

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Pedodonti Anabilim Dalı
(Ankara Üniversitesi Ortak Doktora Program)**

**ANTİMİKROBİYAL POLİPEPTİTLERİN PULPA ÜZERİNE
ETKİLERİNİN DİŞ ORGAN KÜLTÜRÜNDE HİSTOLOJİK
OLARAK İNCELENMESİ**

**Hazırlayan
Ebru ŞENYİĞİT**

**Danışmanlar
1.Danışman Doç. Dr. Mustafa AYDINBELGE
2.Danışman Prof. Dr. Levent ÖZER**

Doktora Tezi

**Şubat 2022
KAYSERİ**

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
PEDODONTİ ANABİLİM DALI
(Ankara Üniversitesi Ortak Doktora Program)**

**ANTİMİKROBİYAL POLİPEPTİTLERİN PULPA ÜZERİNE
ETKİLERİNİN DİŞ ORGAN KÜLTÜRÜNDE HİSTOLOJİK
OLARAK İNCELENMESİ**

Doktora Tezi

**Hazırlayan
Ebru ŞENYİĞİT**

Danışmanlar

**1.Danışman Doç. Dr. Mustafa AYDINBELGE
2.Danışman Prof. Dr. Levent ÖZER**

**Bu çalışma; Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Birimi tarafından TDK-2020-9959 kodlu proje ile
desteklenmiştir.**

**ŞUBAT 2022
KAYSERİ**

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu tezin kendi çalışmam olduğunu, tüm bilgilerin akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda akademik ve etik kuralların gerektirdiği gibi tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel kurallara uygun olarak atıfta bulunduğumu ve kaynaklar listesinde gösterdiğimi belirtirim.

Ebru ŞENYİĞİT



YÖNERGEYE UYGUNLUK SAYFASI

Antimikrobiyal Polipeptitlerin Pulpa Üzerine Etkilerinin Diş Organ Kültüründe Histolojik Olarak İncelenmesi adlı **Doktora Tezi**, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi'ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Hazırlayan

Ebru ŞENYİĞİT

Danışmanlar

1. Doç. Dr. Mustafa AYDINBELGE

Pedodonti ABD Başkanı

Doç. Dr. Zeynep Aslı ÖZKAYA

İmza

Doç. Dr. Mustafa AYDINBELGE ve **Prof. Dr. Levent ÖZER** danışmanlığında Ebru ŞENYİĞİT tarafından hazırlanan “**Antimikrobiyal Polipeptitlerin Pulpa Üzerine Etkilerinin Diş Organ Kültüründe Histolojik Olarak İncelenmesi**” adlı bu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi’nde Pedodonti Anabilim Dalı’N’da **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

../.. /2022

JÜRİ:

Danışman : Doç. Dr. Mustafa AYDINBELGE

Üye : Doç. Dr. Salih DOĞAN

Üye : Doç. Dr. Sezer DEMİRBUĞA

Üye : Doç. Dr. Mesut ELBAY

Üye : Dr. Öğretim Üyesi Firdevs KAHVECİOĞLU

ONAY

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

..... /..... /.....

Enstitü Müdürü
Prof. Dr. Bilal AKYÜZ

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca bana yol gösteren, destek ve emeğini esirgemeyen, öğrencisi olmaktan her zaman gurur duyacağım çok değerli hocam ve tez danışmanım Doç. Dr. Mustafa AYDINBELGE'YE,

Engin bilgi ve tecrübesi ile beni aydınlatan tez ikinci danışmanım Ankara Üniversitesi Pedodonti AD öğretim üyesi Prof. Dr. Levent ÖZER'e,

Doktora eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım değerli hocalarım Doç. Dr. Salih DOĞAN, Doç. Dr. Zeynep Aslı ÖZKAYA, Doç. Dr. Hüsniye GÜMÜŞ'e, Dr. Öğr. Üyesi Esra KIZILCI'ya, Öğretim görevlisi Dr. Kevser Kolçakoğlu'na

Tez çalışmamda emeği geçen arkadaşım Öğretim görevlisi Dr. Gülce ÖZTÜRK ve değerli eşi Öğretim görevlisi Dr. Taner ÖZTÜRK'e

Her zaman her türlü destekleriyle yanımda olan sevgili arkadaşlarım Dr. Öğr. Üyesi Kübra PEDÜK, Dr. Dt. Eda BÜYÜKNALBANT, Dr. Dt. Güldağ HERDEM, Doç. Dr. Ebru DELİKAN'a,

Tez çalışmamda büyük emeği geçen Histoloji Anabilim Dalı hocalarımdan Dr. Öğr. Üyesi Esra BALCIOĞLU ve tüm emektar asistanlarına,

Hayat boyu olduğu gibi doktora eğitimimde de en büyük desteğim sevgili annem Şengül ARISOY, babam Fikret ARISOY'a, kızkardeşim Dr Öğr. Üyesi Eda ALTUN ve kardeşim Mehmet ARISOY'a,

Sevgili eşim ve doktora eğitimimde en büyük destekçim Doç. Dr. Ercan ŞENYİĞİT'e, oğullarım İbrahim ve Fikret ŞENYİĞİT'e

Tezimin klinik aşamasına destek olan hekim yardımcısı Feride KAHYA, tüm hekim yardımcılarımız ve personelimize

Tüm bölüm asistan arkadaşlarıma,

Teşekkür ederim...

Ebru ŞENYİĞİT

Kayseri, Şubat 2022

ANTİMİKROBİYAL POLİPEPTİTLERİN PULPA ÜZERİNE ETKİLERİNİN DİŞ ORGAN KÜLTÜRÜNDE HİSTOLOJİK OLARAK İNCELENMESİ

Ebru ŞENYİĞİT

Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Pedodonti Anabilim Dalı

Doktora Tezi, Şubat 2022

Danışman: Doç. Dr. Mustafa AYDINBELGE

ÖZET

Diş çürüğünün kontrolü her dönemde olduğu gibi günümüzde de üzerinde araştırmalar yapılan stratejiler geliştirilen önemli bir çalışma alanıdır. Doğal antimikrobiyal peptitler ve sentetik peptid tasarımıındaki yeni gelişmeler, ağız diş sağlığı ve genel sağlığın güvenli, etkili ve ekolojik olarak dengeli bir şekilde idamesini sağlayan tedaviler için fırsatlar sunmaktadır.

Bu doktora tezi çalışmasında çürüksüz ortodontik amaçla çekilmiş açık apeksli 20 yaş dişleri kullanılmıştır. Dişler üzerinde açılan sınıf 1 kavite tabanlarında 2 milimetrelik pulpa perforasyon alanları oluşturulmuş ve bu perfore alanlara çalışma ve kontrol gruplarını oluşturan materyaller yerleştirilmiştir. Çalışma gruplarında antimikrobiyal peptitlerden nisin ve natamisin kullanılırken, pozitif kontrol grubunda pulpa kaplama ajanı olarak diş hekimliğinde yaygın kullanılan rejeneratif materyallerden kalsiyum hidroksit (CaOH), negatif kontrol grubu olarak da teflon bant kullanılmıştır. Organ kültüründe difüzyonla apikal bölgeden beslenmeleri devam edecek şekilde in situ şartlarda 1, 2 ve 4 haftalık takipleri yapılan bu 4 grup, daha sonrasında histolojik analizler için rutin doku takip işlemlerine tabi tutuldular. Alınan histolojik kesitlerde fotomikrografik ölçümler yapılmış ve enflamatuar hücre yoğunluğu ve Reperatif Dentin (RD) devamlılığı konularında istatistiksel veriler doğrultusunda değerlendirmeler yapılmıştır.

Sonuç olarak, deney modelinin başarılı olduğunu kanıtlar şekilde, tüm gruplarda pulpa ve dentinin histolojik değerlendirmeye uygun olduğu ve pulpanın canlılığını koruduğu gözlenmiştir.

RD devamlılığının ilk iki haftaya göre dördüncü haftada tüm gruplarda artış gösterdiği, bununla birlikte en olumlu skorların çalışma grubumuzu oluşturan antimikrobiyal polipeptitler olan nisin ve natamisin gruplarında tespit edildiği ve en düşük inflamatuvar reaksiyon değerlerinin yine nisin ve natamisin gruplarında olduğu belirlendi.

Çalışma sonuçlarımızın ileride yapılacak çalışmalara ışık tutacağını nisin ve natamisin direkt pulpa kaplama ajanı olarak kullanımı için değerli veriler sunacağı değerlendirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Antimikrobiyal polipeptitler; Direkt pulpa kaplaması; Natamisin; Nisin

**HISTOLOGICAL INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF
ANTIMICROBIAL POLYPEPTIDES ON PULP IN DENTAL ORGAN
CULTURE**

Ebru ŞENYİĞİT

Erciyes University, Institute of Health Sciences

Department of Pedodontics

PhD Thesis February 2022

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Mustafa AYDINBELGE

ABSTRACT

The control of dental caries is an essential field of study, on which strategies have been developed today, as it has been in every period. Natural antimicrobial peptides and new advances in synthetic peptide design offer opportunities for treatments that provide safe, effective, and ecologically balanced maintenance of oral health and general health.

This doctoral thesis study used caries-free immature third molar teeth extracted for orthodontic purposes. Two-millimeters pulp perforation areas were created on the floor of the class 1 cavities opened on the teeth, and the materials that constitute the study and control groups were placed in these perforated areas. While the antimicrobial peptides nisin and natamycin were used in the study groups, calcium hydroxide (CaOH), one of the regenerative materials commonly used in dentistry, was used as the pulp capping agent in the positive control group, and also teflon tape was used as negative control group.

These four groups, which were followed up for 1, 2, and 4 weeks under in-situ conditions in such a way that they continued to be fed from the apical region by diffusion from the organ culture. Then the teeth were subjected to routine tissue follow-up procedures for histological analysis. Photomicrographic measurements were made on the histological sections taken, and evaluations were made in line with statistical data on inflammatory cell density and reparative dentin continuity.

It was observed that the pulp and dentin were suitable for histological evaluation and preserved the vitality of the pulp in all groups, proving that the experimental model was successful.

It was determined that the continuity of reparative dentin increased in all groups in the fourth week compared to the first two weeks. However, the most positive scores were detected in the antimicrobial polypeptides nisin and natamycin groups that create our study groups, and the lowest inflammatory reaction values was again in the nisin and natamycin groups.

It has been evaluated that our study results will shed light on future studies and will provide valuable data for the use of nisin and natamycin as direct pulp capping agents.

Keywords: Antimicrobial polypeptides; Direct pulp capping; Natamycin; Nisin



İÇİNDEKİLER

İÇ KAPAK.....	i
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK.....	ii
YÖNERGEYE UYGUNLUK SAYFASI.....	iii
KABUL VE ONAY SAYFASI.....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
ÖZET.....	vi
ABSTRACT.....	viii
İÇİNDEKİLER.....	x
KISALTMALAR ve SİMGELER.....	xiii
TABLolar LİSTESİ.....	xiv
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xv
1.GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2.GENEL BİLGİLER.....	3
2.1.Dişlerin Gelişimi.....	3
2.2.Pulpa.....	5
2.2.1.Pulpa Histolojisi.....	5
2.2.2.Pulpa Hücreleri.....	7
2.2.2.1.Odontoblastlar.....	7
2.2.2.2.Fibroblastlar.....	8
2.2.2.3.İmmunokompetan hücreler.....	8
2.2.3.Pulpada Hücreler Arası Matriks.....	9
2.2.4.Pulpada Sinir ve Damar Ağı.....	10
2.3.Dentinogenezis.....	10
2.3.1.Primer Dentinogenezis.....	10
2.3.2.Sekonder Dentinogenezis.....	11
2.3.3.Tersiyer Dentinogenezis.....	12
2.3.4.Reaksiyoner Dentinogenezis.....	12
2.3.5.Reparatif Dentinogenezis.....	13

2.4.Vital Pulpa Tedavileri	13
2.4.1.İndirekt Pulpa Kaplaması	14
2.4.2.Direkt Pulpa Kaplaması.....	14
2.4.3.Amputasyon.....	14
2.5.Vital Pulpa Tedavilerinin Başarısını Etkileyen Kriterler	15
2.5.1.Mikrosızıntı	15
2.5.2.Perforasyon Alanı Büyüklüğü	16
2.5.3.Kanama Kontrolü ve Pıhtı	16
2.6.Vital Pulpa Tedavilerinde Kullanılan Materyaller	17
2.7.Reparatif Dentinogenezis Araştırmalarında CaOH.....	19
2.8.Antimikrobiyal Polipeptitler ve Diş Hekimiğinde Kullanım Alanları	20
2.8.1.Antimikrobiyal Polipeptitlerin Etki Mekanizması	20
2.8.2.Nisin	21
2.8.3.Natamisin.....	23
2.9.Vital Pulpa Tedavilerinde Deney Modelleri	25
2.9.1.In vivo Deneylerde Etik Sorunlar	25
2.10. In Vivo Deneylere Alternatif In Vitro Deney Modelleri.....	26
3.GEREÇ VE YÖNTEM	30
3.1.Yöntem	30
3.2.Histolojik Takip Aşamaları	34
3.3.İstatistiksel Analiz	37
4.BULGULAR	38
4.1.Histolojik Bulgular	38
4.2. Organ Kültüründe Takip Edilen Direkt Pulpa Kaplaması Yapılmayan Sağlıklı Pulpaya Ait Histolojik Bulgular	38
4.2.1.Nisin ile Direkt Pulpa Kaplaması Yapılan Gruba Ait Histolojik Bulgular	39
4.2.2.Natamycin ile Direkt Pulpa Kaplaması Yapılan Gruba Ait Histolojik Bulgular	43

4.2.3.CaOH ile Direkt Pulpa Kaplaması Yapılan Gruba Ait Histolojik Bulgular	47
4.2.4.Teflon Bant ile Direkt Pulpa Kaplaması Yapılan Gruba Ait Histolojik Bulgular	50
4.2.5.İstatistiksel Sonuçlar	54
5.TARTIŞMA VE SONUÇ	56
6.KAYNAKLAR	63

EKLER

ÖZGEÇMİŞ



KISALTMALAR ve SİMGELER

CaOH	: Kalsiyum Hidroksit
MTA	: Mineral Trioksit Agregat
TGF- β 1	: Transforming growth factor β 1
HA	: Hidroksi Apatit
pH	: Power of hydrogen
AMP	: Antimikrobiyal polipeptitler
LPS	: Lipopolisakkarit
CIS	: Cam iyonmer siman
BME	: Basal Medium Eagle
FBS	: Fötal sığır serumu
DMEM	: Dulbeco's Modified Eagle's Medium-Ham's
BI	: Biological Industries
H&E	: Hematoksilen&Eosin
MT	: Masson's trikrom
ANOVA	: Tek yönlü varyans analizi

TABLULAR LİSTESİ

Tablo 3.1.	Işık mikroskobu doku hazırlama tekniği	34
Tablo 3.2.	Hematoksilen-Eozin Boyama Tekniği.....	35
Tablo 3.3.	Masson's trikrom Boyama Tekniği	35
Tablo 3.4.	Histopatolojik değerlendirme kriterleri	36
Tablo 4.1.	Image J programı ile elde edilen perforasyon ölçüm sonuçlarına ait istatistik tablosu.	54
Tablo 4.2.	İnflamatuar reaksiyon şiddeti ve reparatif dentin devamlılığı istatistik tablosu.....	54

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1.	Nisin.....	23
Şekil 2.2.	Natamisin	25
Şekil 3.1.	Sağlıklı diş deney şeması	31
Şekil 3.2.	Klinik uygulama aşamalarının gösterimi	32
Şekil 3.3.	Nisin, Natamisin, Ca (OH) ₂ ve teflon bant ile yapılan direk pulpa kaplamasının deney şeması.....	33
Şekil 3.4.	Etüv Cihazı	34
Şekil 3.5.	Perforasyon boyutlarının belirlenmesinde pulpaya en yakın bölgeden yapılan ölçümler değerlendirmeye alındı (sarı çizgi).....	36
Şekil 4.1.	Normal diş kesitlerinin ışık mikroskopik görüntüsü (H&E, D : Dentin tübüleri, Ob : Odontoblast, P : Pulpasında, *: kan damarları belirgin haldedir).....	39
Şekil 4.2.	Normal diş kesitlerinin ışık mikroskopik görüntüsü (MT, D : Dentin tübüleri, Ob : Odontoblast, Pr : Predentin, P : Pulpasında, *: kan damarları belirgin haldedir)	39
Şekil 4.3.	Birinci hafta Nisin grubuna ait kesitlerin ışık mikroskopik görüntüsü (H&E, D : Dentin tübüleri, Ob : Odontoblast, Pr : Predentin, P : Pulpa, *: kan damarları, ^: İnflamatuar Reaksiyon, Kalın ok : Reperatif Dentin Oluşumu, Per : Perforasyon bölgesi)	40
Şekil 4.4.	Birinci hafta Nisin grubuna ait kesitlerin ışık mikroskopik görüntüsü (MT, D : Dentin tübüleri, Ob : Odontoblast, Pr : Predentin, P : Pulpa, *: kan damarları, ^: İnflamatuar Reaksiyon, Kalın ok : Reperatif Dentin Oluşumu, Per : Perforasyon bölgesi)	41
Şekil 4.5.	İkinci hafta Nisin grubuna ait kesitlerin ışık mikroskopik görüntüsü (H&E, D : Dentin tübüleri, Ob : Odontoblast, P : Pulpa, *: kan damarları, Kalın ok : Reperatif Dentin, Per : Perforasyon bölgesi).....	41
Şekil 4.6.	İkinci hafta Nisin grubuna ait kesitlerin ışık mikroskopik görüntüsü (MT, D : Dentin tübüleri, Ob : Odontoblast, Pr : Predentin, P : Pulpa, *: kan damarları, Kalın ok : Reperatif Dentin, Per : Perforasyon bölgesi).....	42
Şekil 4.7.	Dördüncü hafta Nisin grubuna ait kesitlerin ışık mikroskopik görüntüsü (H&E, D : Dentin tübüleri, Ob : Odontoblast, Pr :	

- Pre dentin, **P:** Pulpa, *****: kan damarları, **^**; İnflamatuar Reaksiyon, **Kalın ok:** Reperatif Dentin, **Per:** Perforasyon bölgesi).....42
- Şekil 4.8.** Dördüncü hafta Nisin grubuna ait kesitlerin ışık mikroskopik görüntüsü (MT, **D:** Dentin tübüleri, **Ob:** Odontoblast, **Pr:** Pre dentin, **P:** Pulpa, *****: kan damarları, **^**: İnflamatuar Reaksiyon, **Kalın ok;** Reperatif Dentin)43
- Şekil 4.9.** Birinci hafta Natamisin grubuna ait kesitlerin ışık mikroskopik görüntüsü (H&E, **D:** Dentin tübüleri, **Ob:** Odontoblast, **P:** Pulpa, *****: kan damarları, **Kalın ok:** Reperatif Dentin, **Per:** Perforasyon bölgesi)...44
- Şekil 4.10.** Birinci hafta Natamisin grubuna ait kesitlerin ışık mikroskopik görüntüsü (MT, **D:** Dentin tübüleri, **Ob:** Odontoblast, **P:** Pulpa, *****: kan damarları, **Kalın ok:** Reperatif Dentin, **Per:** Perforasyon bölgesi)....44
- Şekil 4.11.** İkinci hafta Natamisin grubuna ait kesitlerin ışık mikroskopik görüntüsü (H&E, **D:** Dentin tübüleri, **Ob:** Odontoblast, **P:** Pulpa, *****: kan damarları, **Kalın ok:** Reperatif Dentin, **Per:** Perforasyon bölgesi)....45
- Şekil 4.12.** İkinci hafta Natamisin grubuna ait kesitlerin ışık mikroskopik görüntüsü (MT, **D:** Dentin tübüleri, **Ob:** Odontoblast, **P:** Pulpa, *****: kan damarları, **Kalın ok:** Reperatif Dentin, **Per:** Perforasyon bölgesi).....45
- Şekil 4.13.** Dördüncü hafta Natamisin grubuna ait kesitlerin ışık mikroskopik görüntüsü (H&E, **D:** Dentin tübüleri, **Ob:** Odontoblast, **Pr:** Pre dentin, **P:** Pulpa, *****: kan damarları, **^**; İnflamatuar Reaksiyon, **Kalın ok;** Reperatif Dentin)46
- Şekil 4.14.** Dördüncü hafta Natamisin grubuna ait kesitlerin ışık mikroskopik görüntüsü (MT, **D:** Dentin tübüleri, **Ob:** Odontoblast, **Pr:** Pre dentin, **P:** Pulpa, **^**: İnflamatuar Reaksiyon, **Kalın ok;** Reperatif Dentin, **Per:** Perforasyon bölgesi)46
- Şekil 4.15.** Birinci hafta CaOH grubuna ait kesitlerin ışık mikroskopik görüntüsü (H&E, **D:** Dentin tübüleri, **Ob:** Odontoblast, **Pr:** Pre dentin, **P:** Pulpa, *****: kan damarları, **Kalın ok:** Reperatif Dentin, **Per;** Perforasyon bölgesi).....47
- Şekil 4.16.** Birinci hafta CaOH grubuna ait kesitlerin ışık mikroskopik görüntüsü (MT, **D:** Dentin tübüleri, **Ob:** Odontoblast, **Pr:** Pre dentin, **P:** Pulpa, *****: kan damarları, **^**: İnflamatuar Reaksiyon, **Kalın ok;** Reperatif Dentin, **Per:** Perforasyon bölgesi)48

- Şekil 4.17.** İkinci hafta CaOH grubuna ait kesitlerin ışık mikroskopik görüntüsü (H&E, **D:** Dentin tübüleri, **Pr:** Predentin, **P:** Pulpa, **Kalın ok:** Reperatif Dentin, **Per:** Perforasyon bölgesi).48
- Şekil 4.18.** İkinci hafta CaOH grubuna ait kesitlerin ışık mikroskopik görüntüsü (MT, **D:** Dentin tübüleri, **Pr:** Predentin, **P:** Pulpa, **Per:** Perforasyon bölgesi).....49
- Şekil 4.19.** Dördüncü hafta CaOH grubuna ait kesitlerin ışık mikroskopik görüntüsü (H&E, **D:** Dentin tübüleri, **Pr:** Predentin, **P:** Pulpa, *****: kan damarları, **Kalın ok:** Reperatif Dentin, **Per:** Perforasyon bölgesi).....49
- Şekil 4.20.** Dördüncü hafta CaOH grubuna ait kesitlerin ışık mikroskopik görüntüsü (H&E, **D:** Dentin tübüleri, **P:** Pulpa, *****: kan damarları, **Kalın ok:** Reperatif Dentin, **Per:** Perforasyon bölgesi). 50
- Şekil 4.21.** Birinci hafta Teflon Bant grubuna ait kesitlerin ışık mikroskopik görüntüsü (H&E, **D:** Dentin tübüleri, **Ob:** Odontoblast, **Pr:** Predentin, **P:** Pulpa, *****: kan damarları, **^:** İnflamatuar Reaksiyon, **Kalın ok:** Reperatif Dentin, **Per:** Perforasyon bölgesi). 51
- Şekil 4.22.** Birinci hafta Teflon Bant grubuna ait kesitlerin ışık mikroskopik görüntüsü (MT, **D:** Dentin tübüleri, **Ob:** Odontoblast, **Pr:** Predentin, **P:** Pulpa, *****: kan damarları, **^:** İnflamatuar Reaksiyon, **Kalın ok:** Reperatif Dentin). 51
- Şekil 4.23.** İkinci hafta Teflon Bant grubuna ait kesitlerin ışık mikroskopik görüntüsü (H&E, **D:** Dentin tübüleri, **Ob:** Odontoblast, **Pr:** Predentin, **P:** Pulpa, *****: kan damarları, **Kalın ok:** Reperatif Dentin, **Per:** Perforasyon bölgesi). 52
- Şekil 4.24.** İkinci hafta Teflon Bant grubuna ait kesitlerin ışık mikroskopik görüntüsü (MT, **D:** Dentin tübüleri, **Ob:** Odontoblast, **Pr:** Predentin, **P:** Pulpa, *****: kan damarları, **^:** İnflamatuar Reaksiyon, **Kalın ok:** Reperatif Dentin, **Per:** Perforasyon bölgesi). 52
- Şekil 4.25.** Dördüncü hafta Teflon Bant grubuna ait kesitlerin ışık mikroskopik görüntüsü (H&E, **D:** Dentin tübüleri, **Ob:** Odontoblast, **P:** Pulpa, *****: kan damarları, **Kalın ok:** Reperatif Dentin, **Per:** Perforasyon bölgesi).53
- Şekil 4.26.** Dördüncü hafta Teflon Bant grubuna ait kesitlerin ışık mikroskopik görüntüsü (MT, **D:** Dentin tübüleri, **Ob:** Odontoblast, **P:** Pulpa, **Kalın ok:** Reperatif Dentin, **Per:** Perforasyon bölgesi). 53

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Diş çürüğü, çok sayıda faktörün etkisiyle oluşan, diş sert dokularında yıkıma neden olan kronik ve bulaşıcı bir hastalıktır (Clarkson 1999, Axelsson 2000, Fejerskov, Nyvad ve ark. 2015). Dünyanın her yerinde diş çürüklerinin önlenmesi için koruyucu diş hekimliği anlayışı giderek yaygınlaşmasına rağmen süt, daimi ve karma dişlenme dönemlerinde çok sayıda diş çürük nedeniyle erken dönemde kaybedilmektedir (Nunn and Steele 2003). Diş, ağız içinde görülen kuron ve çene kemikleri içinde yer alan kökten oluşan kompleks bir organdır. Kuronun en dış kısmında mine, kökün en dış kısmında ise sement yer almaktadır. Tüm diş boyunca bu iki tabakanın altında dentin dokusu yer almaktadır. Diş organının en iç kısmında, dişin minyatürü şeklinde diş pulpası bulunmaktadır. Dişin pulpası damar ve sinirden oldukça zengindir. Pulpanın en dış kısmında yer alan odontoblastlar dentini salgılamaktadır ve odontoblastların çekirdekleri pulpanın periferini döşerken odontoblast hücrelerinin uzantıları dentin içine uzanmaktadır. Birbiriyle yakın ilişkide olmaları nedeniyle, dentin ve pulpayı dentin pulpa kompleksi olarak değerlendirmek mümkündür.

Diş pulpası derin çürüklerde bakteriyel olarak veya dişe gelen travma sonucu mekanik olarak hasar görmektedir. Pulpa ile dentin bütünlüğünün korunmasından sorumlu olan odontoblastlar bu hasara karşı cevap oluşturarak pulpayı dentinle kaplamak için harekete geçmektedirler. Bu durumda pulpanın vital fonksiyonlarının devamını sağlamak ve pulpal iyileşmeyi hızlandırmak için yapılan tedavi uygulamalarında dayanak noktası olarak, pulpanın eşsiz iyileşme gücü karşımıza çıkmaktadır (Massler 1967).

Tersiyer dentin, yaralanma derecesine göre reaksiyoner dentin ve reparatif dentin olarak sınıflandırılmaktadır. Reaksiyoner dentin, pulpanın maruz kaldığı ılımlı derecede bir uyarana cevaben salgılanmaktadır. Reperatif dentin (RD) ise pulpanın geri dönüşümsüz bir zarara neden olan etken varlığında veya travma ya da dental işlemler

sırasında meydana gelen perforasyonu sonucunda salgılanmaktadır (Smith, Cassidy ve ark. 2003).

Bu tez kapsamında ortodontik amaçla çekilmiş açık apeksli 3. molar dişlerde perfor edilen pulpaya, herhangi bir tedavi uygulanmaksızın veya rejeneratif materyaller kullanılarak uygulanan tedavi sonrasında, perforasyon alanında oluşması öngörülen tamir dentininin doğasının histolojik olarak araştırılması amaçlanmaktadır. İn vivo ortamda insan üzerinde böyle bir takibin mümkün olmadığı gerçeğinden hareketle, bu tezde pek çok alanda kullanılabilir in vivo şartları yansıtan bir in vitro pulpal cevap modeli oluşturulmuştur. Geliştirilmiş bu organ kültürünün de ileride pek çok alanda yapılacak olan çalışmalarda model olarak kullanılabilirliği düşünülmektedir.

2.GENEL BİLGİLER

2.1.Dişlerin Gelişimi

Diş gelişimi doğumdan önce başlayıp, doğumdan sonra devam etmektedir. Intra uterin hayatın 3. haftasında ilkel ağız oluşmaktadır. Dişlerin oluşumunun başlangıcı ise embriyonel hayatın 6. haftasına rastlamaktadır (Stewart and Poole 1982). Dişler, epitelyal hücreler ve mezenşimal hücreler olmak üzere iki tip hücreden gelişmektedir. Mine organını oral epitel hücreleri oluştururken, mezenşimal hücreler dental papillayı oluşturmaktadır. Mine ektodermden; dentin, sement ve pulpa ektomezenşimden, periodonsiyum mezenşimden köken almaktadır (Avery 2002). Bir dişin gelişim ve fonksiyon kazanması birbirini takip eden, 4 farklı dönemden oluşmaktadır:

1. Proliferasyon dönemi: Dişlerin oluşacağı bölgedeki ektodermal ve mezodermal hücrelerin sayısının arttığı dönemdir.
2. Histodiferansiyasyon dönemi: Sayısı artan ektodermal ve mezodermal hücrelerin ileride oluşturacakları diş dokusunun türüne göre farklılaştıkları dönemdir.
3. Histogenez dönemi: Doku yapımı iki aşamada gerçekleşmektedir. Formasyon aşamasında dişin şekli belirlenirken, mineralizasyon aşamasında ise doku bu şekle uygun olarak mineralize olmaktadır.
4. Erüpsiyon dönemi: Dişin, önce kemik içinde ilerleyerek sonrasında da ağız mukozasını delerek çiğneme düzlemine ulaşmasını ifade eder (McDonald 1969).

Intrauterin hayatın dördüncü haftasında embriyonun ağız boşluğunu döşeyen bölgedeki ektodermden hiç bir gelişim olmamaktadır. Diş gelişiminin ilk belirtisi, intrauterin hayatın 6. haftasında ağız boşluğunu döşeyen ektodermin mezoderm kökenli ilkel bağ dokusu içerisine farklı iki noktadan proliferasyonu ile başlamaktadır (McDonald 1969). Altıncı haftada alt ve üst çene uzantılarının lateralinde ağız epiteli kalınlaşması şeklinde ortaya çıkmaktadır. Bu kalınlaşma anterior bölgeye doğru ilerleyerek simetriği ile birleşmekte ve çene kavsine uygun olarak biçimini almaktadır. Bu yapıya primer epitel çizgi denmektedir. Yedinci haftaya doğru primer epitel çizgiden

iki uzantı ayrılmaktadır. Bu uzantılardan dışta olanı, dudak, yanak ve dişeti sınırını göstermektedir ve vestibüler lamina adını almaktadır. İçte olan odontojen epitele farklılaşmakta ve dental lamina adını almaktadır. Dental lamina, oluşumunun hemen ardından çene kavsi boyunca mezenkim içerisine doğru yoğunlaşmaktadır. Bu epitel tomurcuklar süt dişlerinin mine organlarını oluşturmaktadır. Dişin gelişim sürecinde mine organı ve dental papilla boyutlarındaki artıştan sonra diş germi gelişiminin çan safhasına ulaşmaktadır. Bu safhada mine organında dış ve iç mine epitelleri diferansiye olurken, dental papillanın periferindeki hücreler de odontoblastlara diferansiye olmaktadır. Bu süreç esnasında dental papilla hücreleri ilk önce iç mine epitel hücrelerini indüklemektedir. Bunu takiben indüklenmiş iç mine epitel hücreleri karşılarındaki mezenşim hücrelerinin odontoblastlara diferansiyasyonunu sağlamak ve odontoblastlar, ameloblastların mineyi salgılamaya başlamasından önce dentini şekillendirecek hücre halini almaktadır (Avery, Steele ve ark. 2002). Dental lamina, oluşumunun hemen ardından çene kavsi boyunca mezenkim içerisine doğru yoğunlaşmaktadır. Bu epitel tomurcuklar süt dişlerinin mine organlarıdır. Önce her yarım çenede ön segmentte 4 adet mine organı gelişmektedir. Daha sonra, dental lamina geriye doğru gelişimini sürdürerek arka segmentte 4 mine organı daha oluşturmaktadır. Her iki segmentten gelişen mine organlarına primer mine organları denir. Primer mine organları geliştikten sonra, süt dişi mine organlarının lingual yönünden, onların yerini alacak olan daimi dişlerin mine organları gelişir. Mine organlarının gelişimine paralel olarak bunlara bitişik mezoderm hücrelerinin çoğalması ve yoğunlaşması diş yapısının oluşumuna yol açmaktadır. Bazal membrana komşu hücreler pre-odontoblastlara farklılaşmaktadır. Odontoblastların gelişimi ile dentinin oluşumu sonucunda dental papilla dental pulpaya dönüşmektedir (Nanci 2008).

Dişlerin gelişeceği bölgelerdeki ektoderm ve mezoderm hücreleri ileride diş dokularının bir bölümünü yapıp geliştirebilecek şekilde değişim gösterirler ve dokuyu oluşturabilecek özellik kazanırlar. Bu doku oluşumuna yönelik hücre değişimine histodiferansiyasyon denir. Histodiferansiyasyon, intrauterin hayatın 13. haftasına kadar sürmektedir. Takke şeklindeki mine organı gelişip bir çan şeklini almaktadır. Aynı oluşuma çan organı adı da verilmektedir. Çan şeklini alma sırasında hücrelerdeki histodiferansiyasyon da ilerler ve özellikle iç mine epitel hücreleri, ileride mine dokusunu oluşturabilecek özelliklerin tümüne erişmektedir. Bu dönemde çan organının iç yüzeyindeki hücrelere ameloblast adı verilmektedir. Ameloblastların karşısına dizili

mezenkimal bağ dokusu kökenli silindirik hücreler odontoblast hücreleridir (Nanci 2008).

Tüm diş sert dokuları (mine, dentin ve sement) iç mine epiteli ve bunun köke devamı olan Hertwing kını ile dental papillanın bunlara komşu yüzü arasında oluşmaktadır. Bazal lamina, mine-dentin sınırını belirlemektedir. Mine oluşumu başlamadan önce buralardaki iç mine epiteli hücreleri mitozla çoğalmaktadır. Bu hücrelere komşu dental papilladaki mezenkim hücreleri de odontoblastlara farklılaşmakta ve preentin çökeltmektedir. Daha sonra iç mine epiteli hücreleri ameloblastlara dönüşmekte, mitoz durmakta ve mine yapımı başlamaktadır. Bazal lamina kaybolmaktadır (Nanci 2008). Mine ve dentin oluşumundan sonra iç ve dış mine epitel hücreleri birleşik mine epiteli adını almaktadır. Bileşik mine epitelinin görevi mineyi çevre bağ dokusundan ayrı tutarak korumaktır. Diş sürmesi dişin gelişimsel konumundan fonksiyon konumuna geçmesini sağlayan bir hareket olarak tanımlanır ve sürekli bir hareket olarak kabul edilmektedir (Stewart and Poole 1982).

2.2.Pulpa

Diş pulpası esas maddeden zengin ve nispeten daha az lif içeren, dentini destekleyen gevşek bağ dokusu olarak sınıflandırılmaktadır (Nanci 2008). Gevşek bağ dokusu, embriyo gelişmesine devam ederken, diğer dokular oluşuktan sonra kalan mezenşimden meydana gelmektedir. Pulpa gevşek bağ dokusu olarak sınıflandırılmış olmasına rağmen, aşağıdaki özellikleri ile diğer bağ dokularından ayrılmaktadır:

1. Odontoblastların varlığı
2. Küçük kollateral dolaşım ile sert kavitede doku hapsi
3. Apikalden sınırlı vasküler erişim (Dummett 2002, Yıldırım 2013)

Pulpa %25 organik yapılardan %75 sudan oluşan özelleşmiş bir bağ dokudur. Dıştan içe sıralandığında; odontoblastik tabaka, hücreden fakir tabaka, hücreden zengin tabaka, pulpa merkezi olmak üzere 4 tabakadan oluşur. Pulpada kan hücreleri, sinir ve kollajen lifleri, odontoblastlar ve fibroblastlar bulunur (Alaçam 2000, Trowbridge 2002).

2.2.1.Pulpa Histolojisi

Pulpanın histolojik görünümü incelendiğinde dört farklı bölge ayırdedilebilmektedir:

1. Pulpa periferindeki odontoblastik bölge
2. Koronalde belirgin olan, odontoblastlar altındaki hücresiz bölge (Weil tabaka)
3. Hücre yoğunluğu fazla, koronal pulpanın yakınlarında hücreden zengin bölge

4. Pulpa çekirdeği (Nanci 2008).

Odontoblast bölgesi pulpanın en dış bölgesi olup, predentinin hemen altında bulunmaktadır. Odontoblast hücrelerinin gövdesinden ve hücreler arasında terminal kapiller ile sinir liflerinden oluşmaktadır. Odontoblast bölgesinde, odontoblast hücreleri silindirik gövdelidir ve yan yana dizilişleri palizatik (çit dizilimli) bir görünüm göstermektedir. Histolojik olarak bakıldığında, odontoblast bölgesi 3-5 hücre kalınlığında bir tabaka görünümü vermektedir. Odontoblast hücreleri dişlerin koroner bölgesinde, özellikle pulpa boynuzlarında yoğunlaşmaktadır. Bu nedenle odontoblastlar, bu bölgede çok tabakalı görünmektedirler. Odontoblast hücreleri birbirlerine birleştirici komplekslerle bağlıdır ve aralarında 300-400 Å hücreler arası boşluklar bulunmaktadır (Nanci 2008).

Hüresiz bölge (Weil tabaka), odontoblast bölgesinin hemen altında bulunan bölgedir. Hüresiz bölgeden kapiller damarlar, myelinsiz sinir lifleri ve fibroblastların ince sitoplazmik uzantıları geçmektedir. Hüresiz bölgedeki duysal sinirlerin dentritik uzantıları spesifik ağrı reseptörleri olup, odontoblast bölgesi içine girip, bir kısmı odontoblastlar arasından geçerek dentin tübülleri içine kadar uzanıp bu bölgede sonlanmaktadır. Hüresiz bölgenin varlığı veya yokluğu, pulpanın fonksiyonel durumuna bağlı olabilmektedir. Örneğin, hızlı dentin yapan genç pulpalar ile RD yapımı görünen yaşlı pulpalarda bu bölge görünmeyebilmektedir (Smith, Cassidy ve ark. 1995).

Hücreden zengin bölge, pulpanın merkezine göre daha çok fibroblast hücresi içermektedir. Bu durum, koroner pulpada kök pulpasına göre daha belirgin görünmektedir. Hücreden zengin bölgede fibroblastların yanı sıra farklı sayıda makrofajlara, lenfositlere veya plazma hücrelerine rastlanmaktadır. Normal bir pulpada, hücreden zengin bölgede hücre çoğalması pek görünmezken, odontoblastların ölmesi halinde, hızlı bir mitoz izlenmektedir. Dönüşümsüz olarak zedelenmiş odontoblastların, hücreden zengin bölgeye göç eden hücrelerle yer değiştirdiği düşünülmektedir (Yamamura 1985). Hücreden zengin bölgede izlenen mitotik hareketlerin, odontoblast bölgesinin yenilenmesinin ilk basamağı olduğu düşünülmektedir (Fitzgerald, Chiego ve ark. 1990).

Pulpa merkezi büyük kan damarları ve sinir ağı açısından zengindir (Nanci 2008).

2.2.2.Pulpa Hücreleri

Pulpanın temel hücreleri, odontoblastlar, fibroblastlar, makrofajlar, ve diğer immunokompetan hücrelerdir (Nanci 2008). Ayrıca diş pulpası multipotent kök hücrelerden oldukça zengindir (Yıldırım 2013).

2.2.2.1.Odontoblastlar

Odontoblastlar post-mitotik nöral krest hücrelerinden köken almaktadır. Odontoblastlar, pulpanın periferinde tek tabaka halinde bulunmaktadır ve gevşek bağ dokusu karakterindeki pulpayı predentinden ayırmaktadırlar. Odontoblast hücreleri arasında 30-40 mikrometre boyutunda küçük boşluklar ve özel oluşumlar bulunmaktadır. Bu özel oluşumlar komşu odontoblastlarla bağlantıyı sağlamaktadır (Marion, Jean ve ark. 1991). Odontoblastlar RNA'dan zengin olup çekirdeklerinde bir yada daha fazla çekirdekçik bulunmaktadır. Aktif odontoblastlar dört çekirdekçikten oluşan büyük bir çekirdek içermektedir. Çekirdeğin üzerine, sitoplazmanın merkezine konumlanmış ve iyi gelişmiş bir golgi kompleksi ile belirgin bir endoplazmik retikulum bulunmaktadır. Çok sayıda mitokondri hücre gövdesine eşit bir şekilde dağılmaktadır. Primer dentin oluşumunun erken evreleri boyunca en aktif hücreler odontoblastlardır. Primer dentin oluşumu tamamlandıktan sonra odontoblastlar daha az aktif hale gelmektedirler. Odontoblastlar dentin ve predentin organik matriksinin proteoglikan ve kollajenlerini de üretmektedir. Odontoblastlar mineralizasyon için hücre içinde kalsiyum iyonlarını taşıyabilmektedir (Smith 2002).

Ayrıca odontoblastlar, kemik sialoproteini (bone sialoprotein - BSP), dentin sialoproteini (dentin sialoprotein - DSP), dentin fosfoproteini (dentin phosphoprotein - DPP), dentin sialofosfoproteini (dentin sialophosphoprotein - DSPP), dentin matriks proteini-1 (DMP-1), osteokalsin, osteonektin, ve osteopontin (OPN) gibi çeşitli kollajen olmayan proteinleri sentezlemektedir. DSPP, BSP, DSP, ve DMP-1 dentin spesifik işaretleyicileri olarak kabul edilmektedir (Qin, Brunn ve ark. 2003, Suzuki, Haruyama ve ark. 2012). Bununla birlikte bu moleküller sadece dentin dokusunda bulunan bileşenler değildir (Yıldırım 2013).

Odontoblastların temel fonksiyonu dentin üretmektir. Bunun yanı sıra doğuştan gelen bağışıklık tepkilerinin başlatılması ve şüpheli ağrı iletimini de odontoblastların fonksiyonları arasında olduğu bildirilmektedir (Allard, Magloire ve ark. 2006).

2.2.2.2.Fibroblastlar

Bağ dokusunun esas elemanı olan fibroblastlar, kollajen lifçiklerinin ve esas maddenin yapımından sorumlu hücrelerdir. Granüler tipte endoplazmik retikulumları çok gelişmiş olup sitoplazmaları fazla sayıda vezikül taşımaktadır. Yetişkin pulpada, fibroblastlar düzleştirilmiş iğ şeklinde hücreler olarak görünmektedir (Nanci 2008). Fibroblastlar yaygın olarak pulpanın bağ dokusu boyunca dağılmakta ve koronal pulpanın hücreden zengin bölgesinde yüksek yoğunluklarda bulunabilmektedir (Okiji 2002). Fibroblastların en önemli rolü, pulpa matriksinin devamlılığını sağlamaktır. Pulpadaki fibroblastların başka bir fonksiyonu da vücudun farklı yerlerindeki fibroblastlar gibi Tip I ve tip III kollajen sentezlemektir. Fibroblastlar aynı zamanda, proteoglikanlar ve fibronektin kollajen olmayan hücre dışı matriks bileşenlerini de sentezlemektedirler. Fibroblastlar ek olarak hücreler arası matriks bileşenlerinin yapımında da rol oynamaktadır (Seltzer 1985).

2.2.2.3.İmmunokompetan hücreler

İmmunokompetan hücreler antijenik işgalden korunmaya yardımcı mekanizmaları oluşturmak için etkileşen hücreler olarak tanımlanmakta olup; dentritik hücreler, makrofajlar/histiositler ve T, B lenfositleri gibi inflamatuvar ve savunma sistemi hücrelerini içermektedir. Geçici olarak bulunan immunokompetan hücreler kan dolaşımından desteklenmektedir. Lokal enfeksiyona karşı katkıda bulunmak ve bağışıklık reaksiyonlarını desteklemek gibi yetenekleri bulunmaktadır. Bu yetenekleri immunokompetan hücreleri konak savunmasında aktif bir katılımcı yapmaktadır. İmmunokompetan hücreler, kavite hazırlanması, travma ve çürük gibi diş bütünlüğünü tehdit eden durumlardan etkilenmekte ve pulpanın bağ dokusunda bulunmaktadırlar (Okiji 2002).

Dendritik hücreler, immün sistemin yardımcı hücreleridir ve dendritik stoplazmik uzantıları ve hücre membranı üzerinde MHC sınıf II molekülü bulundurmaları ile karakterizedir. B lenfositleri antikor salgılayan plazma hücrelerine farklılaşırken (humoral bağışıklık), T lenfositleri spesifik bağışıklık tepkisinde temel rol oynamaktadır. Sitotoksik T lenfositleri (CD8+) enfekte olmuş hücrelerin lizisini sağlamakta, yardımcı T lenfositleri (CD4+) ise bağışıklığı düzenlemek için sitokin üretmektedir. CD8+ hücreleri insanlardaki birçok sınıf I MHC moleküllerini bağlamaktadır (Shackelford, Kaufman ve ark. 1982).

Makrofajlar, kan damarlarının çevresinde bulunan histiositler olarak tarif edilmektedir ve pulpa bağ dokusu boyunca son derece yüksek sayıdadırlar. Morfolojik görünimleri farklı olan pulpa makrofajları, pulpanın perivasküler alanında fazlaca bulunmaktadır (Okiji 2002).

Pulpada arterioller, venüller, kapillerler ve lenf damarları bulunmaktadır. Koronal bölgedeki kan akım hızının radiküler bölgenin yaklaşık iki katı olduğu bilinmektedir. Pulpa dokusunun zengin ve karmaşık sinir ve damar ağına sahiptir. Pulpa dokusunun zengin ve karmaşık sinir ve damar ağına sahip olmasının rejeneratif yanıt için önemli olduğu bilinmektedir (Okiji 2002, Yıldırım 2013).

2.2.3.Pulpada Hücreler Arası Matriks

Bağ dokusunun ana hücresi olan fibroblastlar hücreler arası matriks yapımından sorumludur. Hücreler arası matriks, bağ dokunun önemli bir bileşenidir ve fibriler proteinler ile ana maddeyi içermektedir. Pulpanın ana maddesi farklı sayıda glikozaminoglikan yan zincirleri ve protein çekirdekten oluşmaktadır (Okiji 2002). Glikozaminoglikanlar; hyaluronik asit, kondroitin sülfat ve dermatan sülfattır. Fibriler proteinler, yapısal lifleri oluşturmaktadır ve yapısal olanlar ve adeziv olanlar olarak iki sınıfa ayrılmaktadır. Yapısal olanlar kollajen ve elastin, adeziv olanlar fibronektindir (Okiji 2002).

Kollajen, hücrelerarası bağ dokusunun en büyük proteindir ve başlıca görevi pulpa dokusuna destek olmaktır (Okiji 2002). Kollajen lifleri arasından en çok Tip I kollajen bulunmaktadır. Diğer fibriler kollajenler, tip III, V, VI, ve XI pulpada görünürken, fibriler olmayan tip II kollajen pulpada oluşmamaktadır. Dentin ve predentindeki kollajen tiplerinin bileşimi pulpadan oldukça farklılık göstermektedir (Jontell, Okiji ve ark. 1998, Okiji 2002).

Fibronektin, karmaşık fibriler ağlar gibi pulpada ve odontoblast bölgede lokalize olabilmektedir. Primer odontoblast farklılaşması sırasında dental bazal membran bileşenlerinden biri olan fibronektin, preodontoblastlar çevresinde akümüle olmakta ve farklılaşmanın daha ileri aşamalarında polarize odontoblast hücrelerinin apikal kutuplarıyla sınırlı bir dağılım göstermektedir (Lesot, Lisi ve ark. 2001, Zhang, Tian ve ark. 2007)

2.2.4.Pulpada Sinir ve Damar Ağı

Pulpa hem duyu hem de otonom sinir lifleri içermektedir. Sinir lifleri pulpaya apikal foramenden kan damarları ile birlikte girmektedir. Pulpada lifler koronale doğru ilerlemekte ve dentin pulpa sınırında Raschkow sinir pleksusunu oluşturana kadar küçük dallara ayrılmaktadır. Raschkow sinir pleksusu hücresiz bölge merkezinde yer almaktadır (Nanci 2008) . Raschkow sinir pleksusu ağrılı uyarınları izlemektedir. Peptid içeriği sayesinde iltihabi olaylar ve sonrasında doku onarımında önemli rol oynamaktadır. Raschkow sinir pleksusunda ağrı hissine aracılık eden iki tip sinir lifi bulunmaktadır. Bu sinir liflerinden ince ve miyelinsiz olan C-lifleri hafif ağrıya dâhil olurken, miyelinli gruba ait A-lifleri hızlı ve keskin ağrıyı iletmektedir. Pulpa çevresinde bulunan birçoğu dentin tübülllerine uzanan lifler ve odontoblastlarla yakın ilişki içerisinde olan, özellikle A-delta tipi A-lifleri pulpanın periferinde yer almaktadır. C-lifleri tipik olarak kan damarları etrafındaki dallar veya serbest sinir uçları gibi pulpa dokusunda sonlanmaktadır (Kandray 2007).

2.3.Dentinogenezis

Odontoblastlar, en önemli görevi primer dentin yapımı olan, post-mitotik hücrelerdir (Smith 2002). Dentinogenezis, dental papillanın nöral krest hücrelerinden köken alan, ileri derecede farklılaşmış post-mitotik odontoblastlar tarafından düzenlenmektedir (Tziafas 1995).

2.3.1.Primer Dentinogenezis

Odontoblastlar, farklılaşmasının son evrelerini tamamlayıp, pulpaya doğru ilerledikçe kollajen fibril ve organik matriks yapısındaki preentin çökelmeye başlamaktadır. Odontoblastlar fonksiyona geçince hücre çekirdekleri hücrede bazal membrana doğru hareket etmekte, diğer hücre organelleri belirgin hale gelmektedir. Endoplazmik retikulum, golgi kompleksi ve mitokondrilerin görülmesi hücrelerin protein ürettiklerini göstermektedir. Dentin matriksi ilk depolandığı zaman kollajen mineralize değildir ve preentin olarak tanımlanmaktadır. Kollajen matriks şekillenirken odontoblastlar mine-dentin bağlantısının oluşacağı yöne doğru hareket etmektedir (Avery 2002). Bu evrede manto dentin oluşumu tamamlanmaktadır ve odontoblastlar tarafından dentin matriks üretilmektedir. Odontoblastlar, matriks salgılanırken matriks içindeki dentin tübülllerine gömülü tek bir sitoplazmik parça bırakarak, pulpaya doğru hareket etmektedir. Pulpaya

hareket sırasında, pulpanın yakınlarında yoğunlaşmış artan tübüller, dentin üzerinde geçirgenlik özelliği vermektedir. Tübüller dentinde derece derece değişen yoğunluk ile özel bir geçiş göstermektedirler. İntertübüler dentin matriksi, sirkumpulpal dentin kısmını içerirken; peritübüler dentin matriksi, tübül çevresinde salgılanmaktadır. İntertübüler dentin matriksinden daha yüksek mineralli, kollajen olmayan matriks bileşenleri açısından daha zengin olan peritübüler dentin, daha az kollajen fibril içermektedir (Smith 2002).

Primer dentinogenezis boyunca devam eden birikim, dentin matriksi kalınlığında bölgesel farklılıklara yol açmaktadır. Peritubuler dentin oluşumundan dolayı dentin tübüllerinin yapısı gittikçe incelmektedir. Dentin tübülleri, amelodontinal kavşak yakınında 0,9 µm çapındayken pulpaya yakın yaklaşık 2,5 µm'lik bir çapa ulaşmaktadır (Smith 2002).

Dentin sekresyonu ritmik olarak devam etmektedir. Dentin birikiminin kökte kurondan daha yavaş olduğu bildirilirken, hem kök hem kuronda hücre salgısının günlük ritimlerden etkilendiği ifade edilmektedir. Kuron ve kökün her ikisinin de planlı bir şekilde primer dentin oluşumu boyunca (dişin kuron ve kökü arasındaki oran farklılıkları ile) odontoblast salgısı hızla ilerlemektedir. Dişin kuron ve kökü tamamlandıktan sonra, salgılama hızı aniden düşmektedir (Lesot, Lisi ve ark. 2001, Smith 2002).

Fizyolojik dentin salgılanmasında kontrol mekanizmaları mevcuttur ve çeşitli büyüme faktörleri, hormonlar ve transkripsiyon faktörleri odontoblast salgılama etkinliğinin düzenlenmesinde yer almaktadır. Söz konusu büyüme faktörlerinin belirlenmesi, özellikle de transforme edici büyüme faktörü-β (TGF-β) ailesi ile sinyal dönüşüm yollarının odontoblastın salgılama fonksiyonları nasıl etkilediği ile ilgili ipuçları verirler. Kendi salgılama etkinliğini düzenlemek için odontoblastların önceden programlandığını göstermektedir. Hücresel programlama, hücre ölümü veya apoptozu da içeren bir özellik olup, çoğu dokularda daha düşük bir oranda olmakla birlikte, odontoblastlarda da bir dereceye kadar gerçekleşmektedir (Smith 2002).

2.3.2.Sekonder Dentinogenezis

Sekonder dentinogenezis dişin kuron ve kök oluşumu tamamlanmasından sonra da görülen ve bir ömür boyu devam eden dentin matriksinin daha yavaş hızda birikimini sağlamaktadır. Sekonder dentin dişin periferi etrafında depolanırken, pulpa odasının

tavanında ve tabanında salgılanan dentin asimetrik olarak ayrılmaktadır. Periferdeki depolanmanın bireyin yaşına da bağlı olduğu ifade edilmektedir (Shuttleworth, Ward ve ark. 1978).

Sekonder dentin matriksinin tübüllerinin büyük oranda primer dentinin tübülleri ile devam etmesinden hareketle, primer ve sekonder dentin salgılanması için aynı odontoblastların sorumlu olduğu bildirilmektedir. İlave olarak bu hücrelerin salgı aktivitesinin düşük regülasyonunun sekonder dentinin nispeten yavaş çökmesi anlamına geldiğini ifade etmektedir (Smith 2002).

2.3.3.Tersiyer Dentinogenezis

Çürük, diş aşınması, travma ve diğer yaralanmalar gibi dış etkilere karşı olarak dentinin lokal salgılanmasını tanımlamak için tersiyer dentinogenezis terimi önerilmektedir (Kuttler 1959). Hasarlı pulpa dokusu, çevresel uyarana tamir yanıtı olarak pulpa-dentin ara yüzünde tersiyer dentin olarak adlandırılan dentin matriksi birikimini tetiklemektedir. Tersiyer dentin, primer ve sekonder dentinlerden farklı olarak düzenli salgılanmaktadır (Smith 2002). Dentin-pulpa kompleksinin yaralanma derecesine göre tersiyer dentin; reaksiyoner dentin ve RD olarak sınıflandırılmaktadır (Smith, Cassidy ve ark. 1995).

2.3.4.Reaksiyoner Dentinogenezis

Reaksiyoner dentin, uygun bir uyarıcıya tepki olarak post-mitotik odontoblastların aktivitelerindeki artışla oluşan tersiyer dentin olarak tarif edilmektedir. İlimli derecede bir uyarana cevaben odontoblastlar ilk olarak reaksiyoner dentini salgılamaktadırlar. Reaksiyoner dentinogenezis sırasında hayatta kalan odontoblastların salgı aktivitesinin artışı gözlenmektedir. Bu salgı aktivitesi odontoblastların fizyolojik davranışının bir uzantısı olarak kabul edilmektedir. Salgı artışının kontrolünde bu ayırt edici özellik önemlidir. Zira uyarın tarafından belirlenir ve hücre salgı davranışlarının fizyolojik düzenlemesi için farklılık gösterebilmektedir. Yanıtın yoğunluğunu, uyarının derecesi ve uyarının süresi belirlemektedir (Seltzer 1985).

Reaksiyoner dentinogenezis sırasında odontoblast artışına restoratif materyallerin altından bileşenlerin filtrelenmesi veya çürük sırasında plak bakterilerinin sağladığı iritasyonların sebep olduğu ifade edilmektedir (Smith, Cassidy ve ark. 1995, Smith 2002). Geri dönüşümsüz bir zarara neden olan etken varlığında veya travma ya da

dental işlemler sırasında meydana gelen pulpanın perforasyonu ile primer odontoblast hücreleri ölmektedir. Odontoblastlar post-mitotik hücreler olduğu için geri dönüşümsüz hasar görmüş olan odontoblastlar, bölünerek kendi kendilerini yenileyememektedir. Böylece reparatif dentinogenezisi başlatabilmek için pulpal rejeneratif mekanizmalar çalışmaya başlamakta ve pulpa progenitor/kök hücreleri odontoblast benzeri hücrelere farklılaşmaktadır (Fitzgerald 1979, Fitzgerald, Chiego ve ark. 1990, Smith, Cassidy ve ark. 1995). Bu durumda, yeni farklılaşan odontoblast-benzeri hücreler ölmüş olan odontoblast hücrelerinin yerini almakta ve tamir dentin matriksi salgılayabilmektedir (Tziafas 1995). Tamir dentin yapımı, hasar gören dentin dokusu altındaki pulpanın kendini iyileştirebilmesi, canlılığını ve fonksiyonunu sürdürebilmesi için yeni ve sert bir savunma bariyerinin oluştuğunun göstergesidir. Bazı kuvvetli kanıtlar hasara karşı cevabın dental pulpanın progenitor/kök hücrelerinden kaynaklandığını önermesine rağmen, bu hücrelerin pulpanın hangi bölgesinde yer aldıkları ve perforasyon alanına göçleri hakkında çok az şey bilindiği bildirilmektedir (Tecles, Laurent ve ark. 2005, Yıldırım 2013).

2.3.5.Reparatif Dentinogenezis

Ekspoze olmamış pulpada, reparatif dentinogenezis reaksiyoner dentinogenezisin devamı olabilir veya yaralanma aktif çürük bir lezyon gibi yeterli yoğunlukta ise, reaksiyoner dentin yokluğunda bağımsız olarak da gerçekleşebilmektedir. Reparatif dentinogenezisin biyolojik etkinlikleri pulpanın progenitor hücrelerindeki reaksiyoner dentinogenezisten çok daha karmaşık bir prosedür içermekte ve reparatif dentinogenezis matriksin oluşumundan önce odontoblast benzeri hücre farklılaşması tetiklenebilmektedir (Smith 2002).

2.4.Vital Pulpa Tedavileri

Dentin pulpa tedavilerinde, dişin normal fizyolojik olaylarının devam etmesine yol açan tedavi yaklaşımları rejeneratif yaklaşımlar olarak tanımlanmakta ve bu yaklaşımlarla gerçekleştirilen tedavilere de vital pulpa tedavileri denmektedir (Ranly 1994). Vital pulpa tedavileri, çürük, travma ve dental işlemler sebebiyle hasar görmüş olan diş dokularının geleneksel yöntemlerle temizlenmesinin ardından kalan sağlam dentin ve pulpa dokusunun rejeneratif ajanlarla kapatılarak tersiyer dentin formasyonunun indüklenmesidir (Yıldırım 2007). Sert doku bariyerinin oluşumunun indüklenmesi için klinikte rutin olarak uygulanan dental restoratif maddeler veya üzerinde deneysel

çalışmaların devam ettiği biyolojik kökenli materyaller kullanılarak vital pulpa tedavileri yapılmaktadır (Decup, Six ve ark. 2000).

2.4.1.İndirekt Pulpa Kaplaması

Pulpanın çürükle perfore olmadığı ancak pulpaya yakın derin dentin çürüklerinde uygulanan bir tedavi yöntemidir. Tedavide pulpanın tamamının canlılığının korunması amaçlanır. Pulpal duvarın genellikle CaOH esaslı bir örtücüyle kaplanarak restorasyonunun yapılması esasına dayanır (Fuks 2000). İndirekt pulpa tedavisi ile çürük ilerlemesi önlenirken aynı zamanda tersiyer dentin oluşumu da sağlanmaktadır (Alaçam 2012). İndirekt pulpa kaplamasının yapılabilmesi için diş vital olmalı, radyografik olarak herhangi bir patoloji olmamalı, klinik olarak asemptomatik olmalı, spontan,uzun süreli ve şiddetli ağrı olmamalı, diş yaygın bir restorasyon veya kuron restorasyonu gerektirmemelidir (Cohenca, Paranjpe ve ark. 2013).

2.4.2.Direkt Pulpa Kaplaması

Direkt pulpa kaplaması, sağlıklı pulpaya komşu derin çürük lezyonları ve travmaya bağlı olarak meydana gelen pulpa perforasyonunda, pulpanın vitalitesinin devamını sağlamak ve iyileşmeyi hızlandırmak için yapılan bir tedavi yöntemidir. Bu uygulamanın dayanak noktası, pulpanın mükemmel iyileşme gücüdür (Massler 1967, Ranly 1994). Direkt pulpa kaplaması yapılacak olan dişlerde perforasyon alanı bir noktadan ve küçük olmalı, pulpa kalsifikasyonu bulunmamalı, hermetik kapamayı engelleyecek ortam olmamalı, pulpada geri dönüşümlü pulpitis tablosu olmamalı, kanama süresi normal olmalı ve eksuda içermemelidir (Alaçam 2012).

2.4.3.Amputasyon

Amputasyon, kavite preparasyonu sırasında büyük çaplı bir mekanik pulpa perforasyonu oluştuğunda uygulanan ve kullanılan terapotik materyalin doğasına bağlı olarak vital pulpa tedavisi sınıfında değerlendirilebilecek bir tedavidir. Perforasyon sahasının çevresindeki çürük dentine komşu olan pulpa dokusunda bakterilerin bulunduğu, bu dokunun enflamasyon ve dejeneratif değişiklikler gösterdiği düşünülmektedir. Bu nedenle tedavinin amacı koronal pulpanın tamamen çıkarılmasını takiben kökteki sağlıklı pulpa dokusu aracılığıyla kanal ağzlarında iyileşmenin sağlanmasıdır. Amputasyon işlemi enfekte ya da etkilenmiş durumdaki koronal

pulpanın çıkartılmasını takiben bırakılan sağlıklı kök pulpasının iyileşme potansiyeline sahip olduğu temeline dayanmaktadır (Fuks 2000).

2.5.Vital Pulpa Tedavilerinin Başarısını Etkileyen Kriterler

Direkt pulpa kaplamasının klinik ve histopatolojik olarak başarısını, çürük miktarı, mikrosızıntı, kullanılan materyaller, perforasyonun boyutu, basınç, pıhtı, dentin parçacıklarının pulpa dokusuna girmesi, tükürük kontaminasyonu ve izolasyon etkilemektedir (Alaçam 2012).

2.5.1.Mikrosızıntı

Direkt pulpa kaplama ve restorasyon materyalinin sızdırmazlık özelliğinin iyi olması gerekmektedir. Sızdırmazlığın iyi olması mikrosızıntı kaynaklı enfeksiyonların önüne geçmektedir (AAPD 2014).

Direkt pulpa kaplaması sonrasında oluşan sekonder enfeksiyonun bakteri kontaminasyonu ile ilgili olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Direkt pulpa kaplaması sonrası oluşan RD'in mikrosızıntı nedeni ile pulpada yeterli koruma sağlayamadığı bildirilmiştir (Cox 1992). Farklı restoratif materyaller ile maymun dişi pulpalari üzerinde yapılan araştırmalarda, mikrosızıntı önlendiği takdirde olumlu iyileşme cevabı elde edildiği bildirilmiştir (Cox 1987). Ayrıca kaplama materyalinin üzerine kaide konulması ve üst restorasyonun kenar uyumlarının iyi olması gerektiği, aksi durumda tamirin meydana gelmediği ve nekroz oluşabileceği bildirilmektedir (Briso, Rahal ve ark. 2006).

Travma sonucu oluşan perforasyonlarda, bakteriler dokuya yavaş yayılmaktadır. Yedi güne kadar yalnızca ortalama 1,5 mm derinlikte inflamatuvar reaksiyonlar izlenmiştir. İki mm'lik bir pulpa dokusunun uzaklaştırılması, kullanılacak olan materyalin inflamatuvar cevabın başlamadığı doku üzerine yerleştirilmesi ile sızıntının azalmasına izin vermektedir (Cvek, Cleaton-Jones ve ark. 1982). Dokuz güne kadar, 4 mm'ye kadar olan perforasyonlarda, prognozun iyi olabileceği de bildirilmektedir (Cvek and Lundberg 1983).

Yapılan araştırmalarda mikrosızıntının en büyük sebeplerinden birinin restorasyon etrafında bulunan mikroorganizmalar olduğu bildirilmektedir (Bergenholtz, Cox ve ark. 1982, Bergenholtz 2000). Ratlarda yapılan deneysel bir araştırmalar sonucunda, pulpa ekspozunu takip eden 8 gün sonunda pulpa dokusunda parsiyel nekroz, 14. günde ise

total nekroz geliştiği rapor edilmiştir. Aynı çalışmada bakterisiz ortamda ekspoz edilen dişlerde 32. günde tüm pulpa dokusunun normal ve sağlıklı olmasının yanında ekspoz bölgesinde dentin köprüsü oluşumu gözlenmiştir. Bu çalışma, bakteriyel invazyonun tedavinin başarısına etkisini ortaya koymaktadır (Kakehashi, Stanley ve ark. 1966).

Sonuç olarak pulpa patolojisinin gelişiminde, bakterilerin mevcudiyeti ve kullanılan materyalin toksik olmasının pulpal cevabı etkileyen önemli faktörlerden olduğu bildirilmektedir (Bergenholtz 2000).

2.5.2.Perforasyon Alanı Büyüklüğü

Direkt pulpa kaplaması uygulanabilmesi için perfore olan pulpa çapının 1mm'den küçük olması gerektiği bildirilmektedir. Perfore alanın büyüklüğü arttıkça iyileşme ters yönde etkilemektedir (Cvek, Cleaton-Jones ve ark. 1982, Cox 1992). Ancak vital ampütasyon tedavisinin de geniş yüzeyli bir pulpa kaplaması olduğu gerekçesi ile geniş pulpa perforasyonlarının da iyileşebileceği savunulmaktadır (Stanley, Pereira ve ark. 1983). Bu çalışmayı destekler şekilde, travma sonrası 4 mm'ye kadar olan perforasyonlarda yapılan pulpa kaplamasını takiben %96 başarı bildirilmiştir (Cvek 1978). Diğer taraftan tedavi amacıyla kullanılan materyalin pulpaya temasının olmadığı küçüklükteki perforasyon alanları da başarıyı olumsuz yönde etkilemektedir (AAPD 2014).

İnsan diş fizyolojisine benzeyen köpek dişlerinde yapılan 'kritik yara boyutu' ile ilgili çalışmada 2 mm çap 1 mm derinlikteki perforasyonun tamir yanıt oluşturma potansiyeli olduğu bildirilmiş ve bu sebeple pulpada, herhangi bir tedavi uygulanmadığında kendiliğinden iyileşmeyen 'kritik yara boyutu' 2/1 olarak belirlenmiştir (Yildirim, Can ve ark. 2011).

2.5.3.Kanama Kontrolü ve Pıhtı

Perfore pulpada kanamanın miktarı, kanamanın hızlı durması ve oluşan pıhtı kalınlığı iyileşmede önemlidir. Oluşan pıhtının kalınlığı kullanılacak olan kaplama materyalinin dokuya olan temasını engellemekte ve mikrosızıntıya sebep olarak mikroorganizmalar için uygun ortam sağlamaktadır (Alaçam 2012).

Pulpa kaplamasında kullanılacak olan materyal, perforasyon alanına uygulanmadan önce kanamanın kontrol altına alınması gerekmektedir. Kanamanın fazla olması pulpadaki enflamasyonun göstergesidir ve böyle bir durumda pulpanın tamir kapasitesi

azalmaktadır. Aynı zamanda perforasyon bölgesine komşu dentinin kanamadan dolayı ıslanmış olması, uygulanacak materyalin uygulanmasını zorlaştırmaktadır (Hilton 2009). Pıhtı oluşumunun, doku yıkımına neden olan organik materyaller içermesi nedeniyle, tedavi öncesi engellenmesi önerilmektedir (Stanley 2002).

Perforasyon bölgesinde kanama kontrolü yapılırken pıhtı oluşmaması istenmektedir. Kaplama materyali altında devam eden kanama ve plazma sıvısı materyalin yerinden oynamasına neden olmaktadır (Stanley and Lundy 1972). Diğer taraftan dentin köprüsü ve kaplama ajanı arasında pıhtı oluşması nedeni ile oluşan temas eksikliğinin tam bir köprü oluşumunu engellemediği, sadece geciktirdiği ifade edilmektedir (Kerekes, Heide ve ark. 1980).

Serum fizyolojik, sodyum hipoklorit, epinefrin içeren anestetik solüsyonlar, klorheksidin, ferrik sülfat ve lazer enerjisi kanama kontrolünü sağlamak amacıyla kullanılmıştır (Messer 2002). Klorheksidin iyi bir antibakteriyel ajan olmasına rağmen sodyum hipoklorit kadar etkili bir kanama durdurucu olmadığı bildirilmiştir. Sodyum hipokloritin de iyi bir kanama durdurucu olmasına rağmen, pulpal reaksiyon oluşturarak, iyileşmeyi olumsuz etkilediği bildirilmiştir (Murray and Garcia-Godoy 2005).

2.6.Vital Pulpa Tedavilerinde Kullanılan Materyaller

Pulpanın korunmasında ve rejeneratif cevap verebilmesinde etkili olabilecek materyaller; matriks proteinleri ve büyüme faktörleri, CaOH preparatları, mineral trioksit agregat (MTA), rezin dentin adezivleri ve çeşitli simanlardır (Rutherford, Wahle ve ark. 1993). Kullanılan materyallerin toksik olmaması, anti-enflamatuar etkili olması ve RD oluşumunu sağlayacak sert doku indüksiyonu yeteneği olması gerekmektedir (Tziafa, Koliniotou-Koumpia ve ark. 2014). Materyalin perforasyon alanını tıkama kabiliyeti ve toksisitesi vital pulpa tedavisine pulpa cevabını etkileyen önemli faktörlerdendir (Bergenholtz 2000).

Çok sayıda araştırmacı pulpa kaplamasında adeziv sistemlerin kullanılabileceğini bildirmiştir (Kashiwada and Takagi 1991, Cox, Hafez ve ark. 1998, Suzuki, Taira ve ark. 2016). Adeziv sistemler kullanılarak yapılan pulpa kaplaması ile ilgili bir çalışmada, pulpaya direkt olarak uygulama sonrası pulpa dokusu incelenmiş ve 7 gün sonunda adeziv sistem altında hücre infiltrasyonu gözlenmiştir. Zamanla dentin köprüsü oluşumu gözlenmiş ve inflamasyonun gerilediği görülmüştür. Kontrol grubunda CaOH

kullanılmış ve 60 güne kadar incelenen örneklerde RD oluşumu bildirilmiştir (Hebling, Giro ve ark. 1999). Buna karşı olarak CaOH ve adeziv sistemler kullanılarak yapılan karşılaştırmalı bir immunohistokimyasal araştırmada CaOH ile sınırlandırılmış grupta, histolojik olarak dentin köprüsü izlenip, odontoblast benzeri hücre ekspresyonunda artış gözlenirken, adeziv sistemlerin sağlıklı pulpada doğrudan temas ile uygulanmasında tamir için gerekli olan ekspresyona yol açmadığı bildirilmektedir (Fernandes, Silva ve ark. 2008).

Transforming growth factor β 1'in (TGF- β 1) kullanılarak, köpek dişlerinde yapılan Reparatif dentinogenezis araştırmasında, TGF- β 1'in dozuna bağlı RD oluşturduğu gözlenirken, TGF- β 1 taşıyıcısı olarak kullanılan hidroksiapatitin (HA) tek başına uygulandığı grupta inflamatuvar reaksiyonların geliştiği ve tamir yanıtının oluşmadığı bildirilmiştir. HA' in TGF- β 1 ile kullanımı sonucunda inflamatuvar reaksiyonların ortadan kalktığı ve mezenşimal hücre proliferasyonlarının gözlendiği belirtilmiştir (Yıldırım ve Alaçam 2007). Biyolojik materyallerin pulpal rejenerasyona etkileri konusunda çalışmaların devam etmesi gerekliliğinin, indükleyici gen terapilerinin uygulanması ile mümkün olabileceği düşünülmektedir (Yıldırım 2013).

CaOH pulpa dokusuna uygulandığında pH'sı 11,5-12 olduğundan kostik etki yaratmaktadır. Bu kostik etki ile birlikte enzimleri de bloke etmektedir. Oluşan alkalin ortamda fosfataz enzimi kandan inorganik fosfat salımını aktive etmekte ve kalsiyum fosfat çökelmektedir. Perforasyon alanında kaplama materyali yerleştirildikten sonra oluşan pulpal yanıt, damarsal cevap, iltihap hücrelerinin migrasyonu ve proliferasyonu şeklinde ilerlemekte ve bir skar dokusu oluşmaktadır. Pulpa kaplama ajanı ile korunduğu zaman doku formasyonu artmakta, pulpa hücreleri odontoblastlara farklılaşmakta ve dentin benzeri bir doku oluşmaktadır (Schroder 1985, Alaçam 2012). Çok sayıda çalışmada kullanılan ve en popüler materyal olan CaOH, histolojik bulgulara bağlı olarak tedavi edilen vakaların yaklaşık % 87'sinde RD oluşumuna neden olmaktadır. Bununla birlikte uzun süredir kullanılmasına rağmen, CaOH kullanımı hala tartışmalıdır. CaOH'in çözünabilir bir materyal olması ve defekt oluşturarak mikrosızıntıya sebep olması başarısızlık nedenleri arasında sayılmaktadır (Cox, Subay ve ark. 1996, Aeinehchi, Eslami ve ark. 2003, Olsson, Petersson ve ark. 2006).

MTA CaOH'e benzer pH'ya sahiptir ve yaklaşık 24 saatte sertleşmektedir. Başlangıçta 10,2 olan pH'sı sertleşme tamamlandıkça 12'ye çıkmaktadır. CaOH ile karşılaştırıldığında MTA'nın daha az iltihabi reaksiyona yol açtığı gözlenmiştir.

MTA'nın sertleşme süresinin uzun olması dezavantaj olarak kabul edilse de, son zamanlarda yapılan çalışmalarda MTA'nın NaOCl veya %5'lik $CaCl_2$ ile karıştırılmış ve çalışma zamanı kısaltılmıştır (Kogan, He ve ark. 2006). MTA'nın doku uyumluluğunun yüksek olması, oluşturduğu dentin köprüsünde tünel defektlerinin olmaması ve bakteri geçişini oldukça yüksek oranda önlemesi nedeni ile MTA materyali, pulpa kaplaması tedavilerinde popüler olmaya başlamıştır. MTA'nın CaOH ile karşılaştırıldığında daha iyi RD oluşturmasının nedeni olarak materyalin sızdırmazlık özelliğinin iyi olması, yüksek doku uyumu ve bazik pH'ya sahip olması gösterilmektedir (Fischer, Arens ve ark. 1998, Nakata, Bae ve ark. 1998, Torabinejad, Pitt Ford ve ark. 2009).

MTA ile yapılan birçok çalışmada paralel şekilde MTA'nın rejeneratif pulpa cevapları açısından başarılı sonuçlar verdiği bildirilmektedir (Briso, Rahal ve ark. 2006, Farsi, Alamoudi ve ark. 2006). Nitekim son yıllarda, yüksek doku uyumluluğuna sahip olması, oluşturduğu dentin köprüsünde tünel defektlerinin olmaması ve bakteri geçişini son derece iyi önlemesi nedeni ile MTA materyali, pulpa kaplamasında ön plana çıkmaya başlamıştır. MTA'nın oluşturduğu dentinogenez, materyalin sızdırmazlık özelliğinin, yüksek doku uyumunun ve bazik pH'da olmasının bir sonucudur (Alaçam 2012).

2.7.Reparatif Dentinogenezis Araştırmalarında CaOH

CaOH veya CaOH bileşikleri uzun yıllardır pulpa kaplaması için tercih edilen malzemeler olmuşlardır. Fakat CaOH ve çoğu CaOH simanları çözülmeye yatkındır. Restorasyonların etrafında mikrosızıntı olması durumunda, kaplama alanına bakteri geçişi söz konusu olmaktadır. Bu nedenle alternatif malzemeler üretmek için çok sayıda araştırma yapılmıştır. Bununla birlikte, CaOH'in etkisi çok sayıdaki histolojik ve klinik çalışmalarda doğrulanmıştır (Decup, Six ve ark. 2000, Faraco Jr and Holland 2001).

Hem rat hem de insan dişlerinin kullanılarak yapılan histolojik bir çalışmada direkt pulpa kaplamasını takiben histolojik olarak iyileşme değerlendirilmiştir. Rat dişlerinde histolojik olarak 22 gün sonra hücresel iyileşme ve RD görülmüştür. Ortodontik olarak çekilecek olan dişlerde yapılan direkt pulpa kaplamasını takiben 38 ile 145 gün arasında dişler çekilmiş ve histolojik takip işlemlerinden geçirilmiştir. Histolojik olarak CaOH ile yapılan direkt pulpa kaplaması sonrasında RD oluşumu gözlenmiştir (Harris and Bull 1966). Direkt pulpa kaplamasında CaOH kullanılarak yapılan bir başka çalışmada ratların pulparları elektron mikroskobu ile incelenmiş ve pulpa içindeki hücrelerin yara

bölgesine doğru proliferasyon oldukları ve gözle görülebilir bir RD oluştuğu bildirilmiştir (Harrop and Mackay 1968).

2.8. Antimikrobiyal Polipeptitler ve Diş Hekimliğinde Kullanım Alanları

Antimikrobiyal polipeptitler (AMP) doğuştan bağışıklığın bir parçası olup genlerle kodlanan doğal antibiyotiklerdir (Carnicelli, Lizzi ve ark. 2013). İnsan, bitki ve hayvan türlerinin çeşitli doku ve hücre tipleri tarafından üretilirler. Bu proteinler küçük, 12-50 aminoasit içeren, geniş spektrumlu mikrobiyosidal aktiviteye sahip peptidlerdir. Moleküler ağırlıkları ≤ 5 kDa'dır (Brogden ve Brogden 2011). Bu proteinlerin antimikrobiyel aktiviteleri ilk kez 19. yüzyılın sonlarında kan, lökosit ve lenfatik dokularda tanımlanmış ve 1920-1950 yılları arasında bu dokulardan birçok antimikrobiyel bileşen izole edilmiştir (Brogden, Ackermann ve ark. 2003). Daha sonra antimikrobiyal polipeptitlerin gram negatif ve gram pozitif bakterileri, virüsleri, mantarları ve hatta değişmiş ve kanserleşmiş hücreleri de öldürdüğü gösterilmiştir (Carnicelli, Lizzi ve ark. 2013). Bu polipeptitler yapılarındaki aminoasit kompozisyonlarına göre anyonik ve katyonik antimikrobiyal polipeptitler olmak üzere 2 alt gruba ayrılırlar (Brogden, Ackermann ve ark. 2003). Anyonik antimikrobiyal polipeptitler insan, sığır ve koyun akciğerlerinde, bronkoalveolar lavaj sıvılarında, solunum yolu epitel hücrelerinde bulunurlar (Brogden, Ackermann ve ark. 2003). Katyonik antimikrobiyal polipeptitler ise yaygın olarak evcil hayvanlarda bulunurlar. Doğal immun yanıtın anahtar bileşenleridir. Katyonik antimikrobiyal polipeptitler % 50 oranında hidrofobik aminoasit içerirler ve sahip oldukları lizin ve arjinin aminoasitlerinin etkisiyle pozitif yüklüdürler (Brogden ve Brogden 2011).

Antimikrobiyal peptitler, ağız boşluğundaki patojenik mikroorganizmaların kontrolünde de dikkat çekmiştir ve bazı çalışmalarda, defensin, histatin, cathelicidin LL-37, laktoferrin, nisin, pleurocidin ve diğer sentetik peptitler, birkaç oral patojenik bakteriye karşı iyi antibakteriyel aktivite göstermiştir (da Silva, de Freitas ve ark. 2012).

2.8.1. Antimikrobiyal Polipeptitlerin Etki Mekanizması

Antimikrobiyal proteinlerin çoğu antibakteriyel etkilerini mikroorganizmaların membranı ile etkileşerek göstermektedirler. Bu şekilde hücrenin dengesini bozarak hücre ölümüne neden olurlar (Aşkar ve Aşkar 2017). Antimikrobiyal proteinlerin mikroorganizma inhibisyonu sırasında hücre membranını etkilemesi iki farklı yolla

olmaktadır. Birincisi antimikrobiyal proteinler negatif yükleri sayesinde hedef membranına tutunarak lipit odaklı çift tabakalı bakteri membranından suda çözünen (hidrofilik) protein bölgeleri bir araya gelerek penetre olurlar. Bakterilerin fosfolipit yapısındaki iç membranının da negatif yüklü oluşu antimikrobiyel etkiyi kolaylaştırmaktadır (Brogden, Ackermann ve ark. 2003). İkincisi ise hücre membranını delerek por oluşturulmasıdır. Bunun için; önce gram negatif bakterilerin dış membranında bulunan lipopolisakkarit (LPS) tabakası ve gram pozitif bakterilerde bulunan ve asidik bir polisakkarit olan lipoteikoik asit ile AMP'nin bağlanması gerekir (Hancock 1997). Antimikrobiyal proteinler; bakterileri ya doğrudan öldürürler ya da kemokin üretimini teşvik ederek veya kemokin gibi rol alarak bakteriyel lipopolisakkaritlerin indüklediği yangı-öncesi sitokin üretimini baskılayarak, edinilmiş bağışıklık sistemi hücrelerinin yanıtlarını düzenleyerek enfeksiyonu sonlandırılmasında rol alırlar (Aksoy 2013). Antimikrobiyal polipeptitler gram (+) ve gram (-) bakterilere karşı antibakteriyel etkilidir. AMP'lerin antibakteriyel aktiviteleri yanında, antiviral (bazı zarflı virüsler), antiparaziter (tripanozom, plazmodium gibi), antifungal, antikanser aktiviteleri de vardır (Aksoy 2013).

2.8.2.Nisin

Nisin (*Lactococcus lactis*, Sigma Aldrich, Almanya) (Şekil 2.1) lantibiyotik sınıfının üyesi olup, laktik asit bakterileri tarafından üretilmektedir. İlk olarak, 1928 yılında Rogers birkaç *Streptococcus* türünün diğer laktik asit bakterilerini inhibe eden doğal metabolitler ürettiğini keşfetmiştir (Parente and Ricciardi 1999). Nisin, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* tarafından kimyasal bir savunma sistemi olarak rekabet içerisinde bulunduğu mikroorganizmalara karşı üretilen bir bakteriyosindir. Şu ana kadar nisinin A, Z, Q, F, U ve U2 olmak üzere 6 doğal çeşidi tanımlanmıştır. Nisin A, Z, Q ve F *Lactococcus lactis* suşları tarafından, nisin U ve U2 ise *Streptococcus uberis* tarafından üretilmektedir (Egan, Ward ve ark. 2012). Gıda katkı maddesi olarak ticari boyutta kullanılan ilk bakteriyosin olan nisin Avrupa Birliğinde gıda koruyucusu olarak kullanımına izin verilen tek doğal antimikrobiyaldir (Beutner, Frixel ve ark. 2007). Nisin, ilk kez 1953 yılında İngiltere'de satışa sunulmuştur (De Vuyst and Vandamme 1994). Doğal bir antimikrobiyal peptit olan nisin, *Lactococcus lactis*'ten Mattick ve Hirsch tarafından 1947'de izole edilmiş olup, bilinen en eski ve üzerinde en çok çalışılan antibiyotiktir (Mattick and Hirsch 1947). Nisin *Listeria monocytogenes*,

Staphylococcus aureus, *Bacillus cereus*, *Lactobacillus plantarum*, *Micrococcus luteus* ve *Micrococcus flavus* gibi bakterilere karşı oldukça etkili olup renksiz, tatsız, kokusuz ve düşük toksisiteye sahiptir (Severina, Severin ve ark. 1998, Hampikyan 2009). Nisin ayrıca, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis*, *Lactobacillus acidophilus* ve *Enterococcus faecalis* gibi oral patojenik bakterilere karşı antibakteriyel aktivite göstermiştir (Tong, Dong ve ark. 2010, Tong, Zhou ve ark. 2011). Nisin antimikrobiyal etkisini, bakteri hücrelerinin stoplazmik membranında bozulmaya neden olarak ya da hücre ölümüne neden olarak gösterir (Breukink, van Heusden ve ark. 2003, Breukink and de Kruijff 2006). Nisinin antibakteriyel aktivitesi ve stabilitesi ortamdaki pH değerinden etkilenir. Nisin düşük pH değerlerinde yüksek antibakteriyel aktiviteye ve stabiliteye sahiptir (Rollema, Kuipers ve ark. 1995, Cerrutti, Terebiznik ve ark. 2001). Nisinin antibakteriyel etkisi tükürükteki enzimler, proteinler ve diğer inorganik bileşenlerden etkilenmez. Ayrıca gastrointestinal (sindirim) sisteme girdikten sonra tripsin ve pankreatin gibi sindirim enzimleri tarafından hızla emilir ve inaktive edilir (Jarvis and Mahoney 1969, Tong, Dong ve ark. 2010).

Diş çürükleri ile ilgili mikroorganizmalar genellikle gram pozitifdir ve antimikrobiyal peptid nisin genellikle gram pozitif bakteriler üzerinde inhibe edici bir etkisi vardır. Bu da diş çürüklerinin önlenmesinde nisin uygulanabilir olması olanağını oluşturur. Yapılan bir çalışmada nisin karyojenik etkinliği olan 9 mikroorganizma üzerinde (*S. sanguinis*, *Streptococcus gordonii*, *S. mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *L. acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus fermenti*, *Actinomyces viscosus* ve *Actinomyces naeslundii*) inhibe edici etkinliği olduğu belirlenmiştir (Tong, Dong ve ark. 2010). Florür ve nisin kombinasyonunun değerlendirildiği bir çalışmada, florür ve nisin karyojenik patojen *S. mutans* ve biyofilm üzerinde büyük bir sinerjik etki göstermiştir (Tong, Zhou ve ark. 2011). Nisin ve CaOH'in kanal içi pansuman ajanı olarak değerlendirildiği çalışmada birbirlerine yakın antimikrobiyal etkinlik gösterdiği gözlenmiştir (Turner, Love ve ark. 2004). Nisinin biyofilm üzerine etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada nisin biyofilm gelişimini inhibe ettiği ve oral hücrelere zarar vermediği bildirilmiştir (Shin, Ateia ve ark. 2015). Nisinin bonda eklenmesiyle antimikrobiyal etkinliğin ve bağlanma kuvvetine etkisinin araştırıldığı bir çalışmada; nisinin *S. Mutans* büyümesini önemli ölçüde inhibe ettiği ve bağlanma kuvvetinde azalma göstermediği bildirilmiştir (Su, Yao ve ark. 2018). Nisin eklenmiş bond ile yapılan başka bir çalışmada yine *S. mutans* büyümesinin ve biofilmlerin büyümesinin

önemli ölçüde inhibe edildiği ve bağlanma kuvvetine olumsuz etkisinin olmadığı bildirilmiştir (Zhao, Qu ve ark. 2020).Yapılan çalışmaların sonuçlarına göre nisin, diş çürüklerini önlemek için antibakteriyel bir ajan olarak kullanılma potansiyeline sahiptir. Nisinin biyolojik özellikleri, diş çürüklerinin önlenmesinde ve kanal tedavilerinde uygun etkili bir ilaç olabileceğini düşündürmektedir.



Şekil 2.1. Nisin

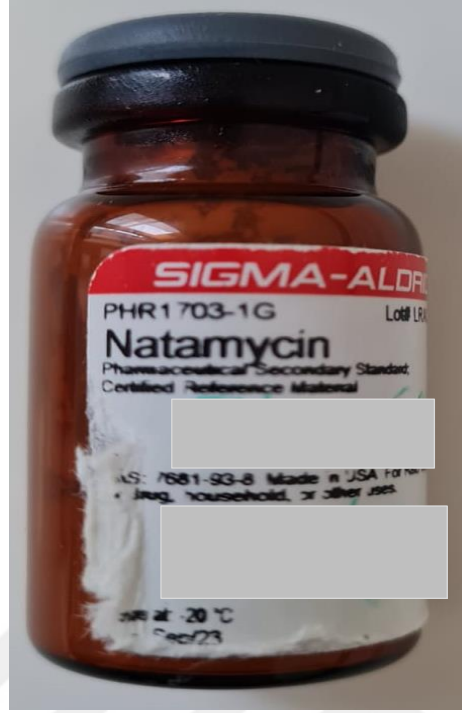
2.8.3.Natamisin

Natamisin (Pharmaceutical Secondary Standard; Certified Reference Material, Sigma Aldrich, Almanya) (Şekil 2.2) belli gıdalarda ve içkilerde oluşan maya, küf ve mantarlardan korunmak için uzun yıllardan beri koruyucu olarak kullanılmaktadır. Natamisin, ilk olarak Güney Afrika'nın Natal eyaletinin yakınlarındaki toprak örneklerinden izole edilen *Streptomyces natalensis* kültürü filtratlarıdır. 1955 yılında keşfedilen doğal polien makrolid bir antibiyotiktir. Fermantasyon ortamından izole edilen kurutulmuş natamisin, beyaz krem renkli ve çok az ya da kokusuz ya da tatsızdır. Natamisinin ticari preparatları, Delvocid, Delvopos, Delvocoat ve Natamax isimleri altında laktoz ile karıştırılmış ve yaklaşık %50 natamisin içermektedir. Natamisin pH 4-7 aralığında stabildir (Delves-Broughton, Thomas ve ark. 2005, Tayel, EL-TRAS ve ark. 2011). Natamisinin, moleküler formülü C₃₃H₄₇NO₁₃ ve molekül ağırlığı 665.725 Daltondur. Natamisin neredeyse tüm maya ve küf karşı etkili fakat bakteriler, virüsler ve protozoalar üzerine herhangi bir etkisi yoktur. Gıda endüstrisinde natamisin bakterilerin fermentasyonu sürecinde ve olgunlaşmasında herhangi bir etki göstermemektedir (Delves-broughton 2005). Bir polien makrolid olan natamisin, küf hücre membranındaki ergosterol ve diğer steroller bağlayan bir antifungaldır. Natamisin steroller bağlayarak küf hücre membranında sızıntı ile sonuçlanan bozulmalara ve

ergosterol sentezinin inhibisyonuna neden olur. Bakteriler hücre duvarı sterollerine sahip olmadıklarından natamisine karşı duyarlı değildir (Yılmaz ve Kural 2005, Öztürk, Gürbüz ve ark. 2006). Ancak natamisin Staphylococcus aureus, Streptococcus faecalis, Streptococcus haemolyticus, Pseudomonas aeruginosa, Bacillus cereus, Bacillus subtilis, Salmonella typhimurium ve Proteus mirabilis gibi bakterilere karşı çok yüksek miktarda (>250 mg/kg) kullanıldığında etkili olabildiği bildirilmiştir. Şeker ve tuz gibi maddeler ortamın su aktivitesini düşürerek sinerjistik etki oluşturarak natamisin antimikrobiyal etkinliğini güçlendirmektedir (De Ruig and Van den Berg 1985, Volpon and Lancelin 2002).

Hayvanlar üzerinde laboratuvarında yapılan araştırmalar sonucunda natamisin zehirli ve alerjik bir etkisi olmadığı belirlenmiştir. Ayrıca, natamisin yağda ve suda çözünmediği için vücuda alındığında % 90'ının bağırsaklar tarafından dışarı atıldığı belirtilmiştir (Yılmaz Ersan, 2005). Sıcaklık, pH değeri, ışık, oksidanlar ve ağır metaller natamisin yapısını etkilemektedir (Sahan, Güven ve ark. 2004).

Diş hekimliğinde natamisin ile yapılan çok az çalışma vardır. Protez stomatitinin tedavisinde kullanılan % 2,5 pimafulin (natamisin içeren) süspansiyonunun etkinliğinin araştırıldığı bir çalışmada candida enfeksiyonunda önemli bir azalma gösterdiği ve yan etkilerin olmadığı bildirilmiştir (Koopmans, Smitt ve ark. 1984). Natamisin, nistatin ve Amfoterisin B 'nin oral kandidiyazisin başlıca etyolojik faktörü olan Candida albicans ve Candida glabratanın oral epitel hücrelerine yapışmasının engellenmesine etkilerinin karşılaştırıldığı bir çalışma yapılmıştır. Çalışmanın sonucunda natamisin, nistatin ve Amfoterisin B'nin Candida albicans ve Candida glabratanın oral epitel hücrelerine yapışmasını azalttığı bildirilmiştir (Dorocka-Bobkowska, Konopka ve ark. 2003).



Şekil 2.2. Natamisin

2.9.Vital Pulpa Tedavilerinde Deney Modelleri

2.9.1.In vivo Deneylerde Etik Sorunlar

Etik, insanlar ilişkilerinin temelinde yer alan değerleri, ahlaki olarak; doğru ya da yanlış olanın niteliğini ve temellerini araştıran felsefe dalı olarak tanımlanmaktadır. Bilimsel araştırma ise araştırmacıların bilimsel yöntemleri kullanarak belirledikleri bir sorunun çözümüne cevap aramasıdır (Aydemir, Yalçın ve ark.,2006).

İnsanda herhangi bir biyolojik materyal üzerinde yapılacak araştırmalarda da etik ilkelere uyma sorumluluğu bulunmaktadır. İnsan üzerinde yapılacak araştırmaların bilimsel ilkelere uygun olması gerekmektedir. Yapılacak olan işlemler çalışmalara yön verecek fakat ilgili bölgede gerekli değil ise bilimsel araştırma etiği dışında kalmaktadır. İn situ çalışmaların büyük bir kısmı bilimsel etik açısından engel teşkil etmekte ve deneklerden onam alınmaktadır.

İn vitro, genellikle biyoloji ve tıp alanlarında, laboratuvar ya da yapay koşul anlamında kullanılan bir terimdir. Örneğin, laboratuvarda doku örneklerinin bakteri üzerinde etkilerinin araştırıldığı çalışma in vitro olarak gerçekleşmiş olmaktadır. Bir şeyin tam olarak yerinde, incelendiğini anlatmak için ise 'in situ' terimi kullanılmaktadır.

2.10. In Vivo Deneylere Alternatif In Vitro Deney Modelleri

Direkt pulpa kaplaması ile ilgili yaklaşık son 50 yıldır yapılan 70'e yakın çalışmada, rat dişlerinin boyutu ve teknik zorluklar nedeniyle klinik uygulamalar öncesi yapılan rat çalışmaları reddedilmektedir. Ayrıca ISO 7405 standardı, diş hekimliğinde hayvansal araştırma için sadece kemirgen olmayan memelilerin uygun türler olduğunu da belirtmektedir. Buna karşı yapılan birçok çalışmada da, rat dişlerindeki pulpa dokusundaki iyileşmenin diğer hayvanlar ve insanlardaki iyileşme ile histolojik olarak benzer düzeyde olduğu bildirilmektedir. Pulpa dokusu da dahil olmak üzere, rat molar dişleri, anatomik, histolojik, biyolojik ve fizyolojik olarak minyatür insan molar dişleri olarak görülebilmektedir. Pulpal doku reaksiyonu ve diş hekimliği ile ilgili değerli veriler sağlamak için geçerli bir çalışma modeli olarak kabul edilmektedir (Dammaschke 2010). Ratlarda CaOH ile yapılan direkt pulpa kaplaması sonrasında pulpa dokusunun histolojik olarak iyileştiğini gözlemlemek, insanlardaki iyileştirme süreciyle kıyaslanabilir olduğu için çalışma modeli olarak kullanılabilirliği öne sürülmektedir (Fitzgerald 1979).

RD ile ilgili çalışmaların insan üzerinde çalışılmasının zorluğuna ek olarak, odontoblast fenotipinin, dentin matris proteinlerinin biyokimyasal karakterizasyonu ve kemik ile birçok benzerliği bulunması nedeniyle, odontoblast fenotipinin araştırılması, diş pulpasındaki sınırlı sayıda hücrenin ve bu hücrelerin popülasyonunun incelenmesi ve izolasyonu zordur. Bu engellerin üstesinden gelmek için birçok kültür sistemi geliştirilmiştir.

Dentin formasyonunu incelemek için geliştirilen kültür ortamında, kültür ortamı olarak % 15 FBS, glutamin, vitamin C, penisilin G ve streptomisin sülfat içeren kültür ortamı kullanılmıştır. Hazırlanan 124 farklı diş örneği 13 mm çaplı bir filtre ile bir metal ızgaranın üzerine yerleştirilmiş ve ızgaralar, 3.5 cm çapında bir plastik petri kabına yerleştirilmiştir. Petri kabındaki örnekler, filtreyi sadece ıslatan bir seviyeye ulaşana kadar kültür ortamı ile doldurulmuştur. Kültür ortamı ile doldurulan petri kablara 37 °C'de 10 güne kadar farklı zaman dilimlerinde (2, 7 ve 10 gün) inkübe edilmiştir. Dokular pH 7.4 olacak şekilde glüteraldehid içerisinde fiksasyonu 24 saatte tamamlandıktan sonra, 0.1 M EDTA ile dekalsifiye edilmiştir. Histolojik olarak dokuların incelenebildiği görülmüştür. Dokuların histolojik olarak incelenebilmesi için

in vivo'ya alternatif in vitro bir ortam hazırlanmıştır (Bronckers, Bervoets ve ark. 1983).

Magloire ve arkadaşları dentinogenezisi in situ olarak takip etmek amacıyla bir doku kültürü sistemi geliştirmişlerdir. Araştırmacılar çekilmiş üçüncü azı dişlerinde oklüzal kaviteler oluşturmuşlardır. Daha sonra çekilen dişler, 50 ug/mL askorbik asit, 50 pg/mL streptomisin, 100 IU / mL penisilin ve % 10 fetal buzağı serumu ilave edilmiş BME (Basal Medium Eagle) kültür ortamına yerleştirilmiştir. Kaviteli ve kavitesiz diş kesitleri BME kültür ortamında bekletildikten sonra dikkatli bir şekilde petri kabına alınmadan önce, etüvde % 5 CO₂ atmosferi altında 3, 7, 12, 16, 21 ve 30 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra kültür ortamından uzaklaştırılan dişler fikse edilerek histolojik analiz için kesitler alınmıştır. Kesitlerden alınan fotomikrograflarda yapılan incelemeler sonucunda sağlıklı pulpaya komşu alanlarda pulpa tamirinin başladığı görülmüştür (Magloire, Joffre ve ark. 1996).

Bunun yanında daha kısa süreli çalışmalarda kullanılmak üzere, dentinogenezis ve doku tamiri sırasında yer alan mekanizmaları tam olarak anlamak için, yetişkin diş dokularından dentin-pulpa kompleksi için kültür modelleri geliştirmeye ihtiyaç olduğu düşüncesiyle başka bir çalışmada farklı bir in vitro kültür modeli geliştirilmiştir. Sloan ve ark. (Sloan, Shelton ve ark. 1998) tarafından yapılan bu çalışmada 28 günlük ratların alt ve üst kesici dişleri kullanılmıştır. Kültür ortamı DMEM içerisine vitamin C, % 10 ısı ile inaktive edilen FBS, L-glutamin, % 1 penisilin/streptomisin ve % 1 düşük erime noktalı agar ilave edilmiştir. Kesitler 14 gün boyunca vizkositesi yüksek agar kültür ortamında bekletilmiştir. Daha sonra dişlerden alınan kesitler steril milipor filtreye aktarılmıştır. Daha sonra kesitler 35x10 milimetrelik petri kabına 4 ml DMEM içerisine yerleştirilmiştir. Bu kültür ortamı sayesinde daha sonra yapılan otoradyografik çalışmalar ile dentin-pulp kompleksi boyunca hücre morfolojisinin korunduğu, odontoblastların sentezlendiği ve ekstrasellüler matriksin aktif olarak salgılandığı gösterilmiştir. Ayrıca yeni doğan ratlarda kesici dişleri kullanarak dentin-pulpa kompleksinin mevcudiyetini koruduğu bildirilmiş ve bu sistemin in vitro şartlarda RD oluşumunu takip etmek için uygun bir organ kültürü olduğu bildirilmiştir (Sloan, Shelton ve ark. 1998).

Ortodontik amaçla çekilmiş üçüncü molar dişleri kullanarak yapılan başka bir in vitro kültür çalışmasında, BrdU kullanarak pulpa hücrelerinin aktivasyonunu gözlenmiştir.

Kullanılan tüm dişlerde, kültür ortamının kökün orta üçlüsündeki pulpal dokulara difüzyonunu sağlamak için kök uçları açık olan immatür dişler tercih edilmiştir. Çalışmada kullanılacak olan immatür üçüncü molar dişler okluzalden perfore edilmiştir. Kontrol grubu dişlere kavite açılmamıştır. Daha sonra dişlerin üzerindeki periodontal ligament steril bir spanç yardımı ile temizlenmiştir. Dişler, içerisinde 200 IU/ml penisilin, 200 mg/ml streptomisin, 0.5 mg/ml amfoterisin B ve % 10 FBS bulunan MEM kültür ortamına taşınmıştır. Dişler, kökleri kültür ortamında kalacak şekilde kuronlarından sabitlenmiştir. BrdU lokalizasyonu için dişler MEM'e ilave edilmiş BrdU içerisinde 1 gün inkübasyona bırakılmıştır. Dişler, ayrıca içerisinde BrdU bulunmayan MEM kültüründe 1 gün, 2 hafta ve 4 haftalık farklı zaman dilimlerinde inkübe edilmiştir. Kültür sonrasında dişler % 4 formolde fikse edilmiş ve %17'lik formik asit ile dekalsifiye edilmiştir. Dişler, rutin histolojik takip aşamalarından geçirilerek parafine gömülmüştür. Histolojik olarak incelenen dişlerde, bir gün BrdU ile inkübe edilen dişlerde, hücre aktivasyonunun perivasküler bölgede, hücre çekirdeklerinde lokalize olduğu gözlenmiştir. İki haftalık inkübasyon sonrasında, işaretlenen hücreler perforasyon alanına yakın gözlenmiştir. Dört haftalık inkübasyon sonrasında ise işaretlenen hücreler sadece perforasyon alanında izlenmiştir. Bu sonuçlardan hareketle progenitör hücrelerin perivasküler alanda lokalize olabileceğini ve kullanılan kültür ortamının in vivo'ya alternatif olabileceği bildirilmiştir (Tecles, Laurent ve ark. 2005).

Reparatif dentinogenezis incelendiği başka bir çalışmada ortodontik amaçla çekilmiş üçüncü molar dişler kullanılmıştır. Çekilen dişler hemen 300 UI/mL penisilin, 300 ug/mL streptomisin, 0.75 ug/mL amfoterisin B ve %10 FBS ilave edilmiş MEM vasatı içerisinde laboratuvara taşınmıştır. Dişlerin periodontal ligament ve dental kesesi temizlendikten sonra steril serum altında perforasyon alanları oluşturulmuştur. Daha sonra dişlere üretici firmanın talimatlarına göre hazırlanan MTA ve CaOH ile pulpa kaplaması işlemi yapılmıştır. Dişler kaplama sonrası restore edilmiştir. Restorasyon sonrasında, dişler okluzal yüzeyden tel ile bağlanıp kökleri kültür ortamı içinde kalacak şekilde sabitlenmiştir. Daha sonra dişler BrdU bulunan MEM ortamında 1 gün süre ile bekletilirken BrdU bulunmayan MEM kültür ortamında 1, 14 ve 28 gün inkübe edilmiştir. Mikroskopik analiz yapıldığında, pulpa ile CaOH ve MTA arası ara yüzüne yakın reaksiyon bölgesinde histolojik değişiklikler gözlenmiştir. Pulpa dokusunun normal morfolojiye sahip olduğu gözlenmiştir. BrdU içeren MEM vasatının, diş organ kültürü olarak kullanıldığı, MTA ve CaOH ile pulpa kaplamasında oluşan Reparatif

dentinogenezisi histolojik olarak incelenmiş ve her iki materyal için de reparatif dentinogenezis oluşturma kapasitelerinde aynı sonuçlar bulunduğu bildirilmiştir (Tecles, Laurent ve ark. 2008).

Yukarıda belirtilen araştırmalarda bugüne kadar genel olarak MTA ve CaOH'nın reparatif dentinogenezis uyarımı ile ilgili histolojik analizler yapılmış fakat bu materyallerin hangisinin avantajlı olduğu netliğe kavuşturulamamıştır. İnsan üzerinde çalışmanın etik sorunları ve hayvan çalışmalarının teknik hassasiyet gerektirmesi yanı sıra denek dişlerinin bire bir insan dişini yansıtmaması, biyomateryaller ile yapılması gerekli olan histolojik çalışmaları sınırlandırmaktadır. Bahsedilen in vitro modeller günümüz koşullarında oldukça değerli deney modelleridir. Tüm bu sebeplerle bu tezde Tecles ve arkadaşları (2008) tarafından sunulan diş organ kültürünün modelinin reparatif dentinogenezis çalışmalarında kullanılabilirliğini test etmek amacıyla henüz çekilmiş, çürüksiz, açık apeksli bir adet 3. molar insan dişisöz konusu besleyici kültür ortamında bir ay, belirtilen koşullarda tutulmuş ve dentin-pulpa bütünlüğünün korunduğu gözlenmiştir. Yapılan bu ön çalışmada diş organ kültürünün etkinliği belirlenmiş ve reparatif dentinogenezisin incelenmesinde kullanımına karar verilmiştir. Çalışmamızda ortodontik amaçla çekilmiş açık apeksli 3. molar dişlerde oluşturulan perforasyonlar CaOH, antimikrobiyal polipeptitler (nisin ve natamisin) ile kapatılmış ve oluşması beklenen reparatif dentogenezisin farklılık gösterip göstermediği incelenmiştir. Çalışmada negatif kontrol grubu olarak teflon bant kullanılmıştır.

Bu tez çalışmasının amacı klinik uygulamaları desteklemek üzere pulpada meydana gelen inflamasyon ve RD devamlılığı konularında, diş organ kültüründe, antimikrobiyal polipeptitlerin CaOH ve teflon bant ile karşılaştırılmasıdır.

3.GEREÇ VE YÖNTEM

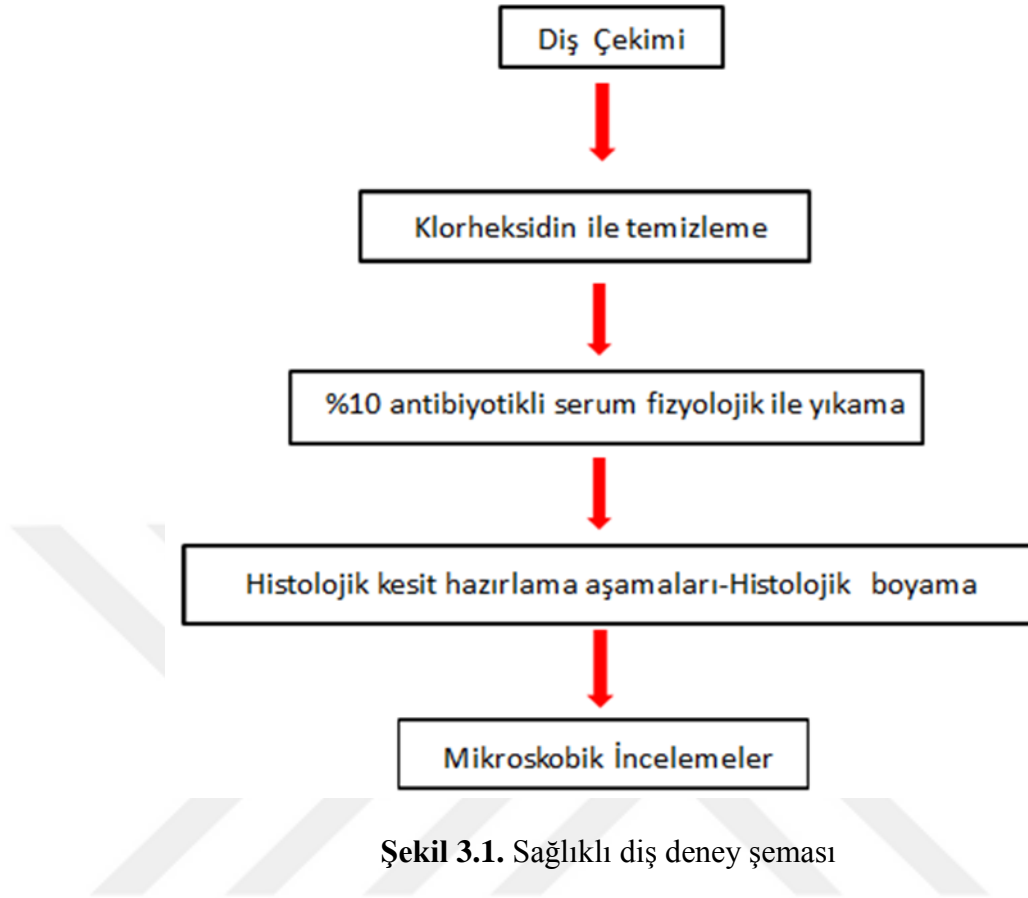
Bu tez çalışmasında, ortodontik amaçla çekilmiş açık apeksli üçüncü molar dişlerde, çalışma grubu olarak antimikrobiyal polipeptitlerden nisin ve natamisin, kontrol grubu olarak CaOH ve negatif kontrol grubu olarak teflon bant ile yapılan direkt pulpa kaplaması yapılmıştır. Daha sonra in situ şartlarda 1, 2, 4. haftalık takip sonrasında oluşan RD ve pulpanın durumu histolojik kesitlerde değerlendirilmiştir. Çalışma öncesi yapılan güç analizi (G*Power Ver 3.1.9.2 Franz Faul, Universitat Kiel, Almanya) sonucunda, etki boyutu $d=0,83$ iken %90 güçte ve $\alpha=0,05$ için $n:4$ olmak üzere toplam örneklem sayısının her bir grupta (3 periyotta)12 diş, 4 grup için toplam ($12 \times 4=48$) 48 diş olması gerektiği belirlenmiştir (Tızıafa ve ark., 2014) (Şekil 3.3).

3.1.Yöntem

Araştırmada, Erciyes Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Etik Kurulu'ndan 13.11.2019 tarihinde yapılan toplantıda alınan 2019/761 sayılı izin doğrultusunda ebeveynin bilgilendirilmesi ve izninin ardından rutin cerrahi prosedür ile ortodontik amaçla çekilen açık apeksli dişler kullanıldı.

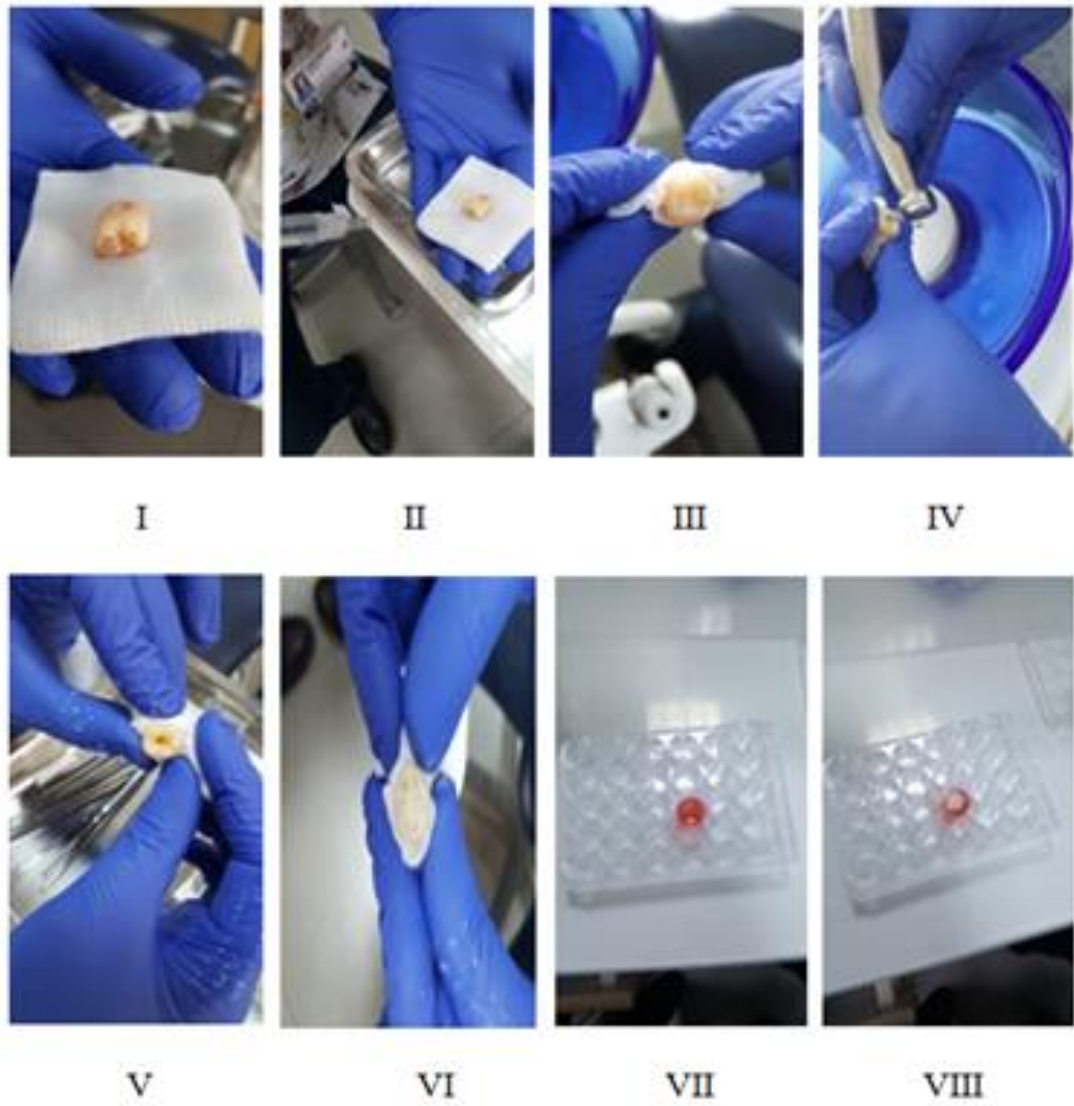
Çalışmamızda kullanılan deney aşamaları Şekil 3.1 ve 3.2 olarak gösterilmiştir.

Çalışmada kullanılan metodun gerçekten dişlerin vitalitesini ve fizyolojisini idame ettirip ettirmediği konusunun netleştirilmesi amacıyla, pilot çalışma şeklinde, yeni çekilmiş apeksi açık çürüksüz bir 20 yaş dişinin söz konusu organ kültürü içerisinde 37 C de etüv ortamında 1 ay boyunca 72 saatte bir solüsyon değiştirilmek suretiyle takibi yapıldı. Daha sonra rutin doku takip işlemleri sonrası histolojik incelemede dişin vitalitesinin devam ettiğini düşündürecek şekilde pulpa bütünlüğünün korunduğu gözlemlendi. Daha sonra çalışma ve kontrol gruplarının değerlendirildiği deney aşamalarına geçildi (Şekil 3.1).



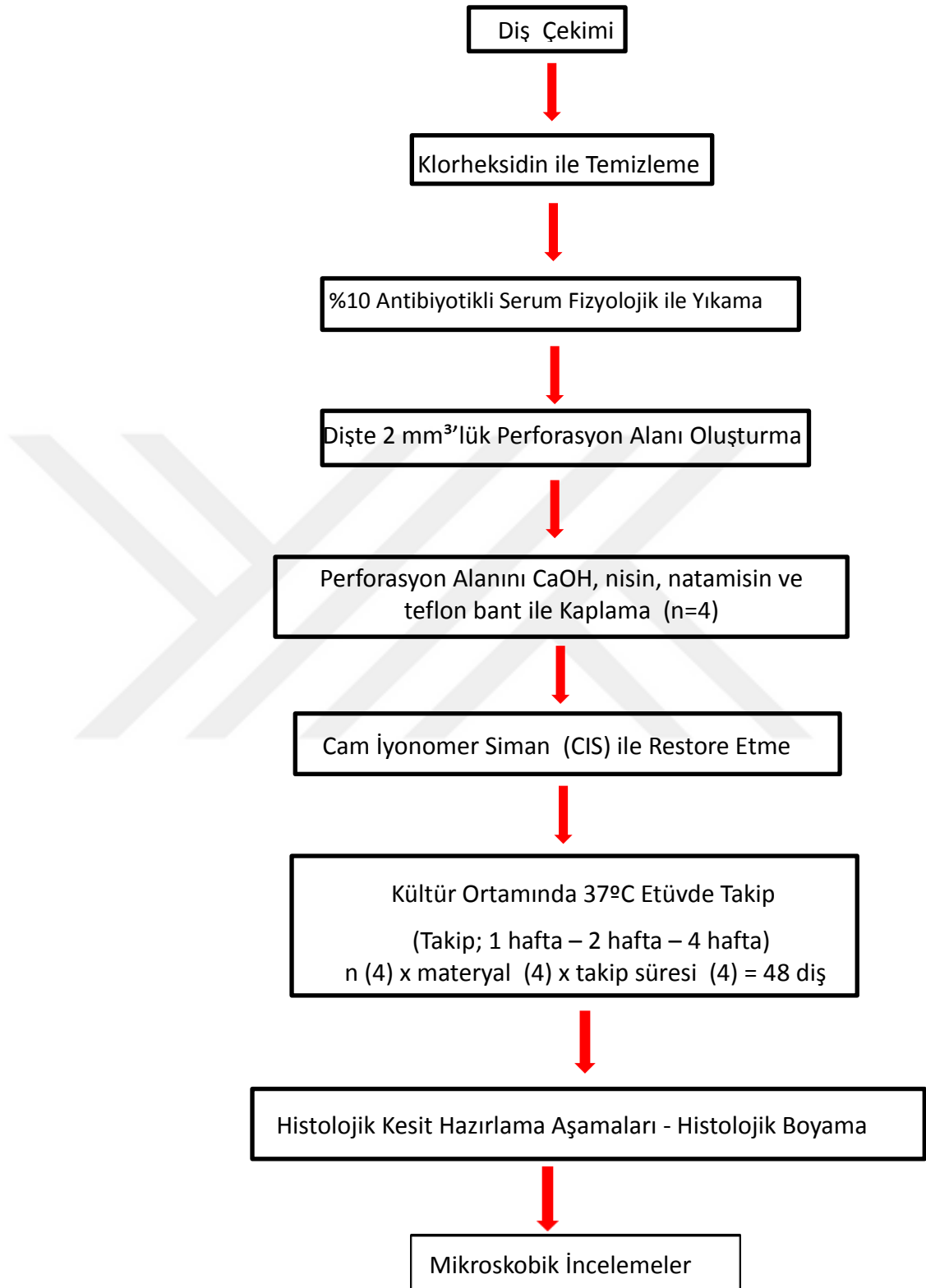
Dişler çekilmeden önce hastalara klorheksidin glukonat içerikli gargara ile çalkalama yaptırıldı. Diş çekimlerini takiben klorheksidinli gazlı bez ile kök yüzeyindeki periodontal ligament ve doku artıkları hızla temizlendi ve diş %10'luk antibiyotik içeren serum fizyolojik ile yıkama işlemine alındı. Çekilmiş dişler %10 antibiyotik (Pen-Strep. Ampho Solusyon (100 ml) (Penicillin:10.000 units/ml- Streptomycin: 10mg/ml- Amphotericin B: 0.025 mg/ml) BI (Biological Industries) ve %10 fötal sığır serumu (FBS, Biowest, Güney Amerika) içeren Dulbeco's Modified Eagle's Medium-Ham's (DMEM F-12, LONZA, Verviers, Belçika) içine yerleştirildi ve derhal aynı binada bulunan araştırmanın yapılacağı Erciyes Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Merkezi Araştırma Laboratuvarına taşındı. Laboratuvar ortamına taşınan dişler, köklerinden steril antibiyotikli spanç ile tutularak, okluzal kaviterler açıldı ve pulpada 2 mm çapındaki steril rond elmas frezin pulpaya tam olarak gömülmesiyle 2mm³'lük perforasyon alanları oluşturuldu. Perfore pulpa steril serum fizyolojik ile yıkandı ve kanama kontrolü sağlandıktan sonra CaOH, nisin, natamisin veya teflon membranla kaplandı.

Her bir grupta dört adet diş bulunmaktaydı. Ardından kaviteler cam iyonomer siman (CIS) ile restore edildi (Şekil 3.2 ve Şekil 3.3).



Şekil 3.2. Klinik uygulama aşamalarının gösterimi

Dişler derhal %10 antibiyotik ve %10 FBS içeren DMEM F-12 bulunan kültür ortamına alındı. Dişler %5 CO₂ etüvde (Şekil 3.4) 37 °C'de 1, 2 ve 4 haftalık periyotlar boyunca takip edildi. Dişlerin içerisinde bulunduğu kültür ortamı 72 saatte bir düzenli olarak değiştirildi.



Şekil 3.3. Nisin, natamisin, CaOH ve teflon bant ile yapılan direk pulpa kaplamasının deney şeması



Şekil 3.4. Etüv Cihazı

3.2.Histolojik Takip Aşamaları

Histopatolojik inceleme için dokular %10'luk formaldehit solüsyonunda tespit edildi (48 saat). Tespit işlemini takiben %10 formaldehit, +%80 distile su ve %10 Nitrik asit ile dekalsifikasyon işlemine tabi tutuldu. Yumuşadığı düşünülen dokular musluk suyunda yıkandıktan sonra rutin histolojik prosedürler gereği dereceli alkol serilerinden geçirildi. Daha sonra ksilol ile şeffaflaştırılarak parafine gömüldü ve bloklama yapıldı (Tablo 3.1).

Tablo 3.1. Işık mikroskobu doku hazırlama tekniği

Sıra	Yapılan işlem	Süre	Sıra	Yapılan işlem	Süre
1	Musluk suyu	1 saat	7	Absolü Alkol	1 saat
2	%50 Alkol	1 saat	8	Absolü Alkol	1 saat
3	%70 Alkol	1 saat	9	Ksilen	20 dakika
4	%80 Alkol	1 saat	10	Ksilen	20 dakika
5	%96 Alkol	1 saat	11	Ksilen	20 dakika
6	Absolü Alkol	1 saat	12	Eriyik parafin (60 °C)	1 gece

Parafin bloklardan mikrotom ile 5 µm kalınlığında kesitler alındı. Hazırlanan lamlar standart histolojik yöntemler kullanılarak ksilen ile parafini uzaklaştırıldı ve dereceli alkol serilerinden geçirilip dehidrate edildi. Genel histolojik yapıyı görmek amacıyla

kesitler Hematoksilen&Eosin (H&E) (Tablo 3.2) ve Masson's trikrom (MT) (Tablo 3.3) ile boyanarak Olympus BX51 mikroskobunda incelendi. Genel değerlendirme ve ölçümler için farklı büyüklükte (X10,20,40) fotoğraflar alındı. Image J programı kullanılarak belirlenen kriterler doğrultusunda uygun alanlardan perforasyon alan ölçümleri yapıldı (Şekil 3.3). Elde edilen ölçüm sonuçları istatistiksel olarak değerlendirilerek gruplar arasında standart perforasyonlar oluşturulup oluşturulmadığı belirlendi.

Tablo 3.2. Hematoksilen-Eozin Boyama Tekniği

Sıra	Yapılan İşlem	Süre	Sıra	Yapılan İşlem	Süre
1	Etüv (60 °C)	2 saat	14	Eozin	3-5 dk
2	Ksilen I	10 dk	15	Akarsu	1 dk
3	Ksilen II	10 dk	16	%50 Alkol	5 dk
4	Ksilen III	10 dk	17	%70 Alkol	5 dk
5	Absolu Alkol I	5 dk	18	%80 Alkol	5 dk
6	Absolu Alkol II	5 dk	19	%96 Alkol	5 dk
7	%96 Alkol	5 dk	20	Absolu Alkol I	5 dk
8	%80 Alkol	5 dk	21	Absolu Alkol II	5 dk
9	%70 Alkol	5 dk	22	Absolu Alkol III	5 dk
10	%50 Alkol	5 dk	23	Ksilen I	20 dk
11	Akarsu	2 dk	24	Ksilen II	20 dk
12	Hematoksilen	5-8 dk	25	Ksilen III	20 dk
13	Akarsu	5 dk	26	Kapatma (Canada Balsam)	

Tablo 3.3. Masson's trikrom Boyama Tekniği

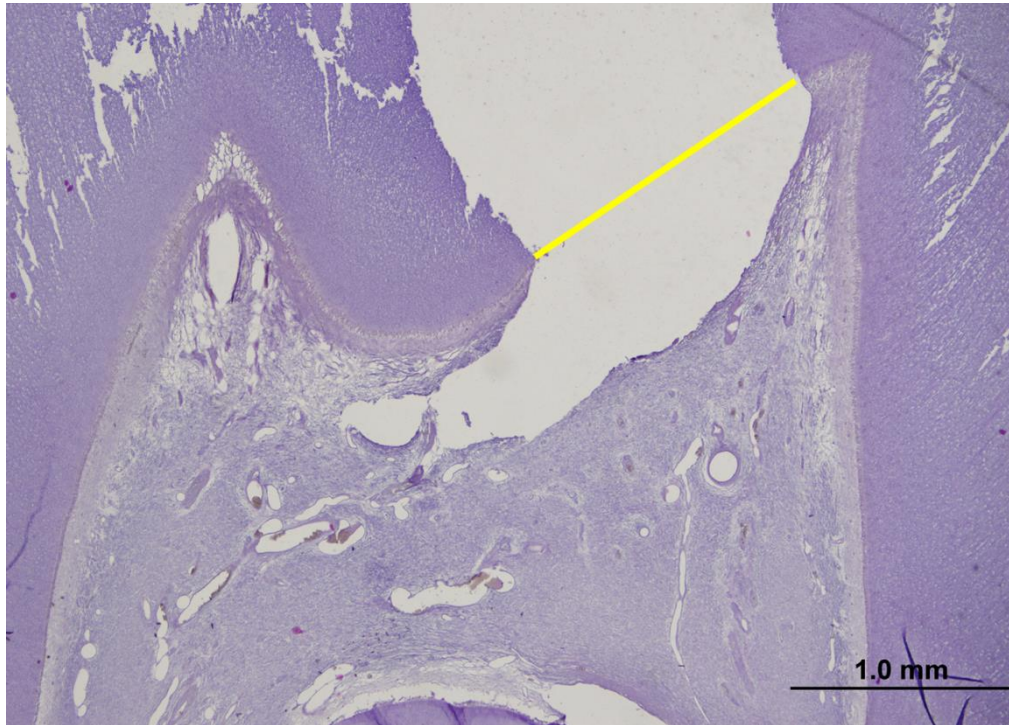
Sıra	Yapılan İşlem	Süre	Sıra	Yapılan İşlem	Süre
1	Etüv (60 °C)	2 saat	18	Fosfomolibdik asit	5 dk
2	Ksilen I	10 dk	19	Kurutma	
3	Ksilen II	10 dk	20	Anilin blue	2-5 dk
4	Ksilen III	10 dk	21	Distile su	2-3 dk
5	Absolu Alkol I	5 dk	22	%1'likasetik asit	2 dk
6	Absolu Alkol II	5 dk	23	%50 Alkol	5 dk
7	%96 Alkol	5 dk	24	%70 Alkol	5 dk
8	%80 Alkol	5 dk	25	%80 Alkol	5 dk
9	%70 Alkol	5 dk	26	%96 Alkol	5 dk
10	%50 Alkol	5 dk	27	Absolu Alkol I	1 dk

11	Akarsu	2 dk	28	Absolu Alkol II	2 dk
12	Hematoksilen	5-8 dk	29	Absolu Alkol III	2 dk
13	Akarsu	5 dk	30	Ksilen I	20 dk
14	%1'lik asit alkol	1-2 sn	31	Ksilen II	20 dk
15	Akarsu	1 dk	32	Ksilen III	20 dk
16	Asit fuksin	5 dk	33	Kapatma (Canada Balsam)	
17	Distile su	2-3 dk			

Tüm gruplara ait değerlendirmeler Tablo 3.4. ' de belirtildiği şekilde yapıldı.

Tablo 3.4. Histopatolojik değerlendirme kriterleri (Faraco Junior, 2004)

Değerlendirme kriterleri	0	1	2	3
İnflamatuar Reaksiyon Şiddeti	İnflamatuar hücre yok	Hafif seviyede İnflamatuar hücre	Orta seviyede İnflamatuar hücre	Şiddetli seviyede İnflamatuar hücre
Reperatif Dentin Devamlılığı	Yok	Az	Orta	Şiddetli



Şekil 3.5. Perforasyon boyutlarının belirlenmesinde pulpaya en yakın bölgeden yapılan ölçümler değerlendirmeye alındı (sarı çizgi).

3.3.İstatistiksel Analiz

Tüm istatistiksel analizler IBM SPSS Statistics (Ver 24.0) programında yapıldı. Araştırma verilerinin normallik (Kolmogorov-Smirnov ve Shapiro-Wilk) testleri yapıldıktan sonra, gruplar arası karşılaştırmalar normal dağılım gösteren değişkenlerde Tek Yönlü Varyans Analizi (ANOVA), fark bulunması durumunda çoklu karşılaştırmaları ise Tukey testi ile yapıldı. $p < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Güç analizi, etki boyutu $d=0,83$ iken %90 güçte ve $\alpha=0,05$ kriterlerinde gerçekleştirildi (G*Power Ver 3.1.9.2 Franz Faul, Universitat Kiel, Almanya). Veriler ortalama \pm SS olarak ifade edildi.



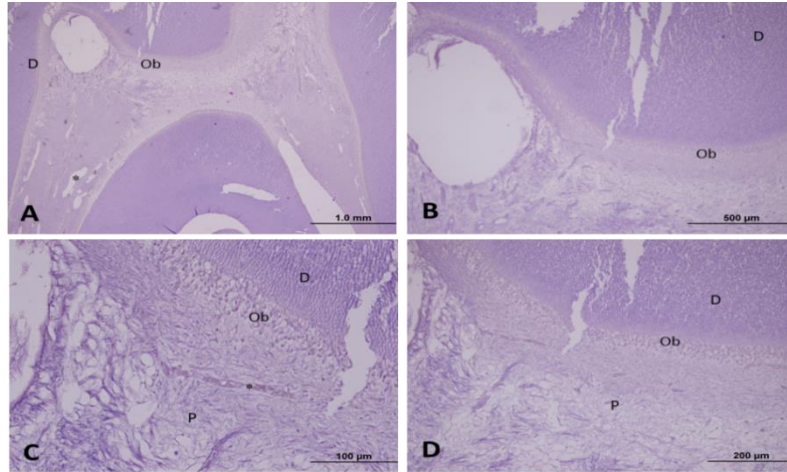
4.BULGULAR

4.1.Histolojik Bulgular

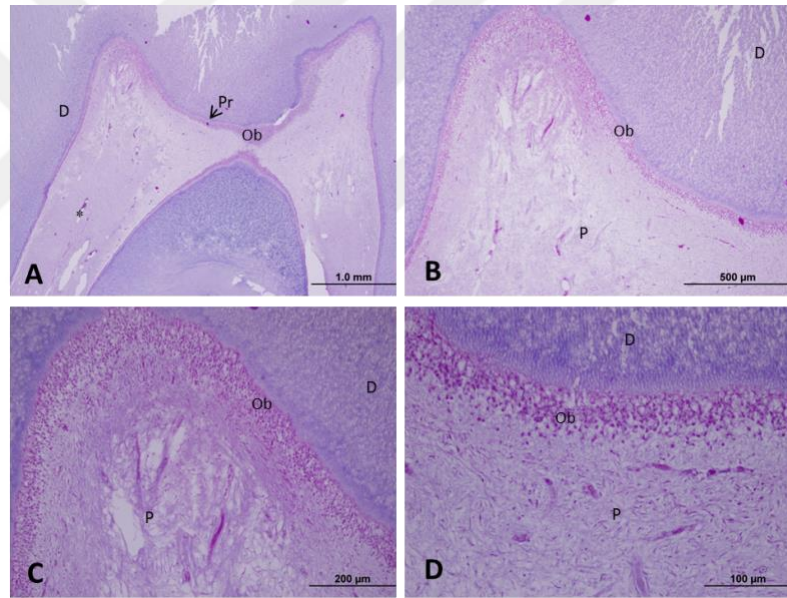
Bu tez çalışması kapsamında kullanılan dişlerden kesitler Hematoksilen & Eozin ve Masson trikrom ile boyandı ve 4, 10, 20 ve 40'lık büyütmede fotomikrografları çekildi. Belirlenen kriterler doğrultusunda (RD devamlılığı, inflamatuvar reaksiyon şiddeti ve perforasyon boyutu) Image J programı ile histolojik analizler yapıldı. Tüm gruplarda perforasyon alanları ve bu alanlara yerleştirilmiş olan restoratif materyal artıkları belirgindi.

4.2. Organ Kültüründe Takip Edilen Direkt Pulpa Kaplaması Yapılmayan Sağlıklı Pulpaya Ait Histolojik Bulgular

Sağlıklı diş pulpa örneğinde, pulpa ve dentin değerlendirmeye uygun şekilde gözlendi. Dentin tübülleri düzenli yapısıyla kolaylıkla ayırt edilmekteydi. Dentinin merkezinde gevşek bağ dokusu özelliğindeki kollajen liflerden meydana gelen pulpa dokusu düzenli yapısını korumaktaydı. Pulpa içerisinde bağ dokusu elemanları ve kan damarları belirgin olarak seçilmekteydi. Dentinin organik elemanlarını sentezleyip salgılayan, aktif salgı hücreleri olan ameloblastların farklılaşmasıyla meydana gelen odontoblastlar pulpanın periferine yerleşmişti ve yassılaştırmış çekirdekleri ile kolaylıkla ayırt edilen prizmatik hücreler olarak gözlendi. Işık mikroskopunda, kalsifiye olmuş dentin ile odontoblast hücreleri arasında ince bir bant şeklinde görülen predentin tabakasında belirgindi (Şekil 4.1 ve Şekil 4.2).



Şekil 4.1. Normal diş kesitlerinin ışık mikroskopik görüntüsü (H&E, **D**: Dentin tübülleri, **Ob**: Odontoblast, **P**: Pulpasında, *: kan damarları)

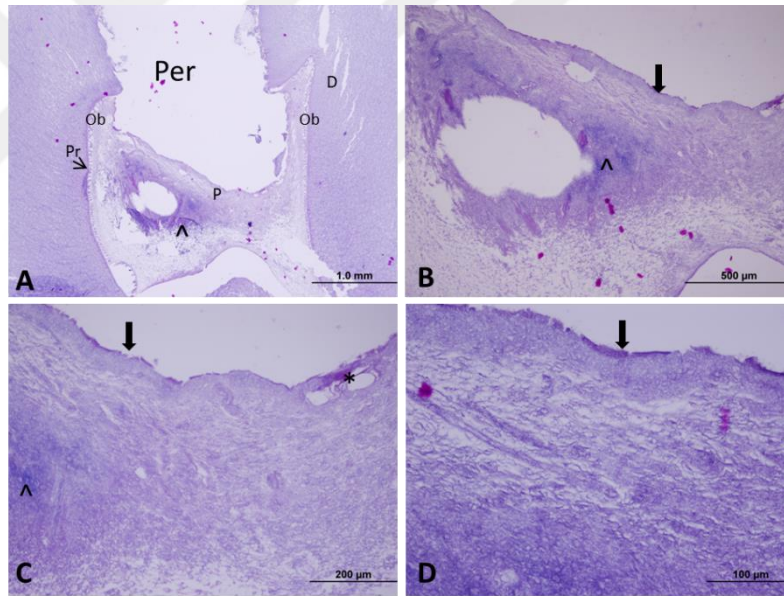


Şekil 4.2. Normal diş kesitlerinin ışık mikroskopik görüntüsü (MT, **D**: Dentin tübülleri, **Ob**: Odontoblast, **Pr**: Predentin, **P**: Pulpasında, *: kan damarları)

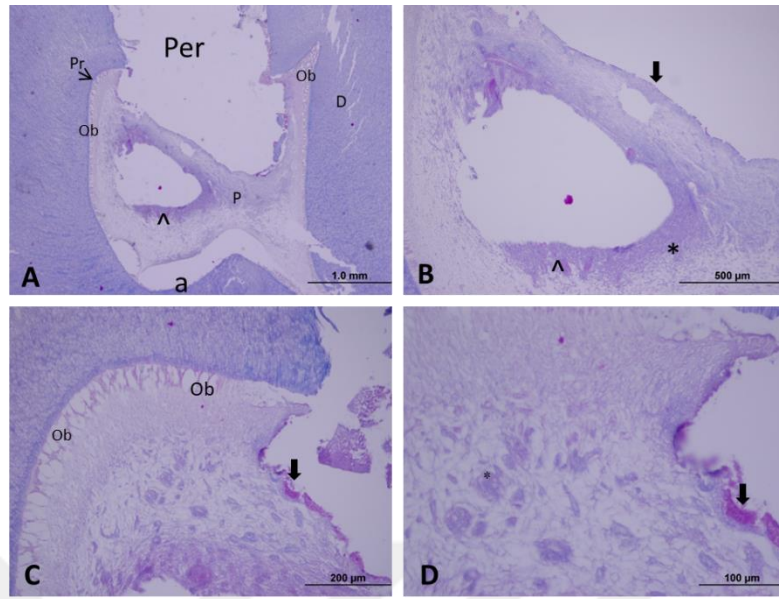
4.2.1. Nisin ile Direkt Pulpa Kaplaması Yapılan Gruba Ait Histolojik Bulgular

Kontrol grubunda olduğu gibi H&E ve MT ile boyanan örneklerin tamamında, pulpa ve dentin değerlendirmeye uygun şekildeydi. Tüm gruplarda pulpanın canlılığını koruduğu gözlemlendi. Kan damarları, kollajen lifler ve fibroblastları içeren pulpa içerisinde fibroblast çekirdekleri 1, 2 ve 4 haftalık takip gruplarının üçünde de belirgindi. Birinci haftaya kıyasla iki ve dört haftalık gruplarda RD devamlılığı belirgin olarak izlendi. Buna ek olarak perforasyon bölgesinin altında kalan pulpa alanlarında damar sayısında

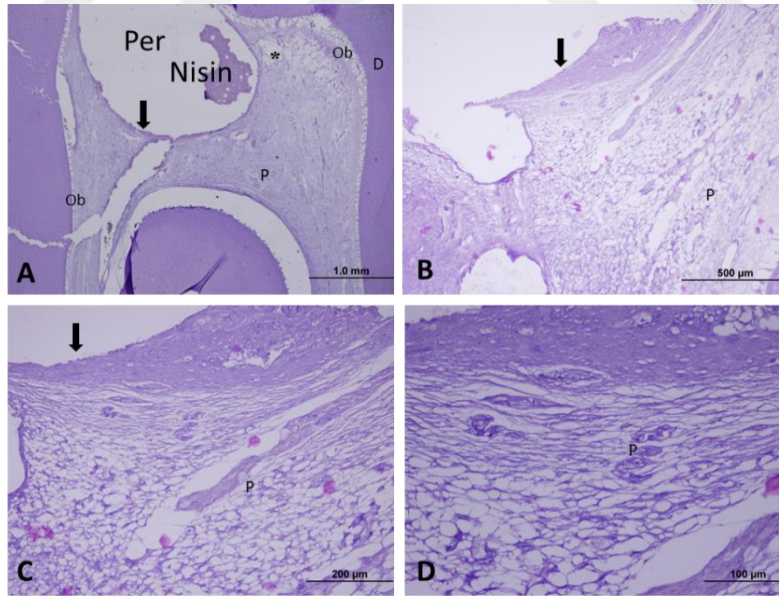
artış mevcuttu. Aynı zamanda pulpa içerisinde yer yer nisin artıklarına da rastlandı. Pulpa içerisinde 4 haftalıkta daha az olmak üzere hafiften orta şiddetliye doğru devam eden inflamatuvar hücre infiltrasyonu mevcuttu. Odontoblastların bir ve iki haftalık gruplarda düzensiz yerleşim gösterdiği ancak dördüncü haftada dentin boyunca çok sıralı düzenli yapıda olduğu tespit edildi. Birinci haftaya ait preparatlar incelendiğinde bazı örneklerde kan damarlarında vazodilatasyon, yer yer hemoroji bölgeleri de gözlemlendi. İki ve dördüncü haftalara ait preparatlarda bu bulguya daha nadir rastlandı. Perforasyon bölgesinden uzakta yer alan pulpa alanlarında ise sağlıklı dokunun korunduğu gözlemlendi. Preparatlar incelendiğinde dentin ve pulpa yapısında yer yer suni kopma alanları da mevcuttu. Birinci haftadan dördüncü haftaya doğru inflamatuvar reaksiyon şiddetinde azalma, RD devamlılığında artış gözlemlendi (Şekil 4.3, Şekil 4.4, Şekil 4.5, Şekil 4.6, Şekil 4.7, Şekil 4.8).



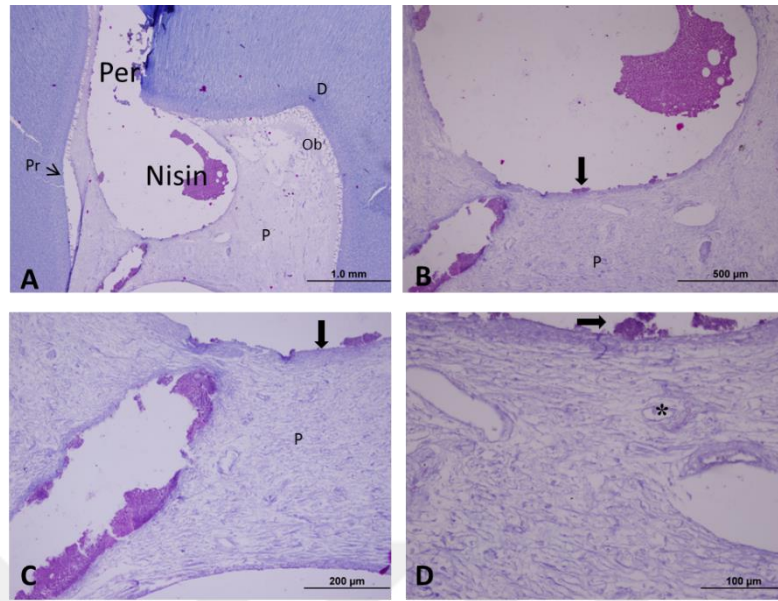
Şekil 4.3. Birinci hafta nisin grubuna ait kesitlerin ışık mikroskopik görüntüsü (H&E, **D:** Dentin tübülleri, **Ob:** Odontoblast, **Pr:** Predentin, **P:** Pulpa, *****: kan damarları, **^:** İnflamatuvar Reaksiyon, **Kalın ok:** Reperatif Dentin Oluşumu, **Per:** Perforasyon bölgesi)



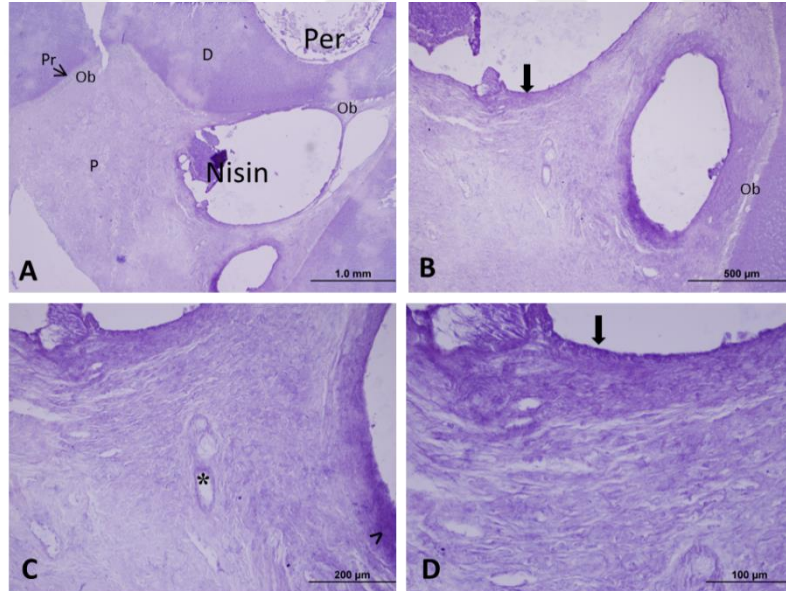
Şekil 4.4. Birinci hafta nisin grubuna ait kesitlerin ışık mikroskopik görüntüsü (MT, **D:** Dentin tübülleri, **Ob:** Odontoblast, **Pr:** Predentin, **P:** Pulpa, *****: kan damarları, **^:** İnflamatuvar Reaksiyon, **Kalın ok:** Reperatif Dentin Oluşumu, **Per:** Perforasyon bölgesi)



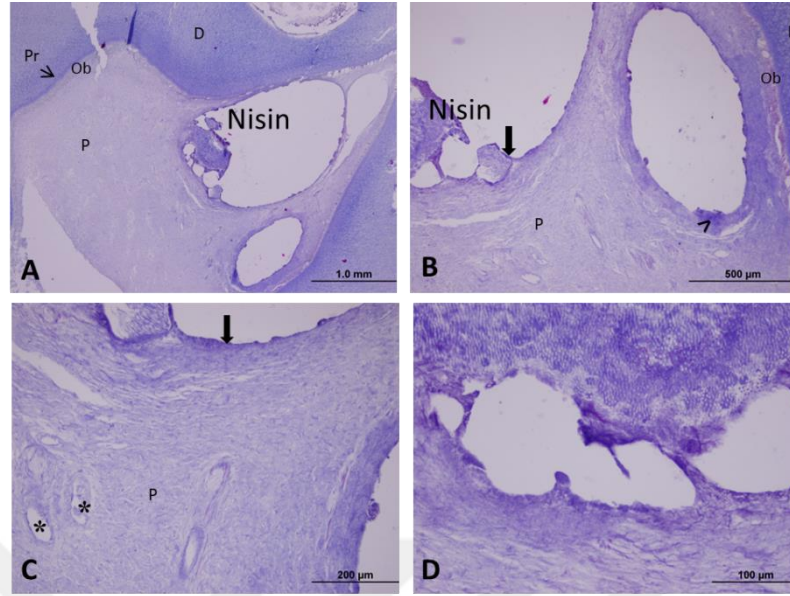
Şekil 4.5. İkinci hafta nisin grubuna ait kesitlerin ışık mikroskopik görüntüsü (H&E, **D:** Dentin tübülleri, **Ob:** Odontoblast, **P:** Pulpa, *****: kan damarları, **Kalın ok:** Reperatif Dentin, **Per:** Perforasyon bölgesi)



Şekil 4.6. İkinci hafta nisin grubuna ait kesitlerin ışık mikroskopik görüntüsü (MT, **D:** Dentin tübülleri, **Ob:** Odontoblast, **Pr:** Predentin, **P:** Pulpa, *****: kan damarları, **Kalın ok:** Reperatif Dentin, **Per:** Perforasyon bölgesi)



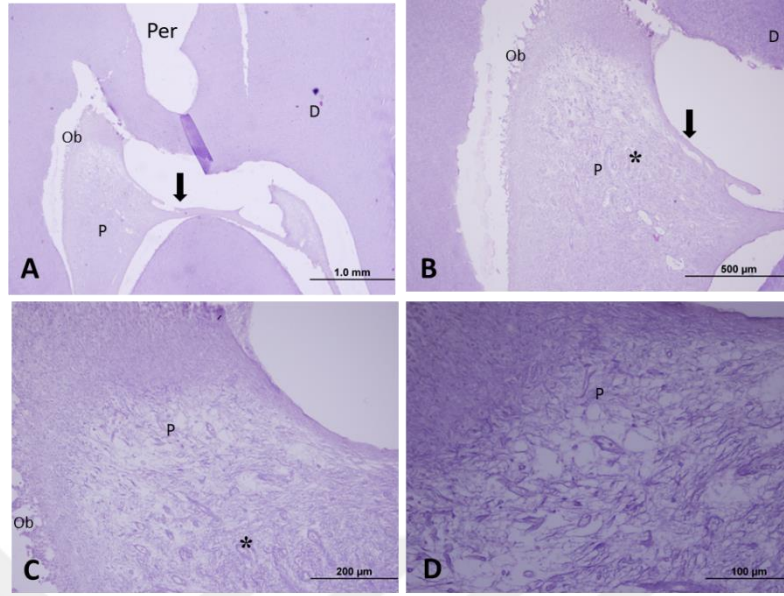
Şekil 4.7. Dördüncü hafta nisin grubuna ait kesitlerin ışık mikroskopik görüntüsü (H&E, **D:** Dentin tübülleri, **Ob:** Odontoblast, **Pr:** Predentin, **P:** Pulpa, *****: kan damarları, **^;** İnflamatuar Reaksiyon, **Kalın ok:** Reperatif Dentin, **Per:** Perforasyon bölgesi)



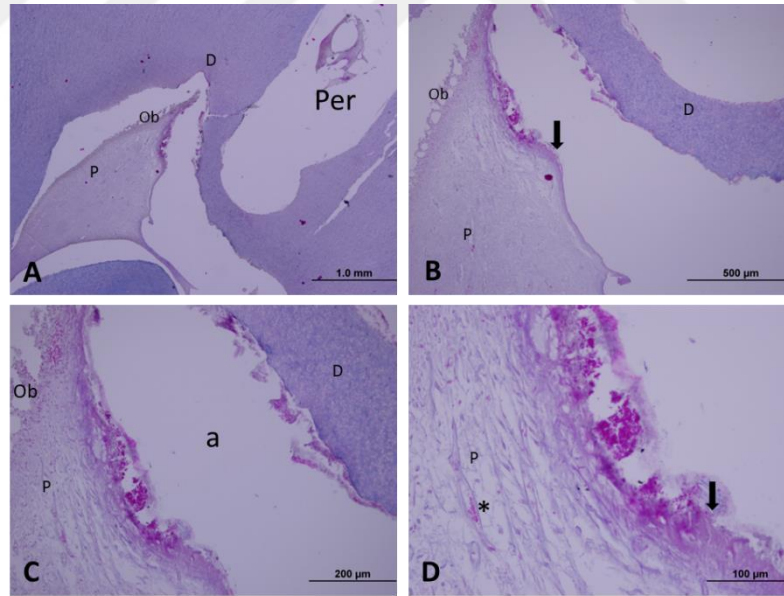
Şekil 4.8. Dördüncü hafta nisin grubuna ait kesitlerin ışık mikroskopik görüntüsü (MT, **D:** Dentin tübülleri, **Ob:** Odontoblast, **Pr:** Predentin, **P:** Pulpa, *****: kan damarları, **^:** İnflamatuvar Reaksiyon, **Kalın ok;** Reperatif Dentin)

4.1.1. Natamisin ile Direkt Pulpa Kaplaması Yapılan Gruba Ait Histolojik Bulgular

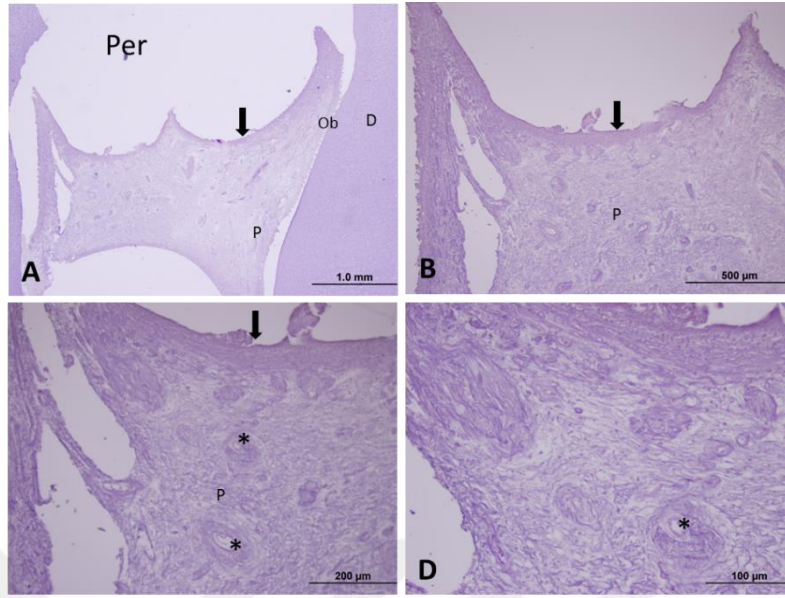
Natamisin grubuna ait H&E ve MT ile boyanmış preparatların tamamında, pulpa ve dentin değerlendirmeye uygun şekilde gözlemlendi. Perforasyon alanları ve natamisin materyali preparatlarda belirgindi. Özellikle perforasyon alanından uzak bölgelerde pulpanın daha düzenli yapıda olduğu tespit edildi. Dentinin merkezinde gevşek bağ dokusu özelliğinde, kan damarları, kollajen lifler ve fibroblastları içeren pulpa yapısının kontrol ve nisin grubunda ki kadar düzenli yapı sergilemediği 1, 2 ve 4 haftalık takip gruplarında gözlemlendi. Birinci haftadan dördüncü haftaya doğru inflamatuvar reaksiyon şiddetinde azalma, reaktif dentin devamlılığında artış gözlemlendi. İlaveten pulpa ve dentin arasına yerleşim gösteren odontoblastlar 1, 2. ve 4. haftalara ait preparatlarda düzensiz yerleşim gösterdi. Birinci haftaya ait preparatlar incelendiğinde bazı örneklerde kan damarlarında vazodilatasyon, yer yer hemoroji bölgeleri gözlemlendi. İki ve dördüncü haftalara ait preparatlarda bu bulgulara nadir rastlandı. Natamisin grubunda da tüm gruplarda olduğu gibi düzensiz suni kopma alanları meydana geldiği gözlemlendi (Şekil 4.9, Şekil 4.10, Şekil 4.11, Şekil 4.12, Şekil 4.13, Şekil 4.14).



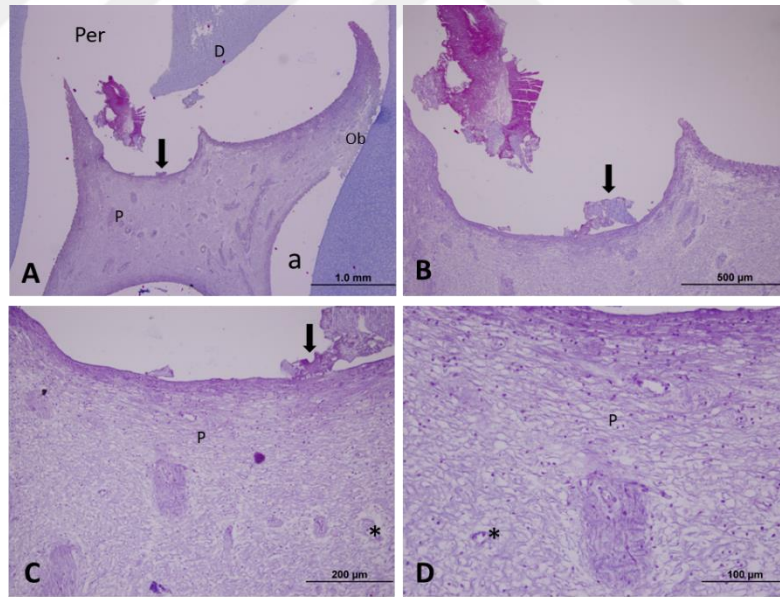
Şekil 4.9. Birinci hafta natamisin grubuna ait kesitlerin ışık mikroskopik görüntüsü (H&E, **D:** Dentin tübülleri, **Ob:** Odontoblast, **P:** Pulpa, *****: kan damarları, **Kalın ok:** Reperatif Dentin, **Per:** Perforasyon bölgesi)



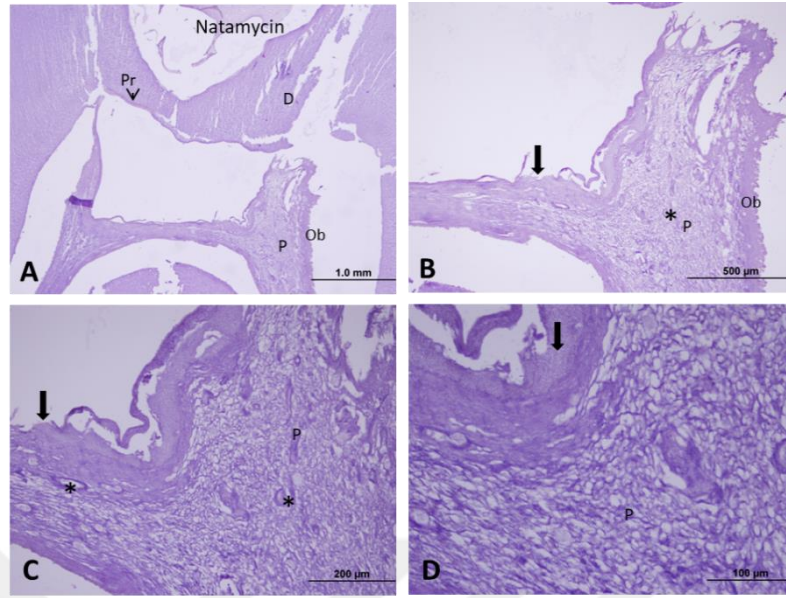
Şekil 4.10. Birinci hafta natamisin grubuna ait kesitlerin ışık mikroskopik görüntüsü (MT, **D:** Dentin tübülleri, **Ob:** Odontoblast, **P:** Pulpa, *****: kan damarları, **Kalın ok:** Reperatif Dentin, **Per:** Perforasyon bölgesi)



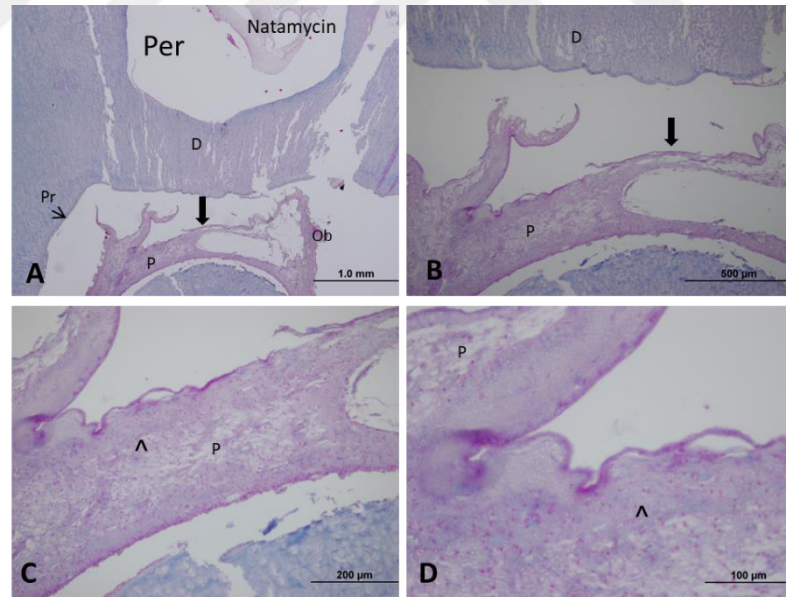
Şekil 4.11. İkinci hafta natamisin grubuna ait kesitlerin ışık mikroskopik görüntüsü (H&E, **D:** Dentin tübülleri, **Ob:** Odontoblast, **P:** Pulpa, *****: kan damarları, **Kalın ok:** Reperatif Dentin, **Per:** Perforasyon bölgesi)



Şekil 4.12. İkinci hafta natamisin grubuna ait kesitlerin ışık mikroskopik görüntüsü (MT, **D:** Dentin tübülleri, **Ob:** Odontoblast, **P:** Pulpa, *****: kan damarları, **Kalın ok:** Reperatif Dentin, **Per:** Perforasyon bölgesi).



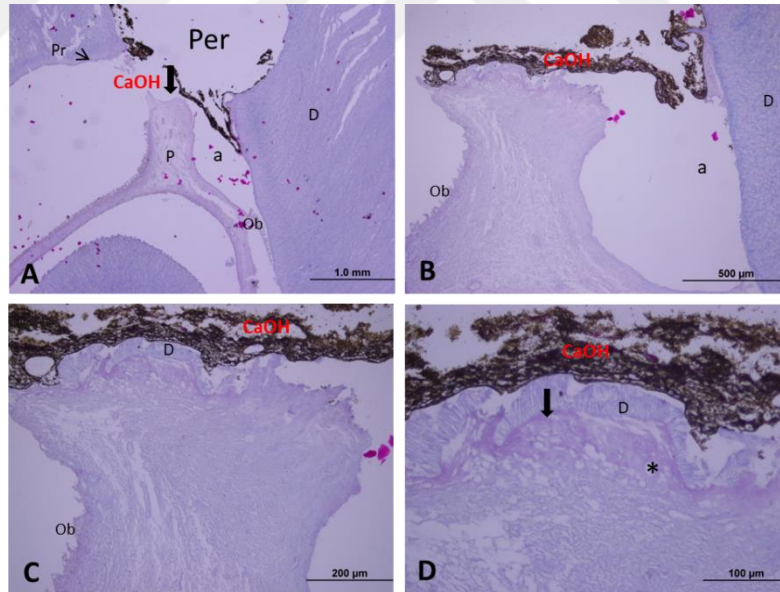
Şekil 4.13. Dördüncü hafta natamisin grubuna ait kesitlerin ışık mikroskopik görüntüsü (H&E, **D**: Dentin tübülleri, **Ob**: Odontoblast, **Pr**: Predentin, **P**: Pulpa, *****: kan damarları, **↓**; İnflamatuar Reaksiyon, **Kalın ok**; Reperatif Dentin)



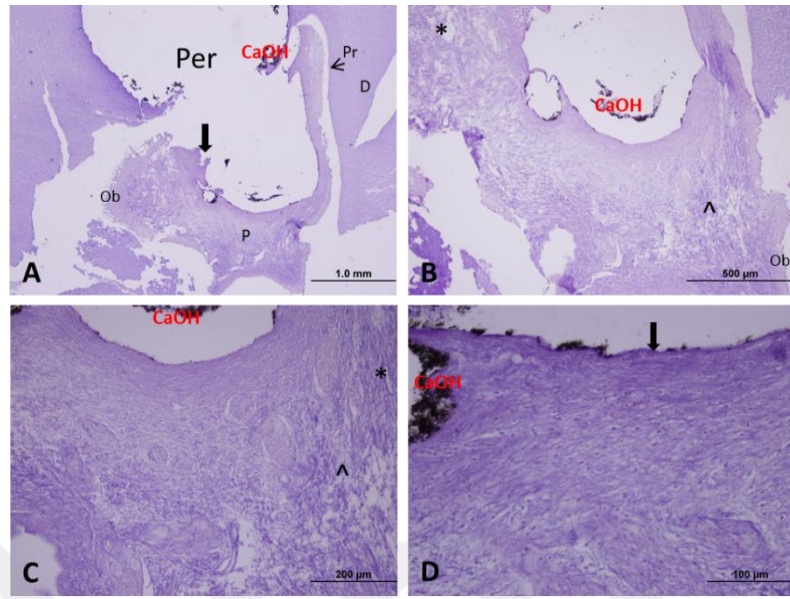
Şekil 4.14. Dördüncü hafta natamisin grubuna ait kesitlerin ışık mikroskopik görüntüsü (MT, **D**: Dentin tübülleri, **Ob**: Odontoblast, **Pr**: Predentin, **P**: Pulpa, **Λ**: İnflamatuar Reaksiyon, **Kalın ok**; Reperatif Dentin, **Per**: Perforasyon bölgesi)

4.1.2. CaOH ile Direkt Pulpa Kaplaması Yapılan Gruba Ait Histolojik Bulgular

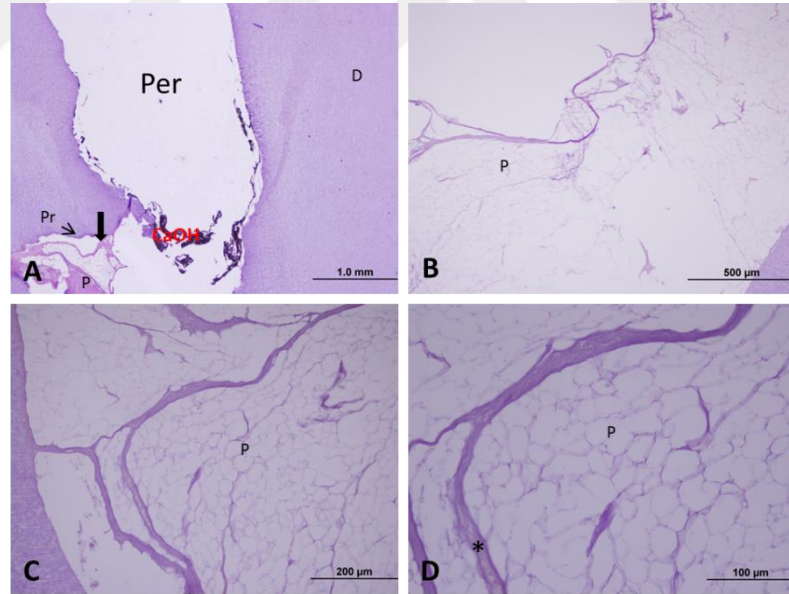
CaOH grubundan elde edilen preparatların tamamında, pulpa ve dentin değerlendirmeye uygun şekilde gözlendi. Perforasyon bölgelerinde ve pulpa içerisinde siyah olarak gözlenen alanların maretyal artıkları olduğu tespit edildi. Bir, iki ve dördüncü haftaya ait preparatlarda pulpanın düzensiz yapı sergilediği ancak canlılığını koruduğu belirlendi. Özellikle pulpanın derin bölgelerinde bile düzensiz yapıda kollojen liflerin varlığı dikkat çekti. İlâveten iki haftalık grupta bağ dokusu elemanları ve kan damarları nadiren gözlendi. Aynı zamanda tüm haftalara ait preparatlarda nisin ve natamisin gruplarındakine göre daha şiddetli şekilde vazodilatasyon ve hemoroji bölgeleri gözlendi. Odontoblastik tabaka 1, 2 ve 4. haftaya ait preparatlarda düzensiz şekildedeydi. Aynı zamanda gevşek bağ dokusu özelliğindeki pulpa yapısında hafif ve orta şiddette inflamatuvar hücre infiltrasyonu diğer gruplara göre daha yoğundu. Perforasyon alanı altında reparatif dentin oluşumu diğer gruplardaki kadar şiddetli gözlenmedi (Şekil 4.15, Şekil 4.16, Şekil 4.17, Şekil 4.18, Şekil 4.19, Şekil 4.20).



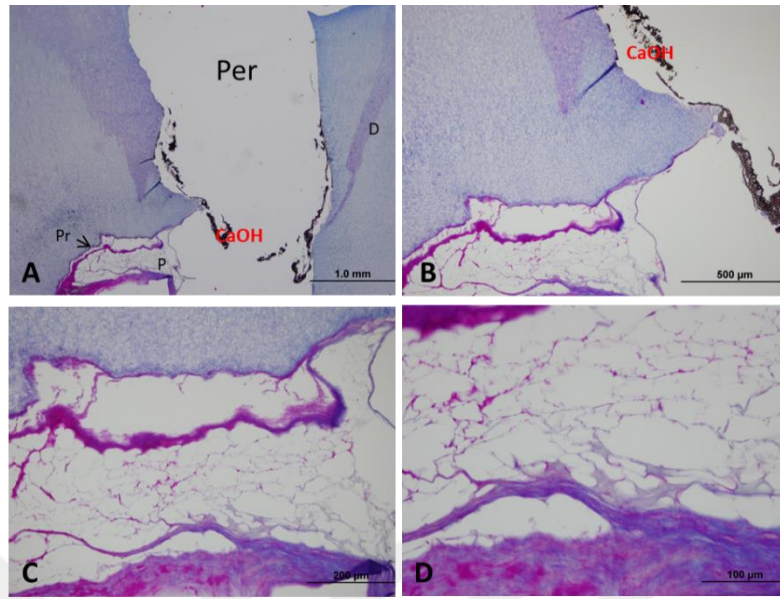
Şekil 4.15. Birinci hafta CaOH grubuna ait kesitlerin ışık mikroskopik görüntüsü (H&E, **D:** Dentin tübülleri, **Ob:** Odontoblast, **Pr:** Predentin, **P:** Pulpa, *****: kan damarları, **Kalın ok:** Reperatif Dentin, **Per;** Perforasyon bölgesi)



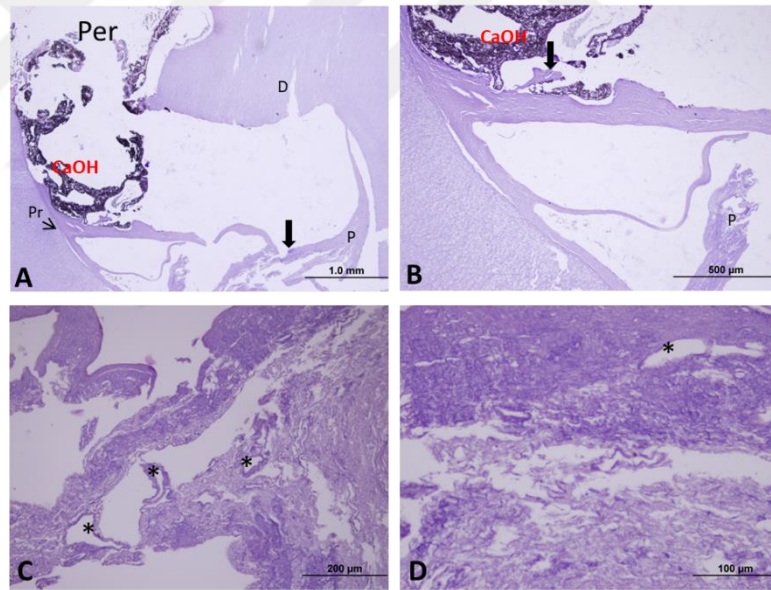
Şekil 4.16. Birinci hafta CaOH grubuna ait kesitlerin ışık mikroskopik görüntüsü (MT, **D:** Dentin tübülleri, **Ob:** Odontoblast, **Pr:** Predentin, **P:** Pulpa, *****: kan damarları, **^:** İnflamatuar Reaksiyon, **Kalın ok;** Reperatif Dentin, **Per:** Perforasyon bölgesi)



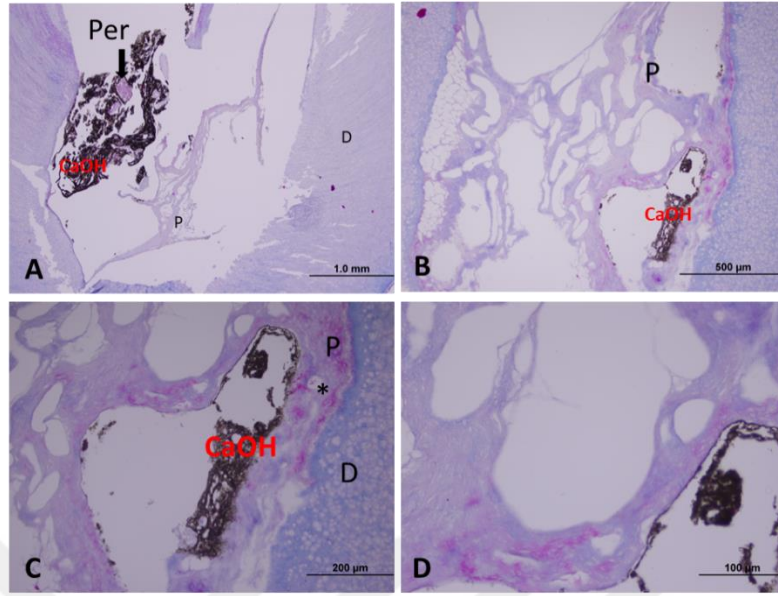
Şekil 4.17. İkinci hafta CaOH grubuna ait kesitlerin ışık mikroskopik görüntüsü (H&E, **D:** Dentin tübülleri, **Pr:** Predentin, **P:** Pulpa, **Kalın ok:** Reperatif Dentin, **Per:** Perforasyon bölgesi).



Şekil 4.18. İkinci hafta CaOH grubuna ait kesitlerin ışık mikroskopik görüntüsü (MT, **D:** Dentin tübülleri, **Pr:** Predentin, **P:** Pulpa, **Per:** Perforasyon bölgesi)



Şekil 4.19. Dördüncü hafta CaOH grubuna ait kesitlerin ışık mikroskopik görüntüsü (H&E, **D:** Dentin tübülleri, **Pr:** Predentin, **P:** Pulpa, *****: kan damarları, **Kalın ok:** Reperatif Dentin, **Per:** Perforasyon bölgesi).



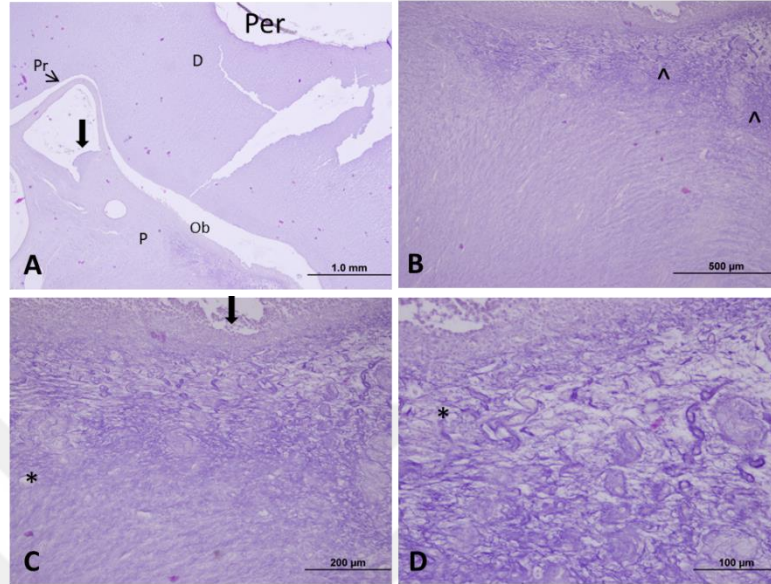
Şekil 4.20. Dördüncü hafta CaOH grubuna ait kesitlerin ışık mikroskopik görüntüsü (H&E, **D**: Dentin tübüleri, **P**: Pulpa, *: kan damarları, **Kalın ok**: Reperatif Dentin, **Per**: Perforasyon bölgesi).

4.1.3. Teflon Bant ile Direkt Pulpa Kaplaması Yapılan Gruba Ait Histolojik Bulgular

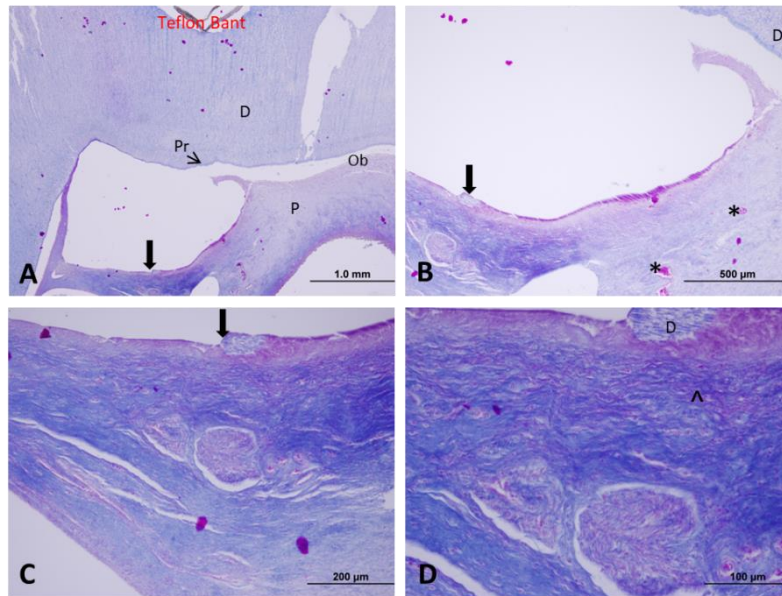
Teflon Bant grubundan elde edilip H&E ve MT ile boyanan preparatlarda, pulpa ve dentin değerlendirmeye uygun şekildeydi. Tüm gruplarda pulpa düzenli yapıda olmasada pulpanın canlılığını koruduğu gözlemlendi. Dentin, düzenli yapıdaki tübüllerin varlığından dolayı diğer deney gruplarında olduğu gibi kolaylıkla seçilebilmekteydi. Perforasyon bölgelerinde ve yer yer pulpa içerisinde maretial artıkları olduğu da gözlemlendi. Bir ve iki haftalık gruplarda dentinin merkezinde gevşek bağ dokusu özelliğinde kan damarları, kollajen lifler ve fibroblastları içeren pulpanın genel histolojik yapısının CaOH grubuna göre daha düzenli olduğu belirlendi. Ancak dört haftalık grupta pulpa yapısı düzensiz histopatolojik yapı sergilemekteydi. Düzensiz, geniş boşluklar ve bu boşluklar etrafında yoğunlaşmış olarak gözlenen kollajen liflerin bulunduğu ışık mikroskopunda belirlendi. Teflon bant grubuna ait preparatlar incelendiğinde vazodilatasyon ve hemorojik bölgelere rastlandı. Odontoblastik tabaka 1, 2 ve 4. haftaya ait preparatlarda CaOH grubunda olduğu kadar şiddetli olmasada düzensiz olarak gözlemlendi.

Aynı zamanda gevşek bağ dokusu özelliğindeki pulpa yapısında hafif ve orta şiddette inflamatuvar hücre infiltrasyonu mevcuttu. Perforasyon alanı altında reparatif dentin

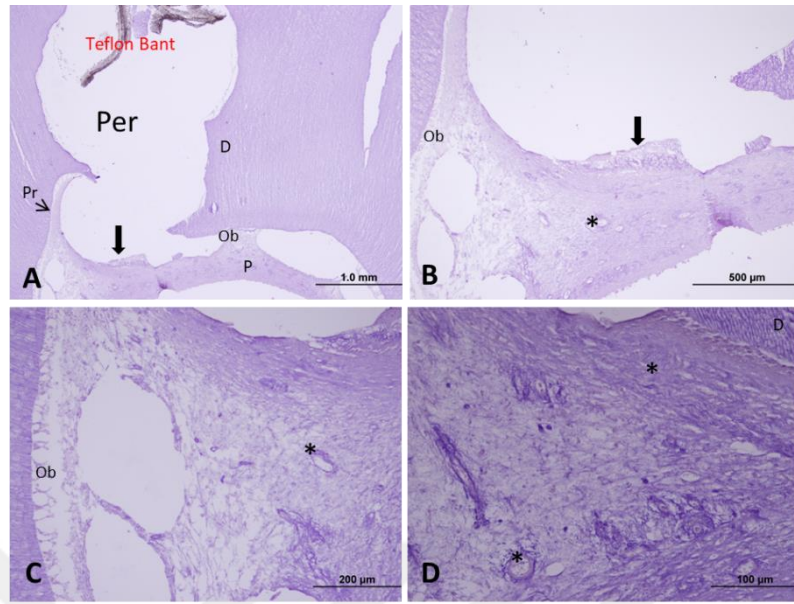
oluşumu nisin ve natamisin gruplarındaki kadar iyi gelişmemiştir (Şekil 4.21, Şekil 4.22, Şekil 4.23, Şekil 4.24, Şekil 4.25, Şekil 4.26).



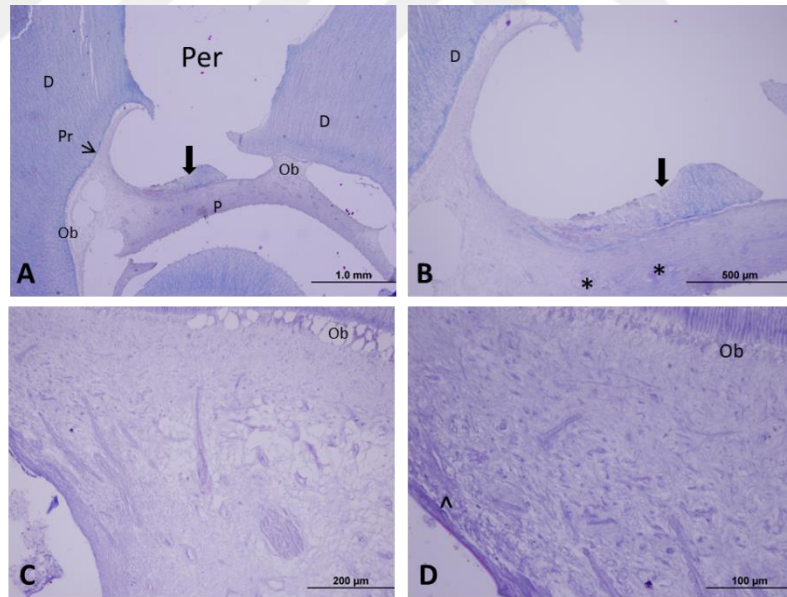
Şekil 4.21. Birinci hafta teflon bant grubuna ait kesitlerin ışık mikroskopik görüntüsü (H&E, **D**: Dentin tübülleri, **Ob**: Odontoblast, **Pr**: Pre-dentin, **P**: Pulpa, *: kan damarları, \wedge : İnflamatuar Reaksiyon, **Kalın ok**: Reperatif Dentin, **Per**: Perforasyon bölgesi).



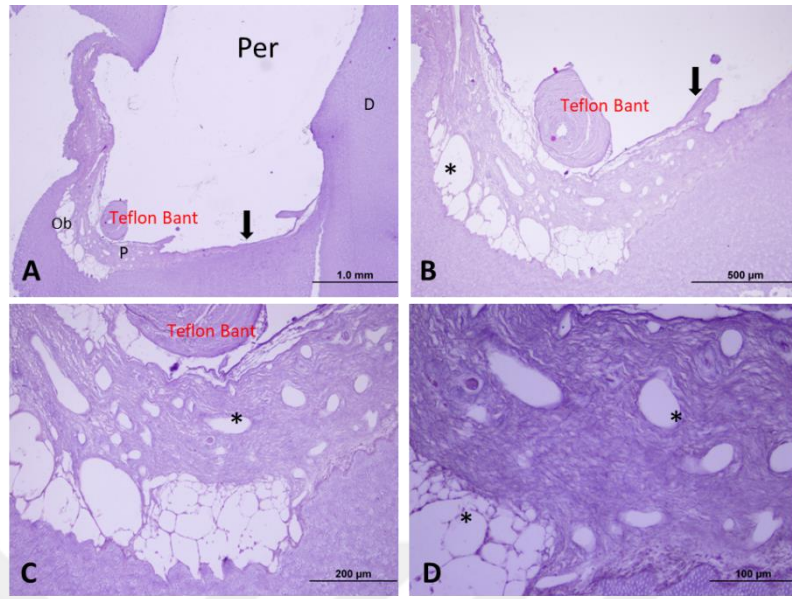
Şekil 4.22. Birinci hafta teflon bant grubuna ait kesitlerin ışık mikroskopik görüntüsü (MT, **D**: Dentin tübülleri, **Ob**: Odontoblast, **Pr**: Pre-dentin, **P**: Pulpa, *: kan damarları, \wedge : İnflamatuar Reaksiyon, **Kalın ok**: Reperatif Dentin).



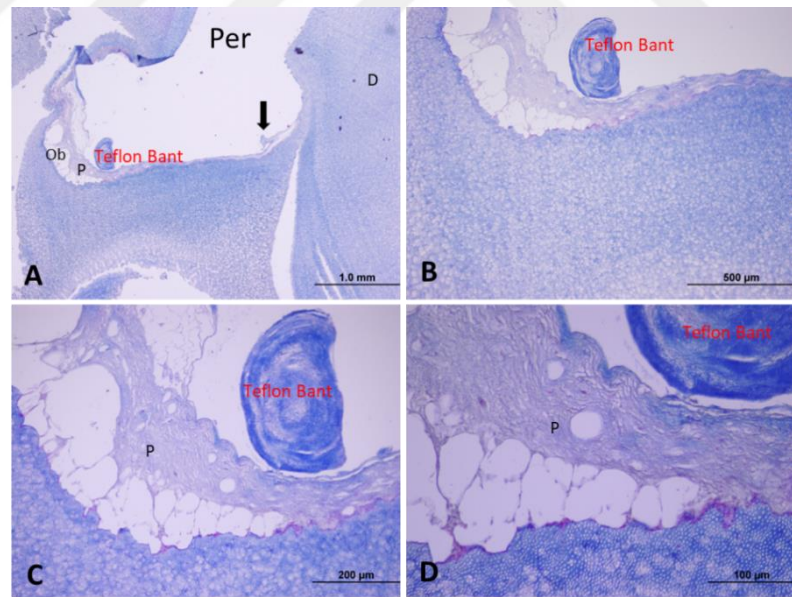
Şekil 4.23. İkinci hafta teflon bant grubuna ait kesitlerin ışık mikroskopik görüntüsü (H&E, **D**: Dentin tübülleri, **Ob**: Odontoblast, **Pr**: Predentin, **P**: Pulpa, *: kan damarları, **Kalın ok**: Reperatif Dentin, **Per**: Perforasyon bölgesi).



Şekil 4.24. İkinci hafta teflon bant grubuna ait kesitlerin ışık mikroskopik görüntüsü (MT, **D**: Dentin tübülleri, **Ob**: Odontoblast, **Pr**: Predentin, **P**: Pulpa, *: kan damarları, ^: İnflamatuar Reaksiyon, **Kalın ok**: Reperatif Dentin, **Per**: Perforasyon bölgesi).



Şekil 4.25. Dördüncü hafta teflon bant grubuna ait kesitlerin ışık mikroskopik görüntüsü (H&E, **D**: Dentin tübülleri, **Ob**: Odontoblast, **P**: Pulpa, *: kan damarları, **Kalın ok**: Reperatif Dentin, **Per**: Perforasyon bölgesi).



Şekil 4.26. Dördüncü hafta teflon bant grubuna ait kesitlerin ışık mikroskopik görüntüsü (MT, **D**: Dentin tübülleri, **Ob**: Odontoblast, **P**: Pulpa, **Kalın ok**: Reperatif Dentin, **Per**: Perforasyon bölgesi).

4.1.4. İstatistiksel Sonuçlar

Tablo 4.1. Image J programı ile elde edilen perforasyon ölçüm sonuçlarına ait istatistik tablosu.

Süre	NİSİN	NATAMİSİN	CaOH	TEFLON BANT	P
	Ort.±S.S.	Ort±SS	Ort±SS	Ort±SS	
1.Hafta	2,04±0,19 ^a	1,94±0,24 ^a	2,09±0,20 ^a	2,08±0,18 ^a	0,152
2.Hafta	2,08±0,33 ^a	2,10±0,29 ^a	2,07±0,31 ^a	2,05±0,21 ^a	0,965
4.hafta	2,07±0,22 ^a	2,02±0,20 ^a	2,09±0,25 ^a	2,06±0,19 ^a	0,847

Aynı satırda yer alan aynı harfler gruplar arası benzerliği, farklı harfler gruplar arası farklılığı ifade etmektedir.

Veriler ortalama±standart sapma olarak verilmiştir.

Perforasyon boyutları incelendiğinde en yüksek değer, 2.10 mm ile 2 haftalık natamisin grubunda, en düşük değer 1.94 mm ile yine natamisin grubunun 1 haftalık örneklerinde olduğu tespit edildi. Bununla birlikte elde edilen veriler değerlendirildiğinde bu ölçümler arasındaki farklılığın istatistiksel olarak anlamlılık seviyesinde olmadığı bulunmuştur.

Tablo 4.2. İnflamatuar reaksiyon şiddeti ve reparatif dentin devamlılığı istatistik tablosu.

1. hafta					
İnceleme Kriteri	Nisin	Natamisin	CaOH	Teflon Bant	p
İRŞ	1,25±0.46 ^{ab}	0,75±0.46 ^a	1.87±0,35 ^b	1.75±0.70 ^b	.001
RDD	1,37±0.51 ^{ab}	2,00±0.53 ^a	1.12±0.64 ^b	1.00±0.75 ^b	.015
2. hafta					
	Nisin	Natamisin	CaOH	Teflon Bant	p
İRŞ	1.00±0.75 ^a	1.00±0.75 ^a	1.87±0.64 ^a	1.62±0.51 ^a	.029
RDD	2.25±0.46 ^a	2.25±0.46 ^a	1.25±0.46 ^b	1.50±0.53 ^b	.001
4. hafta					
	Nisin	Natamisin	CaOH	Teflon Bant	p
İRŞ	1.00±0.75 ^{ab}	0.87±0.70 ^a	1.75±0.46 ^b	1.62±0.51 ^{ab}	.014
RDD	2.25±0.88 ^a	2.12±0.64 ^{ab}	1.25±0.46 ^b	1.50±0.53 ^{ab}	.012

İRŞ; İnflamatuar Reaksiyon Şiddeti, RDD; Reperatif Dentin Devamlılığı

Aynı satırda yer alan aynı harfler gruplar arası benzerliği, farklı harfler gruplar arası farklılığı ifade etmektedir.

Veriler ortalama±standart sapma olarak verilmiştir.

Birinci hafta nisin, natamisin, CaOH ve teflon bant gruplarından elde edilen preparatlar inflamatuvar reaksiyonun şiddetine göre değerlendirildiğinde; nisin ve natamisin grupları arasında istatistiksel olarak fark meydana gelmediği belirlendi. Ancak natamisin grubu ile CaOH ve teflon bant grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark mevcuttu ($p<0.05$). Natamisin grubunda inflamatuvar reaksiyon şiddeti CaOH ve teflon bant grubuna göre daha az olarak belirlenmiştir. İkinci hafta sonunda nisin, natamisin, CaOH ve teflon bant gruplarından elde edilen preparatlar inflamatuvar reaksiyonun şiddetine göre değerlendirildiğinde; CaOH grubunda inflamatuvar reaksiyon şiddetinin en yüksek seviyede olduğu belirlendi. En düşük inflamatuvar reaksiyon şiddetinin ise natamisin ve nisin gruplarında olduğu tespit edildi. Gruplar arasında inflamatuvar reaksiyon şiddetleri açısından fark bulunmasına rağmen bu fark istatistiksel olarak anlamlılık seviyesinde değildi. Dördüncü hafta sonunda da CaOH ve teflon bant gruplarında inflamatuvar reaksiyon şiddeti nisin ve natamisin gruplarına göre yüksekti. Ancak istatistiksel olarak anlamlı fark sadece natamisin ve CaOH grupları arasında gözlemlendi ($p<0.05$). Natamisin grubunda inflamatuvar reaksiyon şiddeti teflon bant grubuna göre daha düşüktü.

Birinci haftada nisin, natamisin, CaOH ve teflon bant gruplarından elde edilen preparatlar RD devamlılığı belirlenen kriterlere göre değerlendirildiğinde; natamisin grubuyla CaOH ve teflon Bant grupları arasında istatistiksel olarak anlamlılık seviyesinde fark olduğu belirlendi ($p<0.05$) (Tablo 6). Natamisin grubunda RD devamlılığı CaOH ve teflon bant gruplarına göre daha olumlu skorlar sergilemiştir. İkinci haftada gruplar arasında RD devamlılığı değerlendirildiğinde; (Tablo 6). Nisin ve natamisin gruplarında RD devamlılığı CaOH ve teflon bant gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı seviyede yüksekti ($p<0.05$). Dördüncü haftada RD devamlılığı birinci ve ikinci haftaya göre özellikle nisin ve natamisin gruplarında artış göstermişti. Fakat elde edilen veriler istatistiksel olarak değerlendirildiğinde anlamlılık seviyesinde tek farkın nisin ve CaOH grupları arasında olduğu belirlendi ($p<0.05$) (Tablo 6). Nisin grubunda RD devamlılığı dördüncü haftada birinci ve ikinci haftaya göre CaOH grubundan daha yüksek seviyede idi.

5.TARTIŞMA VE SONUÇ

Çürük lezyonları gibi patolojik durumlarda, reaksiyoner dentin için odontoblastların salgı aktivitesi uyarılmaktadır. Kavitenin derin hazırlanması odontoblast ölümüne yol açmaktadır. Bu durumda, yeni oluşturulan odontoblast-benzeri hücreler nekrotik hücrelerin yerini almakta ve RD matriksi salgılayabilmektedir (Tziafas 1995). Diğer taraftan dentin ve pulpanın anatomik, gelişimsel ve fonksiyonel ilişkileri dental yaralanmalara karşı pulpa bağ dokusunu, doğrudan uyarılmadığı zamanlarda bile duyarlı hale getirmektedir (Okiji 2002). Bu durum pulpanın eşsiz iyileşme gücü ile tarif edilmektedir.

Pulpada mekanik pulpa perforasyonu ve travma gibi sebeplerle meydana gelen geri dönüşümsüz hasarlar oluşabilmektedir. Uygun koşullar oluştuğunda bu hasarlara yanıt olarak tamir dentinin oluşumuna sebep olan reparatif dentinogenezis başlamaktadır. Reparatif dentinogenezis çok sayıda faktöre bağlı, yeni jenerasyon odontoblast benzeri hücrelerin farklılaşmasının ve göçünün başlaması için moleküler sinyallerin indüksiyonunu içeren, karmaşık bir biyolojik süreçtir. Pulpanın hasarı sonrasında birçok alternatif rejeneratif materyal kullanılarak pulpanın iyileşme gösterdiği bilinmektedir. Tamir dentini indüksiyonu için alternatif birçok yöntem ve materyal test edilmiştir. Fakat bu yöntem ve materyallerin reparatif dentinogenezisi nasıl uyardıkları hala bilinmemektedir (Rutherford, Wahle ve ark. 1993, Mao, Kim ve ark. 2012, Yıldırım 2013).

Reparatif dentinogenezis oluşumunu düzenleyen, moleküler ve hücrel mekanizmalarla ilgili, in vivo ve in vitro yaklaşımlar kullanılarak detaylı araştırmalar yapılmaktadır. Bu araştırmalar, dental pulpanın dentinojenik kapasitesi ile ilgili bilgiler sağlamış olmasına rağmen, özellikle progenitör hücre göçü hakkında çok az bilgi vermektedir (Tecles, Laurent ve ark. 2005).

İnsan üzerinde RD ile ilgili çalışmanın zorluğu nedeniyle literatürde bulunan RD ile ilgili yapılan çalışmalarda birçok denek maymun (Cox, White ve ark. 1992, Rutherford, Wahle ve ark. 1993), köpek (Nakashima 1990), kemirgen (Smith, Tobias ve ark. 1990), minyatür domuz (Jepsen, Albers ve ark. 1997) ve ratlar (Hu, Zhang ve ark. 1998, Decup, Six ve ark. 2000) kullanılmıştır. Anatomik, histolojik, biyolojik ve fizyolojik olarak minyatür insan dişi olarak kabul edilmesi ve histolojik olarak benzer düzeyde iyileşme göstermesi nedeniyle rat dişlerinin çalışma modeli olarak kullanılabilmesi kabul edilmesine rağmen, hayvan çalışmaları pek çok teknik zorluk içermektedir (Fitzgerald 1979, Dammaschke 2010).

Son dönemlerde diş hekimliğindeki etik problemler dikkate alındığında, RD ile ilgili çalışmalar in vitro çalışmalardan ileriye gidememektedir. İn vitro deneylerde de in vivo ortamın tüm özellikleri yansıtlamadığı için literatür sonuçları klinik olarak yetersiz kalmaktadır. Bu nedenle çalışmamızda diş organ kültürü kullanarak histolojik incelemeler yapmaya karar verdik. Bu tez kapsamında gerçekleştirilen deneyler, klinik çalışmaları desteklemek amacıyla RD devamlılığının araştırılması amacıyla diş organ kültüründe kullanılmak üzere ortodontik amaçlarla çekilmiş açık apeksli (apikalden difüzyonla beslenebilmesi için) 3. Molar dişler kullanılmıştır.

Bu konuda yapılan çalışmalar incelendiğinde, RD ile ilgili araştırmaların insan üzerinde yapılmasının getirdiği etik sorunlar in vivo incelemeleri kısıtlamaktadır. Bu engellerin üstesinden gelmek için, insan diş pulpa hücrelerinin odontoblastlara farklılaşmasını sağlayan bir hücre kültürü sistemi geliştirilmiştir. Geliştirilen kültür ortamı içerisinde, BME ortamına ilave olarak askorbik asit, streptomisin, penisilin ve fetal buzağı serumu bulunmaktadır. 30 güne kadar yapılan takiplerde pulpaya komşu alanlarda pulpal tamirin başladığı izlenmiş ve in vitro olarak pulpal takibin yapıldığı görülmüştür (Magloire, Joffre ve ark. 1996).

BrdU içeren MEM vasatı kullanılarak yapılan diş organ kültüründe histolojik olarak RD ve progenitör hücre aktivasyonunun incelendiği bir çalışmada diş organ kültürü olarak %10 FBS, penisilin, streptomisin, amfoterisin B içeren solüsyon kullanılmıştır. Kavite preparasyonu sonrasında BrdU içermeyen MEM vasatı içerisinde 1 gün, 2 hafta ve 4 haftalık farklı periyotlarda dişler inkübe edilmiş ve kültür periyotları tamamlandıktan sonra fikse edilip, formik asit ile dekalsifiye edilmiştir. Dekalsifikasyonu tamamlanan dişler histolojik takip aşamalarından geçirilmiş ve RD histolojik olarak incelenmiştir

(Tecles, Laurent ve ark. 2005, Tecles, Laurent ve ark. 2008). Bu ve benzeri çalışmalar in vivo ortamı başarılı bir şekilde taklit edebilen deney düzeneği olarak diş organ kültürünü ön plana çıkarmaktadır.

Bu tez çalışması kapsamında kültür vasatı olarak DMEM (DMEM F-12, LONZA, Verviers, Belçika) solüsyonu kullanılmıştır. Kültüre ek olarak ilave penisilin, streptomisin, amfoterisin B, %10 FBS kullanılmıştır (Téclès, Laurent ve ark. 2008). DMEM hücre erken yaşlanmasına engel olması ve içerdiği hormon ve besinlerle hücre gelişimini desteklemesi nedeniyle çalışmamızda kullanılmıştır.

In vivo ortamı yansıtan in vitro kültür ortamı çalışmalarının gittikçe değerlendirilmesi nedeniyle bu tezde diş organ kültürü yapılmış ve dişlerin in vitro kültür ortamında canlılığını devam ettirip ettirmediği, pulpal perforasyon alanında RD devamlılığı ve inflamatuvar reaksiyon şiddeti histolojik olarak incelenmiştir. Direkt pulpa kaplama materyali olarak CaOH, nisin, natamisin ve negatif kontrol grubu olarak teflon bant kullanılmıştır.

Literatürde in vivo reparatif dentinogenezis çalışmalarında, RD'in oluşumunun 2. haftadan başlayıp net bir RD 30 gün sonra oluştuğu görülmektedir (Nakashima 1989, Smith, Tobias ve ark. 1990, Tziafas, Kolokuris ve ark. 1992, Jepsen, Albers ve ark. 1997, Hu, Zhang ve ark. 1998). Rat dişlerinde ideal dentin formunun 3 haftada tamamlandığı bildirilmiştir (Hu, Zhang ve ark. 1998). Köpek dişlerinde CaOH ile yapılan pulpa kaplaması sonrası oluşan doku reaksiyonunda 14. günden sonra RD kalınlığının arttığı bildirilmiştir (Yamamura 1985). Hem rat hem insan dişlerine CaOH ile direkt pulpa kaplaması yapılan bir çalışmada histolojik olarak RD 22 gün sonunda izlenmiştir (Harris and Bull 1966). Bu tezde hücre kültür ortamında dişlerin takip süresi literatür bilgileri göz önünde bulundurularak 1, 2 ve 4 hafta olarak belirlenmiştir.

Çalışmamızda CaOH ile birlikte negatif kontrol grubu olarak teflon bant ve son yıllarda diş hekimliğinde kullanılmaya başlanan antimikrobiyal proteinlerden nisin ve natamisinin pulpa üzerine etkileri histolojik olarak incelenmiştir. Antimikrobiyal polipeptitler doğuştan bağışıklığın bir parçası olup genlerle kodlanan doğal antibiyotiklerdir (Carnicelli, Lizzi ve ark. 2013). Diş çürükleri ile ilgili mikroorganizmalar genellikle gram pozitifdir ve nisinin genellikle gram pozitif bakteriler üzerinde inhibe edici bir etkisi vardır, buna rağmen diş çürüklerinin önlenmesinde nisinin etkin rol olabileceği yönünde çalışmalara literatürde

rastlanmaktadır. Bu çalışmalardan birinde nisin karyojenitesi bilinen 9 mikroorganizma üzerinde (*S. sanguinis*, *Streptococcus gordonii*, *S. mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *L. acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus fermenti*, *Actinomyces viscosus* ve *Actinomyces naeslundii*) inhibe edici etkinliği olduğu belirlenmiştir (Tong, Dong ve ark. 2010). Yine florür ve nisin kombinasyonunun değerlendirildiği bir çalışmada, florür ve nisin karyojenik patojen *S.mutans* ve biyofilm üzerinde sinerjik bir etki gösterdiği bildirilmiştir (Tong, Zhou ve ark. 2011). nisin biyofilm üzerine etkilerinin araştırıldığı başka bir çalışmada biyofilm gelişimini inhibe ettiği ve oral mukoza hücrelerine zarar vermediği bildirilmiştir (Shin, Ateia ve ark. 2015). Kanal içi pansuman ajanı olarak nisin ve CaOH'i değerlendiren araştırmacılar birbirlerine yakın antimikrobiyal etkinlik gösterdiğini vurgulamışlardır (Turner, Love ve ark. 2004).

Bir polien makrolid olan natamisin, küf hücre membranındaki ergosterol ve diğer sterollerini bağlayan bir antifungaldır. Natamisin sterollerini bağlayarak küf hücre membranında sızıntı ile sonuçlanan bozulmalara ve ergosterol sentezinin inhibisyonuna neden olur. Bakteriler hücre duvarı sterollerine sahip olmadıklarından natamisine karşı duyarlı değildir (Yılmaz ve Kurdal 2005, Öztürk ve ark. 2006). Ancak natamisin *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus haemolyticus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium* ve *Proteus mirabilis* gibi bakterilere karşı çok yüksek miktarda (>250 mg/kg) kullanıldığında etkili olabildiği bildirilmiştir. Ayrıca şeker ve tuz gibi maddeler ortamın su aktivitesini düşürmek suretiyle sinerjistik etki oluşturarak natamisin antimikrobiyal etkinliğini güçlendirmektedir (De Ruig and Van den Berg 1985, Volpon and Lancelin 2002). Diş hehimliğinde natamisin ile yapılan çok az çalışma vardır. Bunlardan birinde protez stomatitinin tedavisinde kullanılan % 2,5 pimafulcin (natamisin içeren) süspansiyonunun etkinliği araştırılmış ve *Candida enfeksiyonunda* önemli bir azalma sağladığı ayrıca yan etkilerin olmadığı bildirilmiştir (Koopmans, Smitt ve ark. 1984). Natamisin, nistatin ve Amfoterisin B 'nin oral kandidiyazisin başlıca etyolojik faktörü olan *Candida albicans* ve *Candida glabrata*nın oral epitel hücrelerine yapışmasının engellenmesine etkilerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada natamisin, nistatin ve Amfoterisin B 'nin *Candida albicans* ve *Candida glabrata*nın oral epitel hücrelerine yapışmasını azalttığı bildirilmiştir (Dorocka-Bobkowska, Konopka ve ark. 2003). Kısıtlı sayıda yapılmış çalışmalarda nisin ve natamisin pulpa üzerine etkileri ile ilgili

bir çalışma olmadığını gördük ve bu tez projesi kapsamında son dönemin güncel materyallerinin pulpa iyileşmesi üzerine etkilerini incelemeye karar verdik.

Çalışmamızda nisin, natamisin, CaOH ve teflon bant uyguladığımız tüm gruplarda pulpa dentin kompleksinin histolojik değerlendirmeye uygun olduğu gözlenmiştir. Ayrıca pulpanın canlılığını koruduğu ve tüm materyallerin biyouyumlu olduğu olduğu görülmüştür.

Çalışmamızda perforasyon boyutu belirlenirken spontan iyileşme gerçekleşebilecek boyuttan daha büyük bir perforasyon oluşturmanın uygulanacak materyalin etkinliğini değerlendirmede çok önemli olacağı gerçeğinden ve direkt pulpa kaplamasının yapıldığı in vivo çalışmalarda perforasyon alanının literatürde 1 mm³'den küçük olması gerektiği bilgisinden hareketle değerlendirmelerde bulunuldu. Perforasyon alanı büyümesi dentin duvarı desteğinin kaybedilmesine, hemorajide artışa neden olarak iyileşme mekanizmasını olumsuz anlamda etkileyecektir (Alaçam 2012). Kendiliğinden iyileşmeyen bir yara yüzey alanı olarak kabul edilen alan 'kritik yara boyutu' olarak adlandırılmaktadır. İnsan dişlerine çok benzeyen köpek dişlerinde perforasyon boyutu ile RD arasındaki ilişkiyi inceleyen bir çalışmada, Yıldırım ve ark (2011) köpeklerin premolarlar dişlerinde 3 farklı boyutta pulpa defektleri hazırlamışlardır. Defekt çap/derinlik, 1/1, 2/1 ve 2/2 olacak şekilde perforasyonlar oluşturulmuştur. Kontrol grubunda CaOH ve test grubunda teflon bantla kapatılmıştır. Pulpanın teflon bant altında, materyal uygulanmadan da 1/1 mm olan bir defekt boyutuna kadar kendiliğinden iyileşme gösterebildiği gözlenmiştir. Bu durumda bu çalışmaya göre köpek dişi pulpa dokusunun CaOH ile tedavi edildiğinde 2 mm çap, 1 mm derinliğe sahip ekspoz boyutuna kadar tamir yanıtı oluşturma potansiyeli olduğu tespit edilmiştir. Bu sebeple pulpada, herhangi bir tedavi uygulanmadığında kendiliğinden iyileşmeyen 'kritik yara boyutu' 2/1 olarak bildirilmiştir (Yıldırım, Can ve ark. 2011). Kritik yara boyutu kullanıldığında, materyalin iyileşme üzerindeki etkileri deneğin kendi iyileşme potansiyeline değil, kullanılan terapötik materyalin doğasına ve işleyiş mekanizmasına dayandırılabilir (Yıldırım 2007). Bu nedenle tez çalışmamız kapsamında 2 mm boyutunda perforasyonlar oluşturulmuştur. Histomorfometrik ölçümler, çalışmamızda tüm çalışma gruplarda perforasyon boyutları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığını yani standart perforasyonlar oluşturulduğunu ortaya koydu.

Çalışmamızda inflamatuvar reaksiyon şiddetinin birinci haftada natamisin grubunda anlamlı derecede en düşük seviyede olması pulpa üzerinde iritan etkisinin daha düşük seviyelerde olduğunu düşündürdü. Bununla birlikte CaOH ve teflon bant gruplarında görülen ilk haftadaki yüksek inflamatuvar reaksiyon şiddetinin ikinci ve dördüncü haftada gerileme gösterdiği tespit edildi. Her üç değerlendirme periyodunda da (1. 2. ve 4. hafta) en düşük inflamatuvar reaksiyon şiddetinin nisin ve natamisin gruplarında olduğu belirlendi. Enflamasyon derecesinde daha az artışlara neden olabilecek iritan olmayan materyallerin pulpal iyileşmede daha olumlu katkılar sağlayabileceği düşüncesiyle nisin ve daha da olumlu değerler sergileyen natamisinin iyi birer alternatif olabileceği değerlendirildi.

İnsanlarda yapılan pulpa tedavileri sonrasında RD oluşumunun en çok CaOH ile yapılan pulpa kaplamalarında oluştuğunu bildiren çalışmalar bulunmaktadır (Olsson, Petersson ve ark. 2006). CaOH bileşikleri, vital dokular karşısında sınırlı nekroz oluşturması ve doku tarafından iyi tolere edilmesi nedeniyle uzun yıllardır pulpa kaplaması için tercih edilen malzeme olmuştur (Alaçam 2012). Alternatif malzemeler üretmek için birçok araştırma yapılmıştır. Bununla birlikte, CaOH'in etkisi çok sayıdaki histolojik ve klinik çalışmalarda doğrulanmıştır (Schroder 1985, Alaçam 2012).

Yapılan birçok deneysel çalışmada CaOH ve MTA karşılaştırılmış ve her iki materyalin pulpa kaplamasında kullanılması sonucu perforasyon alanında RD oluşumu gözlenmiştir. CaOH'in etkisi birçok klinik ve histolojik çalışma ile doğrulansa da, mikrosızıntı nedeni ile oluşacak bakteri invazyonu nedeni ile yeni materyal arayışları sürmektedir (Faraco Junior and Holland 2004). MTA'nın CaOH'e benzer özelliklerinin bulunması, sertleşme zamanının uzun olmasına rağmen daha az iltihap oluşturması klinik avantaj olarak kabul edilmektedir (Rasaratnam 2016). Direkt pulpa kaplamasının CaOH ve MTA kullanılarak yapılan bir çalışmada, örnekler histolojik olarak incelenmiş ve MTA'nın CaOH'den daha kalın bir RD dokusu oluşturduğu bildirilmiştir (Faraco and Holland 2001). Buna karşı Tziafas ve ark (2002), MTA ve CaOH kullanarak direkt pulpa kaplaması yaptıkları dişleri 90 gün süreyle takip ederek histolojik olarak incelemişler ve RD açısından MTA ve CaOH arasında herhangi bir anlamlı fark tespit edemediklerini rapor etmişlerdir. Rerapatif dentinogenezisin oluşumuna neden olan olayların altında yatan hücresel ve moleküler mekanizmalar, çeşitli in vitro ve in vivo yaklaşımları kullanarak yoğun bir araştırmanın konusu

olmuştur (About, Bottero ve ark. 2000, Tziafas, Smith ve ark. 2000, Smith and Lesot 2001). Bu çalışmalar diş pulpa hücrelerinin dentinojenik kapasitesi ile ilgili değerli bilgiler sağlamış olsa da, RD mekanizması hakkında çok az bilgi bulunmaktadır.

Bununla birlikte çalışmamızda RD devamlılığının, değerlendirilen her üç peryot için de CaOH ve teflon bant gruplarına göre natamisin grubunda anlamlı derecede daha olumlu skorlar sergilediği tespit edilmiştir. Birinci hafta dışında yine natamisinle aynı seviyede olumlu sonuçlar sergileyen nisin grubunun sadece birinci haftada CaOH ve teflon bant grupları ile anlamlı fark sergileyemediği belirlenmiştir. Dördüncü haftada RD devamlılığının ilk iki haftaya göre tüm gruplarda artış gösterdiği ancak en olumlu skorların yine çalışma grubumuzu oluşturan antimikrobiyal polipeptitler olan nisin ve natamisin gruplarında tespit edildiği görülmüştür.

Doğuştan bağışıklığın bir parçası olup genlerle kodlanan doğal antibiyotikler olarak adlandırılan nisin ve natamisinin, diş hekimliği klinik rutinde pulpa kaplama ajanı olarak kullanılan CaOH ile, fotomikrografik ölçümler üzerinden karşılaştırıldığı bu tez çalışması limitasyonları içerisinde aşağıdaki sonuçlara ulaşılmıştır:

1. Diş organ kültürü yönteminin özellikle histolojik çalışmalar için belirli limitasyonlar çerçevesinde etkili bir çalışma modeli olduğu,
2. Natamisin grubu başta olmak üzere çalışma grubumuzu oluşturan antibakteriyel polipeptit gruplarının infamatuar reaksiyon şiddeti konusunda, her üç çalışma peryodunda da pulpa üzerinde en hafif iritan etkiyi ifade edecek şekilde en düşük skorları sergiledikleri,
3. RD devamlılığı kriterlerine göre nisin ve natamisin gruplarının kontrol grupları olan CaOH ve teflon bant gruplarından daha olumlu sonuçlar gösterdikleri gözlenmiştir.

Gelecekte yapılacak materyal ve kök hücre çalışmaları için etik problem oluşturmaksızın uygun bir çalışma alanı sağlayacağını düşündüğümüz bu metotla, düşük maliyetli çalışmalar planlanabileceği ve olumlu özellikleri ile umut vadeden antimikrobiyal polipeptitlerin diş hekimliğinde kullanılmaları ile ilgili geniş kapsamlı prospektif çalışmalara ihtiyaç olduğu değerlendirilmiştir.

6.KAYNAKLAR

- About I, MJ. Bottero P. de Denato J. Camps JC. Franquin and TA. Mitsiadis, Human dentin production in vitro. *Exp Cell Res* 2000; 258 (1): 33-41.
- Aeinehchi MB. Eslami M. Ghanbariha and Saffar.AS. Mineral trioxide aggregate (MTA) and calcium hydroxide as pulp-capping agents in human teeth: a preliminary report. *Int Endod J* 2003; 36 (3): 225-231.
- Aksoy B. Derinin dogal bagisiklik sistemi/Skin innate immune system. *Turkderm* 2013; 47 (1): 2-12.
- Alaçam, A. Pedodontide Endodontik Yaklaşımlar. *Endodonti. T. Alaçam:* 2012;1241-1302.
- Alaçam T. Dentin ve Pulpa Tedavileri. *Endodonti:* 2012;181-238.
- Allard BH. Magloire ML. Couble JC. Maurin and F. Bleicher, Voltage-gated sodium channels confer excitability to human odontoblasts: possible role in tooth pain transmission. *J Biol Chem* 2006;281 (39): 29002-29010.
- Aşkar Ş. and TK. Aşkar antimikrobiyel proteinler ve bağışıklıktaki önemi. *Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi* 2017; 6 (2): 82-86.
- Avery J. Oral development and histology. 2002.
- Avery JK, PF. Steele and N. Avery (2002). *Oral development and histology*, Thieme.
- Axelsson P. *Diagnosis and risk prediction of dental caries*. Chicago: Quintessence Publishing Company, 2000.
- Aydemir C, Yalcin ES. Aksaray Kisa SC. Yıldırım Uzbay SGT, Goka E. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) changes in the serum of depressed women. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 2006; 30 (7): 1256-1260.
- Bergenholtz G. Evidence for bacterial causation of adverse pulpal responses in resin-based dental restorations. *Crit Rev Oral Biol Med* 2000;11 (4): 467-480.

- Bergenholtz G, Cox CF, Loesche WJ, Syed SA. Bacterial leakage around dental restorations: its effect on the dental pulp. *J Oral Pathol* 1982;11 (6): 439-450.
- Beutner S, Frixel S, Ernst H, Hoffmann T, Hernandez-Blanco I, Hundsdoerfer C, Kiesendahl N, Kock S, Martin HD, Mayer B. Carotenylflavonoids, a novel group of potent, dual-functional antioxidants. *Arkivoc* 2007; 8: 279-295.
- Breukink E, de Kruijff B. Lipid II as a target for antibiotics. *Nature reviews Drug discovery* 2006; 5 (4): 321-323.
- Breukink E, H. van Heusden, E. Vollmerhaus PJ, Swiezewska E, Brunner L, Walker S, Heck AJ, de Kruijff B. Lipid II is an intrinsic component of the pore induced by nisin in bacterial membranes. *Journal of Biological Chemistry* 2003; 278 (22): 19898-19903.
- Briso AL, Rahal V, Mestreneur SR, Dezan Junior E. Biological response of pulps submitted to different capping materials. *Braz Oral Res* 2006; 20 (3): 219-225.
- Brogden KA, Ackermann M, McCray Jr PB, Tack BF. Antimicrobial peptides in animals and their role in host defences. *International journal of antimicrobial agents* 2003;22 (5): 465-478.
- Brogden NK, Brogden KA. Will new generations of modified antimicrobial peptides improve their potential as pharmaceuticals? *International journal of antimicrobial agents* 2011;38 (3): 217-225.
- Bronckers AL, Bervoets TJ, Woltgens JH. Effect of developmental stage of explants on further in-vitro development of hamster molars. *Arch Oral Biol* 1983; 28 (1): 69-77.
- Carnicelli V, Lizzi A, Ponzi A, Amicosante G, Bozzi A, Di Giulio A. Interaction between antimicrobial peptides (AMPs) and their primary target, the biomembranes. *Microbial Pathogens and Strategies for Combating Them: Science, Technology and Education* 2013; 2: 1123-1134.
- Cerrutti P, Terebiznik MR, de HUERGO M, Jagus SR, Pilosof AM. Combined effect of water activity and pH on the inhibition of *Escherichia coli* by nisin. *Journal of food protection* 2001; 64 (10): 1510-1514.
- Clarkson BH. Introduction to cariology. *Dental Clinics of North America* 1999; 43 (4): 569-578, v.
- Cohenca, N, Paranjpe A, Berg J. Vital pulp therapy. *Dental Clinics* 2013;57 (1): 59-73.

- Cox CF. Biocompatibility of dental materials in the absence of bacterial infection. *Oper Dent* 1987;12 (4): 146-152.
- Cox CF. Microleakage related to restorative procedures. *Proc Finn Dent Soc* 88 Suppl 1992; 1: 83-93.
- Cox CF, Hafez AA, Akimoto Otsuki NM, Suzuki Tarim SB. Biocompatibility of primer, adhesive and resin composite systems on non-exposed and exposed pulps of non-human primate teeth. *Am J Dent* 1998;11 Spec No: S55-63.
- Cox CF, Subay R, Ostro K, Suzuki ES, Suzuki SH. Tunnel defects in dentin bridges: their formation following direct pulp capping. *Oper Dent* 1996;21 (1): 4-11.
- Cox CF, White KC, Ramus DL, Farmer JB, Snuggs HM. Reparative dentin: factors affecting its deposition. *Quintessence Int* 1992; 23 (4): 257-270.
- Cvek M. A clinical report on partial pulpotomy and capping with calcium hydroxide in permanent incisors with complicated crown fracture. *J Endod* 1978; 4 (8): 232-237.
- Cvek M, Cleaton-Jones PE, Austin JC, Andreasen JO. Pulp reactions to exposure after experimental crown fractures or grinding in adult monkeys. *J Endod* 1982; 8 (9): 391-397.
- Cvek M, Lundberg M. Histological appearance of pulps after exposure by a crown fracture, partial pulpotomy, and clinical diagnosis of healing. *J Endod* 1983; 9 (1): 8-11.
- da Silva, BR, de Freitas, VAA, Nascimento-Neto LG, Carneiro VA, Arruda FV, de Aguiar SA, Cavada SW, BS, Teixeira EH. Antimicrobial peptide control of pathogenic microorganisms of the oral cavity: a review of the literature. *Peptides* 2012; 36 (2): 315-321.
- Dammaschke T. Rat molar teeth as a study model for direct pulp capping research in dentistry. *Lab Anim* 2010; 44 (1): 1-6.
- De Ruig W, Van den Berg G. Influence of the fungicides sorbate and natamycin in cheese coatings on the quality of the cheese. *Netherlands milk and dairy journal* 1985; 39 (3): 165-172.
- De Vuyst L, Vandamme EJ. Nisin, a lantibiotic produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*: properties, biosynthesis, fermentation and applications. *Bacteriocins of lactic acid bacteria*, Springer: 1994;151-221.

- Decup F, Six N. Palmier, Buch BD. Lasfargues J. Salih E. Goldberg M. Bone sialoprotein-induced reparative dentinogenesis in the pulp of rat's molar. *Clinical oral investigations* 2000;4 (2): 110-119.
- Decup F, Six N. Palmier B. Buch D. Lasfargues, JJ. Salih E. Goldberg M. Bone sialoprotein-induced reparative dentinogenesis in the pulp of rat's molar. *Clin Oral Investig* 2000;4 (2): 110-119.
- Delves-broughton J. Nisin as a food preservative. *Food Australia* 2005; 57 (12): 525-527.
- Delves-Broughton J, Thomas LV. Doan CH. Davidson PM. Natamycin. *Food Science And Technology-New York-Marcel Dekker-* 2005; 145: 275.
- Dorocka-Bobkowska B, Konopka K. Düzgüneş N. Influence of antifungal polyenes on the adhesion of *Candida albicans* and *Candida glabrata* to human epithelial cells in vitro. *Archives of oral biology* 2003; 48 (12): 805-814.
- Egan SA, Ward PN. Watson Field MTR. Leigh JA. Vru (Sub0144) controls expression of proven and putative virulence determinants and alters the ability of *Streptococcus uberis* to cause disease in dairy cattle. *Microbiology (Reading)* 2012; 158 (Pt 6): 1581-1592.
- Faraco IM, Holland R. Response of the pulp of dogs to capping with mineral trioxide aggregate or a calcium hydroxide cement. *Dent Traumatol* 2001; 17 (4): 163-166.
- Faraco Jr, I. M. Holland R. Response of the pulp of dogs to capping with mineral trioxide aggregate or a calcium hydroxide cement. *Dental Traumatology* 2001; 17 (4): 163-166.
- Faraco Junior IM. Holland R. Histomorphological response of dogs' dental pulp capped with white mineral trioxide aggregate. *Braz Dent J* 2004; 15 (2): 104-108.
- Farsi NN. Alamoudi, K. Balto and A. Al Mushayt Clinical assessment of mineral trioxide aggregate (MTA) as direct pulp capping in young permanent teeth. *J Clin Pediatr Dent* 2006; 31 (2): 72-76.
- Fejerskov O, Nyvad B. Kidd E. *Dental caries: the disease and its clinical management*, John Wiley & Sons, 2015.
- Fernandes AM, Silva G. Lopes AN. Jr, Napimoga MH. Benatti BB. Alves JB. Direct capping of human pulps with a dentin bonding system and calcium

- hydroxide: an immunohistochemical analysis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2008; 105 (3): 385-390.
- Fischer EJ, Arens DE. and Miller CH. Bacterial leakage of mineral trioxide aggregate as compared with zinc-free amalgam, intermediate restorative material, and Super-EBA as a root-end filling material. *J Endod* 1998; 24 (3): 176-179.
- Fitzgerald M. Cellular mechanics of dentinal bridge repair using 3H-thymidine. *J Dent Res* 58 (Spec Issue D): 1979; 2198-2206.
- Fitzgerald M, Chiego DJ. Jr. Heys DR. Autoradiographic analysis of odontoblast replacement following pulp exposure in primate teeth. *Arch Oral Biol* 1990; 35 (9): 707-715.
- Fuks AB. Pulp therapy for the primary and young permanent dentitions. *Dental Clinics of North America* 2000;44 (3): 571-596.
- Hampikyan H. Efficacy of nisin against *Staphylococcus aureus* in experimentally contaminated sucuk, a Turkish-type fermented sausage. *Journal of food protection* 2009;72 (8): 1739-1743.
- Hancock RE. The bacterial outer membrane as a drug barrier. *Trends in microbiology* 1997; 5 (1): 37-42.
- Harris R. Bull A. The healing of the traumatized dental pulp following capping. *Australian dental journal* 1966;11 (4): 236-247.
- Harrop T. Mackay B. Electron microscopic observations on healing in dental pulp in the rat. *Archives of oral biology* 1968; 13 (4): 365-385.
- Hebling J, E. M. Giro and C. A. Costa (1999). Biocompatibility of an adhesive system applied to exposed human dental pulp. *J Endod* 25 (10): 676-682.
- Hilton TJ. Keys to clinical success with pulp capping: a review of the literature. *Oper Dent* 2009; 34 (5): 615-625.
- Hu CC, Zhang, Qian CQ. and N. B. Tatum (1998). Reparative dentin formation in rat molars after direct pulp capping with growth factors. *J Endod* 24 (11): 744-751.
- Jarvis B. Mahoney R. Inactivation of nisin by alpha-chymotrypsin. *Journal of dairy science* 1969; 52 (9): 1448-1450.
- Jepsen S, Albers HK. Fleiner, Tucker BM. and Rueger D. Recombinant human osteogenic protein-1 induces dentin formation: an experimental study in miniature swine. *J Endod* 1997; 23 (6): 378-382.

- Jontell M, Okiji T. Dahlgren U. Bergenholtz G. Immune defense mechanisms of the dental pulp. *Crit Rev Oral Biol Med* 1998; 9 (2): 179-200.
- Takehashi S, Stanley HR. Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposures of dental pulps in germfree and conventional laboratory rats. *J South Calif Dent Assoc* 1966; 34 (9): 449-451.
- Kandray DP. Review of: Dental Embryology, Histology, and Anatomy, American Dental Hygienists' Association, 2007.
- Kashiwada T. Takagi M. New restoration and direct pulp capping systems using adhesive composite resin. *Bull Tokyo Med Dent Univ* 1991;38 (4): 45-52.
- Kerekes K, Heide S. Jacobsen I. Follow-up examination of endodontic treatment in traumatized juvenile incisors. *J Endod* 1980; 6 (9): 744-748.
- Kogan P, He J. Glickman GN. Watanabe I. The effects of various additives on setting properties of MTA. *J Endod* 2006; 32 (6): 569-572.
- Koopmans A, Smitt PS Kalk. W. De Graaff J. Efficacy of 2.5% Pimafucin suspension in the treatment of denture stomatitis. *The Journal of prosthetic dentistry* 1984; 51 (4): 461-466.
- Kuttler Y. Classification of dentin into primary, secondary and tertiary. 1959; 996.
- Lesot H, Lisi S. Peterkova R. Peterka M. Mitolo V. Ruch JV. Epigenetic signals during odontoblast differentiation. *Adv Dent Res* 2001; 15: 8-13.
- Magloire H, Joffre A. Bleicher F. An in vitro model of human dental pulp repair. *J Dent Res* 1996; 75 (12): 1971-1978.
- Mao JJ, im SG. Zhou KJL. Ye Cho S. Suzuki Fu TSY Yang R. Zhou X. Regenerative endodontics: barriers and strategies for clinical translation. *Dent Clin North Am* 2012; 56 (3): 639-649.
- Marion D, Jean A. H. Hamel, L. M. Kerebel and B. Kerebel Scanning electron microscopic study of odontoblasts and circumpulpal dentin in a human tooth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1991; 72 (4): 473-478.
- Massler M. Pulpal reactions to dental caries. *Int Dent J* 1967;17 (2): 441-460.
- Mattick A. Hirsch A. Further observations on an inhibitory substance (nisin) from lactic streptococci. *Lancet* 1947; 5: 5-8.
- McDonald R E. *Dentistry for the Child and Adolescent*, CV Mosby, 1969.
- Messer HH. *Permanent Restorations and the Dental Pulp*. Seltzer and Benders's Dental Pulp. L. C. Bywaters, Quintessence Publishing: 2002; 354-356.

- Murray PE, Garcia-Godoy F. Systemic evaluation of various haemostatic agents following local application prior to direct pulp capping. *Brazilian Journal of Oral Science* 2005; 4 (14): 791-797.
- Nakashima M. Dentin induction by implants of autolyzed antigen-extracted allogeneic dentin on amputated pulps of dogs. *Endod Dent Traumatol* 1989; 5 (6): 279-286.
- Nakashima M. The induction of reparative dentine in the amputated dental pulp of the dog by bone morphogenetic protein. *Arch Oral Biol* 1990; 35 (7): 493-497.
- Nakata TT, Bae KS, Baumgartner JC. Perforation repair comparing mineral trioxide aggregate and amalgam using an anaerobic bacterial leakage model. *J Endod* 1998;24 (3): 184-186.
- Nanci A. *Ten Cate's oral histology: development, structure, and function* 2008.
- Nunn JH, Steele JG. *The prevention of oral disease* 2003.
- Okiji T. Pulp is a connective tissue. *Ten Cate's Oral Histology*: 2002; 95-114.
- Olsson H, Petersson Rohlin KM. Formation of a hard tissue barrier after pulp cappings in humans. A systematic review. *Int Endod J* 2006;39 (6): 429-442.
- Öztürk U, Gürbüz Ü, Çalım HD. Besinlerin Muhafazasında Bazı Doğal Antimikrobiyal Sistemlerin Rolü ve Önemi. *Türkiye* 2006;9: 24-26.
- Parente E, Ricciardi A. Production, recovery and purification of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology* 1999;52 (5): 628-638.
- Qin C, Brunn J, Cadena CE, Ridall A, Butler WT. Dentin sialoprotein in bone and dentin sialophosphoprotein gene expressed by osteoblasts. *Connect Tissue Res* 2003; 44 Suppl 1: 179-183.
- Ranly D M. Pulpotomy therapy in primary teeth: new modalities for old rationales. *Pediatr Dent* 1994;16 (6): 403-409.
- Rasaratnam L. Review suggests direct pulp capping with MTA more effective than calcium hydroxide. *Evid Based Dent* 2016; 17 (3): 94-95.
- Rollema HS, Kuipers OP, Both PW, De Vos M, Siezen RJ. Improvement of solubility and stability of the antimicrobial peptide nisin by protein engineering. *Applied and environmental microbiology* 1995; 61 (8): 2873-2878.

- Rutherford RB, Wahle Tucker, JM. Rueger D. Charette M. (). Induction of reparative dentine formation in monkeys by recombinant human osteogenic protein-1. *Arch Oral Biol* 1993; 38 (7): 571-576.
- Sahan N, Güven Kaçar MA. Farklı asitliklerdeki yoğurtlardan torba yoğurdu üretimi ve natamisin raf ömrü üzerine etkisi. *Gıda* 2004; 29 (1): 11-20.
- Schroder U. Effects of calcium hydroxide-containing pulp-capping agents on pulp cell migration, proliferation, and differentiation. *J Dent Res* 1985; 64 Spec No: 541-548.
- Seltzer SB, IB *The Dental Pulp*, Quintessence Books, 1985.
- Severina E, Severin A. Tomasz A. Antibacterial efficacy of nisin against multidrug-resistant Gram-positive pathogens. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 1998; 41 (3): 341-347.
- Shackelford DA, Kaufman, JF. Korman AJ. Strominger JL. HLA-DR antigens: structure, separation of subpopulations, gene cloning and function. *Immunol Rev* 1982; 66: 133-187.
- Shin JM, Ateia IJ. Paulus R. H. Liu, J. C. Fenno, A. H. Rickard and Y. L. Kapila. Antimicrobial nisin acts against saliva derived multi-species biofilms without cytotoxicity to human oral cells. *Frontiers in microbiology* 2015;6: 617.
- Shuttleworth CA, Ward JL. Hirschmann PN. The presence of type III collagen in the developing tooth. *Biochim Biophys Acta* 1978; 535 (2): 348-355.
- Sloan AR. Shelton, A. Hann, B. Moxham and A. Smith. An in vitro approach for the study of dentinogenesis by organ culture of the dentine-pulp complex from rat incisor teeth. *Archives of oral biology* 1998; 43 (6): 421-430.
- Sloan AJ, Shelton RM. Hann AC. Moxham BJ Smith AJ. An in vitro approach for the study of dentinogenesis by organ culture of the dentine-pulp complex from rat incisor teeth. *Arch Oral Biol* 1998; 43 (6): 421-430.
- Smith A, Tobias, RC. Plant, R. Browne, H. Lesot Ruch J. Preliminary studies on the in vivo morphogenetic properties of dentine matrix proteins. *Biomaterials* 1990; 11: 22-24.
- Smith AJ. Pulpal responses to caries and dental repair. *Caries Res* 2002;36 (4): 223-232.
- Smith, AJ, Cassidy N. Perry, Begue-Kirn HC. Ruch JV. Lesot H. Reactionary dentinogenesis. *Int J Dev Biol* 1995;39 (1): 273-280.

- Smith AJ, Lesot H. Induction and regulation of crown dentinogenesis: embryonic events as a template for dental tissue repair? *Crit Rev Oral Biol Med* 2001; 12 (5): 425-437.
- Smith AJ, Tobias RS, Plant CG, Browne RM, Lesot H, Ruch JV. (). Preliminary studies on the in vivo morphogenetic properties of dentine matrix proteins. *Biomaterials* 1990;11: 22-24.
- Stanley HR. (). Calcium Hydroxide and Vital Pulp Therapy. Seltzer and Bender's Dental Pulp, Quintessence Publishing 2002; 309-324.
- Stanley HR, Lundy T. Dycal therapy for pulp exposures. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1972;34 (5): 818-827.
- Stanley HR, Pereira, JC, Spiegel Broom EC, Schultz M. The detection and prevalence of reactive and physiologic sclerotic dentin, reparative dentin and dead tracts beneath various types of dental lesions according to tooth surface and age. *J Oral Pathol* 1983; 12 (4): 257-289.
- Stewart RE, Poole AE. The orofacial structures and their association with congenital abnormalities. *Pediatr Clin North Am* 1982;29 (3): 547-584.
- Su M, Yao SL, Gu Z, Huang and S. Mai. Antibacterial effect and bond strength of a modified dental adhesive containing the peptide nisin. *Peptides* 2018;99: 189-194.
- Suzuki MY, Taira, C, Kato, K, Shinkai and Y. Katoh. Histological evaluation of direct pulp capping of rat pulp with experimentally developed low-viscosity adhesives containing reparative dentin-promoting agents. *J Dent* 2016; 44: 27-36.
- Suzuki S, Haruyama NF, Nishimura AB, Kulkarni. Dentin sialophosphoprotein and dentin matrix protein-1: Two highly phosphorylated proteins in mineralized tissues. *Arch Oral Biol* 2012; 57 (9): 1165-1175.
- Tayel AA, El-Tras, W, Moussa, FS, A. F. EL-BAZ, H. Mahrous, M. F. Salem and L. Brimer (). Antibacterial action of zinc oxide nanoparticles against foodborne pathogens. *Journal of Food Safety*, 2011; 31 (2): 211-218.
- Tecles O, Laurent PV, Aubut I. About Human tooth culture: a study model for reparative dentinogenesis and direct pulp capping materials biocompatibility. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2008; 85 (1): 180-187.

- Téclès O, Laurent P, Aubut V, About I. Human tooth culture: a study model for reparative dentinogenesis and direct pulp capping materials biocompatibility. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials* 2008; 85 (1): 180-187.
- Tecles O, Laurent P, S. Zygouritsas, A. S. Burger, J. Camps, J. Dejou and I. About. Activation of human dental pulp progenitor/stem cells in response to odontoblast injury. *Arch Oral Biol* 2005;50 (2): 103-108.
- Tong Z, L. Dong, L. Zhou, R. Tao and L. Ni. Nisin inhibits dental caries-associated microorganism in vitro. *Peptides* 2010;31 (11): 2003-2008.
- Tong Z, L. Zhou, W. Jiang, R. Kuang, J. Li, R. Tao and L. Ni. An in vitro synergetic evaluation of the use of nisin and sodium fluoride or chlorhexidine against *Streptococcus mutans*. *Peptides* 2011; 32 (10): 2021-2026.
- Tong Z, L. Zhou, J. Li, W. Jiang, L. Ma and L. Ni. In vitro evaluation of the antibacterial activities of MTAD in combination with nisin against *Enterococcus faecalis*. *Journal of endodontics* 2011;37 (8): 1116-1120.
- Torabinejad M, Pitt Ford, TR. D. J. McKendry, H. R. Abedi, D. A. Miller and S. P. Kariyawasam Histologic assessment of mineral trioxide aggregate as a root-end filling in monkeys. 1997. *Int Endod J* 2009; 42 (5): 408-411.
- Trowbridge H. Structure and functions of the dentin and pulp complex. The pathways of the pulp, 2002.
- Turner S, R. Love and K. Lyons. An in-vitro investigation of the antibacterial effect of nisin in root canals and canal wall radicular dentine. *International endodontic journal* 2004;37 (10): 664-671.
- Tziafa C, E. Koliniotou-Koumpia, S. Papadimitriou and D. Tziafas. Dentinogenic responses after direct pulp capping of miniature swine teeth with Biodentine. *J Endod* 2014; 40 (12): 1967-1971.
- Tziafas D. Basic mechanisms of cytodifferentiation and dentinogenesis during dental pulp repair. *Int J Dev Biol* 1995; 39 (1): 281-290.
- Tziafas D, I. Kolokuris, A. Alvanou and K. Kaidoglou. Short-term dentinogenic response of dog dental pulp tissue after its induction by demineralized or native dentine, or predentine. *Arch Oral Biol* 1992; 37 (2): 119-128.

- Tziafas D, O. Pantelidou, A. Alvanou, G. Belibasakis and S. Papadimitriou. The dentinogenic effect of mineral trioxide aggregate (MTA) in short-term capping experiments. *International Endodontic Journal* 2002; 35 (3): 245-254.
- Tziafas D, A. J. Smith and H. Lesot. Designing new treatment strategies in vital pulp therapy. *J Dent* 2000; 28 (2): 77-92.
- Volpon L. and J. M. Lancelin. Solution NMR structure of five representative glycosylated polyene macrolide antibiotics with a sterol-dependent antifungal activity. *European journal of biochemistry* 2002; 269 (18): 4533-4541.
- Yamamura T. Differentiation of pulpal cells and inductive influences of various matrices with reference to pulpal wound healing. *J Dent Res* 1985; 64 Spec No: 530-540.
- Yıldırım S. Vital Pulpa Tedavilerinde Protein ve Gen Terapileri. *Hacettepe Dişhekimliği Fakültesi Dergisi* 2007;31 (2): 54-63.
- Yıldırım S. *Dental Pulp Stem Cell*, Springer New York, 2013.
- Yıldırım S. Alaçam A. Vital pulpa tedavilerinde protein ve gen terapileri. *Hacettepe Dişhekimliği Fakültesi Derg. (. Clinical Dentistry and Research)* 2007; 31 (2): 54-63.
- Yıldırım S, A. Can, M. Arican, M. C. Embree and J. J. Mao. Characterization of dental pulp defect and repair in a canine model. *Am J Dent* 2011;24 (6): 331-335.
- Yılmaz E, L. Kurdal E. Peynir muhafazasında kullanılan doğal bir antimikrobiyal: natamisin. *GIDA* 2005; 30 (6): 385-388.
- Zhang J, Tian, WD. X. Nie, L. Liu, W. Tang and Y. F. Lin [Expressions of fibronectin and bone morphogenetic protein-2, 4 during development of mouse tooth germ]. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 2007;38 (5): 826-828.
- Zhao M, Y. Qu, J. Liu, S. Mai and L. Gu. A universal adhesive incorporating antimicrobial peptide nisin: Effects on *Streptococcus mutans* and saliva-derived multispecies biofilms. *Odontology*: 2020; 1-10.

EKLER

ANTİMİKROBİYAL POLİPEPTİTLERİN PULPA ÜZERİNE ETKİLERİNİN DIŞ ORGAN KÜLTÜRÜNDE HİSTOLOJİK OLARAK İNCELENMESİ

ORJİNALLIK RAPORU

%**22**

BENZERLİK ENDEKSİ

%**22**

İNTERNET KAYNAKLARI

%**11**

YAYINLAR

%

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	researchmgt.monash.edu İnternet Kaynağı	% 3
2	dergipark.org.tr İnternet Kaynağı	% 2
3	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	% 2
4	acikerisim.aku.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	% 1
5	www.scribd.com İnternet Kaynağı	% 1
6	eprints.usm.my İnternet Kaynağı	% 1
7	docplayer.biz.tr İnternet Kaynağı	% 1
8	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	% 1

restoratifdistedavisi.blogspot.com

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı: Ebru ŞENYİĞİT

Uyruğu: Türkiye (T.C.)

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Yüksek Lisans	Çukurova Üniversitesi	2008

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görev
2008-Halen	Erciyes Üniversitesi	Diş hekimi

YABANCI DİL

İngilizce