bis-GMA, TEGDMA ve HEMA bileşenleri doğrudan pulpa üzerine veya derin kavitelere yerleştirildiklerinde istenmeyen pulpal reaksiyonlara neden olabilmektedir (377).

Costa ve arkadaşları 2003 yılında yaptıkları çalışmada, artık monomerlerin pulpaya yayılması ve pulpa dokusunda kimyasal hasara yol açmasını önlemek için dentin üzerindeki polimerize olmamış monomer miktarının azaltılması gerektiği belirtilmiştir (378).

Harvard BioCal-CAP'in organik içeriğinin incelendiği bir çalışmada, ana organik bileşenin HEMA olduğu ve farklı kimyasal maddelerin de tespit edildiği belirtilmiştir. Ancak ışıkla sertleşen numunelerde serbest HEMA bulunmamış; organik ve inorganik gaz kromatografisi ve kütle spektrometresi tek iyon izleme modu analizinde, BioCal-CAP'te reaksiyona girmeyen monomerlerinin belirlenemediği bildirilmiştir. Bu çalışmanın sonuçlarına göre BioCal-CAP'in direkt pulpa kuafajında olumlu avantajlara sahip olabileceğini ve bu durumu desteklemek için daha fazla araştırmanın yapılması gerektiği ortaya koyulmuştur (379). Bu doktora tez çalışmasında, piyasaya yeni sürülmüş rezin ile modifiye edilmiş kalsiyum silikat esaslı materyal olan Harvard BioCal- CAP 'in incelenmesine karar verilmiştir.

Piyasaya yeni sürülmüş bir diğer rezin ile modifiye edilmiş kalsiyum silikat esaslı materyal ise Oxford ActiveCal PC (Oxford Scientific, Elmshorn, Almanya)'dır. Bu materyal ile ilgili literatürde yayınlanmış sadece bir çalışma bulunmuştur (380) ve daha fazla çalışmaya ihtiyaç olduğu düşünülmüş ve bu tez çalışmasında, piyasaya yeni sürülmüş ve rezin ile modifiye edilmiş kalsiyum silikat esaslı materyal olan Oxford ActiveCal PC'nin (Oxford Scientific, Elmshorn, Almanya) değerlendirilmiştir.

Pulpa kuafajında kullanılan materyaller dokunun normal fonksiyonunu ve canlılığını geri kazanmasını ve sürdürmesini sağlamak için kullanılır (381,382). İdeal olarak, bu materyallerin pulpa hücreleri için toksik etki göstermemesi ve aynı zamanda hücrelerin migrasyonunu, proliferasyonunu ve osteojenik farklılaşmasını uyarak dokulara karşı "biyoaktif" olması gerekmektedir (146,383). Restoratif diş hekimliği ve endodontide kullanım için biyouyumlu materyallere duyulan ihtiyaç, bileşenleri araştırmak ve materyalin klinik kullanımından önce ağız dokularına potansiyel olarak zararlı etkilerini karakterize etmek için sitotoksikite analizlerine yönelik bir gereksinimi doğurmaktadır (68,384). Sitotoksikite analizleri, materyallerin veya bunların ekstraktlarının hücre ölümüne neden olup olmadığını tespit etmek için kullanılır. Bir materyalin, hücrenin hayatta kalması üzerindeki etkisi biyouyumluluğun belirleyicisi gibi görünmektedir (385). Bu nedenle, bu tez çalışmasında, dört farklı pulpa kuafaj ajanının sitotoksikitesi ve biyouyumluluğu değerlendirilmiştir.

Bir materyalin biyouyumluluğunun in vitro hücre kültürü testi kullanılarak değerlendirilmesi ve bundan yola çıkarak in vivo oral doku tepkilerini tahmin etmeye çalışmak yeterli olmayabilir (386). Ayrıca, hücre kültürü analizleri ile yapılan biyouyumluluk değerlendirmelerinin hayvan in vivo biyouyumluluk değerlendirmeleri ile uyumluluk göstermediği bulunmuştur (387,388). Biyolojik testler büyük ölçüde hayvan deneylerine dayanmaktadır. Bir diş hekimliği materyalinin klinik olarak kullanılabilmesinden önce sistemik ve sitotoksik özelliklerinin belirlenmesi için çeşitli laboratuvar hayvanı türlerinde tam kapsamlı olarak test edilmesi gerekir (389). Hayvanların kullanılması insanlarda karşılaşılabilecek olası toksik tehlikelerin tahmin edilmesine yardımcı olur (390). Hayvan deneyleri sitotoksikite ve biyouyumluluğun araştırılması için klinik öncesi en güvenilir çalışmalar olarak kabul edilmektedir. Bu bilgiler doğrultusunda, bu tez çalışmasının in vivo koşullarda yapılmasına karar verilmiş ve materyallerin sitotoksikite analizlerinin araştırılması için etik açıdan daha avantajlı olan zebra balığı tercih edilmiştir.

1982 yılında zebra balığı çalışmalarının öncüsü George Streisinger (264), çevresel kanserojenlerin neden olduğu mutasyonların sıklığını incelemek için zebra balığının omurgalı bir model olarak kullanılmasını önermiştir (391).

Daha sonraki yıllarda, zebra balığı; teratojenleri tanımlamak, toksik maddelerin etki mekanizmalarını ortaya çıkarmak ve toksik maddelerin omurgalılar üzerindeki etkisini değerlendirmek için kullanılmıştır (392). Zebra balığı, benzersiz bir in vivo sistem sağlamaktadır. Zebra balığı üzerinde yapılan çalışmalar toksisitenin hızlı bir şekilde değerlendirilmesine ve canlı omurgalılarda toksik maddeye maruz kalma ile ilişkili gelişimsel problemlerin ve hastalıkların altında yatan moleküler mekanizmaların çalışılmasına olanak sağlamaktadır (393). Bu tez çalışmasında, pulpa kuafaj materyallerinin sitotoksikite ve biyouyumlulukları iyi bir toksikolojik model olan zebra balığı kullanılarak belirlenmiştir.

Zebra balığı, geçmişten günümüze karmaşık hücresel ve moleküler yaklaşımların kullanımı ile birlikte gelişimsel biyolojide en çok çalışılan model sistemlerden biri haline gelmiştir (265). Zebra balığı embriyoları, biyolojik ve çevresel toksisite analizleri için çok uygundur. Apoptozun analizi, moleküler hücre biyolojisi çalışmalarında ve farklı tedavilerin veya materyallerin toksisitesinin değerlendirilmesinde önemlidir. Ancak istatistiksel olarak anlamlı sayıda embriyodaki apoptoz seviyelerini analiz edebilecek basit bir yöntem arayışı devam etmektedir (336).

Akridin oranj, tek sarmallı nükleik asitlere karşı çift sarmallı nükleik asitleri farklı şekilde boyayabilen bir floresan boyadır. 488 nm lazer ışığı uyarımında denatüre (tek sarmallı) DNA'ya bağlandığında kırmızı bir floresan verirken, çift sarmallı DNA ile ilişkili ise yeşil renkte floresan vermektedir. Ayrıca DNA veya RNA'ya bağlandığında farklı spektral özellikler sergileyebilir, böylece hücrelerin DNA ve RNA içeriğinin eş zamanlı değerlendirilmesine olanak tanır (394). Zebra balığı embriyolarında apoptoz seviyesinin ölçülmesi, ölen hücrelere nüfuz ederek kromatini bağlayan akridin oranj boyaması ile gerçekleşir. Ardından mikroskop altında boyanmış hücrelerin yoğunluğu değerlendirilir. Genellikle, aynı tedaviye tabi tutulan embriyolar arasında, özellikle apoptozun gerçekleştiği durumlarda, akridin oranj boyamasında önemli farklılıklar gözlenir (395,396).

Apoptozda yer alan genlerin karakterizasyonuna bakıldığında ise iki ana gen sınıfı olan bcl2 ailesi ve kaspaz ailesi tanımlanmıştır. Kaspazlar, hedef substratları spesifik bir peptid dizisi ile parçalayan proteazlardır (397,398). Apoptoz sırasında, nükleer, metabolik veya dışarıdan aktive edilen uyarılarla indüklenebilen kaspazların aktivasyonu, kademeli bir şekilde gerçekleşir ve hücre ölümüne yol açar (397,399).

Aynı zamanda kaspazlar; apoptoz, hücre büyümesi ve farklılaşma dahil olmak üzere hücre sinyalleme olaylarında işlev görmektedir (400). Bu tez çalışmasında, pulpa kuafaj materyallerinin sitotoksikite ve biyouyumluluklarının değerlendirilmesi için akrinin oranj ve Cleaved Caspase-3 yöntemleri ile apoptoz analizleri yapılmıştır.

Literatürde zebra balığı üzerinde çeşitli maddelerin gelişimsel toksisitenin incelendiği birçok çalışma mevcuttur.

Cilt bakımı için oldukça önemli olan *Panax notoginseng*'in ham ekstraktının ve kaynatılmış ekstraktının zebra balığı larvaları kullanılarak toksisitesinin araştırıldığı bir çalışmada, zebra balığı larvaları üç doz (0,5, 1,5 ve 5,0 µg/mL) *Panax notoginseng*'e maruz bırakılmıştır. *Panax notoginseng*'in ham ekstraktının kaynatılmış ekstrakttan daha fazla akut toksisite gösterdiği ve artan dozlarda toksisitenin de arttığı gösterilmiştir (401).

Bir başka çalışmada, dikkat eksikliği ve hiperaktivite bozukluğunun tedavisinde de kullanılan psikoaktif bir madde olan metamfetaminin zebra balıklarında yapılan toksisite analizinde artan dozların ölüm oranını artırdığı bildirilmiştir (402).

Elektronik sigaralarının toksisitesinin değerlendirilmesi için zebra balığı embriyolarının farklı dozlarda e- sigara sıvılarına maruz bırakıldığı bir çalışmada, yüksek dozların anlamlı derecede daha fazla toksik etki gösterdiği görülmüştür (403).

Yapılan bir çalışmada, zebra balığı embriyoları üzerinde mutfaklarda ve çeşitli gıda ürünlerinde yaygın olarak bulunan, antioksidan, antimikrobiyal, nöroprotektif ve antikanser gibi çeşitli farmasötik aktivitelere sahip olan ve susam tohumlarından elde edilen sesamolinin toksisitesi incelenmiştir. Bu çalışmada, değişen konsantrasyonların gelişimsel toksisiteyi etkilemediği bildirilmekle beraber (404) geçmişte Ayurveda ve Çin bitkisel tıbbında kullanılan kroton bitkisinin, gelişimsel toksisitesinin araştırıldığı bir başka çalışmada, farklı konsantrasyonların sağ kalımı etkilediği gösterilmiştir (405).

Zebra balıkları üzerinde gelişimsel toksisitenin incelendiği tüm bu çalışmalar göz önüne alınarak Oxford ActiveCal PC, Harvard BioCal- CAP, MTA Angelus ve Biodentine materyallerinin X, X/2, X/4, X/8, X/16 ve X/32 olmak üzere farklı konsantrasyonlarının zebra balığı embriyoları üzerinde gelişimsel toksisitesi değerlendirilmiştir.

MTA Angelus ve Biodentine materyallerinin yüksek konsantrasyonlarda sağ kalım oranının oldukça düşük olduğu gözlenirken Oxford ActiveCal PC, ve Harvard BioCal- CAP materyallerinin yüksek konsantrasyonlarında bile sağ kalım oranının diğer gruplara kıyasla daha yüksek olduğu görülmüştür. Bu doktora tez çalışması ile, farklı konsantrasyonların sağ kalımı etkilediği gösterilmekle beraber artan dozların ölüm oranını artırdığı ve dolayısıyla anlamlı derecede daha fazla toksik etki gösterdiği sonucuna ulaşılmaktadır.

Zebra balığı embriyolarında koryonun dış etkenlere karşı embriyoyu koruduğu bilinmektedir. Bununla birlikte, bakır sülfat ve bakır oksit nanomateriyallerin toksisitesi ve metal birikimindeki farklılıkların araştırıldığı bir çalışmada, koryondan çıkışın geciktiği gözlenmiştir (406).

Shi ve arkadaşlarının 2008 yılında yaptıkları bir çalışmada, bir pestisit olan perflorooktansülfonat (PFOS)'ın zebra balığı embriyolarında gelişim toksisitesini incelemişlerdir. Farklı dozlarda PFOS uygulanan embriyolarda, koryondan çıkış süresinde artış ve embriyoların koryondan çıkma oranında azalma bildirilmiştir (407).

Nano titanyum dioksitin zebra balığı embriyoları üzerindeki toksisitesinin koryondan çıkış oranları ile değerlendirildiği bir çalışmada, nano titanium dioksit maruz kalan embriyolarda normal koryondan çıkma için gereken sürenin doza bağlı olarak değişiklik gösterdiği bildirilmektedir (408).

Zebra balığı embriyolarında gümüş nanopartiküllerinin embriyotoksitesinin araştırıldığı bir çalışmada, koryondan çıkış oranlarının gruplar arası anlamlı farklılık göstermediği bildirilmesine rağmen (409), papaya ekstraktı kullanılarak sentezlenen çinko oksit nanopartiküllerinin zebra balığı üzerinde toksisitesinin değerlendirildiği bir çalışmada, yüksek konsantrasyonlarda uygulanan çinko oksit nanopartiküllerinin koryondan çıkışı geciktirdiği bildirilmiştir (410).

Zebra balıkları üzerinde Oxford ActiveCal PC, Harvard BioCal- CAP, MTA Angelus ve Biodentine materyallerinin X, X/2, X/4, X/8, X/16 ve X/32 olmak üzere farklı konsantrasyonlarda zebra balığı embriyolarının koryondan çıkışı değerlendirilmiştir.

Zebra balığı ile yapılan diğer çalışmalara paralel olarak, koryondan çıkma için gereken sürenin doza bağlı olarak değişiklik gösterdiği; farklı konsantrasyonlarda Oxford ActiveCal PC, Harvard BioCal- CAP, MTA Angelus ve Biodentine materyallerine maruz bırakılan embriyolarda, koryondan çıkış süresinde artış ve embriyoların koryondan çıkma oranında azalma görülmektedir. Bununla birlikte, koryondan çıkış azalan konsantrasyonlarda kontrol grubu ile benzerlik göstermektedir. Tüm materyallerin düşük konsantrasyonlarında koryondan çıkışın eş zamanlı gerçekleştiği görülmüştür.

Zebra balığı embriyolarında farklı maddelerin neden olduğu gelişimsel toksisitenin ve malformasyonların incelendiği çalışmalar incelendiğinde; diş hekimliğinde kullanılan metal destekli kronların içeriğindeki altın paladyum, gümüş paladyum, nikel krom, kobalt krom ve titanyumun toksisitesinin araştırıldığı bir zebra balığı çalışmasında, spontan harekette, kalp atış hızında, koryondan çıkış oranında ve yüzme davranışlarında değişiklik olduğu bildirilmiştir (327).

Sabun, el dezenfektanı, diş macunu ve gargara gibi çeşitli ürünlerde bulunan (411) triklosanın; kan akışında azalma, perikardiyal ödem, kalp atışında azalma, damar tıkanıklığı ve kraniyofasiyal malformasyonlara neden olduğu bildirilmiştir (412). Bisfenol A (BPA) ve türevleri, plastik endüstrisinde sıklıkla kullanılmaktadır. Bisfenoller ile yapılan bir çalışmada, koryondan çıkış oranı, spontan hareketlerin sıklığı ve kalp atış hızını azaltmanın yanı sıra larvalarda yolk ödemi, perikardiyal ödem ve omurga deformasyonuna neden olduğu gösterilmiştir (413).

Bu doktora tez çalışmasında, Oxford ActiveCal PC, Harvard BioCal-CAP, MTA Angelus ve Biodentin'e maruz bırakılan zebra balığı embriyolarında materyallerin yüksek konsantrasyonlarında malformasyonlara yol açtığı görülmüştür. 48, 72 ve 96. saatlerde vertebra deformasyonları, vitellüs kesesi ödemi, kalp ödemi, baş ve kuyruk anomalileri, aksiyal deformasyonlar gibi malformasyonlar gözlenmiştir. Bununla birlikte, materyallerin düşük konsantrasyonlarında malformasyon bulgusu izlenmemiştir.

Romatoid artrit tedavisinde kullanılan Auranofin isimli ilacın için antikanser ilacı olarak yeniden kullanılması ile gelişimsel toksisitesinin araştırılması gerektiğini düşünen araştırmacılar, zebra balığı embriyolarında ilacın yüksek konsantrasyonlarında hipopigmentasyon gözlemlemişlerdir (414).

Bir başka çalışmada ise, yaklaşık 80 yıldır klinik pratiğinde yaygın olarak kullanılan bir antiepileptik ilaç olan Fenitoin araştırılmış ve konsantrasyonun artmasıyla hipopigmentasyon görülme oranının da arttığı bildirilmiştir (415). Bu doktora tez çalışmasında MTA Angelus, Biodentin, Oxford ActiveCal PC ve Harvard BiCal-CAP'e maruz bırakılan zebra balığı embriyolarında kontrol grubu ile kıyaslandığında yüksek dozlarda pigmentasyonlarında azalma görülmüştür.

2018 yılında yapılan bir çalışmada, plastik kirliliğinin kritik bir çevresel sorun olduğu nanoplastiklerin toksisitesinin araştırılması gerektiği vurgulanarak polistiren nanopartiküllerine maruz kalan larvalarda, yüzme hipoaktivitesi ile larva davranışını değiştirdiği bildirilmektedir. Nanoplastiklerin gelişmekte olan zebra balığının koryonuna nüfuz edebileceği, dokularda birikebileceği, fizyolojiyi ve davranışı etkileyebileceği, potansiyel olarak kirlenmiş su ekosistemlerindeki organizmanın uyumunu etkileyebileceği gösterilmiştir (416). Bu doktora tez çalışmasında da MTA Angelus, Biodentin, Oxford ActiveCal PC ve Harvard BiCal-CAP'in tüm deney gruplarında larvalarda yüzme aktivitesinin değiştiği, hareketlerinin kontrol grubuna göre daha az olduğu görülmüştür.

Bu doktora tez çalışmasında, MTA Angelus, Biodentin, Oxford ActiveCal PC ve Harvard BiCal-CAP materyallerinin Cleaved Caspase-3 ve akrinin oranj yöntemleri ile apoptoz deneyleri gerçekleştirilmiştir.

Tetrasiklinin zebra balığı embriyoları üzerinde toksisitesinin değerlendirildiği bir çalışmada, gelişimin etkilendiği ve akrinin oranj ile yapılan apoptoz sonuçlarına göre ise bu ilacın apoptozu indüklediği bildirilmiştir (417).

Dünya çapında yaygın olarak kullanılan oldukça etkili, geniş spektrumlu bir fungusit olan benomilin toksisitesini belirlemek için zebra balığı kullanılan bir çalışmada, benomilin akrinin oranj boyaması sonrasında zebra balığında apoptozu indüklediğini gösterilmiştir (418).

Sanguinaria canadensis bitkisinin kökünden elde edilen Sanguinarin sıklıkla antimikrobiyal, böcek öldürücü, antitümör, antiinflamatuvar ajan olarak kullanılmaktadır. İnsan dişeti fibroblastlarının in vitro çoğalmasını engelleyebilen (419) Sanguinarin'in gelişimsel toksisitesinin zebra balığı üzerinde değerlendirildiği bir çalışmada, akrinin oranj kullanılmıştır ve apoptozda belirgin bir artış gözlenmiştir (420).

Bu doktora tez çalışmasında, MTA Angelus, Biodentin, Oxford ActiveCal PC ve Harvard BiCal-CAP materyallerinin toksik olmayan en etkili dozları apoptoz deneylerinde kullanılmıştır. Yüksek konsantrasyonların değişen derecelerde apoptozu indüklediği görülürken düşük konsantrasyonlarda kontrol grubu ile istatistiksel farklılık görülmemektedir.

Panoramik röntgenler, teşhis ve tedavi planlaması için diş hekimliğinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Panoramik görüntüleme ile hastalar düşük radyasyon dozlarına maruz kalıyor olsa da ancak yaşam boyu maruz kalma sıklığı göz önüne alındığında ciddi sonuçlara yol açabileceği bilinmektedir. Panoramik röntgenlerin iki farklı maruz kalma süresinde zebra balığı embriyolarının gelişimi üzerindeki etkilerini değerlendiren bir çalışmada, Cleaved Caspase-3 yöntemi ile apoptoz belirlenmiştir. Her iki grupta da apoptozun indüklendiği gözlenmiştir (421). Bu doktora tez çalışmasında, Cleaved Caspase-3 yöntemi ile de akridin oranj sonuçlarına benzer sonuçlara ulaşılmıştır.

Zebra balığı embriyolarında bir tüberküloz ilacı olan izoniazidin nörogelişimsel toksisitesinin incelendiği bir çalışmada, akridin oranj ve Cleaved Caspase-3 antikoru ile apoptoz deneyleri yapılmıştır. Kontrol grubunda hiçbir belirgin apoptotik hücre gözlenmezken, izoniazide maruz kalan embriyolarda 120. saatte larvalarda önemli sayıda apoptotik hücre ile görülmekle birlikte izoniazidin zebra balığı apoptotik sinyal yolunda Caspase-3 transkripsiyon seviyelerini önemli ölçüde arttırdığı bildirilmiştir (422). Bu doktora tez çalışmasında Harvard BioCal-CAP ve MTA Angelus materyallerine maruz bırakılan zebra balığı embriyolarında hem akridin oranj hem de Cleaved Caspase-3 yöntemiyle apoptoz deneyleri yapılmıştır. Akridin oranj ile yapılan analizlerde, yüksek dozların apoptotik yanıtı artırdığı görülmekle birlikte en düşük doz olan x/32 dozunun ise kontrol grubu ile benzer sonuçlarda olduğu görülmektedir. Cleaved Caspase-3 antikoru kullanılarak yapılan apoptoz deneyinde ulaşılan sonuçlar dikkate alındığında akridin oranj ile yapılan apoptoz deneyi doğrulanmaktadır.

Klinik çalışmalarda test edilmeden önce pulpa kuafaj materyallerinin toksisite ve biyouyumluluğunu belirlemek için in vitro çalışmalar yapılmaktadır. Malzemelerin sitotoksitesi, bileşimlerinde toksik veya çözünebilir bileşiklerin bulunmasından kaynaklanabilmektedir (423). Hücre kültürü çalışmalarında, hücrelerin malzeme ile teması, biyouyumluluğun iyi bir göstergesidir. Ek olarak, materyallerin hücre çoğalmasını veya hayatta kalmasını sağlamasının onarım sürecini de destekleyeceği düşünülmektedir (424).

Biodentine, diğer biyomateryallere kıyasla farklı biyolojik süreçleri üzerinde büyük etkiye sahip olan trikalsiyum silikat bazlı bir dental materyaldir. Bu nedenle, hücre proliferasyonu, sitotoksite, migrasyon, adezyon ve mineralizasyon potansiyelini belirlemek önemlidir (370). Biodentin'in periodontal ligamentten üretilen kök hücrelerle optimum biyouyumlu konsantrasyonunu araştırmayı amaçlayan bir çalışmada, 20, 2, 0,2 ve 0,02 mg/mL konsantrasyonlarda Biodentin'in 6 gün boyunca MTT canlılık analizi ve AnnexinV/7AAD ile sitotoksite deneyi gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmaya göre, Biodentine'in düşük konsantrasyonlarında (2, 0,2 ve 0,02 mg/mL) periodontal ligamentten türetilen hücrelerin çoğalmasında önemli bir artış olduğu, daha yüksek konsantrasyonun (20 mg/mL) ise hücreler üzerinde sitotoksik etki gösterdiği bildirilmiştir (425). Bu doktora tez çalışmasında, 120. saatin sonunda Biodentine materyallerinin sadece en düşük dozunda zebra balığı embriyolarında sağ kalım görülmektedir. Buna göre, tüm saatler dikkate alındığında en düşük dozu hariç tüm dozlarının toksik olduğu sonucuna ulaşılabilmektedir.

Dental materyallere radyopak özellik sağlayan tantal peroksit, Neo MTA Plus ve MTA Angelus'un insan osteoblast benzeri hücreleri üzerinde 24 saatlik biyouyumluluğunun değerlendirildiği bir başka çalışmada ise, materyallerin 1:1, 1:2, 1:4 ve 1:8 dilüsyonları MTT ve nötr kırmızı analizleri kullanılarak incelenmiştir. MTT analizi sonucunda Neo MTA Plus ve MTA Angelus daha düşük sitotoksite göstermiştir. Ancak nötr kırmızı kullanılarak gerçekleştirilen hücre canlılığı analizinde tüm seyreltmelerde Neo MTA Plus, MTA Angelus ve tantal peroksitin sitotoksik etkisi olmadığı bildirilmiştir (426).

Bu doktora tez çalışmasında ise; MTA Angelus materyalinin farklı dozlarına maruz bırakılan zebra balığı embriyolarının 24, 48, 72, 96 ve 120. saatlerde sağ kalım oranları değerlendirilmiştir. MTA Angelus materyalinin yüksek dozlarında canlılık gözlenmemekle beraber düşük dozlarda embriyo sağ kalım oranı kontrol grubu ile benzerlik göstermektedir.

Rezin içerikli materyaller, iyi fiziksel ve mekanik özelliklere sahip olmalarına rağmen, monomerlerin yetersiz polimerizasyonu mekanik özelliklerini olumsuz etkileyebilir ve rezinin sitotoksitesini artırabilir (13,110). Yapılan bir çalışmada, insan dental pulpa kök hücreleri üzerinde biyoaktif cam içeren ve ışıkla polimerize olan Bioactive isimli materyal, geleneksel kalsiyum hidroksit içeren Dycal ve ışıkla polimerize olan TheraCal LC karşılaştırılmıştır. Örneklerden elde edilen seyreltik solüsyonların sitotoksite ve biyomineralizasyonunu belirlemek için alkalın fosfataz (ALP) aktivitesi ve alizarin kırmızısı boyama (ARS) analizleri kullanılmıştır. Dycal dışında tüm grupların %50, Dycal'ın %25, seyreltilmiş ekstraktın %70'in altında hücre canlılığı gösterdiği bildirilmiştir. %12,5 seyreltilmiş TheraCal LC'nin diğer gruplara kıyasla ALP aktivitesini ve biyomineralizasyonu değiştirmedeği gözlenmiştir (427).

Bu doktora tez çalışmasında ise rezin ile modifiye edilmiş kalsiyum silikat esaslı bir materyal olan ve litaretürde toksisitesinin araştırıldığı bir çalışma bulunmayan Oxford ActiveCal PC materyalinin yüksek dozlarında bile sağ kalım oranının yüksek olduğu görülmektedir.

Kalsiyum hidroksit (Dycal), cam iyonomer (Fuji IX) ve ışıkla sertleşen rezin ile modifiye edilmiş kalsiyum silikat (TheraCal LC)'nin eksfoliye süt dişlerinden elde edilen kök hücrelerin (SHEDler) canlılığı, çoğalması ve farklılaşması üzerindeki etkisini inceleyen bir in vitro çalışmada, üç materyalin de biyolojik olarak uyumlu olduğu ve canlılığı koruyarak çoğalmayı sağladığı bildirilmiştir. Bununla beraber TheraCal LC'nin SHEDlerin çoğalmasını daha iyi teşvik ettiği gösterilmiştir (374). Bu doktora tez çalışmasında da rezin ile modifiye edilmiş kalsiyum silikat Harvard BiCal-CAP'in en yüksek doz hariç tüm gruplarda ve tüm saatlerde canlılığı devam ettirdiği görülmektedir.

İnsan dental pulpa kök hücreleri üzerinde yapılan bir çalışmada, ProRoot MTA, Biodentine, DyCal ve TheraCal LC'nin pulpa hücreleri üzerine etkisi karşılaştırılmıştır. Resin ile modifiye edilmiş olan TheraCal LC'nin ProRoot MTA ve Biodentine'den daha toksik olduğu belirtilmekle beraber hücrelerin ProRoot MTA ve Biodentine ekstraksiyon ortamında çoğalabildiği ve bu materyallerin bulunduğu ortamda hücre tutunması ve yayılmasının daha kolay olduğu bildirilmiştir (428). Bu çalışmada ise, resin ile modifiye edilmiş kalsiyum silikatlar olan Oxford ActiveCal PC ve Harvard BiCal-CAP'in geleneksel kalsiyum silikatlar olan MTA Angelus ve Biodentine'e kıyasla daha az toksik olduğu, yüksek dozlarında bile canlı embriyo sayısının daha fazla olduğu, büyüme ve gelişimi daha az etkilediği görülmektedir.

MTA, Biodentine, nano-hidroksiapatit kristalleri ve kalsiyum hidroksit ile gerçekleştirilen ve köpeklerde direkt pulpa kuafajının sonuçlarını araştıran bir çalışmada, 7. günde Biodentine ve nano-hidroksiapatit kristallerinin önemli ölçüde daha az inflamatuvar hücre yanıtına neden olduğu ve Biodentine'in direkt pulpa kuafajında kalsiyum hidroksite potansiyel bir alternatif olabileceği bulunmuştur (429). Bu doktora tez çalışmasında ise, Biodentine'e maruz kalan zebra balığı embriyolarının sadece en düşük konsatrasyonda canlılık gösterdiği, diğer dozların toksik etkide bulunduğu görülmektedir. Ancak Dycal ile bir karşılaştırılması yapılmamıştır.

2021 yılında köpekler üzerinde yapılan bir çalışmada, furkasyon perforasyonu onarım malzemesi olarak MTA Angelus ve NeoMTA Plus'ın biyoyumluluğu karşılaştırılmıştır. NeoMTA Plus, 7 gün sonra MTA Angelus'a göre daha iyi bir biyoyumluluk gösterirken bir ay ve üç ay sonra benzer biyoyumluluğa sahip oldukları bildirilmiştir (430).

Liu ve arkadaşları, 2015 yılında Wistar sıçanlarını kullanarak yaptığı bir çalışmada, MTA ve kalsiyum silikat bazlı bir biyoseramik olan iRoot BP Plus'ı kullanmıştır. Bu çalışmanın sonucuna göre, iRoot BP Plus kullanılan sıçan diş pulpasında 1 ve 4 hafta sonrasında reperatif dentin köprüsü oluşabildiği ve bu dentin köprüsünün MTA'dan daha güçlü olduğu bildirilmiştir (206). Bu doktora tez çalışmasında, MTA Angelus materyalinin özellikle yüksek dozlarında diğer materyallere kıyasla daha toksik olduğu görülmektedir.

Bir adeziv sistemin (Scotchbond MP; 3M/ESPE-Dental Products, St Paul, MN, ABD) ve HEMA monomerinin (Polysciences, Inc., Warrington, PA, ABD) sıçan deri altı dokusuna implante edildiği bir çalışmada, bağ dokusuyla temas halinde kalan kısmen polimerize olmuş veya hiç polimerize olmamış rezin partiküllerinin kalıcı inflamatuvar reaksiyon oluşturduğu gözlenmiştir (431). Farelerin deri altı dokusunda yapılan başka bir çalışma, dokuya doğrudan uygulanan adeziv sistemlerin, iyileşmeyi engelleyen kalıcı inflamatuvar reaksiyona neden olduğunu ve bu materyallerin biyouyumlu olarak kabul edilemeyeceğini bildirmiştir (432).

Primat pulparları üzerinde yapılan bir çalışmada, ışıkla sertleşen rezin ile modifiye edilmiş kalsiyum silikat olan TheraCal LC, saf Portland çimentosu, rezin ile modifiye edilmiş kalsiyum hidroksit ve cam iyonomer uygulaması sonrası TheraCal LC'nin daha iyi bir sert doku köprüsü oluşturduğu ve pulpal inflamasyon açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmediği bildirilmiştir (433).

Bu doktora tez çalışmasında da Oxford ActiveCal PC materyalinin kontrol grubu ile karşılaştırıldığında hiçbir saat diliminde dört farklı dozda istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmadığı, dolayısıyla Oxford ActiveCal PC materyalinin rezin içerikli olmasına rağmen biyouyumluluğunun iyi olduğu belirlenmiştir.

Rezin ile modifiye edilmiş kalsiyum silikat (TheraCal LC) ve geleneksel kalsiyum silikatın (ProRoot MTA) pulpotomi sonrası pulpa iyileşmesi üzerindeki etkisini karşılaştırmayı amaçlayan bir çalışmada, sıçanların maksiller birinci azı dişlerine pulpotomi uygulanmış ve pulpa yanıtları değerlendirilmiştir. TheraCal LC'nin inflamatuvar hücrelerin kalıcı infiltrasyonunu indüklediği ve reperatif dentin oluşumunu geciktirdiği ancak her iki materyalin de uzun vadede pulpal iyileşmeye izin verdiği gösterilmiştir. Bu çalışmanın sonucunda rezin ile modifiye edilmiş kalsiyum silikatların geleneksel kalsiyum silikatlara göre daha az biyouyumluluk gösterdiği ve biyoindüktif etkisinin daha az olduğu bildirilmiştir (434).

Bu doktora tez çalışmasında ise Harvard BioCal-CAP isimli rezin ile modifiye edilmiş kalsiyum silikat esaslı materyalin yüksek dozlarında bile canlılık görüldüğü, bu materyalin biyouyumluluğunun geleneksel kalsiyum silikatlara göre daha yüksek olduğu görülmektedir.

Dikalsiyum veya trikalsiyum silikatla modifiye edilmiş hidrofilik rezinlerin kullanımının konservatif restorasyonların uzun süreli performansını artırdığı söylenmektedir (435). Bu nedenle günümüzde geleneksel kalsiyum silikatlara alternatif olarak rezin ile modifiye edilmiş kalsiyum silikatların kullanımı araştırmaların konusu olmaktadır. MTA Angelus, NeoMTA ve TheraCal PT'nin kullanıldığı ve fare modelinde dentin-pulpa kompleksinin rejenerasyonu ve biyouyumluluğunun incelendiği bir çalışmada, gruplar arasında istatistiksel bir farklılık bulunmamakla birlikte üç materyalin de biyouyumlu olduğu bildirilmiştir (436). Bu doktora tez çalışmasında, rezin ile modifiye edilmiş kalsiyum silikat esaslı materyaller olan Oxford ActiveCal PC ve Harvard BiCal-CAP'in MTA Angelus ve Biodentin'e kıyasla daha biyouyumlu olduğu sonucuna varılmıştır.

İmmatür daimi molar dişlere Biodentine ve MTA kullanılarak yapılan direkt pulpa kuafajının klinik ve radyografik olarak karşılaştırıldığı bir çalışmada, 6 ve 1 yıllık takip sürelerinde her iki materyalin de %100 başarı gösterdiği bildirilmekle birlikte daha uzun süreli takiplerin yapılması önerilmiştir (437).

Biodentine, ProRoot MTA ve TheraCal LC ile pulpotomi yapılan dişlerin takip edildiği bir başka klinik çalışmada ise, Biodentin ve MTA'nın TheraCal LC'dan daha iyi performans gösterdiği ve iyi klinik sonuçları olduğu bildirilmiştir (438). Bu doktora tez çalışmasında ise, bu çalışmanın aksine, rezin ile modifiye edilmiş kalsiyum silikatların yüksek dozlarda bile daha iyi canlı oranlarına sahip olduğu gösterilmektedir. Yapılan diğer araştırmalar göz önünde bulundurularak yeni materyaller ile yapılacak klinik çalışmalara ihtiyaç olduğu görülmektedir.

Apoptoz, düzensiz hücrelerin diğer hücreler tarafından fagosite edilerek uzaklaştırılması olarak tanımlanabilir. Dişin, periodontal ligamentin ve destekleyici dokuların embriyolojik gelişiminde, ağız hastalıklarının ilerlemesinde, kemik rezorpsiyonunda, immünolojik yanıt ve inflamasyon sürecinde ve yara iyileşmesinde anahtar rol oynamaktadır. Materyallerin apoptozu indüklemeye veya inhibe etmesinin yanı sıra apoptozun pulpal ve periradiküler hastalıkların patogenezi ile ilişkili olarak araştırılması önemlidir (439).

Pulpa kuafaj tedavisinde kullanılan ticari biyoaktif materyallerin biyouyumluluğunu değerlendiren bir in vitro hücre kültürü çalışmasında, geleneksel (ProRoot MTA, MTA Angelus, Biodentine) ışıkla sertleşen (TheraCal LC) ve dual cure (ACTIVA BioACTIVE, Predicta Bioactive Bulk) kuafaj materyalleri kullanılmıştır. FITC Annexin V Apoptoz Tespit Kiti I ile akış sitometrisi apoptoz tespiti yapılmıştır. MTA, Biodentine, ACTIVA BioACTIVE ve Predicta Bioactive'nin sitotoksikite ve genotoksikite göstermediği bildirilmiştir (440). MTA Angelus materyalinin zebra balığı embriolarında akrinin oranı kullanılarak apoptotik yanıtın değerlendirildiği bu doktora tez çalışmasında ise kontrol grubu ile karşılaştırıldığında tüm dozlarda istatistiksel anlamlılığın çok yüksek düzeyde olduğu görülmektedir.

NeoMTA Plus, ProRootMTA ve Biodentine'in insan dental pulpa kök hücreleri üzerindeki biyouyumluluğunu değerlendiren ve potansiyel in vitro sitotoksik etkilerini karşılaştıran bir çalışmada, tüm materyallerin biyouyumlu olduğu; Annexin V tespit kiti ve akış sitometrisi kullanılarak yapılan apoptoz deneylerinde, insan dental pulpa kök hücreleri üzerinde apoptoza neden olmadığı bildirilmiştir (441). Bu tez çalışmasında ise Biodentine'in en düşük dozunda canlılık görüldüğünden apoptoz deneyine sadece bu grup dahil edilmiştir. Bu dozun apoptozu indüklediği görülmüştür.

Üç adet geleneksel ve üç adet akışkan kompozit rezin olmak üzere altı farklı nanokompozitin (Tetric EvoCeram, Tetric EvoFlow, Filtek Ultimate, Filtek Ultimate Flow, G-aenial ve G-aenial Flo) insan lenfositleri üzerindeki sitotoksikitesini ve genotoksikitesini inceleyen bir çalışmada, her bir materyal hem polimerize edilerek hem de polimerize edilmeden değerlendirilmiştir. Polimerize olmamış formların apoptoz ve nekrozu artırdığı gözlenmiştir. Polimerize edilmemiş materyallerin içeriğindeki monomerler nedeniyle belirli düzeyde sitotoksikite ve genotoksikite sergilediği bildirilmiştir (442).

Bu doktora tez çalışmasında, zebra balığı embriolarının bulunduğu ortama koyulan Oxford ActiveCal PC polimerize edilerek hazırlanmıştır. Yapılan apoptoz deneylerinde doz azaldıkça apoptozun da azaldığı görülmektedir.

Son yıllarda MTA'ya alternatif olarak kullanılabilecek çeşitli kalsiyum silikat bazlı biyomateriyaller geliştirilmiştir. Geleneksel kalsiyum silikatlarla rezin ile modifiye edilmiş kalsiyum silikatların insan osteoblast hücrelerinde (SAOS-2) sitotoksosite, genotoksosite ve apoptoz/nekrozu değerlendiren bir çalışmada, rezin ile modifiye edilmiş kalsiyum silikatların 24 saatlik maruziyetten sonra apoptoz testinde kontrol grubuna göre daha yüksek bir apoptoz yüzdesi gösterdiği bildirilmiştir (443).

Bu doktora tez çalışmasında ise, Harvard BioCal- CAP ticari adıyla piyasaya sürülmüş olan rezin ile modifiye edilmiş kalsiyum silikat materyali yüksek dozlarında bile sağ kalım görülmektedir ve apoptoz deneylerinde geleneksel kalsiyum silikatlara göre daha iyi sonuçlar göstermektedir.

Ticari olarak temin edilebilen MTA ve Biodentin'in zebra balığı embriyoları üzerinde in vivo moleküler toksisitesi incelenmiştir. Biyouyumluluk analizi, hayatta kalma ve koryondan çıkış gibi temel parametreleri ölçen standart toksisite analizleriyle gerçekleştirilmekle beraber farklı konsantrasyonlara maruz kalan zebra balığında ROS indüksiyonu ve apoptoz ölçülmüştür. Materyallerin konsantrasyonundaki artışla birlikte koryondan çıkış ve hayatta kalma oranlarında önemli bir azalma olduğu gösterilmiştir. ROS ve apoptoz deneyleri de değerlendirilerek Biodentin'in MTA'dan daha iyi biyouyumluluğa sahip olduğu bildirilmiştir (444). Bu doktora tez çalışması, geleneksel kalsiyum silikatların yanı sıra rezin ile modifiye edilmiş kalsiyum silikatların da biyouyumluluk ve sitotoksisiteleri incelenmiştir. Çalışmaya ROS analizi dahil edilmemiştir ancak apoptoz deneyleri Cleaved Caspase-3 yöntemi ile desteklenmiştir.

Makkar ve arkadaşlarının çalışmasına paralel olarak, bu çalışmada da materyallerin konsantrasyonundaki artışla birlikte koryondan çıkış ve hayatta kalma oranlarında önemli bir azalma olduğu gösterilmiştir. Ancak Makkar ve arkadaşlarının çalışmasının (444) aksine Biodentin grubunda doza bağlı olarak hayatta kalan canlı sayısı daha fazladır. Dolayısıyla MTA, Biodentin'den daha biyouyumlu bulunmuştur. Bunların yanı sıra rezin ile modifiye edilmiş kalsiyum silikatların, geleneksel kalsiyum silikat materyallerine göre daha iyi biyouyumluluğa sahip olduğu görülmektedir.

Bu doktora tez çalışmasında kullanılan rezin ile modifiye edilmiş kalsiyum silikat esaslı Oxford ActiveCal PC ve Harvard BiCal-CAP, literatürde in vitro veya in vivo herhangi bir sitotoksosite ve biyouyumluluk çalışmasında kullanılmamış olup bu materyallerle ilgili daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

Bu doktora tez çalışmasının limitasyonları aşağıda maddeler halinde belirtilmiştir:

- 1) Hayvan etiği ve bilimsel etik kuralları göz önüne alınarak anlamlı olacak şekilde en az sayıda hayvan kullanılmasına dikkat edilmiştir. Hayvan sayısının artırılması çalışmanın anlamlılığı açısından önemli olmakla birlikte etik açıdan uygun olmadığından yapılan güç analizi doğrultusunda her grupta toplam 180 adet zebra balığı embriyosu kullanılmıştır.
- 2) Geçmişte altın standart olarak kabul edilen kalsiyum hidroksit materyali çalışmaya dahil edilmemiştir. Günümüzde sıklıkla kullanılan ve birçok araştırmacı tarafından altın standart sayılabilecek MTA Angelus materyali kullanılmıştır. Çalışmada sadece kalsiyum silikat esaslı materyallerin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.
- 3) Farklı gruplar ile kalsiyum silikat esaslı materyallerin zebra balığı deneyleri yapılarak sitotoksistelerinin karşılaştırılmasının faydalı olacağı düşünülmektedir.
- 4) Bu çalışmada kullanılan Oxford ActiveCal PC (Oxford Scientific, Elmshorn, Almanya) ve Harvard BioCal-CAP (Harvard Dental International GmbH, Almanya) materyallerinin sitotoksiste ve biyouyumluluklarının değerlendirildiği herhangi bir literatüre rastlanılmamış olup daha fazla in vitro ve in vivo çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.
- 5) Pulpa kuafaj materyallerinin sitotoksiste ve biyouyumluluklarının klinik çalışmalar ile desteklenmesi önerilmektedir.
- 6) Çalışma sadece gelişimsel toksisiteyi araştırmakta olup yetişkin zebra balıkları üzerinde toksiste ve biyouyumluluk değerlendirmesi için ek çalışmalara ihtiyaç vardır.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Çocuk diş hekimliğinde, pulpa kuafajı tedavisinde kullanılan MTA Angelus (Angelus, Brezilya), Biodentine (Septodont, Fransa), Oxford ActiveCal PC (Oxford Scientific, Elmshorn, Almanya) ve Harvard BioCal-CAP (Harvard Dental International GmbH, Almanya) materyallerinin in vivo zebra balığı modeli üzerinde sitotoksik etkilerini ve biyouyumluluklarını inceleyen bu doktora tez çalışmasında elde edilen sonuçlar aşağıda belirtilmiştir.

Oxford ActiveCal PC, MTA Angelus, Biodentine ve Harvard BioCal-CAP materyallerinin altı farklı dozunun 24, 48, 72, 96 ve 120 olmak üzere beş farklı saat diliminde zebra balığı embriyoları üzerinde sağ kalımları incelenmiştir.

- 1) Rezin ile modifiye edilmiş bir kalsiyum silikat olan Oxford ActiveCal PC materyalinin en yüksek dozunda 24. saatte canlı zebra balığı izlenmediğinden en toksik doz X dozu olarak belirlenmiştir.
- 2) Oxford ActiveCal PC materyalinin X/4, X/8, X/16 ve X/32 dozları tüm saat dilimlerinde kontrol grubu ile anlamlı bir farklılık göstermediğinden bu dozlar biyouyumlu kabul edilmiştir.
- 3) Geleneksel bir kalsiyum silikat olan Biodentine materyalinin X, X/2, X/4, X/8 ve X/16 dozlarının tüm saat diliminde zebra balığı embriyolarının sağ kalımı üzerinde toksik etki gösterdiği görülmüştür. Biodentine materyalinin tüm saatlerde toksik olmayan en etkili dozu en seyretik doz olan X/32 dozu olarak belirlenmiştir.
- 4) Rezin ile modifiye edilmiş bir kalsiyum silikat olan Harvard BioCal- CAP materyalinin en yüksek dozunda 24. saatte canlı zebra balığı izlenmediğinden en toksik doz X dozu olarak bulunmuştur.
- 5) Harvard BioCal- CAP materyalinin X/2 dozunun zebra balığı embriyoları üzerinde toksik etkileri gözlenmekle beraber Oxford ActiveCal PC materyalinin X/2 dozu ile kıyaslandığında daha az toksisiteye neden olduğu görülmüştür.

- 6) Harvard BioCal- CAP materyalinin X/4, X/8, X/16 ve X/32 dozları, Oxford ActiveCal PC materyaline benzer olarak tüm saat dilimlerinde kontrol grubu ile anlamlı bir farklılık göstermediğinden bu dozlar biyouyumlu kabul edilmiştir.
- 7) Geleneksel kalsiyum silikat olan ve günümüzde pulpa kuafajında altın standart olarak kabul edilen MTA Angelus materyalinin en yüksek dört dozu tüm saatlerde zebra balığı embriyoları üzerinde toksik etki göstermiştir. MTA Angelus materyalinin en seyreltik iki dozu olan X/16 ve X/32 dozlarında ise kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunamadığından bu dozlar biyouyumlu bulunmuştur.
- 8) Biodentine materyalinin X/16 dozu ile karşılaştırıldığında MTA Angelus materyalinin X/16 dozunda zebra balığı embriyolarında sağ kalımın daha yüksek olduğu görüldüğünden MTA Angelus materyalinin Biodentine materyalinden daha biyouyumlu olduğu belirlenmiştir.
- 9) Dört materyalin zebra balığı embriyoları üzerinde sağ kalım oranları göz önüne alındığında biyouyumlulukları sırasıyla Harvard BioCal- CAP, Oxford ActiveCal PC, MTA Angelus, Biodentine olarak sıralanmaktadır.

Oxford ActiveCal PC, MTA Angelus, Biodentine ve Harvard BioCal-CAP materyallerinin altı farklı dozunun 24, 48, 72, 96 ve 120 olmak üzere beş farklı saat diliminde zebra balığı embriyoları üzerinde koryondan çıkış üzerindeki etkileri incelenmiştir.

- 10) 48. saatte materyallerin hiçbir dozunda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır.
- 11) Oxford ActiveCal PC materyalinin en yüksek iki dozu koryondan çıkışı geciktirirken diğer dört dozun koryondan çıkışı etkilemediği görülmüştür.
- 12) Biodentine materyalinin sadece en seyreltik dozu olan X/32 dozunun koryondan çıkışı etkilemediği görülürken diğer tüm dozlarda koryondan çıkışı geciktirdiği bulunmuştur.
- 13) Harvard BioCal- CAP materyalinin X/4, X/8, X/16 ve X/32 dozlarında koryondan çıkış kontrol grubu ile eş zamanlı gerçekleşmiştir.

- 14) MTA Angelus materyali kontrol grubu ile karşılaştırıldığında en düşük üç dozun hiçbir saat diliminde koryondan çıkışı etkilemediği belirlenmiştir.
- 15) Dört materyalin zebra balığı embriyoları üzerinde koryondan çıkış oranları göz önüne alındığında sağ kalım oranları ile tutarlı sonuçlara ulaşılmıştır.
- 16) Oxford ActiveCal PC, Harvard BioCal-CAP, MTA Angelus ve Biodentine'e maruz bırakılan zebra balığı embriyo/larvalarında 48, 72 ve 96. saatlerde materyallerin yüksek konsantrasyonlarda malformasyonlara yol açtığı görülmüştür. Malformasyon gösteren embriyo/larvaların bir sonraki deney saatine kadar canlılığını yitirdiği belirlenmiştir. Bu nedenle istatistiksel olarak analiz edilememiştir.
- 17) Akridin oranj kullanılarak yapılan apopitoz deneylerinde Oxford ActiveCal PC, Biodentine ve Harvard BioCal- CAP materyallerinin en seyreltik dozlarının apoptotik yanıt oluşturmadığı görülmekle beraber MTA Angelus materyalinin en seyreltik dozu apoptozu indüklemiştir.
- 18) Cleaved Caspase-3 yöntemi ile MTA Angelus materyalinin apoptozu Harvard BioCal- CAP materyalinden daha fazla indüklediği doğrulanmıştır.
- 19) MTA Angelus materyalinin en seyreltik dozu apoptozu indüklerken Biodentine materyalinin en seyreltik dozunda apoptotik yanıt gözlenmemiştir. MTA Angelus materyalinin Biodentine materyaline kıyasla daha toksik olduğu sonucuna varılabilmektedir. Bu sebeple, MTA Angelus ve Biodentine materyallerinin karşılaştırıldığı daha fazla çalışmaya ihtiyaç olduğu düşünülmektedir.

Rezin ile modifiye edilmiş kalsiyum silikatlar grubuna dahil olan Oxford ActiveCal PC materyali ve Harvard BioCal- CAP materyali ile ilgili literatürde herhangi bir toksisite ve biyouyumluluk çalışmasına rastlanılmamıştır. Bu nedenle bu doktora tez çalışması, rutinde sıklıkla kullanılan geleneksel kalsiyum silikatlar (MTA Angelus ve Biodentine) ile piyasaya yeni sürülen rezin ile modifiye edilmiş kalsiyum silikatların (Oxford ActiveCal PC ve Harvard BioCal-CAP) toksisite ve biyouyumluluklarını zebra balığı modeli üzerinde in vivo olarak test etmeyi amaçlamıştır.

Sonuç olarak, bu doktora tez çalışması, diş hekimliği materyallerindeki toksisite ve biyouyumluluk testleri için özgün bir model organizma olan zebra balığının kullanımını sunmaktadır. Zebra balığı, çeşitli bilim dallarında materyallerin toksikolojik etkilerini incelemek amacıyla sıklıkla kullanılan bir in vivo model olmasına rağmen diş hekimliğinde bu çalışmalar oldukça azdır. Bu nedenle, bu tez çalışmasında zebra balığı üzerinde toksisite ve biyouyumluluk araştırılarak diş hekimliği toksikoloji alanına yenilikçi bir bakış açısı getirilmesi hedeflenmiştir. Literatürde rezin ile modifiye edilmiş kalsiyum silikat esaslı materyaller ile ilgili sınırlı çalışma mevcuttur. Pulpa kuafajında kullanılan bu materyallerle ilgili daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır. Bu doktora tez çalışmasında, rezin ile modifiye edilmiş kalsiyum silikat esaslı materyaller (Oxford ActiveCal PC ve Harvard BioCal-CAP) ile geleneksel kalsiyum silikat esaslı materyallerin (MTA Angelus ve Biodentine) karşılaştırılması amaçlanarak zebra balığı üzerinde in vivo deneyler yapılmıştır. Yapılan deneylerde rezin ile modifiye edilmiş kalsiyum silikat esaslı materyallerin (Oxford ActiveCal PC ve Harvard BioCal-CAP) geleneksel kalsiyum silikat esaslı materyallere (MTA Angelus ve Biodentine) kıyasla yüksek dozlarında bile daha az toksik ve daha biyouyumlu olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Ancak, bu doktora tez çalışmasında kullanılan Oxford ActiveCal PC ve Harvard BioCal-CAP isimli piyasaya yeni sürülen rezin ile modifiye edilmiş kalsiyum silikatlarla ilgili in vitro çalışmalara rastlanılmamıştır. Bu sebeple, rezin ile modifiye edilmiş kalsiyum silikat esaslı materyallerle ilgili in vitro ve in vivo araştırmalara ağırlık verilmesi gerektiği düşünülmektedir. Ayrıca, bu doktora tez çalışması in vivo bir çalışma olup klinik çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir.

KAYNAKLAR

1. American Association of Endodontists. (2020). *Glossary of Endodontic Terms* (American Association of Endodontists, Ed.; 10th ed.). American Association of Endodontists (AAE).
2. The American Academy of Pediatric Dentistry. (2009). Guideline on Pulp Therapy for Primary and Immature Permanent Teeth. *Pediatric Dentistry*, 32(6), 10–11.
3. Mjör, I. A., Dah, E., & Cox, C. F. (1991). Healing of pulp exposures: an ultrastructural study. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, 20(10), 496–501. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0714.1991.tb00412.x>
4. International Standard Organisation. (2008). Preclinical Evaluation of Biocompatibility of Medical Devices Used in Dentistry - Test Methods for Dental Material. In *International Standard Organisation: Vol. ISO 7405*. International Standard Organisation.
5. Li, Y., Sui, B., Dahl, C., Bergeron, B., Shipman, P., Niu, L., Chen, J., & Tay, F. R. (2019). Pulpotomy for carious pulp exposures in permanent teeth: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Dentistry*, 84, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2019.03.010>
6. Cushley, S., Duncan, H. F., Lappin, M. J., Chua, P., Elamin, A. D., Clarke, M., & El-Karim, I. A. (2021). Efficacy of direct pulp capping for management of cariously exposed pulps in permanent teeth: a systematic review and meta-analysis. *International Endodontic Journal*, 54(4), 556–571. <https://doi.org/10.1111/iej.13449>
7. Primus, C. M., Tay, F. R., & Niu, L. (2019). Bioactive tri/dicalcium silicate cements for treatment of pulpal and periapical tissues. *Acta Biomaterialia*, 96, 35–54. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.05.050>
8. Parirokh, M., Torabinejad, M., & Dummer, P. M. H. (2018). Mineral trioxide aggregate and other bioactive endodontic cements: an updated overview - part I: vital pulp therapy. *International Endodontic Journal*, 51(2), 177–205. <https://doi.org/10.1111/iej.12841>
9. Cushley, S., Duncan, H. F., Lappin, M. J., Tomson, P. L., Lundy, F. T., Cooper, P., Clarke, M., & El Karim, I. A. (2019). Pulpotomy for mature carious teeth with symptoms of irreversible pulpitis: A systematic review. *Journal of Dentistry*, 88, 103158. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2019.06.005>
10. Camilleri, J., Atmeh, A., Li, X., & Meschi, N. (2022). Present status and future directions: Hydraulic materials for endodontic use. *International Endodontic Journal*, 55(S3), 710–777. <https://doi.org/10.1111/iej.13709>
11. American Association of Endodontists. (2021). AAE Position Statement on Vital Pulp Therapy. *Journal of Endodontics*, 47(9), 1340–1344. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2021.07.015>
12. Gandolfi, M. G., Spagnuolo, G., Siboni, F., Procino, A., Riviaccio, V., Pelliccioni, G. A., Prati, C., & Rengo, S. (2015). Calcium silicate/calcium phosphate biphasic cements for vital pulp therapy: chemical-physical properties and human pulp cells response. *Clinical Oral Investigations*, 19(8), 2075–2089. <https://doi.org/10.1007/s00784-015-1443-2>
13. Chen, L., & Suh, B. I. (2017). Cytotoxicity and biocompatibility of resin-free and resin-modified direct pulp capping materials: A state-of-the-art review. *Dental Materials Journal*, 36(1), 1–7. <https://doi.org/10.4012/dmj.2016-107>
14. Yoshii, E. (1997). Cytotoxic effects of acrylates and methacrylates: Relationships of monomer structures and cytotoxicity. *Journal of Biomedical Materials Research*, 37(4), 517–524. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4636\(19971215\)37:4<517::AID-JBM10>3.0.CO;2-5](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4636(19971215)37:4<517::AID-JBM10>3.0.CO;2-5)
15. Teng, Y., Xie, X., Walker, S., Saxena, M., Kozłowski, D. J., Mumm, J. S., & Cowell, J. K. (2011). Loss of Zebrafish Igi1b Leads to Hydrocephalus and Sensitization to Pentylene-tetrazol Induced Seizure-Like Behavior. *PLoS ONE*, 6(9), e24596. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024596>
16. Clemens, D. M., Németh-Cahalan, K. L., Trinh, L., Zhang, T., Schilling, T. F., & Hall, J. E. (2013). In Vivo Analysis of Aquaporin 0 Function in Zebrafish: Permeability Regulation Is Required for Lens Transparency. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 54(7), 5136. <https://doi.org/10.1167/iovs.13-12337>
17. De Oliveira, R. (2009). *Zebrafish early life-stages and adults as a tool for ecotoxicity assessment*. Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro.

18. Goldberg, M., Njeh, A., & Uzunoglu, E. (2015). Is Pulp Inflammation a Prerequisite for Pulp Healing and Regeneration? *Mediators of Inflammation*, 2015, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2015/347649>
19. Pashley, D. H. (1996). Dynamics of the Pulpo-Dentin Complex. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 7(2), 104–133. <https://doi.org/10.1177/10454411960070020101>
20. Bjørndal, L. (2008). The Caries Process and Its Effect on the Pulp: The Science Is Changing and So Is Our Understanding. *Journal of Endodontics*, 34(7), S2–S5. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2008.02.037>
21. Cooper, P. R., Takahashi, Y., Graham, L. W., Simon, S., Imazato, S., & Smith, A. J. (2010). Inflammation–regeneration interplay in the dentine–pulp complex. *Journal of Dentistry*, 38(9), 687–697. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2010.05.016>
22. Cooper, P. R., McLachlan, J. L., Simon, S., Graham, L. W., & Smith, A. J. (2011). Mediators of Inflammation and Regeneration. *Advances in Dental Research*, 23(3), 290–295. <https://doi.org/10.1177/0022034511405389>
23. Finkelman, R. D., Mohan, S., Jennings, J. C., Taylor, A. K., Jepsen, S., & Baylink, D. J. (2009). Quantitation of growth factors IGF-I, SGF/IGF-II, and TGF- β in human dentin. *Journal of Bone and Mineral Research*, 5(7), 717–723. <https://doi.org/10.1002/jbmr.5650050708>
24. Cassidy, N., Fahey, M., Prime, S. S., & Smith, A. J. (1997). Comparative analysis of transforming growth factor- β isoforms 1–3 in human and rabbit dentine matrices. *Archives of Oral Biology*, 42(3), 219–223. [https://doi.org/10.1016/S0003-9969\(96\)00115-X](https://doi.org/10.1016/S0003-9969(96)00115-X)
25. Smith, A. J., Scheven, B. A., Takahashi, Y., Ferracane, J. L., Shelton, R. M., & Cooper, P. R. (2012). Dentine as a bioactive extracellular matrix. *Archives of Oral Biology*, 57(2), 109–121. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2011.07.008>
26. Smith, A. J., Duncan, H. F., Diogenes, A., Simon, S., & Cooper, P. R. (2016). Exploiting the Bioactive Properties of the Dentin-Pulp Complex in Regenerative Endodontics. *Journal of Endodontics*, 42(1), 47–56. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2015.10.019>
27. Tomson, P. L., Lumley, P. J., Smith, A. J., & Cooper, P. R. (2017). Growth factor release from dentine matrix by pulp-capping agents promotes pulp tissue repair-associated events. *International Endodontic Journal*, 50(3), 281–292. <https://doi.org/10.1111/iej.12624>
28. Ricucci, D., Loghin, S., & Siqueira, J. F. (2014). Correlation between Clinical and Histologic Pulp Diagnoses. *Journal of Endodontics*, 40(12), 1932–1939. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2014.08.010>
29. Trowbridge, H. O. (1981). Pathogenesis of pulpitis resulting from dental caries. *Journal of Endodontics*, 7(2), 52–60. [https://doi.org/10.1016/S0099-2399\(81\)80242-7](https://doi.org/10.1016/S0099-2399(81)80242-7)
30. Ricketts, D. (2001). Management of the deep carious lesion and the vital pulp dentine complex. *British Dental Journal*, 191(11), 606–610. <https://doi.org/10.1038/sj.bdj.4801246>
31. Simon, S. R. J., Berdal, A., Cooper, P. R., Lumley, P. J., Tomson, P. L., & Smith, A. J. (2011). Dentin-Pulp Complex Regeneration. *Advances in Dental Research*, 23(3), 340–345. <https://doi.org/10.1177/0022034511405327>
32. Ghoddusi, J., Forghani, M., & Parisay, I. (2014). New approaches in vital pulp therapy in permanent teeth. *Iranian Endodontic Journal*, 9(1), 15–22.
33. Cvek, M. (1978). A clinical report on partial pulpotomy and capping with calcium hydroxide in permanent incisors with complicated crown fracture. *Journal of Endodontics*, 4(8), 232–237. [https://doi.org/10.1016/S0099-2399\(78\)80153-8](https://doi.org/10.1016/S0099-2399(78)80153-8)
34. Aguilar, P., & Linsuwanont, P. (2011). Vital Pulp Therapy in Vital Permanent Teeth with Cariously Exposed Pulp: A Systematic Review. *Journal of Endodontics*, 37(5), 581–587. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2010.12.004>
35. Simon, S., Perard, M., Zanini, M., Smith, A. J., Charpentier, E., Djole, S. X., & Lumley, P. J. (2013). Should pulp chamber pulpotomy be seen as a permanent treatment? Some preliminary thoughts. *International Endodontic Journal*, 46(1), 79–87. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.2012.02113.x>
36. Asgary, S., Eghbal, M. J., Fazlyab, M., Baghban, A. A., & Ghoddusi, J. (2015). Five-year results of vital pulp therapy in permanent molars with irreversible pulpitis: a non-inferiority multicenter randomized clinical trial. *Clinical Oral Investigations*, 19(2), 335–341. <https://doi.org/10.1007/s00784-014-1244-z>

37. Stanley, H. R. (1989). Pulp capping: Conserving the dental pulp—Can it be done? Is it worth it? *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology*, 68(5), 628–639. [https://doi.org/10.1016/0030-4220\(89\)90252-1](https://doi.org/10.1016/0030-4220(89)90252-1)
38. Demarco, F. F., Rosa, M. S., Tarquínio, S. B. C., & Piva, E. (2005). Influence of the restoration quality on the success of pulpotomy treatment: a preliminary retrospective study. *Journal of Applied Oral Science*, 13(1), 72–77. <https://doi.org/10.1590/S1678-77572005000100015>
39. Mitchell, D. F., & Tarplee, R. E. (1960). Painful pulpitis. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology*, 13(11), 1360–1370. [https://doi.org/10.1016/0030-4220\(60\)90301-7](https://doi.org/10.1016/0030-4220(60)90301-7)
40. Seltzer, S., Bender, I. B., & Ziontz, M. (1963). The dynamics of pulp inflammation: Correlations between diagnostic data and actual histologic findings in the pulp. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology*, 16(8), 969–977. [https://doi.org/10.1016/0030-4220\(63\)90201-9](https://doi.org/10.1016/0030-4220(63)90201-9)
41. Matsuo, T., Nakanishi, T., Shimizu, H., & Ebisu, S. (1996). A clinical study of direct pulp capping applied to carious-exposed pulps. *Journal of Endodontics*, 22(10), 551–556. [https://doi.org/10.1016/S0099-2399\(96\)80017-3](https://doi.org/10.1016/S0099-2399(96)80017-3)
42. Çalışkan, M. K. (1995). Pulpotomy of carious vital teeth with periapical involvement. *International Endodontic Journal*, 28(3), 172–176. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.1995.tb00293.x>
43. Mejare, I., & Cvek, M. (1993). Partial pulpotomy in young permanent teeth with deep carious lesions. *Dental Traumatology*, 9(6), 238–242. <https://doi.org/10.1111/j.1600-9657.1993.tb00279.x>
44. Wolters, W. J., Duncan, H. F., Tomson, P. L., Karim, I. E., McKenna, G., Dorri, M., Stangvaltaite, L., & van der Sluis, L. W. M. (2017). Minimally invasive endodontics: a new diagnostic system for assessing pulpitis and subsequent treatment needs. *International Endodontic Journal*, 50(9), 825–829. <https://doi.org/10.1111/iej.12793>
45. Smith, A. J., Cassidy, N., Perry, H., Bègue-Kirn, C., Ruch, J. V., & Lesot, H. (1995). Reactionary dentinogenesis. *The International Journal of Developmental Biology*, 39(1), 273–280.
46. Tziafas, D. (2004). The Future Role of a Molecular Approach to Pulp-Dentinal Regeneration. *Caries Research*, 38(3), 314–320. <https://doi.org/10.1159/000077771>
47. Hilton, T. J. (2009). Keys to Clinical Success with Pulp Capping: A Review of the Literature. *Operative Dentistry*, 34(5), 615–625. <https://doi.org/10.2341/09-132-0>
48. Oen, K. T., Thompson, V. P., Vena, D., Caufield, P. W., Curro, F., Dasanayake, A., Ship, J. A., & Lindblad, A. (2007). Attitudes and expectations of treating deep caries: a PEARL Network survey. *General Dentistry*, 55(3), 197–203.
49. Kiziltan Eliaçık, B., Tez, B. Ç., Baydili, K. N., & Güven Polat, G. (2022). Attitudes and Treatment Practices of Pediatric Dentists in Turkey About Pulp Therapy in Deciduous Teeth: A Multicentric Survey Study. *Türkiye Klinikleri Journal of Dental Sciences*, 28(1), 86–96. <https://doi.org/10.5336/dentalsci.2021-82967>
50. Mertz-Fairhurst, E. J., Curtis, J. W., Ergle, J. W., Rueggeberg, F. A., & Adair, S. M. (1998). Ultraconservative And Cariostatic Sealed Restorations: Results at Year 10. *The Journal of the American Dental Association*, 129(1), 55–66. <https://doi.org/10.14219/jada.archive.1998.0022>
51. Ribeiro, C. C., Baratieri, L. N., Perdigão, J., Baratieri, N. M., & Ritter, A. V. (1999). A clinical, radiographic, and scanning electron microscopic evaluation of adhesive restorations on carious dentin in primary teeth. *Quintessence International (Berlin, Germany: 1985)*, 30(9), 591–599.
52. Foley, J., Evans, D., & Blackwell, A. (2004). Partial caries removal and cariostatic materials in carious primary molar teeth: a randomised controlled clinical trial. *British Dental Journal*, 197(11), 697–701. <https://doi.org/10.1038/sj.bdj.4811865>
53. Magnusson, B. O., & Sundell, S. O. (1977). Stepwise excavation of deep carious lesions in primary molars. *Journal of the International Association of Dentistry for Children*, 8(2), 36–40.
54. Leksell, E., Ridell, K., Cvek, M., & Mejare, I. (1996). Pulp exposure after stepwise versus direct complete excavation of deep carious lesions in young posterior permanent teeth. *Dental Traumatology*, 12(4), 192–196. <https://doi.org/10.1111/j.1600-9657.1996.tb00513.x>
55. Schwendicke, F., Dörfer, C. E., & Paris, S. (2013). Incomplete Caries Removal. *Journal of Dental Research*, 92(4), 306–314. <https://doi.org/10.1177/0022034513477425>

56. Hayashi, M., Fujitani, M., Yamaki, C., & Momoi, Y. (2011). Ways of enhancing pulp preservation by stepwise excavation—A systematic review. *Journal of Dentistry*, 39(2), 95–107. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2010.10.012>
57. Thompson, V. T., Craig, R. G., Curro, F. A., Green, W. S., & Ship, J. A. (2008). Treatment of deep carious lesions by complete excavation or partial removal. *The Journal of the American Dental Association*, 139(6), 705–712. <https://doi.org/10.14219/jada.archive.2008.0252>
58. Ricketts, D., Kidd, E., Innes, N. P. T., & Clarkson, J. E. (2006). Complete or ultraconservative removal of decayed tissue in unfilled teeth. In D. Ricketts (Ed.), *Cochrane Database of Systematic Reviews*. John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD003808.pub2>
59. Cox, C. F., Hafez, A. A., Akimoto, N., Otsuki, M., & Mills, J. C. (1999). Biological basis for clinical success: pulp protection and the tooth-restoration interface. *Practical Periodontics and Aesthetic Dentistry: PPAD*, 11(7), 819–826; quiz 827.
60. Mickenautsch, S., Yengopal, V., & Banerjee, A. (2010). Pulp response to resin-modified glass ionomer and calcium hydroxide cements in deep cavities: A quantitative systematic review. *Dental Materials*, 26(8), 761–770. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2010.03.021>
61. Bègue-Kirn, C., Smith, A. J., Loriot, M., Kupferle, C., Ruch, J. V, & Lesot, H. (1994). Comparative analysis of TGF beta s, BMPs, IGF1, msxs, fibronectin, osteonectin and bone sialoprotein gene expression during normal and in vitro-induced odontoblast differentiation. *The International Journal of Developmental Biology*, 38(3), 405–420.
62. Al-Hiyasat, A. S., Barrieshi-Nusair, K. M., & Al-Omari, M. A. (2006). The radiographic outcomes of direct pulp-capping procedures performed by dental students. *The Journal of the American Dental Association*, 137(12), 1699–1705. <https://doi.org/10.14219/jada.archive.2006.0116>
63. Dammaschke, T., Leidinger, J., & Schäfer, E. (2010). Long-term evaluation of direct pulp capping—treatment outcomes over an average period of 6.1 years. *Clinical Oral Investigations*, 14(5), 559–567. <https://doi.org/10.1007/s00784-009-0326-9>
64. Barthel, C., Rosenkranz, B., Leuenberg, A., & Roulet, J. (2000). Pulp Capping of Carious Exposures: Treatment Outcome after 5 and 10 Years: A Retrospective Study. *Journal of Endodontics*, 26(9), 525–528. <https://doi.org/10.1097/00004770-200009000-00010>
65. Baume, L. J., & Holz, J. (1981). Long term clinical assessment of direct pulp capping. *International Dental Journal*, 31(4), 251–260.
66. Bergenholtz, G., & Lindhe, J. (1975). Effect of soluble plaque factors on inflammatory reactions in the dental pulp. *European Journal of Oral Sciences*, 83(3), 153–158. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0722.1975.tb01193.x>
67. Watts, A., & Paterson, R. C. (1987). Bacterial contamination as a factor influencing the toxicity of materials to the exposed dental pulp. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology*, 64(4), 466–474. [https://doi.org/10.1016/0030-4220\(87\)90155-1](https://doi.org/10.1016/0030-4220(87)90155-1)
68. Murray, P. E., Windsor, L. J., Smyth, T. W., Hafez, A. A., & Cox, C. F. (2002). Analysis of pulpal reactions to restorative procedures, materials, pulp capping, and future therapies. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 13(6), 509–520. <https://doi.org/10.1177/154411130201300607>
69. Brännström, M., & Nordenvall, K. J. (1978). Bacterial penetration, pulpal reaction and the inner surface of concise enamel bond. Composite fillings in etched and unetched cavities. *Journal of Dental Research*, 57(1), 3–10. <https://doi.org/10.1177/00220345780570011301>
70. Besic, F. C. (1943). The Fate of Bacteria Sealed in Dental Cavities. *Journal of Dental Research*, 22(5), 349–354. <https://doi.org/10.1177/00220345430220050101>
71. Al-Zayer, M. A., Straffon, L. H., Feigal, R. J., & Welch, K. B. (2003). Indirect pulp treatment of primary posterior teeth: a retrospective study. *Pediatric Dentistry*, 25(1), 29–36.
72. Marchi, J., de Araujo, F., Fröner, A., Straffon, L., & Nör, J. (2007). Indirect Pulp Capping in the Primary Dentition: a 4 Year Follow-up Study. *Journal of Clinical Pediatric Dentistry*, 31(2), 68–71. <https://doi.org/10.17796/jcpd.31.2.yum5076341226m5>

73. Pinto, A. S., de Araújo, F. B., Franzon, R., Figueiredo, M. C., Henz, S., García-Godoy, F., & Maltz, M. (2006). Clinical and microbiological effect of calcium hydroxide protection in indirect pulp capping in primary teeth. *American Journal of Dentistry*, 19(6), 382–386.
74. Stanley, H. R. (1998). Criteria for standardizing and increasing credibility of direct pulp capping studies. *American Journal of Dentistry*, 11 Spec No, S17-34.
75. Costa, C. A., Edwards, C. A., & Hanks, C. T. (2001). Cytotoxic effects of cleansing solutions recommended for chemical lavage of pulp exposures. *American Journal of Dentistry*, 14(1), 25–30.
76. Maltz, M., Oliveira, E. F., Fontanella, V., & Carminatti, G. (2007). Deep Caries Lesions after Incomplete Dentine Caries Removal: 40-Month Follow-Up Study. *Caries Research*, 41(6), 493–496. <https://doi.org/10.1159/000109349>
77. Nair, P. N. R., Duncan, H. F., Pitt Ford, T. R., & Luder, H. U. (2008). Histological, ultrastructural, and quantitative investigations on the response of healthy human pulps to experimental capping with mineral trioxide aggregate: a randomized controlled trial. *International Endodontic Journal*, 41(2), 128–150. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.2007.01329.x>
78. Demir, T., & Cehreli, Z. C. (2007). Clinical and radiographic evaluation of adhesive pulp capping in primary molars following hemostasis with 1.25% sodium hypochlorite: 2-year results. *American Journal of Dentistry*, 20(3), 182–188.
79. Accorinte, M. de L. R., Loguercio, A. D., Reis, A., Muench, A., & de Araújo, V. C. (2005). Response of human pulp capped with a bonding agent after bleeding control with hemostatic agents. *Operative Dentistry*, 30(2), 147–155.
80. Bogen, G., Kim, J. S., & Bakland, L. K. (2008). Direct Pulp Capping with Mineral Trioxide Aggregate. *The Journal of the American Dental Association*, 139(3), 305–315. <https://doi.org/10.14219/jada.archive.2008.0160>
81. Silva, G. A. B., Lanza, L. D., Lopes-Júnior, N., Moreira, A., & Alves, J. B. (2006). Direct Pulp Capping with a Dentin Bonding System in Human Teeth: A Clinical and Histological Evaluation. *Operative Dentistry*, 31(3), 297–307. <https://doi.org/10.2341/05-65>
82. de Souza Costa, C. (2000). Current Status of pulp capping with dentin adhesive systems: a review. *Dental Materials*, 16(3), 188–197. [https://doi.org/10.1016/S0109-5641\(00\)00008-7](https://doi.org/10.1016/S0109-5641(00)00008-7)
83. Morotomi, T., Washio, A., & Kitamura, C. (2019). Current and future options for dental pulp therapy. *Japanese Dental Science Review*, 55(1), 5–11. <https://doi.org/10.1016/j.jdsr.2018.09.001>
84. Bergenholtz G, Hørsted-Bindslev P, & Reit C. (2009). *Textbook of endodontolog* (2nd ed.). Wiley-Blackwell.
85. Al-Dlaigan, Y. H. (2015). Pulpotomy Medicaments used in Deciduous Dentition: An Update. *The Journal of Contemporary Dental Practice*, 16(6), 486–503. <https://doi.org/10.5005/jp-journals-10024-1711>
86. Reston, E. G., & De Souza Costa, C. A. (2009). Scanning electron microscopy evaluation of the hard tissue barrier after pulp capping with calcium hydroxide, mineral trioxide aggregate (MTA) or ProRoot MTA. *Australian Endodontic Journal*, 35(2), 78–84. <https://doi.org/10.1111/j.1747-4477.2008.00131.x>
87. Leye Benoist, F., Gaye Ndiaye, F., Kane, A. W., Benoist, H. M., & Farge, P. (2012). Evaluation of mineral trioxide aggregate (MTA) versus calcium hydroxide cement (Dycal®) in the formation of a dentine bridge: a randomised controlled trial. *International Dental Journal*, 62(1), 33–39. <https://doi.org/10.1111/j.1875-595X.2011.00084.x>
88. Kaaren G. Vargas, Fuks, A. B., & Peretz, B. (2016). Pulpotomy Techniques: Cervical (Traditional) and Partial. In A. B. Fuks & Peretz Benjamin (Eds.), *Pediatric Endodontics: Current Concepts in Pulp Therapy for Primary and Young Permanent Teet*. Springer.
89. Cvek, M., Cleaton-Jones, P. E., Austin, J. C., & Andreasen, J. O. (1982). Pulp reactions to exposure after experimental crown fractures or grinding in adult monkeys. *Journal of Endodontics*, 8(9), 391–397. [https://doi.org/10.1016/S0099-2399\(82\)80092-7](https://doi.org/10.1016/S0099-2399(82)80092-7)
90. Fuks, A. B., Chosack, A., Klein, H., & Eidelman, E. (1987). Partial pulpotomy as a treatment alternative for exposed pulps in crown-fractured permanent incisors. *Dental Traumatology*, 3(3), 100–102. <https://doi.org/10.1111/j.1600-9657.1987.tb00610.x>

91. Cohen, B. D., & Combe, E. C. (1994). Development of new adhesive pulp capping materials. *Dental Update*, 21(2), 57–62.
92. Watts, A., & Paterson, R. C. (1987). Pulpal response to a zinc oxide eugenol cement. *International Endodontic Journal*, 20(2), 82–86. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.1987.tb00593.x>
93. Chien, M. M., Setzer, S., & Cleaton-Jones, P. (2001). How does zinc oxide-eugenol compare to ferric sulphate as a pulpotomy material? *SADJ: Journal of the South African Dental Association = Tydskrif van Die Suid-Afrikaanse Tandheelkundige Vereniging*, 56(3), 130–135.
94. Hui-Derksen, E. K., Chen, C.-F., Majewski, R., Tootla, R. G. H., & Boynton, J. R. (2013). Retrospective record review: reinforced zinc oxide-eugenol pulpotomy: a retrospective study. *Pediatric Dentistry*, 35(1), 43–46.
95. Erdem, A. P., Guven, Y., Balli, B., Ilhan, B., Sepet, E., Ulukapi, I., & Aktoren, O. (2011). Success rates of mineral trioxide aggregate, ferric sulfate, and formocresol pulpotomies: a 24-month study. *Pediatric Dentistry*, 33(2), 165–170.
96. Banoe, M., Seif, S., Nazari, Z. E., Jafari-Fesharaki, P., Shahverdi, H. R., Moballegh, A., Moghaddam, K. M., & Shahverdi, A. R. (2010). ZnO nanoparticles enhanced antibacterial activity of ciprofloxacin against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 93B (2), 557–561. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.31615>
97. Schmalz, G., Schweikl, H., Esch, J., & Hiller, K.-A. (1996). Evaluation of a dentin barrier test by cytotoxicity testing of various dental cements. *Journal of Endodontics*, 22(3), 112–115. [https://doi.org/10.1016/S0099-2399\(96\)80285-8](https://doi.org/10.1016/S0099-2399(96)80285-8)
98. Ho, Y.-C., Huang, F.-M., & Chang, Y.-C. (2006). Mechanisms of cytotoxicity of eugenol in human osteoblastic cells in vitro. *International Endodontic Journal*, 39(5), 389–393. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.2006.01091.x>
99. Chang, Y., Tai, K., Huang, F., & Huang, M. (2000). Cytotoxic and Nongenotoxic Effects of Phenolic Compounds in Human Pulp Cell Cultures. *Journal of Endodontics*, 26(8), 440–443. <https://doi.org/10.1097/00004770-200008000-00002>
100. Hume, W. R. (1984). An Analysis of the Release and the Diffusion Through Dentin of Eugenol from Zinc Oxide-Eugenol Mixtures. *Journal of Dental Research*, 63(6), 881–884. <https://doi.org/10.1177/00220345840630061301>
101. Torabinejad, M., Hong, C. U., Pitt Ford, T. R., & Kettering, J. D. (1995). Cytotoxicity of four root end filling materials. *Journal of Endodontics*, 21(10), 489–492. [https://doi.org/10.1016/S0099-2399\(06\)80518](https://doi.org/10.1016/S0099-2399(06)80518)
102. Koulaouzidou, E., Papazisis, K., Economides, N., Beltes, P., & Kortsaris, A. (2005). Antiproliferative Effect of Mineral Trioxide Aggregate, Zinc Oxide-Eugenol Cement, and Glass-Ionomer Cement Against Three Fibroblastic Cell Lines. *Journal of Endodontics*, 31(1), 44–46. <https://doi.org/10.1097/01.DON.0000132302.03725.50>
103. Hume, W. R. (1984). Basic Biological Sciences Effect of Eugenol on Respiration and Division in Human Pulp, Mouse Fibroblasts, and Liver Cells in vitro. *Journal of Dental Research*, 63(11), 1262–1265. <https://doi.org/10.1177/00220345840630110101>
104. Escobar-García, M., Rodríguez-Contreras, K., Ruiz-Rodríguez, S., Pierdant-Pérez, M., Cerda-Cristerna, B., & Pozos-Guillén, A. (2016). Eugenol Toxicity in Human Dental Pulp Fibroblasts of Primary Teeth. *Journal of Clinical Pediatric Dentistry*, 40(4), 312–318. <https://doi.org/10.17796/1053-4628-40.4.312>
105. Tewari, S., & Tewari, S. (2002). Assessment of coronal microleakage in intermediately restored endodontic access cavities. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 93(6), 716–719. <https://doi.org/10.1067/moe.2002.122347>
106. Didilescu, A. C., Cristache, C. M., Andrei, M., Voicu, G., & Perlea, P. (2018). The effect of dental pulp-capping materials on hard-tissue barrier formation. *The Journal of the American Dental Association*, 149(10), 903-917.e4. <https://doi.org/10.1016/j.adaj.2018.06.003>
107. Kanca, J. (1996). Replacement of a fractured incisor fragment over pulpal exposure: a long-term case report. *Quintessence International (Berlin, Germany: 1985)*, 27(12), 829–832.

108. de Souza Costa, C. A., Vaerten, M. A., Edwards, C. A., & Hanks, C. T. (1999). Cytotoxic effects of current dental adhesive systems on immortalized odontoblast cell line MDPC-23. *Dental Materials*, 15(6), 434–441. [https://doi.org/10.1016/S0109-5641\(99\)00071-8](https://doi.org/10.1016/S0109-5641(99)00071-8)
109. Ratanasathien, S., Wataha, J. C., Hanks, C. T., & Dennison, J. B. (1995). Cytotoxic Interactive Effects of Dentin Bonding Components on Mouse Fibroblasts. *Journal of Dental Research*, 74(9), 1602–1606. <https://doi.org/10.1177/00220345950740091601>
110. Kızıltan Eliaçık, B., & Seymen, F. (2021). İki tip bağlayıcı ajanın monomer salınımlarının pulpa fibroblast hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerinin değerlendirilmesi. In *Med Res Rep* (Vol. 4, Issue 1).
111. Ölmez, A., Öztaş, N., Başak, F., & Sabuncuoğlu, B. (1998). A histopathologic study of direct pulp-capping with adhesive resins. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 86(1), 98–103. [https://doi.org/10.1016/S1079-2104\(98\)90157-3](https://doi.org/10.1016/S1079-2104(98)90157-3)
112. Tsuneda, Y., Hayakawa, T., Yamamoto, H., Ikemi, T., & Nemoto, K. (1995). A histopathological study of direct pulp capping with adhesive resins. *Operative Dentistry*, 20(6), 223–229.
113. Costa, C. A., Mesas, A. N., & Hebling, J. (2000). Pulp response to direct capping with an adhesive system. *American Journal of Dentistry*, 13(2), 81–87.
114. Trope, M., McDougal, R., Levin, L., May, K. N., & Swift, E. J. (2002). Capping the Inflamed Pulp under Different Clinical Conditions. *Journal of Esthetic and Restorative Dentistry*, 14(6), 349–357. <https://doi.org/10.1111/j.1708-8240.2002.tb00177.x>
115. Mestreneur, S. R., Holland, R., & Dezan, E. (2003). Influence of age on the behavior of dental pulp of dog teeth after capping with an adhesive system or calcium hydroxide. *Dental Traumatology*, 19(5), 255–261. <https://doi.org/10.1034/j.1600-9657.2003.00167.x>
116. Cox, C. F., Hafez, A. A., Akimoto, N., Otsuki, M., Suzuki, S., & Tarim, B. (1998). Biocompatibility of primer, adhesive and resin composite systems on non-exposed and exposed pulps of non-human primate teeth. *American Journal of Dentistry*, 11 Spec No, S55-63.
117. Akimoto, N., Momoi, Y., Kohno, A., Suzuki, S., Otsuki, M., Suzuki, S., & Cox, C. F. (1998). Biocompatibility of Clearfil Liner Bond 2 and Clearfil AP-X system on nonexposed and exposed primate teeth. *Quintessence International (Berlin, Germany: 1985)*, 29(3), 177–188.
118. Fujitani, M., Shibata, S., Van Meerbeek, B., Yoshida, Y., & Shintani, H. (2002). Direct adhesive pulp capping: pulpal healing and ultra-morphology of the resin-pulp interface. *American Journal of Dentistry*, 15(6), 395–402.
119. Kitasako, Y., Inokoshi, S., & Tagami, J. (1999). Effects of direct resin pulp capping techniques on short-term response of mechanically exposed pulps. *Journal of Dentistry*, 27(4), 257–263. [https://doi.org/10.1016/S0300-5712\(98\)00054-2](https://doi.org/10.1016/S0300-5712(98)00054-2)
120. Kitasako, Y., Inokoshi, S., Fujitani, M., Otsuki, M., & Tagami, J. (1998). Short-term reaction of exposed monkey pulp beneath adhesive resins. *Operative Dentistry*, 23(6), 308–317.
121. Hafez, A. A., Cox, C. F., Tarim, B., Otsuki, M., & Akimoto, N. (2002). An in vivo evaluation of hemorrhage control using sodium hypochlorite and direct capping with a one- or two-component adhesive system in exposed nonhuman primate pulps. *Quintessence International (Berlin, Germany: 1985)*, 33(4), 261–272.
122. Kemalsubay, R., & Demirci, M. (2005). Pulp Tissue Reactions to a Dentin Bonding Agent as a Direct Capping Agent. *Journal of Endodontics*, 31(3), 201–204. <https://doi.org/10.1097/01.don.0000137649.24821.91>
123. Hörsted-Bindslev, P., Vilkinis, V., & Sidlauskas, A. (2003). Direct capping of human pulps with a dentin bonding system or with calcium hydroxide cement. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 96(5), 591–600. [https://doi.org/10.1016/S1079-2104\(03\)00155-0](https://doi.org/10.1016/S1079-2104(03)00155-0)
124. Fernandes, A. M., Silva, G. A. B., Lopes, N., Napimoga, M. H., Benatti, B. B., & Alves, J. B. (2008). Direct capping of human pulps with a dentin bonding system and calcium hydroxide: an immunohistochemical analysis. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 105(3), 385–390. <https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2007.08.031>

125. Accorinte, M. de L. R., Loguercio, A. D., Reis, A., Muench, A., & de Araújo, V. C. (2005). Adverse effects of human pulps after direct pulp capping with the different components from a total-etch, three-step adhesive system. *Dental Materials*, 21(7), 599–607. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2004.08.008>
126. Accorinte, M. L. R., Loguercio, A. D., Reis, A., & Costa, C. A. S. (2008). Response of human pulps capped with different self-etch adhesive systems. *Clinical Oral Investigations*, 12(2), 119–127. <https://doi.org/10.1007/s00784-007-0161-9>
127. Pameijer, C. H., & Stanley, H. R. (1998). The disastrous effects of the “total etch” technique in vital pulp capping in primates. *American Journal of Dentistry*, 11 Spec No, S45-54.
128. Ford, T. R. P., & Roberts, G. J. (1991). Immediate and delayed direct pulp capping with the use of a new visible light-cured calcium hydroxide preparation. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology*, 71(3), 338–342. [https://doi.org/10.1016/0030-4220\(91\)90311-Y](https://doi.org/10.1016/0030-4220(91)90311-Y)
129. Andrei, M., Vacaru, R. P., Coricovac, A., Ilinca, R., Didilescu, A. C., & Demetrescu, I. (2021). The Effect of Calcium-Silicate Cements on Reparative Dentinogenesis Following Direct Pulp Capping on Animal Models. *Molecules*, 26(9), 2725. <https://doi.org/10.3390/molecules26092725>
130. Simon, S., Cooper, P., Smith, A., Picard, B., Naulin Ifi, C., & Berdal, A. (2008). Evaluation of a new laboratory model for pulp healing: preliminary study. *International Endodontic Journal*, 41(9), 781–790. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.2008.01433.x>
131. Long, Y., Liu, S., Zhu, L., Liang, Q., Chen, X., & Dong, Y. (2017). Evaluation of Pulp Response to Novel Bioactive Glass Pulp Capping Materials. *Journal of Endodontics*, 43(10), 1647–1650. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2017.03.011>
132. Abebe, W., Pashley, D., & Rueggeberg, F. (2005). Vasorelaxant Effect of Resin-Based, Single-Bottle Dentin Bonding Systems. *Journal of Endodontics*, 31(3), 194–197. <https://doi.org/10.1097/01.don.0000137647.06614.ad>
133. Jacobsen, T., & Söderholm, K.-J. (1995). Some effects of water on dentin bonding. *Dental Materials*, 11(2), 132–136. [https://doi.org/10.1016/0109-5641\(95\)80048-4](https://doi.org/10.1016/0109-5641(95)80048-4)
134. Jontell, M., Hanks, C. T., Bratel, J., & Bergenholtz, G. (1995). Effects of Unpolymerized Resin Components on the Function of Accessory Cells Derived from the Rat Incisor Pulp. *Journal of Dental Research*, 74(5), 1162–1167. <https://doi.org/10.1177/00220345950740050401>
135. Sidhu, S., & Nicholson, J. (2016). A Review of Glass-Ionomer Cements for Clinical Dentistry. *Journal of Functional Biomaterials*, 7(3), 16. <https://doi.org/10.3390/jfb7030016>
136. Hanna, S. N., Perez Alfayate, R., & Prichard, J. (2020). Vital Pulp Therapy an Insight Over the Available Literature and Future Expectations. *European Endodontic Journal*, 5(1), 46–53. <https://doi.org/10.14744/ej.2019.44154>
137. Mount, GJ., & Papageorgiou E. (1992). Some curing properties of light activated glass ionomer cement. *Australian Dental Journal*, 37, 309–310.
138. de Souza Costa, C. A., Aparecida Giro, E. M., Lopes do Nascimento, A. B., Teixeira, H. M., & Hebling, J. (2003). Short-term evaluation of the pulpo-dentin complex response to a resin-modified glass-ionomer cement and a bonding agent applied in deep cavities. *Dental Materials*, 19(8), 739–746. [https://doi.org/10.1016/S0109-5641\(03\)00021-6](https://doi.org/10.1016/S0109-5641(03)00021-6)
139. Cui, C., Zhou, X., Chen, X., Fan, M., Bian, Z., & Chen, Z. (2009). The adverse effect of self-etching adhesive systems on dental pulp after direct pulp capping. *Quintessence International (Berlin, Germany: 1985)*, 40(6), e26-34.
140. do Nascimento, A. B., Fontana, U. F., Teixeira, H. M., & Costa, C. A. (2000). Biocompatibility of a resin-modified glass-ionomer cement applied as pulp capping in human teeth. *American Journal of Dentistry*, 13(1), 28–34.
141. Murray, P. E., Hafez, A. A., Smith, A. J., & Cox, C. F. (2002). Bacterial microleakage and pulp inflammation associated with various restorative materials. *Dental Materials*, 18(6), 470–478. [https://doi.org/10.1016/S0109-5641\(01\)00072-0](https://doi.org/10.1016/S0109-5641(01)00072-0)
142. Heys, R. J., & Fitzgerald, M. (1991). Microleakage of Three Cement Bases. *Journal of Dental Research*, 70(1), 55–58. <https://doi.org/10.1177/00220345910700010901>

143. Murray, P. E., Hafez, A. A., Windsor, L. J., Smith, A. J., & Cox, C. F. (2002). Comparison of pulp responses following restoration of exposed and non-exposed cavities. *Journal of Dentistry*, 30(5–6), 213–222. [https://doi.org/10.1016/S0300-5712\(02\)00021-0](https://doi.org/10.1016/S0300-5712(02)00021-0)
144. de Souza Costa, C. A., Hebling, J., Garcia-Godoy, F., & Hanks, C. T. (2003). In vitro cytotoxicity of five glass-ionomer cements. *Biomaterials*, 24(21), 3853–3858. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(03\)00253-9](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(03)00253-9)
145. Müller, J., Hörz, W., Bruckner, G., & Kraft, E. (1990). An experimental study on the biocompatibility of lining cements based on glass ionomer as compared with calcium hydroxide. *Dental Materials*, 6(1), 35–40. [https://doi.org/10.1016/0109-5641\(90\)90042-D](https://doi.org/10.1016/0109-5641(90)90042-D)
146. Schröder, U. (1985). Effects of Calcium Hydroxide-containing Pulp-capping Agents on Pulp Cell Migration, Proliferation, and Differentiation. *Journal of Dental Research*, 64(4), 541–548. <https://doi.org/10.1177/002203458506400407>
147. Barthel, C. R., Levin, L. G., Reisner, H. M., & Trope, M. (2003). TNF- α release in monocytes after exposure to calcium hydroxide treated Escherichia coli LPS. *International Endodontic Journal*, 30(3), 155–159. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2591.1997.00066.x>
148. 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*, 2014, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2014/181945>
149. de Lourdes Rodrigues Accorinte, M., Reis, A., Dourado Loguercio, A., Cavalcanti de Araújo, V., & Muench, A. (2006). Influence of rubber dam isolation on human pulp responses after capping with calcium hydroxide and an adhesive system. *Quintessence International (Berlin, Germany: 1985)*, 37(3), 205–212.
150. Robertson, A., Andreasen, F. M., Andreasen, J. O., & Norén, J. G. (2001). Long-term prognosis of crown-fractured permanent incisors. The effect of stage of root development and associated luxation injury. *International Journal of Paediatric Dentistry*, 10(3), 191–199. <https://doi.org/10.1046/j.1365-263x.2000.00191.x>
151. Stuart, K. G., Miller, C. H., Brown, C. E., & Newton, C. W. (1991). The comparative antimicrobial effect of calcium hydroxide. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology*, 72(1), 101–104. [https://doi.org/10.1016/0030-4220\(91\)90198-L](https://doi.org/10.1016/0030-4220(91)90198-L)
152. Prosser, H. J., Groffman, D. M., & Wilson, A. D. (1982). The Effect of Composition on the Erosion Properties of Calcium Hydroxide Cements. *Journal of Dental Research*, 61(12), 1431–1435. <https://doi.org/10.1177/00220345820610121101>
153. Covaci, A., Ciocan, L. T., Gălbinașu, B., Bucur, M. V., Matei, M., & Didilescu, A. C. (2022). Dental Pulp Response to Different Types of Calcium-Based Materials Applied in Deep Carious Lesion Treatment-A Clinical Study. *Journal of Functional Biomaterials*, 13(2). <https://doi.org/10.3390/jfb13020051>
154. Cox, C. F., Sübay, R. K., Ostro, E., Suzuki, S., & Suzuki, S. H. (1996). Tunnel defects in dentin bridges: their formation following direct pulp capping. *Operative Dentistry*, 21(1), 4–11.
155. Kitasako, Y., Ikeda, M., & Tagami, J. (2008). Pulpal responses to bacterial contamination following dentin bridging beneath hard-setting calcium hydroxide and self-etching adhesive resin system. *Dental Traumatology*, 24(2), 201–206. <https://doi.org/10.1111/j.1600-9657.2007.00517.x>
156. Ulmanský, M., Sela, J., & Sela, M. (1972). Scanning electron microscopy of calcium hydroxide induced bridges. *Journal of Oral Pathology and Medicine*, 1(5), 244–248. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0714.1972.tb01662.x>
157. Graham, L., Cooper, P. R., Cassidy, N., Nor, J. E., Sloan, A. J., & Smith, A. J. (2006). The effect of calcium hydroxide on solubilisation of bio-active dentine matrix components. *Biomaterials*, 27(14), 2865–2873. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.12.020>
158. Smith, A. J. (2003). Vitality of the dentin-pulp complex in health and disease: growth factors as key mediators. *Journal of Dental Education*, 67(6), 678–689.
159. Zhang, W., Walboomers, X. F., & Jansen, J. A. (2008). The formation of tertiary dentin after pulp capping with a calcium phosphate cement, loaded with PLGA microparticles containing TGF- β 1. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 85A (2), 439–444. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.31558>

160. Duque, C., Hebling, J., Smith, A. J., Giro, E. M. A., Oliveira, M. F., & De Souza Costa, C. A. (2006). Reactionary dentinogenesis after applying restorative materials and bioactive dentin matrix molecules as liners in deep cavities prepared in nonhuman primate teeth. *Journal of Oral Rehabilitation*, 33(6), 452–461. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2842.2005.01585.x>
161. Torabinejad, M., Watson, T. F., & Pitt Ford, T. R. (1993). Sealing ability of a mineral trioxide aggregate when used as a root end filling material. *Journal of Endodontics*, 19(12), 591–595. [https://doi.org/10.1016/S0099-2399\(06\)80271-2](https://doi.org/10.1016/S0099-2399(06)80271-2)
162. Casella, G., & Ferlito, S. (2006). The use of mineral trioxide aggregate in endodontics. *Minerva Stomatologica*, 55(3), 123–143.
163. Hakki, S. S., Bozkurt, S. B., Hakki, E. E., & Belli, S. (2009). Effects of Mineral Trioxide Aggregate on Cell Survival, Gene Expression Associated with Mineralized Tissues, and Biomineralization of Cementoblasts. *Journal of Endodontics*, 35(4), 513–519. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2008.12.016>
164. Torabinejad, M., & White, D. J. (1998). *Tooth Filling Material and Method of Use* (Patent 5,769,638).
165. Camilleri, J. (2008). Characterization of hydration products of mineral trioxide aggregate. *International Endodontic Journal*, 41(5), 408–417. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.2007.01370.x>
166. Camilleri, J., & Pitt Ford, T. R. (2006). Mineral trioxide aggregate: a review of the constituents and biological properties of the material. *International Endodontic Journal*, 39(10), 747–754. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.2006.01135.x>
167. Fridland, M., & Rosado, R. (2005). MTA Solubility: A Long Term Study. *Journal of Endodontics*, 31(5), 376–379. <https://doi.org/10.1097/01.DON.0000140566.97319.3e>
168. Fridland, M., & Rosado, R. (2003). Mineral Trioxide Aggregate (MTA) Solubility and Porosity with Different Water-to-Powder Ratios. *Journal of Endodontics*, 29(12), 814–817. <https://doi.org/10.1097/00004770-200312000-00007>
169. 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), 349–353. [https://doi.org/10.1016/S0099-2399\(06\)80967-2](https://doi.org/10.1016/S0099-2399(06)80967-2)
170. Islam, I., Kheng Chng, H., & Jin Yap, A. U. (2006). Comparison of the Physical and Mechanical Properties of MTA and Portland Cement. *Journal of Endodontics*, 32(3), 193–197. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2005.10.043>
171. Tomson, P. L., Grover, L. M., Lumley, P. J., Sloan, A. J., Smith, A. J., & Cooper, P. R. (2007). Dissolution of bio-active dentine matrix components by mineral trioxide aggregate. *Journal of Dentistry*, 35(8), 636–642. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2007.04.008>
172. Aeinehchi, M., Eslami, B., Ghanbariha, M., & Saffar, A. S. (2003). Mineral trioxide aggregate (MTA) and calcium hydroxide as pulp-capping agents in human teeth: a preliminary report. *International Endodontic Journal*, 36(3), 225–235. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2591.2003.00652.x>
173. Song, J.-S., Mante, F. K., Romanow, W. J., & Kim, S. (2006). Chemical analysis of powder and set forms of Portland cement, gray ProRoot MTA, white ProRoot MTA, and gray MTA-Angelus. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 102(6), 809–815. <https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2005.11.034>
174. Ferik Luketić, S., Malčić, A., Jukić, S., Anić, I., Šegović, S., & Kalenić, S. (2008). Coronal Microleakage of Two Root-end Filling Materials Using a Polymicrobial Marker. *Journal of Endodontics*, 34(2), 201–203. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2007.09.019>
175. Ford, T. R. P., Torabinejad, M., Abedi, H. R., Bakland, L. K., & Kariyawasam, S. P. (1996). Using Mineral Trioxide Aggregate as a Pulp-Capping Material. *The Journal of the American Dental Association*, 127(10), 1491–1494. <https://doi.org/10.14219/jada.archive.1996.0058>
176. Faraco, I. M., & Holland, R. (2001). Response of the pulp of dogs to capping with mineral trioxide aggregate or a calcium hydroxide cement. *Dental Traumatology*, 17(4), 163–166. <https://doi.org/10.1034/j.1600-9657.2001.170405.x>

177. Dominguez, M., Witherspoon, D., Gutmann, J., & Opperman, L. (2003). Histological and Scanning Electron Microscopy Assessment of Various Vital Pulp-Therapy Materials. *Journal of Endodontics*, 29(5), 324–333. <https://doi.org/10.1097/00004770-200305000-00003>
178. Briso, A. L. F., Rahal, V., Mestrenner, S. R., & Dezan Junior, E. (2006). Biological response of pulps submitted to different capping materials. *Brazilian Oral Research*, 20(3), 219–225. <https://doi.org/10.1590/S1806-83242006000300007>
179. de Souza Costa, C. A., Duarte, P. T., de Souza, P. P. C., Giro, E. M. A., & Hebling, J. (2008). Cytotoxic effects and pulpal response caused by a mineral trioxide aggregate formulation and calcium hydroxide. *American Journal of Dentistry*, 21(4), 255–261.
180. Percinoto, C., de Castro, A. M., & Pinto, L. M. C. P. (2006). Clinical and radiographic evaluation of pulp tomies employing calcium hydroxide and trioxide mineral aggregate. *General Dentistry*, 54(4), 258–261.
181. Qudeimat, M. A., Barrieshi-Nusair, K. M., & Owais, A. I. (2007). Calcium Hydroxide vs. Mineral Trioxide Aggregates for Partial Pulpotomy of Permanent Molars with Deep Caries. *European Archives of Paediatric Dentistry*, 8(2), 99–104. <https://doi.org/10.1007/BF03262577>
182. Tuna, D., & Ölmez, A. (2008). Clinical long-term evaluation of MTA as a direct pulp capping material in primary teeth. *International Endodontic Journal*, 41(4), 273–278. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.2007.01339.x>
183. Accorinte, M. de L. R., Holland, R., Reis, A., Bortoluzzi, M. C., Murata, S. S., Dezan, E., Souza, V., & Alessandro, L. D. (2008). Evaluation of Mineral Trioxide Aggregate and Calcium Hydroxide Cement as Pulp-capping Agents in Human Teeth. *Journal of Endodontics*, 34(1), 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2007.09.012>
184. Chacko, Dr. V., & Kurikose, Dr. S. (2006). Human pulpal response to Mineral Trioxide Aggregate (MTA): A histologic study. *Journal of Clinical Pediatric Dentistry*, 30(3), 203–209. <https://doi.org/10.17796/jcpd.30.3.38h13g5p84651652>
185. Farsi, N., Alamoudi, N., Balto, K., & Al Mushayt, A. (2007). Clinical Assessment of Mineral Trioxide Aggregate (MTA) as Direct Pulp Capping in Young Permanent Teeth. *Journal of Clinical Pediatric Dentistry*, 31(2), 72–76. <https://doi.org/10.17796/jcpd.31.2.n462281458372u64>
186. Caicedo, R., Abbott, P., Alongi, D., & Alarcon, M. (2006). Clinical, radiographic, and histological analysis of the effects of mineral trioxide aggregate used in direct pulp capping and pulp tomies of primary teeth. *Australian Dental Journal*, 51(4), 297–305. <https://doi.org/10.1111/j.1834-7819.2006.tb00447.x>
187. Nowicka, A., Lipski, M., Parafiniuk, M., Sporniak-Tutak, K., Lichota, D., Kosierkiewicz, A., Kaczmarek, W., & Buczkowska-Radlińska, J. (2013). Response of Human Dental Pulp Capped with Biodentine and Mineral Trioxide Aggregate. *Journal of Endodontics*, 39(6), 743–747. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2013.01.005>
188. Camilleri, J., Sorrentino, F., & Damidot, D. (2013). Investigation of the hydration and bioactivity of radiopacified tricalcium silicate cement, Biodentine and MTA Angelus. *Dental Materials*, 29(5), 580–593. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2013.03.007>
189. Septodont. (2017). *Biodentine Safety Data Sheet*. <https://www.septodont.es/wp-content/uploads/sites/16/2022/11/Biodentine-SDS.pdf?x41233>
190. Tran, X. V., Gorin, C., Willig, C., Baroukh, B., Pellat, B., Decup, F., Opsahl Vital, S., Chaussain, C., & Boukpepsi, T. (2012). Effect of a Calcium-silicate-based Restorative Cement on Pulp Repair. *Journal of Dental Research*, 91(12), 1166–1171. <https://doi.org/10.1177/0022034512460833>
191. Laurent, P., Camps, J., & About, I. (2012). Biodentine™ induces TGF-β1 release from human pulp cells and early dental pulp mineralization. *International Endodontic Journal*, 45(5), 439–448. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.2011.01995.x>
192. Shayegan, A., Jurysta, C., Atash, R., Petein, M., & Abbeele, A. Vanden. (2012). Biodentine used as a pulp-capping agent in primary pig teeth. *Pediatric Dentistry*, 34(7), e202–8.
193. 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), 24–35. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2018.09.008>

194. Davaie, S., Hooshmand, T., & Ansarifard, S. (2021). Different types of bioceramics as dental pulp capping materials: A systematic review. *Ceramics International*, 47(15), 20781–20792. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2021.04.193>
195. 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), 1686–1691. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2018.06.009>
196. Nowicka, A., Wilk, G., Lipski, M., Kolečki, J., & Buczkowska-Radlińska, J. (2015). Tomographic Evaluation of Reparative Dentin Formation after Direct Pulp Capping with Ca(OH)₂, MTA, Biodentine, and Dentin Bonding System in Human Teeth. *Journal of Endodontics*, 41(8), 1234–1240. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2015.03.017>
197. Dube, K., Jain, P., Rai, A., & Paul, B. (2018). Preventive endodontics by direct pulp capping with restorative dentin substitute-biodentine: A series of fifteen cases. *Indian Journal of Dental Research*, 29(3), 268. https://doi.org/10.4103/ijdr.IJDR_292_15
198. Awawdeh, L., Al-Qudah, A., Hamouri, H., & Chakra, R. J. (2018). Outcomes of Vital Pulp Therapy Using Mineral Trioxide Aggregate or Biodentine: A Prospective Randomized Clinical Trial. *Journal of Endodontics*, 44(11), 1603–1609. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2018.08.004>
199. Cheng, L., Ye, F., Yang, R., Lu, X., Shi, Y., Li, L., Fan, H., & Bu, H. (2010). Osteoinduction of hydroxyapatite/β-tricalcium phosphate bioceramics in mice with a fractured fibula. *Acta Biomaterialia*, 6(4), 1569–1574. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2009.10.050>
200. Hermansson, L. (2014). *Nanostructural Bioceramics* (L. Hermansson, Ed.). Jenny Stanford Publishing. <https://doi.org/10.1201/b17300>
201. Saikia, K., Bhattacharya, T., Bhuyan, S., Talukdar, D., Saikia, S., & Jitesh, P. (2008). Calcium phosphate ceramics as bone graft substitutes in filling bone tumor defects. *Indian Journal of Orthopaedics*, 42(2), 169. <https://doi.org/10.4103/0019-5413.39588>
202. Shi, S., Bao, Z. F., Liu, Y., Zhang, D. D., Chen, X., Jiang, L. M., & Zhong, M. (2016). Comparison of in vivo dental pulp responses to capping with iRoot BP Plus and mineral trioxide aggregate. *International Endodontic Journal*, 49(2), 154–160. <https://doi.org/10.1111/iej.12439>
203. Camilleri, J. (2014). *Mineral Trioxide Aggregate in Dentistry: From Preparation to Application* (J. Camilleri, Ed.). Springer.
204. Malhotra, S. (2014). Bioceramic Technology in Endodontics. *British Journal of Medicine and Medical Research*, 4(12), 2446–2454. <https://doi.org/10.9734/BJMMR/2014/7143>
205. Elshamy, F. M., Elraih, H., Gupta, I., & Idris, F. A. (2016). Antibacterial Effect of New Bioceramic Pulp Capping Material on the Main Cariogenic Bacteria. *The Journal of Contemporary Dental Practice*, 17(5), 349–353. <https://doi.org/10.5005/jp-journals-10024-1854>
206. Liu, S., Wang, S., & Dong, Y. (2015). Evaluation of a Bioceramic as a Pulp Capping Agent In Vitro and In Vivo. *Journal of Endodontics*, 41(5), 652–657. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2014.12.009>
207. Zhang, S., Yang, X., & Fan, M. (2013). BioAggregate and iRoot BP Plus optimize the proliferation and mineralization ability of human dental pulp cells. *International Endodontic Journal*, 46(10), 923–929. <https://doi.org/10.1111/iej.12082>
208. Machado, J., Johnson, J. D., & Paranjpe, A. (2016). The Effects of Endosequence Root Repair Material on Differentiation of Dental Pulp Cells. *Journal of Endodontics*, 42(1), 101–105. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2015.08.007>
209. Park, J.-W., Hong, S.-H., Kim, J.-H., Lee, S.-J., & Shin, S.-J. (2010). X-Ray diffraction analysis of White ProRoot MTA and Diadent BioAggregate. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 109(1), 155–158. <https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2009.08.039>
210. Yalcin, M., Arslan, U., & Dundar, A. (2014). Evaluation of antibacterial effects of pulp capping agents with direct contact test method. *European Journal of Dentistry*, 08(01), 095–099. <https://doi.org/10.4103/1305-7456.126256>

211. Mukhtar-Fayyad, D. (2011). Cytocompatibility of new bioceramic-based materials on human fibroblast cells (MRC-5). *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 112(6), e137–e142. <https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2011.05.042>
212. Leal, F., De-Deus, G., Brandão, C., Luna, A. S., Fidel, S. R., & Souza, E. M. (2011). Comparison of the root-end seal provided by bioceramic repair cements and White MTA. *International Endodontic Journal*, 44(7), 662–668. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.2011.01871.x>
213. Zhang, H., Pappen, F. G., & Haapasalo, M. (2009). Dentin Enhances the Antibacterial Effect of Mineral Trioxide Aggregate and Bioaggregate. *Journal of Endodontics*, 35(2), 221–224. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2008.11.001>
214. Bolhari, B., Nekoofar, M. H., Sharifian, M., Ghabrai, S., Meraji, N., & Dummer, P. M. H. (2014). Acid and Microhardness of Mineral Trioxide Aggregate and Mineral Trioxide Aggregate-like Materials. *Journal of Endodontics*, 40(3), 432–435. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2013.10.014>
215. Alsubait, S. A., Hashem, Q., AlHargan, N., AlMohimeed, K., & Alkahtani, A. (2014). Comparative Evaluation of Push-out Bond Strength of ProRoot MTA, Bioaggregate and Biodentine. *The Journal of Contemporary Dental Practice*, 15(3), 336–340. <https://doi.org/10.5005/jp-journals-10024-1539>
216. Hashem, A. A. R., & Wanees Amin, S. A. (2012). The Effect of Acidity on Dislodgment Resistance of Mineral Trioxide Aggregate and Bioaggregate in Furcation Perforations: An In Vitro Comparative Study. *Journal of Endodontics*, 38(2), 245–249. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2011.09.013>
217. Shokouhinejad, N., Nekoofar, M. H., Razmi, H., Sajadi, S., Davies, T. E., Saghiri, M. A., Gorjestani, H., & Dummer, P. M. H. (2012). Bioactivity of EndoSequence Root Repair Material and Bioaggregate. *International Endodontic Journal*, 45(12), 1127–1134. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.2012.02083.x>
218. Yan, P., Yuan, Z., Jiang, H., Peng, B., & Bian, Z. (2010). Effect of bioaggregate on differentiation of human periodontal ligament fibroblasts. *International Endodontic Journal*, 43(12), 1116–1121. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.2010.01786.x>
219. 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), 1145–1148. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2010.03.025>
220. Hung, C.-J., Kao, C.-T., Chen, Y.-J., Shie, M.-Y., & Huang, T.-H. (2013). Antiosteoclastogenic Activity of Silicate-based Materials Antagonizing Receptor Activator for Nuclear Factor KappaB Ligand-induced Osteoclast Differentiation of Murine Macrophages. *Journal of Endodontics*, 39(12), 1557–1561. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2013.07.004>
221. Hashiguchi, D., Fukushima, H., Nakamura, M., Morikawa, K., Yasuda, H., Udagawa, N., Maki, K., & Jimi, E. (2011). Mineral trioxide aggregate solution inhibits osteoclast differentiation through the maintenance of osteoprotegerin expression in osteoblasts. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 96A(2), 358–364. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.32990>
222. Hashiguchi, D., Fukushima, H., Yasuda, H., Masuda, W., Tomikawa, M., Morikawa, K., Maki, K., & Jimi, E. (2011). Mineral Trioxide Aggregate Inhibits Osteoclastic Bone Resorption. *Journal of Dental Research*, 90(7), 912–917. <https://doi.org/10.1177/0022034511407335>
223. Zhang, J., Zhu, L., & Peng, B. (2015). Effect of BioAggregate on osteoclast differentiation and inflammatory bone resorption *in vivo*. *International Endodontic Journal*, 48(11), 1077–1085. <https://doi.org/10.1111/iej.12405>
224. Formosa, L. M., Mallia, B., & Camilleri, J. (2012). The effect of curing conditions on the physical properties of tricalcium silicate cement for use as a dental biomaterial. *International Endodontic Journal*, 45(4), 326–336. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.2011.01980.x>
225. Nielsen MJ, Casey JA, VanderWeele RA, & Vandewalle KS. (2016). Mechanical properties of new dental pulp-capping materials. *General Dentistry*.
226. Poggio, C., Ceci, M., Dagna, A., Beltrami, R., Colombo, M., & Chiesa, M. (2015). In vitro cytotoxicity evaluation of different pulp capping materials: a comparative study. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, 66(3), 181–188. <https://doi.org/10.1515/aiht-2015-66-2589>

227. 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>
228. Deepa, V., Dhamaraju, B., Bollu, I., & Balaji, T. (2016). Shear bond strength evaluation of resin composite bonded to three different liners: TheraCal LC, Biodentine, and resin-modified glass ionomer cement using universal adhesive: An in vitro study. *Journal of Conservative Dentistry*, 19(2), 166. <https://doi.org/10.4103/0972-0707.178696>
229. 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), 1786–1791. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2017.06.025>
230. 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), 2074–2080. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2017.07.010>
231. 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), 5009–5024. <https://doi.org/10.1007/s00784-021-03811-0>
232. Gomes-Filho, J. E., de Faria, M. D., Bernabé, P. F. E., Nery, M. J., Otoboni-Filho, J. A., Dezan-Júnior, E., de Moraes Costa, M. M. T., & Cannon, M. (2008). Mineral Trioxide Aggregate but not Light-cure Mineral Trioxide Aggregate Stimulated Mineralization. *Journal of Endodontics*, 34(1), 62–65. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2007.09.018>
233. Sanz, J. L., Soler-Doria, A., López-García, S., García-Bernal, D., Rodríguez-Lozano, F. J., Lozano, A., Llena, 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), 1896–1906. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2021.08.001>
234. 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), 1510–1522. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2015.09.020>
235. Aranha, A. M. F., Giro, E. M. A., Hebling, J., Lessa, F. C. R., & Costa, C. A. de S. (2010). Effects of light-curing time on the cytotoxicity of a restorative composite resin on odontoblast-like cells. *Journal of Applied Oral Science*, 18(5), 461–466. <https://doi.org/10.1590/S1678-77572010000500006>
236. Kızıltan, B. B. (2004). *Günümüzde kullanılan iki tip bağlayıcı ajanın fibroplast hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerinin incelenmesi*. İstanbul Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi.
237. Hench, L. L., & Wilson, J. (1984). Surface-Active Biomaterials. *Science*, 226(4675), 630–636. <https://doi.org/10.1126/science.6093253>
238. Dennis, L., Anthony, S., Longo, D., Larry, J., & Loscalzo, J. (2015). *Harrison's Principles of Internal Medicine* (19th ed.). McGraw-Hill Education/Medical.
239. Klaassen, C. (2013). *Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons* (8th ed.). McGraw-Hill Education/Medical.
240. Garrido, M., Morales, D., Saldías, M. P., Fernández, C., Villalobos, V., Cerda, O., & Cáceres, M. (2021). Cellular response of human apical papilla cells to calcium hydroxide and tricalcium silicate-based cements. *BMC Oral Health*, 21(1), 106. <https://doi.org/10.1186/s12903-021-01467-6>
241. Guarina, R. (2004). *New Drug Approval Process: Accelerating Global Registrations*. Marcel Dekker, Inc.
242. Summerfield, S. G., & Dong, K. C. (2013). In vitro, in vivo and in silico models of drug distribution into the brain. *Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*, 40(3), 301–314. <https://doi.org/10.1007/s10928-013-9303-7>

243. Hartung, T. (2009). Food for thought on in silico methods in toxicology. *ALTEX*, 155–166. <https://doi.org/10.14573/altex.2009.3.155>
244. Gnesi, S., & Rensink, A. (2014, April 5). Fundamental Approaches to Software Engineering. *17th International Conference, FASE 2014, Held as Part of the European Joint Conferences on Theory and Practice of Software*.
245. Jeong, H., Tombor, B., Albert, R., Oltvai, Z. N., & Barabási, A.-L. (2000). The large-scale organization of metabolic networks. *Nature*, 407(6804), 651–654. <https://doi.org/10.1038/35036627>
246. Madorran, E., Stožer, A., Bevc, S., & Maver, U. (2019). In vitro toxicity model: Upgrades to bridge the gap between preclinical and clinical research. *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences*. <https://doi.org/10.17305/bjbms.2019.4378>
247. Zeisberg, M., Yang, C., Martino, M., Duncan, M. B., Rieder, F., Tanjore, H., & Kalluri, R. (2007). Fibroblasts Derive from Hepatocytes in Liver Fibrosis via Epithelial to Mesenchymal Transition. *Journal of Biological Chemistry*, 282(32), 23337–23347. <https://doi.org/10.1074/jbc.M700194200>
248. Cressey, D. (2015). DNA repair sleuths win chemistry Nobel. *Nature*, 526(7573), 307–308. <https://doi.org/10.1038/nature.2015.18515>
249. Glass, L. (2001). Synchronization and rhythmic processes in physiology. *Nature*, 410(6825), 277–284. <https://doi.org/10.1038/35065745>
250. Song, W., Li, S., Tang, Q., Chen, L., & Yuan, Z. (2021). In vitro biocompatibility and bioactivity of calcium silicate-based bioceramics in endodontics (Review). *International Journal of Molecular Medicine*, 48(1), 128. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2021.4961>
251. Henderson, V. C., Kimmelman, J., Fergusson, D., Grimshaw, J. M., & Hackam, D. G. (2013). Threats to Validity in the Design and Conduct of Preclinical Efficacy Studies: A Systematic Review of Guidelines for In Vivo Animal Experiments. *PLoS Medicine*, 10(7), e1001489. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001489>
252. Ricucci, D., & Siqueira, J. F. (2010). Biofilms and Apical Periodontitis: Study of Prevalence and Association with Clinical and Histopathologic Findings. *Journal of Endodontics*, 36(8), 1277–1288. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2010.04.007>
253. Nagendrababu, V., Kishen, A., Murray, P. E., Nekoofar, M. H., Figueiredo, J. A. P., Priya, E., Jayaraman, J., Pulikkotil, S. J., & Dummer, P. M. H. (2019). Preferred Reporting Items for Animal Studies in Endodontology: a development protocol. *International Endodontic Journal*, 52(9), 1290–1296. <https://doi.org/10.1111/iej.13125>
254. Kim, D. S., & Hahn, Y. (2015). The acquisition of novel N-glycosylation sites in conserved proteins during human evolution. *BMC Bioinformatics*, 16(1), 29. <https://doi.org/10.1186/s12859-015-0468-5>
255. Tortora, G., & Derrickson, B. (2011). *Principles of Anatomy and Physiology* (13th ed.). Wiley.
256. Westbrook, J. I., Rob, M. I., Woods, A., & Parry, D. (2011). Errors in the administration of intravenous medications in hospital and the role of correct procedures and nurse experience. *BMJ Quality & Safety*, 20(12), 1027–1034. <https://doi.org/10.1136/bmjqs-2011-000089>
257. Kilkenny, C., Browne, W. J., Cuthill, I. C., Emerson, M., & Altman, D. G. (2010). Improving Bioscience Research Reporting: The ARRIVE Guidelines for Reporting Animal Research. *PLoS Biology*, 8(6), e1000412. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000412>
258. Kilkenny, C., Parsons, N., Kadyszewski, E., Festing, M. F. W., Cuthill, I. C., Fry, D., Hutton, J., & Altman, D. G. (2009). Survey of the Quality of Experimental Design, Statistical Analysis and Reporting of Research Using Animals. *PLoS ONE*, 4(11), e7824. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007824>
259. Selderslaghs, I. W. T., Hooyberghs, J., Blust, R., & Witters, H. E. (2013). Assessment of the developmental neurotoxicity of compounds by measuring locomotor activity in zebrafish embryos and larvae. *Neurotoxicology and Teratology*, 37, 44–56. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2013.01.003260>
260. Hill, A. J., Teraoka, H., Heideman, W., & Peterson, R. E. (2005). Zebrafish as a Model Vertebrate for Investigating Chemical Toxicity. *Toxicological Sciences*, 86(1), 6–19. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfi110>

261. Jacobson, J. L., Fein, G. G., Jacobson, S. W., Schwartz, P. M., & Dowler, J. K. (1984). The transfer of polychlorinated biphenyls (PCBs) and polybrominated biphenyls (PBBs) across the human placenta and into maternal milk. *American Journal of Public Health*, 74(4), 378–379. <https://doi.org/10.2105/AJPH.74.4.378>
262. Veldman, M. B., & Lin, S. (2008). Zebrafish as a Developmental Model Organism for Pediatric Research. *Pediatric Research*, 64(5), 470–476. <https://doi.org/10.1203/PDR.0b013e318186e609>
263. Hamilton, F. (1822). *An account of the fishes found in the river Ganges and its branches / by Francis Hamilton, (formerly Buchanan,) ...; With a volume of plates in royal quarto*. Printed for A. Constable and company; [etc., etc.]. <https://doi.org/10.5962/bhl.title.6897>
264. Streisinger, G., Walker, C., Dower, N., Knauber, D., & Singer, F. (1981). Production of clones of homozygous diploid zebra fish (*Brachydanio rerio*). *Nature*, 291(5813), 293–296. <https://doi.org/10.1038/291293a0>
265. Kimmel, C. B. (1993). Patterning the Brain of the Zebrafish Embryo. *Annual Review of Neuroscience*, 16(1), 707–732. <https://doi.org/10.1146/annurev.ne.16.030193.003423>
266. Kimmel, C. B., Warga, R. M., & Schilling, T. F. (1990). Origin and organization of the zebrafish fate map. *Development*, 108(4), 581–594. <https://doi.org/10.1242/dev.108.4.581>
267. Kimmel, C. B. (1989). Genetics and early development of zebrafish. *Trends in Genetics*, 5, 283–288. [https://doi.org/10.1016/0168-9525\(89\)90103-0](https://doi.org/10.1016/0168-9525(89)90103-0)
268. Felsenfeld, A. L., Walker, C., Westerfield, M., Kimmel, C., & Streisinger, G. (1990). Mutations affecting skeletal muscle myofibril structure in the zebrafish*. *Development*, 108(3), 443–459. <https://doi.org/10.1242/dev.108.3.443>
269. Hatta, K., Kimmel, C. B., Ho, R. K., & Walker, C. (1991). The cyclops mutation blocks specification of the floor plate of the zebrafish central nervous system. *Nature*, 350(6316), 339–341. <https://doi.org/10.1038/350339a0>
270. Grunwald, D. J., Kimmel, C. B., Westerfield, M., Walker, C., & Streisinger, G. (1988). A neural degeneration mutation that spares primary neurons in the zebrafish. *Developmental Biology*, 126(1), 115–128. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(88\)90245-X](https://doi.org/10.1016/0012-1606(88)90245-X)
271. Grunwald, D. J., & Eisen, J. S. (2002). Headwaters of the zebrafish — emergence of a new model vertebrate. *Nature Reviews Genetics*, 3(9), 717–724. <https://doi.org/10.1038/nrg892>
272. Postlethwait, J. H., Johnson, S. L., Midson, C. N., Talbot, W. S., Gates, M., Ballinger, E. W., Africa, D., Andrews, R., Carl, T., Eisen, J. S., Horne, S., Kimmel, C. B., Hutchinson, M., Johnson, M., & Rodriguez, A. (1994). A Genetic Linkage Map for the Zebrafish. *Science*, 264(5159), 699–703. <https://doi.org/10.1126/science.8171321>
273. Shimoda, N., Knapik, E. W., Ziniti, J., Sim, C., Yamada, E., Kaplan, S., Jackson, D., de Sauvage, F., Jacob, H., & Fishman, M. C. (1999). Zebrafish Genetic Map with 2000 Microsatellite Markers. *Genomics*, 58(3), 219–232. <https://doi.org/10.1006/geno.1999.5824>
274. Childs, S., Weinstein, B. M., Mohideen, M.-A. P. K., Donohue, S., Bonkovsky, H., & Fishman, M. C. (2000). Zebrafish dracula encodes ferrochelatase and its mutation provides a model for erythropoietic protoporphyria. *Current Biology*, 10(16), 1001–1004. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(00\)00653-9](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(00)00653-9)
275. Wang, H., Long, Q., Marty, S. D., Sassa, S., & Lin, S. (1998). A zebrafish model for hepatoerythropoietic porphyria. *Nature Genetics*, 20(3), 239–243. <https://doi.org/10.1038/3041>
276. Brownlie, A., Donovan, A., Pratt, S. J., Paw, B. H., Oates, A. C., Brugnara, C., Witkowska, H. E., Sassa, S., & Zon, L. I. (1998). Positional cloning of the zebrafish sauternes gene: a model for congenital sideroblastic anaemia. *Nature Genetics*, 20(3), 244–250. <https://doi.org/10.1038/3049>
277. Talbot, W. S., & Hopkins, N. (2000). Zebrafish mutations and functional analysis of the vertebrate genome. *Genes & Development*, 14(7), 755–762.
278. Nasevicius, A., & Ekker, S. C. (2000). Effective targeted gene ‘knockdown’ in zebrafish. *Nature Genetics*, 26(2), 216–220. <https://doi.org/10.1038/79951>
279. Howe, K., Clark, M. D., Torroja, C. F., Torrance, J., Berthelot, C., Muffato, M., Collins, J. E., Humphray, S., McLaren, K., Matthews, L., McLaren, S., Sealy, I., Caccamo, M., Churcher, C., Scott, C.,

- Barrett, J. C., Koch, R., Rauch, G.-J., White, S., ... Stemple, D. L. (2013). The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*, 496(7446), 498–503. <https://doi.org/10.1038/nature12111>
280. Sprague, J. (2001). The Zebrafish Information Network (ZFIN): a resource for genetic, genomic, and developmental research. *Nucleic Acids Research*, 29(1), 87–90. <https://doi.org/10.1093/nar/29.1.87>
281. Stella, S., & Montoya, G. (2016). The genome editing revolution: A CRISPR-Cas TALE off-target story. *BioEssays*, 38, S4–S13. <https://doi.org/10.1002/bies.201670903>
282. Hwang, W. Y., Fu, Y., Reyon, D., Maeder, M. L., Kaini, P., Sander, J. D., Joung, J. K., Peterson, R. T., & Yeh, J.-R. J. (2013). Heritable and Precise Zebrafish Genome Editing Using a CRISPR-Cas System. *PLoS ONE*, 8(7), e68708. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068708>
283. Hruscha, A., Krawitz, P., Rechenberg, A., Heinrich, V., Hecht, J., Haass, C., & Schmid, B. (2013). Efficient CRISPR/Cas9 genome editing with low off-target effects in zebrafish. *Development*, 140(24), 4982–4987. <https://doi.org/10.1242/dev.099085>
284. Chang, T.-Y., Pardo-Martin, C., Allalou, A., Wählby, C., & Yanik, M. F. (2012). Fully automated cellular-resolution vertebrate screening platform with parallel animal processing. *Lab Chip*, 12(4), 711–716. <https://doi.org/10.1039/C1LC20849G>
285. Early, J. J., Marshall-Phelps, K. L., Williamson, J. M., Swire, M., Kamadurai, H., Muskavitch, M., & Lyons, D. A. (2018). An automated high-resolution in vivo screen in zebrafish to identify chemical regulators of myelination. *ELife*, 7. <https://doi.org/10.7554/eLife.35136>
286. Pardo-Martin, C., Chang, T.-Y., Koo, B. K., Gilleland, C. L., Wasserman, S. C., & Yanik, M. F. (2010). High-throughput in vivo vertebrate screening. *Nature Methods*, 7(8), 634–636. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1481>
287. Astell, K. R., & Sieger, D. (2020). Zebrafish In Vivo Models of Cancer and Metastasis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 10(8). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a037077>
288. Lewis, K. E., & Eisen, J. S. (2003). From cells to circuits: development of the zebrafish spinal cord. *Progress in Neurobiology*, 69(6), 419–449. [https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(03\)00052-2](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(03)00052-2)
289. Barbazuk, W. B., Korf, I., Kadavi, C., Heyen, J., Tate, S., Wun, E., Bedell, J. A., McPherson, J. D., & Johnson, S. L. (2000). The Syntenic Relationship of the Zebrafish and Human Genomes. *Genome Research*, 10(9), 1351–1358. <https://doi.org/10.1101/gr.144700>
290. Muto, A., & Kawakami, K. (2013). Prey capture in zebrafish larvae serves as a model to study cognitive functions. *Frontiers in Neural Circuits*, 7. <https://doi.org/10.3389/fncir.2013.00110>
291. Newman, M., Ebrahimie, E., & Lardelli, M. (2014). Using the zebrafish model for Alzheimer's disease research. *Frontiers in Genetics*, 5. <https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00189>
292. Norton, W., & Bally-Cuif, L. (2010). Adult zebrafish as a model organism for behavioural genetics. *BMC Neuroscience*, 11(1), 90. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-11-90>
293. Dent, J. A., Polson, A. G., & Klymkowsky, M. W. (1989). A whole mount immunocytochemical analysis of the expression of the intermediate filament protein vimentin in *Xenopus*. *Development*, 105(1), 61–74. <https://doi.org/10.1242/dev.105.1.61>
294. Klymkowsky, M. W., & Hanken, J. (1991). *Whole-Mount Staining of Xenopus and Other Vertebrates* (pp. 419–441). [https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(08\)60290-3](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(08)60290-3)
295. Lieschke, G. J., & Currie, P. D. (2007). Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nature Reviews Genetics*, 8(5), 353–367. <https://doi.org/10.1038/nrg2091>
296. Linney, E., Upchurch, L., & Donerly, S. (2004). Zebrafish as a neurotoxicological model. *Neurotoxicology and Teratology*, 26(6), 709–718. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2004.06.015>
297. Kimmel, C. B., Ballard, W. W., Kimmel, S. R., Ullmann, B., & Schilling, T. F. (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental Dynamics*, 203(3), 253–310. <https://doi.org/10.1002/aja.1002030302>

298. Parichy, D. M., Elizondo, M. R., Mills, M. G., Gordon, T. N., & Engeszer, R. E. (2009). Normal table of postembryonic zebrafish development: Staging by externally visible anatomy of the living fish. *Developmental Dynamics*, 238(12), 2975–3015. <https://doi.org/10.1002/dvdy.22113>
299. Spitsbergen, J. M., & Kent, M. L. (2003). The State of the Art of the Zebrafish Model for Toxicology and Toxicologic Pathology Research—Advantages and Current Limitations. *Toxicologic Pathology*, 31(1_suppl), 62–87. <https://doi.org/10.1080/01926230390174959>
300. Teraoka, H., Dong, W., & Hiraga, T. (2003). Zebrafish as a novel experimental model for developmental toxicology. *Congenital Anomalies*, 43(2), 123–132. <https://doi.org/10.1111/j.1741-4520.2003.tb01036.x>
301. Leslie, E. J., Liu, H., Carlson, J. C., Shaffer, J. R., Feingold, E., Wehby, G., Laurie, C. A., Jain, D., Laurie, C. C., Doheny, K. F., McHenry, T., Resick, J., Sanchez, C., Jacobs, J., Emanuele, B., Vieira, A. R., Neiswanger, K., Standley, J., Czeizel, A. E., ... Marazita, M. L. (2016). A Genome-wide Association Study of Nonsyndromic Cleft Palate Identifies an Etiologic Missense Variant in GRHL3. *The American Journal of Human Genetics*, 98(4), 744–754. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2016.02.014>
302. Liu, H., Leslie, E. J., Jia, Z., Smith, T., Eshete, M., Butali, A., Dunnwald, M., Murray, J., & Cornell, R. A. (2016). Irf6 directly regulates Klf17 in zebrafish periderm and Klf4 in murine oral epithelium, and dominant-negative KLF4 variants are present in patients with cleft lip and palate. *Human Molecular Genetics*, 25(4), 766–776. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddv614>
303. Leslie, E. J., Taub, M. A., Liu, H., Steinberg, K. M., Koboldt, D. C., Zhang, Q., Carlson, J. C., Hetmanski, J. B., Wang, H., Larson, D. E., Fulton, R. S., Kousa, Y. A., Fakhouri, W. D., Naji, A., Ruczinski, I., Begum, F., Parker, M. M., Busch, T., Standley, J., ... Murray, J. C. (2015). Identification of Functional Variants for Cleft Lip with or without Cleft Palate in or near PAX7, FGFR2, and NOG by Targeted Sequencing of GWAS Loci. *The American Journal of Human Genetics*, 96(3), 397–411. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2015.01.004>
304. Liu, H., Leslie, E. J., Carlson, J. C., Beaty, T. H., Marazita, M. L., Lidral, A. C., & Cornell, R. A. (2017). Identification of common non-coding variants at 1p22 that are functional for non-syndromic orofacial clefting. *Nature Communications*, 8(1), 14759. <https://doi.org/10.1038/ncomms14759>
305. Chiquet, B. T., Yuan, Q., Swindell, E. C., Maili, L., Plant, R., Dyke, J., Boyer, R., Teichgraeber, J. F., Greives, M. R., Mulliken, J. B., Letra, A., Blanton, S. H., & Hecht, J. T. (2018). Knockdown of Crisp1d2 in zebrafish identifies a novel network for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate candidate genes. *European Journal of Human Genetics*, 26(10), 1441–1450. <https://doi.org/10.1038/s41431-018-0192-5>
306. Watt, K. E. N., Neben, C. L., Hall, S., Merrill, A. E., & Trainor, P. A. (2018). tp53-dependent and independent signaling underlies the pathogenesis and possible prevention of Acrofacial Dysostosis–Cincinnati type. *Human Molecular Genetics*, 27(15), 2628–2643. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddy172>
307. Noack Watt, K. E., Achilleos, A., Neben, C. L., Merrill, A. E., & Trainor, P. A. (2016). The Roles of RNA Polymerase I and III Subunits Polr1c and Polr1d in Craniofacial Development and in Zebrafish Models of Treacher Collins Syndrome. *PLOS Genetics*, 12(7), e1006187. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006187>
308. Chassaing, N., Sorrentino, S., Davis, E. E., Martin-Coignard, D., Iacovelli, A., Paznekas, W., Webb, B. D., Faye-Petersen, O., Encha-Razavi, F., Lequeux, L., Vigouroux, A., Yesilyurt, A., Boyadjiev, S. A., Kayserili, H., Loget, P., Carles, D., Sergi, C., Puvabanditsin, S., Chen, C.-P., ... Jabs, E. W. (2012). OTX2 mutations contribute to the otocephaly-dysgnathia complex. *Journal of Medical Genetics*, 49(6), 373–379. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2012-100892>
309. Ng, D., Thakker, N., Corcoran, C. M., Donnai, D., Perveen, R., Schneider, A., Hadley, D. W., Tifft, C., Zhang, L., Wilkie, A. O. M., van der Smagt, J. J., Gorlin, R. J., Burgess, S. M., Bardwell, V. J., Black, G. C. M., & Biesecker, L. G. (2004). Oculofaciocardiodental and Lenz microphthalmia syndromes result from distinct classes of mutations in BCOR. *Nature Genetics*, 36(4), 411–416. <https://doi.org/10.1038/ng1321>
310. Gebuijs, I. G. E., Metz, J. R., Zethof, J., Carels, C. E. L., Wagener, F. A. D. T. G., & Von den Hoff, J. W. (2020). The anti-epileptic drug valproic acid causes malformations in the developing craniofacial skeleton of zebrafish larvae. *Mechanisms of Development*, 163, 103632. <https://doi.org/10.1016/j.mod.2020.103632>

311. Yamaguchi, T., Hosomichi, K., Narita, A., Shiota, T., Tomoyasu, Y., Maki, K., & Inoue, I. (2011). Exome resequencing combined with linkage analysis identifies novel PTH1R variants in primary failure of tooth eruption in Japanese. *Journal of Bone and Mineral Research*, 26(7), 1655–1661. <https://doi.org/10.1002/jbmr.385>
312. Yuan, Q., Zhao, M., Tandon, B., Maili, L., Liu, X., Zhang, A., Baugh, E. H., Tran, T., Silva, R. M., Hecht, J. T., Swindell, E. C., Wagner, D. S., & Letra, A. (2017). Role of WNT10A in failure of tooth development in humans and zebrafish. *Molecular Genetics & Genomic Medicine*, 5(6), 730–741. <https://doi.org/10.1002/mgg3.332>
313. Bloch-Zupan, A., Jamet, X., Etard, C., Laugel, V., Muller, J., Geoffroy, V., Strauss, J.-P., Pelletier, V., Marion, V., Poch, O., Strahle, U., Stoetzel, C., & Dollfus, H. (2011). Homozygosity Mapping and Candidate Prioritization Identify Mutations, Missed by Whole-Exome Sequencing, in SMOC2, Causing Major Dental Developmental Defects. *The American Journal of Human Genetics*, 89(6), 773–781. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2011.11.002>
314. Gregory-Evans, C. Y., Moosajee, M., Hodges, M. D., Mackay, D. S., Game, L., Vargesson, N., Bloch-Zupan, A., Ruschendorf, F., Santos-Pinto, L., Wackens, G., & Gregory-Evans, K. (2007). SNP genome scanning localizes oto-dental syndrome to chromosome 11q13 and microdeletions at this locus implicate FGF3 in dental and inner-ear disease and FADD in ocular coloboma. *Human Molecular Genetics*, 16(20), 2482–2493. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddm204>
315. Atukorala, A. D. S., & Ratnayake, R. K. (2021). Cellular and molecular mechanisms in the development of a cleft lip and/or cleft palate; insights from zebrafish (*Danio rerio*). *The Anatomical Record*, 304(8), 1650–1660. <https://doi.org/10.1002/ar.24547>
316. Raterman, S. T., Metz, J. R., Wagener, F. A. D. T. G., & Von den Hoff, J. W. (2020). Zebrafish Models of Craniofacial Malformations: Interactions of Environmental Factors. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.600926>
317. Prajsnar, T. K., Renshaw, S. A., Ogryzko, N. V., Foster, S. J., Serror, P., & Mesnage, S. (2013). Zebrafish as a Novel Vertebrate Model to Dissect Enterococcal Pathogenesis. *Infection and Immunity*, 81(11), 4271–4279. <https://doi.org/10.1128/IAI.00976-13>
318. Chen, Y.-Z., Yang, Y.-L., Chu, W.-L., You, M.-S., & Lo, H.-J. (2015). Zebrafish Egg Infection Model for Studying *Candida albicans* Adhesion Factors. *PLOS ONE*, 10(11), e0143048. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143048>
319. Lu, J.-J., Lo, H.-J., Wu, Y.-M., Chang, J.-Y., Chen, Y.-Z., & Wang, S.-H. (2018). DST659 genotype of *Candida albicans* showing positive association between biofilm formation and dominance in Taiwan. *Medical Mycology*. <https://doi.org/10.1093/mmy/myx151>
320. Leu, S.-J., Lee, Y.-C., Lee, C.-H., Liao, P.-Y., Chiang, C.-W., Yang, C.-M., Su, C.-H., Ou, T.-Y., Liu, K.-J., Lo, H.-J., Tsai, B.-Y., & Yang, Y.-Y. (2020). Generation and Characterization of Single Chain Variable Fragment against Alpha-Enolase of *Candida albicans*. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(8), 2903. <https://doi.org/10.3390/ijms21082903>
321. Chao, C.-C., Hsu, P.-C., Jen, C.-F., Chen, I.-H., Wang, C.-H., Chan, H.-C., Tsai, P.-W., Tung, K.-C., Wang, C.-H., Lan, C.-Y., & Chuang, Y.-J. (2010). Zebrafish as a Model Host for *Candida albicans* Infection. *Infection and Immunity*, 78(6), 2512–2521. <https://doi.org/10.1128/IAI.01293-09>
322. Al-Zubidi, M., Widziolek, M., Court, E. K., Gains, A. F., Smith, R. E., Ansbro, K., Alrafaie, A., Evans, C., Murdoch, C., Mesnage, S., Douglas, C. W. I., Rawlinson, A., & Stafford, G. P. (2019). Identification of Novel Bacteriophages with Therapeutic Potential That Target *Enterococcus faecalis*. *Infection and Immunity*, 87(11). <https://doi.org/10.1128/IAI.00512-19>
323. Al Zubidi, M. (2017). Bacteriophages targeting *Enterococcus faecalis* strains - a potential new root canal therapy. *Journal of Oral Microbiology*, 9(sup1), 1325237. <https://doi.org/10.1080/20002297.2017.1325237>
324. Hajishengallis, G., Darveau, R. P., & Curtis, M. A. (2012). The keystone-pathogen hypothesis. *Nature Reviews Microbiology*, 10(10), 717–725. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2873>
325. Williams, R. C., Barnett, A. H., Claffey, N., Davis, M., Gadsby, R., Kellett, M., Lip, G. Y. H., & Thackray, S. (2008). The potential impact of periodontal disease on general health: a consensus view. *Current Medical Research and Opinion*, 24(6), 1635–1643. <https://doi.org/10.1185/03007990802131215>

326. Widziulek, M., Prajsnar, T. K., Tazzyman, S., Stafford, G. P., Potempa, J., & Murdoch, C. (2016). Zebrafish as a new model to study effects of periodontal pathogens on cardiovascular diseases. *Scientific Reports*, 6(1), 36023. <https://doi.org/10.1038/srep36023>
327. Zhao, L., Si, J., Wei, Y., Li, S., Jiang, Y., Zhou, R., Liu, B., & Zhang, H. (2018). Toxicity of porcelain-fused-to-metal substrate to zebrafish (*Danio rerio*) embryos and larvae. *Life Sciences*, 203, 66–71. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.04.019>
328. Alifui-Segbaya, F., Bowman, J., White, A. R., Varma, S., Lieschke, G. J., & George, R. (2018). Toxicological assessment of additively manufactured methacrylates for medical devices in dentistry. *Acta Biomaterialia*, 78, 64–77. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.08.007>
329. Hsieh, Y.-L., Yao, J.-C., Hsieh, S.-C., Teng, N.-C., Chu, Y.-T., Yu, W.-X., Chen, C.-H., Chang, L.-Y., Huang, C.-S., Lee, T.-H., Kareiva, A., & Yang, J.-C. (2020). The In Vivo Toxicity and Antimicrobial Properties for Electrolyzed Oxidizing (EO) Water-Based Mouthwashes. *Materials*, 13(19), 4299. <https://doi.org/10.3390/ma13194299>
330. Ducharme, N. A., Peterson, L. E., Benfenati, E., Reif, D., McCollum, C. W., Gustafsson, J.-Å., & Bondesson, M. (2013). Meta-analysis of toxicity and teratogenicity of 133 chemicals from zebrafish developmental toxicity studies. *Reproductive Toxicology*, 41, 98–108. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2013.06.070>
331. Steller, H. (1995). Mechanisms and Genes of Cellular Suicide. *Science*, 267(5203), 1445–1449. <https://doi.org/10.1126/science.7878463>
332. Nicholson, D. W., & Thornberry, N. A. (1997). Caspases: killer proteases. *Trends in Biochemical Sciences*, 22(8), 299–306. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(97\)01085-2](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(97)01085-2)
333. Fernandes-Alnemri, T., Litwack, G., & Alnemri, E. S. (1994). CPP32, a novel human apoptotic protein with homology to *Caenorhabditis elegans* cell death protein Ced-3 and mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *The Journal of Biological Chemistry*, 269(49), 30761–30764.
334. Cohen, J. J., Duke, R. C., Fadok, V. A., & Sellins, K. S. (1992). Apoptosis and Programmed Cell Death in Immunity. *Annual Review of Immunology*, 10(1), 267–293. <https://doi.org/10.1146/annurev.iy.10.040192.001411>
335. Ellis, R. E., Yuan, J., & Horvitz, H. R. (1991). Mechanisms and Functions of Cell Death. *Annual Review of Cell Biology*, 7(1), 663–698. <https://doi.org/10.1146/annurev.cb.07.110191.003311>
336. Tucker, B., & Lardelli, M. (2007). A Rapid Apoptosis Assay Measuring Relative Acridine Orange Fluorescence in Zebrafish Embryos. *Zebrafish*, 4(2), 113–116. <https://doi.org/10.1089/zeb.2007.0508>
337. Yamashita, M. (2003). Apoptosis in zebrafish development. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 136(4), 731–742. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2003.08.013>
338. Yamashita, M., Mizusawa, N., Hojo, M., & Yabu, T. (2008). Extensive apoptosis and abnormal morphogenesis in pro-caspase-3 transgenic zebrafish during development. *Journal of Experimental Biology*, 211(12), 1874–1881. <https://doi.org/10.1242/jeb.012690>
339. Yabu, T., Todoriki, S., & Yamashita, M. (2001). Stress-induced apoptosis by heat shock, UV and gamma-ray irradiation in zebrafish embryos detected by increased caspase activity and whole-mount TUNEL staining. *Fisheries Science*, 67(2), 333–340. <https://doi.org/10.1046/j.1444-2906.2001.00233.x>
340. Yabu, T., Kishi, S., Okazaki, T., & Yamashita, M. (2001). Characterization of zebrafish caspase-3 and induction of apoptosis through ceramide generation in fish fathead minnow tailbud cells and zebrafish embryo. *Biochemical Journal*, 360(1), 39. <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3600039>
341. Yu, K. N., Tung, M. M. T., Choi, V. W. Y., & Cheng, S. H. (2012). Alpha radiation exposure decreases apoptotic cells in zebrafish embryos subsequently exposed to the chemical stressor, Cd. *Environmental Science and Pollution Research*, 19(9), 3831–3839. <https://doi.org/10.1007/s11356-012-1032-8>
342. Choi, V. W. Y., Ng, C. Y. P., Kong, M. K. Y., Cheng, S. H., & Yu, K. N. (2013). Adaptive response to ionising radiation induced by cadmium in zebrafish embryos. *Journal of Radiological Protection*, 33(1), 101–112. <https://doi.org/10.1088/0952-4746/33/1/101>

343. Ng, C. Y. P., Choi, V. W. Y., Lam, A. C. L., Cheng, S. H., & Yu, K. N. (2013). The multiple stressor effect in zebrafish embryos from simultaneous exposure to ionising radiation and cadmium. *Journal of Radiological Protection*, 33(1), 113–121. <https://doi.org/10.1088/0952-4746/33/1/113>
344. Parng, C., Seng, W. L., Semino, C., & McGrath, P. (2002). Zebrafish: A Preclinical Model for Drug Screening. *ASSAY and Drug Development Technologies*, 1(1), 41–48. <https://doi.org/10.1089/154065802761001293>
345. Svoboda, K. R., Linares, A. E., & Ribera, A. B. (2001). Activity regulates programmed cell death of zebrafish Rohon-Beard neurons. *Development*, 128(18), 3511–3520. <https://doi.org/10.1242/dev.128.18.3511>
346. Cole, L. K., & Ross, L. S. (2001). Apoptosis in the Developing Zebrafish Embryo. *Developmental Biology*, 240(1), 123–142. <https://doi.org/10.1006/dbio.2001.0432>
347. Furutani-Seiki, M., Jiang, Y.-J., Brand, M., Heisenberg, C.-P., Houart, C., Beuchle, D., Eeden, F. J. M. van, Granato, M., Haffter, P., Hammerschmidt, M., Kane, D. A., Kelsh, R. N., Mullins, M. C., Odenthal, J., & Nüsslein-Volhard, C. (1996). Neural degeneration mutants in the zebrafish, *Danio rerio*. *Development*, 123(1), 229–239. <https://doi.org/10.1242/dev.123.1.229>
348. Abrams, J. M., White, K., Fessler, L. I., & Steller, H. (1993). Programmed cell death during *Drosophila* embryogenesis. *Development*, 117(1), 29–43. <https://doi.org/10.1242/dev.117.1.29>
349. Eimon, P. M., & Ashkenazi, A. (2010). The zebrafish as a model organism for the study of apoptosis. *Apoptosis*, 15(3), 331–349. <https://doi.org/10.1007/s10495-009-0432-9>
350. Lamkanfi, M. (2002). Alice in caspase land. A phylogenetic analysis of caspases from worm to man. *Cell Death and Differentiation*, 9(4), 358–361. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4400989>
351. Kesavardhana, S., Malireddi, R. K. S., & Kanneganti, T.-D. (2020). Caspases in Cell Death, Inflammation, and Pyroptosis. *Annual Review of Immunology*, 38(1), 567–595. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-073119-095439>
352. Porter, A. G., & Jänicke, R. U. (1999). Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death & Differentiation*, 6(2), 99–104. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4400476>
353. Lopez, K. E., & Bouchier-Hayes, L. (2022). Lethal and Non-Lethal Functions of Caspases in the DNA Damage Response. *Cells*, 11(12). <https://doi.org/10.3390/cells11121887>
354. Oh, H., Kim, E., Lee, S., Park, S., Chen, D., Shin, S.-J., Kim, E., & Kim, S. (2020). Comparison of Biocompatibility of Calcium Silicate-Based Sealers and Epoxy Resin-Based Sealer on Human Periodontal Ligament Stem Cells. *Materials*, 13(22), 5242. <https://doi.org/10.3390/ma13225242>
355. Adrain, C., & Martin, S. J. (2001). The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome seas. *Trends in Biochemical Sciences*, 26(6), 390–397. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(01\)01844-8](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(01)01844-8)
356. Spierings, D. C., de Vries, E. G., Vellenga, E., van den Heuvel, F. A., Koornstra, J. J., Wesseling, J., Hollema, H., & de Jong, S. (2004). Tissue Distribution of the Death Ligand TRAIL and Its Receptors. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 52(6), 821–831. <https://doi.org/10.1369/jhc.3A6112.2004>
357. Adams, J. M., & Cory, S. (2001). Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family. *Trends in Biochemical Sciences*, 26(1), 61–66. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(00\)01740-0](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(00)01740-0)
358. Güleş, Ö., & Eren, Ü. (2008). Apoptozun Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler. *Y.Y.Ü. Veteriner Fakültesi Dergisi*, 2, 73–78.
359. Overbeeke, R., Steffens-Nakken, H., Vermes, I., Reutelingsperger, C., & Haanen, C. (1998). Early features of apoptosis detected by four different flow cytometry assays. *Apoptosis*, 3(2), 115–121. <https://doi.org/10.1023/A:1009649025439>
360. Martinez-Lopez, M., Póvoa, V., & Fior, R. (2021). Generation of Zebrafish Larval Xenografts and Tumor Behavior Analysis. *Journal of Visualized Experiments*, 172. <https://doi.org/10.3791/62373>
361. Ferreira, T., & Rasband, W. (2012). *ImageJ User Guide ImageJ User Guide IJ 1.46r*. <http://fiji.sc/guide.git>.

362. Asgary, S., & Ahmadyar, M. (2013). Vital pulp therapy using calcium-enriched mixture: An evidence-based review. *Journal of Conservative Dentistry*, 16(2), 92. <https://doi.org/10.4103/0972-0707.108173>
363. Cao, Y., Bogen, G., Lim, J., Shon, W.-J., & Kang, M. K. (2016). Bioceramic Materials and the Changing Concepts in Vital Pulp Therapy. *Journal of the California Dental Association*, 44(5), 278–290.
364. Stockton, L. W. (1999). Vital pulp capping: a worthwhile procedure. *Journal (Canadian Dental Association)*, 65(6), 328–331.
365. Vire, D. E. (1991). Failure of endodontically treated teeth: Classification and evaluation. *Journal of Endodontics*, 17(7), 338–342. [https://doi.org/10.1016/S0099-2399\(06\)81702-4](https://doi.org/10.1016/S0099-2399(06)81702-4)
366. Caplan, D. J., Cai, J., Yin, G., & White, B. A. (2005). Root Canal Filled Versus Non-Root Canal Filled Teeth: A Retrospective Comparison of Survival Times. *Journal of Public Health Dentistry*, 65(2), 90–96. <https://doi.org/10.1111/j.1752-7325.2005.tb02792.x>
367. Kundzina, R., Stangvaltaite, L., Eriksen, H. M., & Kerosuo, E. (2017). Capping carious exposures in adults: a randomized controlled trial investigating mineral trioxide aggregate versus calcium hydroxide. *International Endodontic Journal*, 50(10), 924–932. <https://doi.org/10.1111/iej.12719>
368. Mente, J., Hufnagel, S., Leo, M., Michel, A., Gehrig, H., Panagidis, D., Saure, D., & Pfefferle, T. (2014). Treatment Outcome of Mineral Trioxide Aggregate or Calcium Hydroxide Direct Pulp Capping: Long-term Results. *Journal of Endodontics*, 40(11), 1746–1751. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2014.07.019>
369. Biodentine, & Septodont. (2010). “Active Biosilicate Technology™.”
370. Kaur, M. (2017). MTA versus Biodentine: Review of Literature with a Comparative Analysis. *Journal Of Clinical and Diagnostic Research*. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2017/25840.10374>
371. Suh, B., Cannon, M., Yin, R., & Martin, D. (2008). *Polymerizable Dental Pulp Healing, Capping, And Lining Material and Method for Use*.
372. Smail-Faugeron, V., Glenney, A.-M., Courson, F., Durieux, P., Muller-Bolla, M., & Fron Chabouis, H. (2018). Pulp treatment for extensive decay in primary teeth. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2018(5). <https://doi.org/10.1002/14651858.CD003220.pub3>
373. García-Mota, L. F., Hardan, L., Bourgi, R., Zamarripa-Calderón, J. E., Rivera-Gonzaga, J. A., Hernández-Cabanillas, J. C., & Cuevas-Suárez, C. E. (2022). Light-Cured Calcium Silicate Based-Cements As Pulp Therapeutic Agents: A Meta-Analysis Of Clinical Studies. *Journal of Evidence-Based Dental Practice*, 22(4), 101776. <https://doi.org/10.1016/j.jebdp.2022.101776>
374. Shalaby, R. A., Abdel-Aziz, A. M., Rashed, L. A., & Radwan, M. Z. (2023). The Effect of Calcium hydroxide, Glass Ionomer and light cured resin modified calcium silicate on viability, proliferation, and differentiation of stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *BMC Oral Health*, 23(1), 721. <https://doi.org/10.1186/s12903-023-03429-6>
375. *Harvard Dental International*. (n.d.). Retrieved October 20, 2023, from <https://harvard-dental-international.de/en/products/endodontics/cap-pulp-8-protection/harvard-biocal-cap/>
376. Sideridou, I. D., & Achilias, D. S. (2005). Elution study of unreacted Bis-GMA, TEGDMA, UDMA, and Bis-EMA from light-cured dental resins and resin composites using HPLC. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 74B (1), 617–626. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.30252>
377. Geurtsen, W., Spahl, W., Müller, K., & Leyhausen, G. (1999). Aqueous extracts from dentin adhesives contain cytotoxic chemicals. *Journal of Biomedical Materials Research*, 48(6), 772–777. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4636\(1999\)48:6<772::AID-JBM2>3.0.CO;2-X](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4636(1999)48:6<772::AID-JBM2>3.0.CO;2-X)
378. Costa, C. A. S., Oliveira, M. F., Giro, E. M. A., & Hebling, J. (2003). Biocompatibility of resin-based materials used as pulp-capping agents. *International Endodontic Journal*, 36(12), 831–839. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.2003.00702.x>
379. Tsanova-Tosheva, D., Dimitrova, I., & Kouzmanova, Y. (2021). Analysis of the Organic Content in Two Hybrid Calcium-Silicate Cements. *2021 International Symposium on Biomedical Engineering and Computational Biology*, 1–6. <https://doi.org/10.1145/3502060.3502276>
380. Valizadeh, S., Kamangar, S. S. H., Nekoofar, M. H., Behroozbakhsh, M., & Shahidi, Z. (2022). Comparison of Dentin Caries Remineralization with Four Bioactive Cements. *The European Journal of*

381. Pedano, M. S., Li, X., Yoshihara, K., Landuyt, K. Van, & Van Meerbeek, B. (2020). Cytotoxicity and Bioactivity of Dental Pulp-Capping Agents towards Human Tooth-Pulp Cells: A Systematic Review of In-Vitro Studies and Meta-Analysis of Randomized and Controlled Clinical Trials. *Materials*, 13(12), 2670. <https://doi.org/10.3390/ma13122670>
382. Olsson, H., Petersson, K., & Rohlin, M. (2006). Formation of a hard tissue barrier after pulp cappings in humans. A systematic review. *International Endodontic Journal*, 39(6), 429–442. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.2006.01116.x>
383. About, I. (2011). Dentin Regeneration in Vitro: The Pivotal Role of Supportive Cells. *Advances in Dental Research*, 23(3), 320–324. <https://doi.org/10.1177/0022034511405324>
384. Daneshian, M. (2015). Animal use for science in Europe. *ALTEX*, 32(4), 261–274. <https://doi.org/10.14573/altex.1509081>
385. Murray, P. E., García Godoy, C., & García Godoy, F. (2007). How is the biocompatibility of dental biomaterials evaluated? *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal*, 12(3), E258–66.
386. Shahi, S., Özcan, M., Maleki Dizaj, S., Sharifi, S., Al-Haj Husain, N., Eftekhari, A., & Ahmadian, E. (2019). A review on potential toxicity of dental material and screening their biocompatibility. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 29(5), 368–377. <https://doi.org/10.1080/15376516.2019.1566424>
387. Hanks, C. T., Wataha, J. C., & Sun, Z. (1996). In vitro models of biocompatibility: A review. *Dental Materials*, 12(3), 186–193. [https://doi.org/10.1016/S0109-5641\(96\)80020-0](https://doi.org/10.1016/S0109-5641(96)80020-0)
388. Mallineni, S. K., Nuvvula, S., Matinlinna, J. P., Yiu, C. K., & King, N. M. (2013). Biocompatibility of various dental materials in contemporary dentistry: a narrative insight. *Journal of Investigative and Clinical Dentistry*, 4(1), 9–19. <https://doi.org/10.1111/j.2041-1626.2012.00140.x>
389. Kiani, A. K., Pheby, D., Henahan, G., Brown, R., Sieving, P., Sykora, P., Marks, R., Falsini, B., Capodicasa, N., Miertus, S., Lorusso, L., Dondossola, D., Tartaglia, G. M., Ergoren, M. C., Dundar, M., Michelini, S., Malacarne, D., Bonetti, G., Dautaj, A., ... International Bioethics Study Group. (2022). Ethical considerations regarding animal experimentation. *Journal of Preventive Medicine and Hygiene*, 63(2 Suppl 3), E255–E266. <https://doi.org/10.15167/2421-4248/jpmh2022.63.2S3.2768>
390. Faggion, C. M., Listl, S., & Giannakopoulos, N. N. (2012). The methodological quality of systematic reviews of animal studies in dentistry. *The Veterinary Journal*, 192(2), 140–147. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2011.08.006>
391. Streisinger, G. (1983). Extrapolations from species to species and from various cell types in assessing risks from chemical mutagens. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, 114(1), 93–105. [https://doi.org/10.1016/0165-1110\(83\)90021-0](https://doi.org/10.1016/0165-1110(83)90021-0)
392. Gamse, J. T., & Gorelick, D. A. (2016). Mixtures, Metabolites, and Mechanisms: Understanding Toxicology Using Zebrafish. *Zebrafish*, 13(5), 377–378. <https://doi.org/10.1089/zeb.2016.1370>
393. Bambino, K., & Chu, J. (2017). *Zebrafish in Toxicology and Environmental Health* (pp. 331–367). <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2016.10.007>
394. Darzynkiewicz, Z. (1994). Acid-Induced Denaturation of DNA in Situ as a Probe of Chromatin Structure. In *Methods in Cell Biology* (pp. 527–541). [https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(08\)61738-0](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(08)61738-0)
395. Gaudin, A., Hofmeister, W., & Key, B. (2012). Chemoattractant axon guidance cues regulate de novo axon trajectories in the embryonic forebrain of zebrafish. *Developmental Biology*, 367(2), 126–139. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2012.04.032>
396. Ellett, F., & Lieschke, G. J. (2012). Computational Quantification of Fluorescent Leukocyte Numbers in Zebrafish Embryos. In *Methods in Enzymology* (Vol. 506, pp. 425–435). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-391856-7.00046-9>
397. Chou, K.-C., Tomasselli, A. G., & Heinrikson, R. L. (2000). Prediction of the tertiary structure of a caspase 9/inhibitor complex. *FEBS Letters*, 470(3), 249–256. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(00\)01333-8](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)01333-8)

398. Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A., & Nagata, S. (1998). A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature*, 391(6662), 43–50. <https://doi.org/10.1038/34112>
399. Thornberry, N. A., & Lazebnik, Y. (1998). Caspases: Enemies Within. *Science*, 281(5381), 1312–1316. <https://doi.org/10.1126/science.281.5381.1312>
400. Wang, J., & Lenardo, M. J. (2000). Roles of caspases in apoptosis, development, and cytokine maturation revealed by homozygous gene deficiencies. *Journal of Cell Science*, 113(5), 753–757. <https://doi.org/10.1242/jcs.113.5.753>
401. Wang, R., Li, T., Zhang, L., Hu, Z., Zhou, L., Shan, L., Huang, J., & Li, L. (2023). Acute Developmental Toxicity of Panax notoginseng in Zebrafish Larvae. *Chinese Journal of Integrative Medicine*, 29(4), 333–340. <https://doi.org/10.1007/s11655-022-3302-8>
402. Chen, Y., Wisner, A. S., Schiefer, I. T., Williams, F. E., & Hall, F. S. (2022). Methamphetamine-induced lethal toxicity in zebrafish larvae. *Psychopharmacology*, 239(12), 3833–3846. <https://doi.org/10.1007/s00213-022-06252-z>
403. Chang, Y., Park, S., Rah, Y., Han, E., Koun, S., Chang, J., & Choi, J. (2021). In vivo assessment of the toxicity of electronic cigarettes to zebrafish (*Danio rerio*) embryos, following gestational exposure, in terms of mortality, developmental toxicity, and hair cell damage: Toxicity of E-cigs to zebrafish embryos. *Human & Experimental Toxicology*, 40(1), 148–157. <https://doi.org/10.1177/0960327120947785>
404. Kitipaspalloo, W., Sillapaprayoon, S., Phuwapraisirisan, P., Kim, W.-K., Chanchao, C., & Pimtong, W. (2022). Developmental effects of sesamol on zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 256, 109319. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2022.109319>
405. Yumnamcha, T., Devi, M. D., Roy, D., & Nongthomba, U. (2022). Evaluation of developmental toxicity and genotoxicity of aqueous seed extract of *Croton tiglium* L. using zebrafish. *Drug and Chemical Toxicology*, 45(1), 398–406. <https://doi.org/10.1080/01480545.2019.1708094>
406. Pereira, S. P. P., Boyle, D., Nogueira, A., & Handy, R. D. (2023). Differences in toxicity and accumulation of metal from copper oxide nanomaterials compared to copper sulphate in zebrafish embryos: Delayed hatching, the chorion barrier, and physiological effects. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 253, 114613. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2023.114613>
407. Shi, X., Du, Y., Lam, P. K. S., Wu, R. S. S., & Zhou, B. (2008). Developmental toxicity and alteration of gene expression in zebrafish embryos exposed to PFOS. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 230(1), 23–32. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2008.01.043>
408. Samaee, S.-M., Rabbani, S., Jovanović, B., Mohajeri-Tehrani, M. R., & Haghpanah, V. (2015). Efficacy of the hatching event in assessing the embryo toxicity of the nano-sized TiO₂ particles in zebrafish: A comparison between two different classes of hatching-derived variables. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 116, 121–128. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.03.012>
409. Yoo, M. H., Rah, Y. C., Choi, J., Park, S., Park, H.-C., Oh, K. H., Lee, S. H., & Kwon, S.-Y. (2016). Embryotoxicity and hair cell toxicity of silver nanoparticles in zebrafish embryos. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*, 83, 168–174. <https://doi.org/10.1016/j.ijporl.2016.02.013>
410. Zavitri, N., Syahbaniati, A., Primastuti, R., Putri, R., Damayanti, S., & Wibowo, I. (2023). Toxicity evaluation of zinc oxide nanoparticles green synthesized using papaya extract in zebrafish. *Biomedical Reports*, 19(6), 96. <https://doi.org/10.3892/br.2023.1678>
411. Fang, J.-L., Stingley, R. L., Beland, F. A., Harrouk, W., Lumpkins, D. L., & Howard, P. (2010). Occurrence, Efficacy, Metabolism, and Toxicity of Triclosan. *Journal of Environmental Science and Health, Part C*, 28(3), 147–171. <https://doi.org/10.1080/10590501.2010.504978>
412. Iannetta, A., Caioni, G., Di Vito, V., Benedetti, E., Perugini, M., & Merola, C. (2022). Developmental toxicity induced by triclosan exposure in zebrafish embryos. *Birth Defects Research*, 114(5–6), 175–183. <https://doi.org/10.1002/bdr2.1982>
413. Gao, Y., Li, A., Zhang, W., Pang, S., Liang, Y., & Song, M. (2022). Assessing the toxicity of bisphenol A and its six alternatives on zebrafish embryo/larvae. *Aquatic Toxicology*, 246, 106154. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2022.106154>

414. Gao, X., Li, K., Jiang, L., He, M., Pu, C., Kang, D., & Xie, J. (2017). Developmental toxicity of auranofin in zebrafish embryos. *Journal of Applied Toxicology*, 37(5), 602–610. <https://doi.org/10.1002/jat.3410>
415. Cardoso-Vera, J. D., Gómez-Oliván, L. M., Islas-Flores, H., García-Medina, S., Orozco-Hernández, J. M., Heredia-García, G., Elizalde-Velázquez, G. A., Galar-Martínez, M., & SanJuan-Reyes, N. (2022). Acute exposure to environmentally relevant concentrations of phenytoin damages early development and induces oxidative stress in zebrafish embryos. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 253, 109265. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2021.109265>
416. Pitt, J. A., Kozal, J. S., Jayasundara, N., Massarsky, A., Trevisan, R., Geitner, N., Wiesner, M., Levin, E. D., & Di Giulio, R. T. (2018). Uptake, tissue distribution, and toxicity of polystyrene nanoparticles in developing zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology*, 194, 185–194. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.11.017>
417. Zhang, Q., Cheng, J., & Xin, Q. (2015). Effects of tetracycline on developmental toxicity and molecular responses in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Ecotoxicology*, 24(4), 707–719. <https://doi.org/10.1007/s10646-015-1417-9>
418. Luo, Q., Tang, S., Xiao, X., Wei, Y., Cheng, B., Huang, Y., Zhong, K., Tian, G., & Lu, H. (2022). Benomyl-induced development and cardiac toxicity in zebrafish embryos. *Environmental Science and Pollution Research*, 30(12), 33090–33100. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-24213-z>
419. Malíková, J., Zdařilová, A., Hlobilková, A., & Ulrichová, J. (2006). The effect of chelerythrine on cell growth, apoptosis, and cell cycle in human normal and cancer cells in comparison with sanguinarine. *Cell Biology and Toxicology*, 22(6), 439–453. <https://doi.org/10.1007/s10565-006-0109-x>
420. Yang, X., Wang, X., Gao, D., Zhang, Y., Chen, X., Xia, Q., Jin, M., Sun, C., He, Q., Wang, R., & Liu, K. (2021). Developmental toxicity caused by sanguinarine in zebrafish embryos via regulating oxidative stress, apoptosis and wnt pathways. *Toxicology Letters*, 350, 71–80. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2021.07.001>
421. Karagöz, A., Beler, M., Altun, B. D., Ünal, İ., Cansız, D., Gündüz, H., Alturfan, A. A., Emekli-Alturfan, E., & Erçalık Yalçinkaya, Ş. (2023). Panoramic dental X-ray exposure leads to oxidative stress, inflammation and apoptosis-mediated developmental defects in zebrafish embryos. *Journal of Stomatology, Oral and Maxillofacial Surgery*, 124(6), 101661. <https://doi.org/10.1016/j.jormas.2023.101661>
422. Liu, L., Wu, F., Zhu, C., Zou, H., Kong, R., Ma, Y., Su, D., Song, G., Zhang, Y., & Liu, K. (2021). Involvement of dopamine signaling pathway in neurodevelopmental toxicity induced by isoniazid in zebrafish. *Chemosphere*, 265, 129109. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.129109>
423. de Oliveira, N. G., de Souza Araújo, P. R., da Silveira, M. T., Sobral, A. P. V., & Carvalho, M. de V. (2018). Comparison of the biocompatibility of calcium silicate-based materials to mineral trioxide aggregate: Systematic review. *European Journal of Dentistry*, 12(02), 317–326. https://doi.org/10.4103/ejd.ejd_347_17
424. Roach, P., Eglin, D., Rohde, K., & Perry, C. C. (2007). Modern biomaterials: a review—bulk properties and implications of surface modifications. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 18(7), 1263–1277. <https://doi.org/10.1007/s10856-006-0064-3>
425. Abuarqoub, D., Aslam, N., Jafar, H., Abu Harfil, Z., & Awidi, A. (2020). Biocompatibility of Biodentine™ ® with Periodontal Ligament Stem Cells: In Vitro Study. *Dentistry Journal*, 8(1), 17. <https://doi.org/10.3390/dj8010017>
426. Tanomaru-Filho, M., Andrade, A. S., Rodrigues, E. M., Viola, K. S., Faria, G., Camilleri, J., & Guerreiro-Tanomaru, J. M. (2017). Biocompatibility and mineralized nodule formation of Neo MTA Plus and an experimental tricalcium silicate cement containing tantalum oxide. *International Endodontic Journal*, 50(S2). <https://doi.org/10.1111/iej.12780>
427. Jun, S.-K., Lee, J.-H., & Lee, H.-H. (2017). The Biomineralization of a Bioactive Glass-Incorporated Light-Curable Pulp Capping Material Using Human Dental Pulp Stem Cells. *BioMed Research International*, 2017, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2017/2495282>
428. Manaspon, C., Jongwannasiri, C., Chumprasert, S., Sa-Ard-Iam, N., Mahanonda, R., Pavasant, P., Pornraveetus, T., & Osathanon, T. (2021). Human dental pulp stem cell responses to different dental pulp capping materials. *BMC Oral Health*, 21(1), 209. <https://doi.org/10.1186/s12903-021-01544-w>

429. Zaen El-Din, A. M., Hamama, H. H., Abo El-Elaa, M. A., Grawish, M. E., Mahmoud, S. H., & Neelakantan, P. (2020). The effect of four materials on direct pulp capping: An animal study. *Australian Endodontic Journal*, 46(2), 249–256. <https://doi.org/10.1111/aej.12400>
430. Abboud, K. M., Abu-Seida, A. M., Hassanien, E. E., & Tawfik, H. M. (2021). Biocompatibility of NeoMTA Plus® versus MTA Angelus as delayed furcation perforation repair materials in a dog model. *BMC Oral Health*, 21(1), 192. <https://doi.org/10.1186/s12903-021-01552-w431>.
- Costa, C. A., Teixeira, H. M., do Nascimento, A. B., & Hebling, J. (1999). Biocompatibility of an adhesive system and 2-hydroxyethylmethacrylate. *ASDC Journal of Dentistry for Children*, 66(5), 337–342, 294.
432. De Souza Costa, C., Teixeira, H., Lopesdonascimento, A., & Hebling, J. (2000). Biocompatibility of Two Current Adhesive Resins. *Journal of Endodontics*, 26(9), 512–516. <https://doi.org/10.1097/00004770-200009000-00006>
433. Cannon, M., Gerodias, N., Vieira, A., Percinoto, C., & Jurado, R. (2014). Primate Pulpal Healing after Exposure and TheraCal Application. *Journal of Clinical Pediatric Dentistry*, 38(4), 333–337. <https://doi.org/10.17796/jcpd.38.4.m585322121536q71>
434. Edanami, N., Ibn Belal, R. S., Yoshiba, K., Yoshiba, N., Ohkura, N., Takenaka, S., & Noiri, Y. (2022). Effect of a resin-modified calcium silicate cement on inflammatory cell infiltration and reparative dentin formation after pulpotomy in rat molars. *Australian Endodontic Journal*, 48(2), 297–304. <https://doi.org/10.1111/aej.12568>
435. Cannon, M. L. (2019). Pulp Therapy in the Difficult Child Patient. *Compendium of Continuing Education in Dentistry (Jamesburg, N.J.: 1995)*, 40(suppl 1), 20–22.
436. Quiñonez-Ruvalcaba, F., Bermúdez-Jiménez, C., Aguilera-Galavíz, L. A., Villanueva-Sánchez, F. G., García-Cruz, S., & Gaitán-Fonseca, C. (2023). Histopathological Biocompatibility Evaluation of TheraCal PT, NeoMTA, and MTA Angelus in a Murine Model. *Journal of Functional Biomaterials*, 14(4), 202. <https://doi.org/10.3390/jfb14040202>
437. Katge, F. A., & Patil, D. P. (2017). Comparative Analysis of 2 Calcium Silicate-based Cements (Biodentine and Mineral Trioxide Aggregate) as Direct Pulp-capping Agent in Young Permanent Molars: A Split Mouth Study. *Journal of Endodontics*, 43(4), 507–513. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2016.11.026>
438. 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), 1786–1791. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2017.06.025>
439. Satchell, P. G., Gutmann, J. L., & Witherspoon, D. E. (2003). Apoptosis: an introduction for the endodontist. *International Endodontic Journal*, 36(4), 237–245. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2591.2003.00657.x>
440. Kunert, M., Rozpedek-Kaminska, W., Galita, G., Sauro, S., Bourgi, R., Hardan, L., Majsterek, I., & Lukomska-Szymanska, M. (2022). The Cytotoxicity and Genotoxicity of Bioactive Dental Materials. *Cells*, 11(20), 3238. <https://doi.org/10.3390/cells11203238>
441. Birant, S., Gokalp, M., Duran, Y., Koruyucu, M., Akkoc, T., & Seymen, F. (2021). Cytotoxicity of NeoMTA Plus, ProRoot MTA and Biodentine on human dental pulp stem cells. *Journal of Dental Sciences*, 16(3), 971–979. <https://doi.org/10.1016/j.jds.2020.10.009>
442. Brzović Rajić, V. (2018). Cytotoxicity and Genotoxicity of Resin Based Dental Materials in Human Lymphocytes in Vitro. *Acta Clinica Croatica*, 57(2). <https://doi.org/10.20471/acc.2018.57.02.07>
443. Gomes-Cornélio, A. L., Rodrigues, E. M., Mestieri, L. B., Falcowski, T. De O. R. S., Soares, C. P., Guerreiro-Tanomaru, J. M., Rossa Junior, C., & Tanomaru Filho, M. (2016). Cytotoxicity and genotoxicity of calcium silicate-based cements on an osteoblast lineage. *Brazilian Oral Research*, 30(1). <https://doi.org/10.1590/1807-3107BOR-2016.vol30.0048>
444. Makkar, H., Verma, S. K., Panda, P. K., Jha, E., Das, B., Mukherjee, K., & Suar, M. (2018). In Vivo Molecular Toxicity Profile of Dental Bioceramics in Embryonic Zebrafish (Danio rerio). *Chemical Research in Toxicology*, 31(9), 914–923. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.8b00129>

EK

Etik Kurul Onayı



İZMİR BİYOTIP VE GENOM MERKEZİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU (İBG-HADYEK)
KARARI

Toplantı Tarihi : 09/03/2022 Toplantı Günü : Çarşamba
Toplantı Sayısı : 5 Toplantı Saati : 15:30

Sayın Doç.Dr. Bahar Başak KIZILTAN ELİAÇIK,

2022-010 Protokol No'lu; yürütücüsü olduğunuz "Farklı Pulpa Kuafaj Materyallerinin Toksik Etkilerinin Morfolojik ve Moleküler Yöntemler Kullanılarak Zebra Balığı (Danio rerio) üzerinde Belirlenmesi" başlıklı projenin uygulanmasında etik açıdan sakınca olmadığına oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederiz.

Dr. Gülçin ÇAKAN AKDOĞAN Başkan	Vet. Hek. Kerem ESMEN Başkan Yardımcısı
Prof. Dr. Ehsari GÜNELİ Üye	(Projede Araştırmacı) Doç. Dr. Güneş ÖZHAN Üye
Doç. Dr. Kasım DİRİL Üye	Dr. Yavuz DOĞAN Üye
Vet. Hek. Umur KELEŞ Üye	Vet. Hek. Ceren ULKER Üye
Vet. Hek. Arzum ARALAN Üye	İrem KARADAŞ Üye

