



T.C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SERTLEŞME SÜRESİ FARKLI HIZLANDIRICILAR İLE
KISALTILAN MİNERAL TRİOKSİT AGREGATIN
DAİMİ DİŞ PULPA KAYNAKLI KÖK HÜCRELER ÜZERİNDEKİ
SİTOTOKSİSİTESİNİN VE REJENERATİF KAPASİTESİNİN
İNCELENMESİ**

Dt. PINAR KULAN

DOKTORA TEZİ

PEDODONTİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Prof. Dr. Betül KARGÜL

2015- İSTANBUL

TEZ ONAYI

Kurum : Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Programın seviyesi : Doktora
Anabilim Dalı : Pedodonti
Tez Sahibi : Pınar KULAN
Tez Başlığı : Sertleşme Süresi Farklı Hızlandırıcılar ile Kısaltılan Mineral Trioksit Agregatın Daimi Diş Pulpa Kaynaklı Kök Hücreler Üzerindeki Sitotoksitesinin ve Rejeneratif Kapasitesinin İncelenmesi
Sınav Yeri : M.Ü. Diş Hekimliği Fakültesi Pedodonti Anabilim Dalı
Sınav Tarihi : 05.05.2015

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman (Unvan, Adı, Soyadı)

Prof.Dr. Betül KARGÖL

Kurumu

M.Ü. Diş Hek. Fak. Pedodonti A.D.

İmza

Sınav Jüri Üyeleri (Unvan, Adı, Soyadı)

Prof. Dr. İlknur TANBOĞA

Prof. Dr. Gamze TORUN KÖSE

Prof. Dr. Serap AKYÜZ

Prof. Dr. Oya AKTÖREN

M.Ü. Diş Hek. Fak. Pedodonti A.D.

Y.Ü. Müh-Mim Fak. Genetik ve

Biyomühendislik Bölümü

M.Ü. Diş Hek. Fak. Pedodonti A.D.

I.Ü. Diş Hek. Fak. Pedodonti A.D.

Yukarıdaki jüri kararı Enstitü Yönetim Kurulu'nun 06.05.2015 tarih ve 1. sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Feyza ARICIOĞLU
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

F. Aricioğlu.

BEYAN FORMU

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

06.04.2015

PINAR KULAN



ÖNSÖZ

Marmara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Pedodonti Anabilim Dalı'na girişimde büyük desteği olan, Pedodonti eğitimini en iyi şekilde almamız için gerekli ortam ve şartları sağlayan, klinik deneyimlerinin yanı sıra hayata dair tecrübelerinden de her zaman yararlandığım değerli hocam Pedodonti Anabilim Dalı Başkanı Sayın **Prof. Dr. İlknur TANBOĞA**'ya

Doktora eğitimim boyunca ve tez çalışmam sırasında bana büyük bir özveri ile destek olan; samimiyetini, bilgi ve tecrübesini benden esirgemeyerek akademik deneyimi ve önerileri ile bana yol gösteren, sevgisini ve iyi niyetini her zaman hissettiğim çok değerli danışman hocam Sayın **Prof. Dr. Betül KARGÜL**'e,

Pedodonti doktora eğitiminin disiplinini en iyi şekilde almamız için çaba gösteren ve bana sayısız katkıları olan değerli hocalarım Sayın **Prof. Dr. Serap AKYÜZ** ve **Prof. Dr. Ali MENTEŞ**'e,

Tezimin planlanması ve gerçekleştirilebilmesi için tüm imkanlarını kullanarak tüm tez çalışmam boyunca daima yanımda bulunan, tezim için değerli vaktini ayıran ve laboratuvar koşullarını sağlayan, fikirlerini ve emeklerini esirgemeyen Yeditepe Üniversitesi Genetik ve Biyomühendislik bölümü Öğretim Üyesi Sayın **Prof. Dr. Gamze TORUN KÖSE**'ye ve tezimin laboratuvar çalışmalarında, tezimi kendi tezi gibi sahiplenerek bilgisini ve tecrübesini sınırsızca paylaşan, emeklerinin karşılığını asla ödeyemeyeceğim Yeditepe Üniversitesi Genetik ve Biyomühendislik bölümü araştırma görevlisi Sayın **Araş. Gör. Özge KARABIYIK**'a

Tez jüri komitemde bulunan İstanbul Üniversitesi Pedodonti Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın **Prof. Dr. Oya AKTÖREN**'e

Tüm klinik ve akademik çalışmalarım boyunca bana daima yardımcı ve destek olan Sayın **Yrd. Doç. Dr. Sertaç PEKER**, **Yrd. Doç. Dr. Işıl Özgül KALYONCU** ve **Yrd.**

Doç. Dr. Eda HAZNEDAROĞLU, Dr. Figen EREN GİRAY ve Dr. Başak DURMUŞ'a

Pedodonti Anabilim Dalı'na girdiğim ilk günden beri bilimsel ve mesleki alandaki birlikteliğimizin ötesinde dostluklarını, sevgilerini paylaştığım ve birlikteliğimizden güç aldığım **Canan DUMAN, Berna GÖKKAYA, Edibe EGİL, Elif Gizem AKTEPE, Ezgi ÇEKMEGELİ ve Belen ŞİRİNOĞLU ÇAPAN'a**

Ayrıca doktora hayatımın pek çok mutlu ve hüzünlü günlerini paylaştığım tüm asistan arkadaşlarıma ve **Bahtişen ÜRER'e**

Beni her daim en iyi koşullarda yetiştiren, hayatım boyunca attığım her adımda sonsuz sevgi ve fedakârlığı ile bana destek olan, bugünlere gelmemi sağlayan canım annem **Zülal KULAN** ve canım babam **Ahmet KULAN'a**

Hayatımdaki en iyi dostum ve gece gündüz tüm sıkıntılarımı paylaşan, yardım etmek için elinden geleni yapan canım kardeşim **Mehmet Çağlar KULAN'a**

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez, Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Komisyonu Başkanlığı tarafından SAG-C-DRP-280214-0036 numaralı proje ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	i
İÇİNDEKİLER	iii
ŞEKİL LİSTESİ	xiv
RESİM LİSTESİ	xvi
TABLO LİSTESİ	xx
1. ÖZET	1
2. SUMMARY	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER	6
4.1.Doku Mühendisliği	6
4.2.Kök Hücre Tanımı ve Özellikleri.....	7
4.2.1.Kök hücre sınıflandırması	10
4.2.1.1.Embriyonik kök hücreler (EKH).....	10
4.2.1.2.Erişkin (Somatik) kök hücreler	11
4.2.2.Dental dokulardan izole edilen kök hücreler	12
4.2.2.1.Periodontal ligamentten alınan kök hücreler (PDLKH).....	14
4.2.2.2.Diş pulpasından elde edilen kök hücreler (DPKH).....	15
4.3.Rejeneratif Tedaviler ve Kök Hücrelerin Pulpa - Dentin Kompleksindeki Etkisi.....	18

4.3.1.Rejeneratif tedavilerde biyoaktif molekül ve MTA kullanımı.....	21
4.4.MTA’nın Genel Özellikleri.....	23
4.4.1.MTA’nın kimyasal yapısı	23
4.4.2.MTA’nın fiziksel özellikleri	25
4.4.2.1.Çözünürlük.....	25
4.4.2.2.Sıkıştırma dayanıklılığı	26
4.4.2.3.Bükülme dayanıklılığı.....	27
4.4.2.4.pH.....	27
4.4.2.5.Radyoopasite... ..	27
4.4.2.6.Sızdırmazlık özelliği	28
4.4.2.7.Mikrosertlik.....	28
4.4.2.8.Antibakteriyel ve antifungal özellikleri	29
4.5.MTA’nın Hazırlanması ve Sertleşmesi	30
4.5.1.MTA’nın sertleşme mekanizması ve hidratasyonu.....	31
4.5.1.1.Karıştırma süreci	33
4.5.1.2.Uyku süreci.... ..	34
4.5.1.3.Sertleşme süreci	35
4.5.1.4.Soğuma süreci	36

4.5.1.5.Yoğunlaşma süreci	36
4.5.2.MTA'ya eklenen hızlandırıcılar (akseleratörler)	38
4.5.2.1.Kalsiyum klorid (CaCl_2)	39
4.5.2.2.K-Y Jelly	39
4.5.2.3.Disodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4).....	40
4.5.2.4.Kalsiyum laktat glukonat (CLG).....	40
4.5.2.5.Sodyum hipoklorit jel.....	41
4.5.2.6.Kalsiyum nitrit/nitrat.....	41
4.5.3.MTA'nın sertleşme süresinin ölçülmesi	41
4.5.3.1.Gillmore aparatı (Gillmore iğnesi).....	41
4.5.3.2.Vicat aparatı (Vicat iğnesi)	42
4.5.3.3.Otomatik Vicat iğnesi.....	43
4.6.MTA'nın Klinik Kullanım Alanları	44
4.7.MTA'nın Biyolojik Uyumu (Biyouyumluluk)	45
4.7.1.Biyouyumluluk ve biyouyumluluk testleri.....	47
4.7.2.Sitotoksisite testleri	48
4.8.MTA'nın Rejeneratif Potansiyeli.....	49
4.8.1.MTA'nın osteo/odontojenik farklılaşma belirteçleri	51

4.8.1.1.Alkalen fosfataz (ALP)	54
4.8.1.2.Kollajen Tip 1	54
4.8.1.3.Dentin sialofosfoproteini (DSPP)	55
4.8.1.4.Osteokalsin (Ocn).....	55
4.8.1.5.Osteonektin....	55
4.8.1.6.Kalsiyum (Ca)	55
5. GEREÇ VE YÖNTEM.....	57
5.1.Gereç.....	57
5.1.1. Materyal.....	57
5.1.2.Sertleşme süresini kısaltmak için kullanılan hızlandırıcılar.....	57
5.1.3.Sertleşme süresi belirleme deneyinde kullanılan cihazlar	57
5.1.4.Dişlerin laboratuvara transferi için kullanılan gereçler.....	57
5.1.5.İnsan diş pulpa kök hücrelerin izolasyonunda kullanılan gereçler	57
5.1.6.Alt-kültür (pasajlama) işleminde kullanılan gereçler.....	58
5.1.7.Hücre sayımında kullanılan gereçler.....	58
5.1.8.Diş pulpa kök hücrelerinin dondurulması işleminde kullanılan gereçler	59
5.1.9.Akış sitometri analizlerinde kullanılan antikor ve gereçler	59
5.1.10.Hücre canlılık ve çoğalma testlerinde kullanılan gereçler	59

5.1.11.SEM (Taramalı Elektron Mikroskop) için gerekli gereçler	60
5.1.12.ALP tayini için gereçler	60
5.1.13.Von Kossa boyaması için gerekli gereçler	60
5.1.14.Gerçek Zamanlı Polimer Zincir Reaksiyonu (GZ-PZR) için gerekli gereçler	61
5.1.15.Araştırmada kullanılan cihazlar	61
5.2.Yöntem.....	62
5.2.1. Farklı hızlandırıcılar ile hazırlanan MTA örneklerinin sertleşme süresinin belirlenmesi.....	62
5.2.1.1.Sertleşme süresinin belirleneceği MTA örneklerinin hazırlanması	62
5.2.1.2.Sertleşme sürelerinin ölçülmesi	66
5.2.2.Daimi diş pulpa kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin izolasyonu	62
5.2.3.Daimi diş pulpa kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin alt-kültür işlemi (Pasajlama).....	70
5.2.4.Daimi diş pulpa kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin sayımı	71
5.2.5.Daimi diş pulpa kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin dondurularak saklanması...	72
5.2.6.Daimi diş pulpa kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin karakterizasyon çalışmaları.....	73
5.2.6.1.Akış sitometrik analizler	73
5.2.7.Canlılık ve çoğalma deneyi.....	74

5.2.7.1.Canlılık ve çoğalma deneyi için farklı hızlandırıcılar ile MTA örneklerinin hazırlanması.....	74
5.2.7.2.Canlılık ve çoğalma deneyi için hücre ekimi.....	76
5.2.7.3.Sitotoksiste (MTS) testi	76
5.2.8.Taramalı elektron mikroskop (SEM) analizi:	77
5.2.9.Farklılaşma deneyi	80
5.2.9.1.Farklılaşma deneyleri için osteo/odontojenik besiyerinin hazırlanması	80
5.2.9.2.Farklılaşma deneyleri için farklı hızlandırıcılar ile MTA örneklerinin hazırlanması.....	81
5.2.9.3.Farklılaşma deneyi için hücre ekimi	83
5.2.9.4.Farklılaşma deneyi öncesi hücre canlılık ve çoğalma testi (MTS)	83
5.2.9.5.Alkalin Fosfataz (ALP) tayini	84
5.2.9.6.Von Kossa boyaması.....	86
5.2.9.7. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR).....	88
5.2.9.8.Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (GZ-PZR)	96
5.3.İstatistiksel İncelemeler.....	98
6. BULGULAR	99
6.1.Hücre Morfolojisi ve Çoğalma Özellikleri	99
6.2.Hücrelerin İmmunofenotipik Özellikleri.....	100

6.3.MTA Örneklerinin Sertleşme Süresi.....	101
6.4.Hücrelerin Canlılık ve Çoğalma Özellikleri	103
6.5.SEM Görüntü Sonuçları.....	108
6.6.Hücrelerin Osteo/odontojenik Ortamda Canlılık ve Çoğalma Özellikleri.....	114
6.7.Hücrelerin Osteo/odontojenik Hücelere Farklılaşma Potansiyeli.....	117
6.7.1.ALP testi sonuçları.....	117
6.7.2.Von Kossa boyaması.....	120
6.7.3.Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) sonuçları	122
6.7.4.Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (GZ-PZR) sonuçları.....	124
7. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	126
7.1.Sonuçlar....	154
8. KAYNAKLAR	158
9. EKLER.....	183
10. ÖZGEÇMİŞ.....	189
10.1.Uluslararası ve ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler.....	190
10.2.Ulusal ve uluslararası yayınlar	190

KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

ALP	Alkalen Fosfataz
APKH	Apikal Papilla Kök Hücreleri
ASTM	American Society for Testing and Materials
BiO ₂	Bizmut oksit
BMP	Kemik Morfogenetik Proteini
C ₂ S	Di-kalsiyum Silikat Kimyasal Formülü
C ₃ S	Tri-kalsiyum Silikat Kimyasal Formülü
Ca	Kalsiyum Kimyasal Formülü
CaCl ₂	Kalsiyum klorid
Ca(OH) ₂	Kalsiyum Hidroksit Kimyasal Formülü
CaO	Kalsiyum Oksitin Kimyasal Formülü
CD	Konjuge Monoklonal Antikor
CHX	Klorheksidin
CLG	Kalsiyum laktat glukonat
CO ₂	Karbondioksit
DFKH	Diş Folikül Kök Hücreleri
DGKH	Diş Germ Kök Hücreleri

DKH	Dental Kök Hücre
DMEM	Dulbecco's Modifiye Eagle Besiyeri
DMP	Dentin Matriks Proteini
DMSO	Dimetilsülfoksit
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Tuz Solüsyonu
DPKH	Diş Pulpa Kök Hücre
DSPP	Dentin Sialofosfoproteini
EDTA	Etilen Diamin Tetraasetik Asit
EKH	Embriyonik Kök Hücreler
FBS	Fetal Sığır Serumu
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi
FDI	Uluslararası Dişhekimliği Birliği
FGF	Fibroblast Büyüme Faktörü
FITC	Fluoresan İzotiyosiyonat
GDF	Büyüme Farklılaştırma Faktörü
GMTA	Gri MTA
GZ-PZR	Gerçek Zamanlı Polimer Zincir Reaksiyonu
HLA	İnsan Lökosit Antijeni

hOB	İnsan Osteoblast Hücreleri
IL	İnterlökin
ISCT	International Society of Cellular Therapy
ISO	Uluslararası Standardizasyon Organizasyonu
MKH	Mezenkimal Kök Hücreler
MTA	Mineral Trioksit Aggregat
MUC-18	Melanom Hücre Adezyon Molekülü 18
Na ₂ HPO ₄	Disodyum hidrojen fosfat
Na ₂ O	Sodyum Oksit
NF-κB	Nükleer Faktör kappa B
nm	Nanometre
Ocn	Osteokalsin
P	Pasaj
PBS	Phosphate Buffered Tuz Solüsyonu
PE	Fikoeritrin
PDLKH	Periodontal ligament kök hücreleri
PICP	Karboksiterminal propeptid
PINP	Aminoterminal propeptid

PNL	Polimorfonükleer Lökositler
P ₂ O ₅	Fosfor Pentoksit'in Kimyasal Formülü
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SEM	Taramalı Elektron Mikroskop
SDKH	Süt Dişlerinden Alınan Kök Hücreler
STRO-1	Fibroblast Yüzey Belirleyici
TBE	Tris Borik Asit
TGF- β	Dönüştürücü Büyüme faktörü- β
TNF	Tümör Nekroz Faktör
UV	Ultraviyole Işını
VCAM-1	Vasküler Hücre Adezyon Molekülü 1
WMTA	Beyaz MTA
α - SM actin	α -Düz Kas Actin
α -MEM	α -Minimum Essential Besiyeri

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1 Totipotent, pluripotent ve multipotent kök hücreler.....	9
Şekil 2 Kök hücre kaynakları.....	10
Şekil 3 Dental kaynaklı kök hücreler.....	14
Şekil 4 Rejeneratif endodonti teknikleri	20
Şekil 5 MTA'nın hidratasyon basamakları	32
Şekil 5a Jelimsi tabaka oluşumu.....	34
Şekil 5b Uyku süreci.....	35
Şekil 5c Sertleşme süreci	35
Şekil 5d Soğuma süreci	36
Şekil 5e Yoğunlaşma süreci.....	37
Şekil 6 Gillmore iğnesi	42
Şekil 7 Vicat iğnesi	43
Şekil 8 Otomatik Vicat iğnesi.....	44
Şekil 9 İnsan daimi diş pulpasından izole edilen MKH'lerin P3'deki immunofenotipik özelliklerinin akış sitometri sonuçları.....	99
Şekil 10 Farklı hızlandırıcılar ve sıvılar ile hazırlanan MTA örneklerinin sertleşme süreleri.....	102
Şekil 11 MTS ile 1., 3. ve 7. günlerde hücre sayısında çoğalma analizi.....	107

Şekil 12 MTS ile 1., 7. ve 21. günlerde hücre sayısında çoğalma analizi.	117
Şekil 13 ALP aktivite değerlerinin 7. ve 14. gün karşılaştırması	120
Şekil 14 MTA örneklerinin 14. ve 21. günlerdeki Kollajen Tip 1 aktivitesi.	124
Şekil 15 MTA örneklerinin 14. ve 21. günlerdeki DSPP aktivitesi.....	125

RESİM LİSTESİ

Resim 1 Hassas terazi ile hızlandırıcıların ağırlığının ölçülmesi	63
Resim 2 Beyaz ProRoot MTA (Dentsply Tulsa Dental, Johnson City, TN)	63
Resim 3 İzotonik serum fizyolojik	64
Resim 4 Anestezik solüsyon (Maxicaine)	64
Resim 5 K-Y Jelly	65
Resim 6 Kalsiyum klorid	65
Resim 7 Disodyum hidrojen fosfat	66
Resim 8 Vicat cihazı ve Vicat halkası	67
Resim 9 Sertleşme süresinin belirlenmesi	67
Resim 10 Pulpa dokusunun steril ekskavatör ile çıkarılması ve pulpa dokusunun parçalara ayrılması	69
Resim 11 Pulpa dokusunun penisilin/streptomisin içeren α -MEM (%10 FBS) besiyerine alınması	69
Resim 12 Mezenkimal kök hücrelerin 1800 rpm’de santrifügasyonu	70
Resim 13 Hemositometre	71
Resim 14 Işık mikroskopunda hücre sayımı	72
Resim 15 Akış sitometri cihazı	74

Resim 16 Canlılık ve çoğalma deneyi için her bir güne 4 adet hazırlanan 2 mm yüksekliğindeki MTA örnekleri.....	75
Resim 17 MTS solüsyonu eklendikten 2 saat sonraki MTA örnekleri üzerindeki hücrelerin görüntüsü.....	77
Resim 18 SEM görüntülerinin alınması için farklı hızlandırıcılar ile MTA örneklerinin hazırlanması	78
Resim 19 SEM görüntülemesi için hazırlanan MTA örnekleri üzerine DPKH hücrelerinin ekimi	79
Resim 20 Altın-Palladyum ile kaplanmış SEM örnekleri	80
Resim 21 GZ-PZR deneyi için, üretici firmanın tavsiyesi doğrultusunda hazırlanan MTA örnekleri	82
Resim 22 MTS solüsyonu eklendikten 2 saat sonraki osteo/odontojenik besiyeri içeren kaplardaki MTA örnekleri üzerindeki hücrelerin görüntüsü	84
Resim 23 ALP örneklerinin sonikasyon işlemi	85
Resim 24 ALP belirleme solüsyonu eklendikten sonraki görüntüsü.....	86
Resim 25 Fiksasyon işlemleri için yuvarlak lameller üzerindeki farklı hızlandırıcılar ile hazırlanan MTA örneklerinin PBS ile yıkanması	87
Resim 26 GeneJET RNA purification kit.....	89
Resim 27 MTA örneklerinden elde edilen hücre süspansiyonunun santrifügasyonu.....	90
Resim 28 PZR cihazında cDNA sentezinin yapılması	92
Resim 29 PZR için hazırlanmış karışımın buz içerisinde bekletilmesi	94

Resim 30	Primerlerin optimum sıcaklıklarını belirlemek için yapılan Gradyan PZR	95
Resim 31	Örneklerin jel elektroforezinde yürütülmesi	96
Resim 32	Hazırlanan karışımın GZ-PZR cihazında okutulması	98
Resim 33	Hücre popülasyonunun oluşturduğu kolonilerin inverted mikroskop ile alınan görüntüleri	99
Resim 34a	%10 CaCl ₂ ile hazırlanan MTA örneğinin SEM görüntüsü.	109
Resim 34b	K-Y Jelly ile hazırlanan MTA örneğinin SEM görüntüsü.	110
Resim 34c	Na ₂ HPO ₄ ile hazırlanan MTA örneğinin SEM görüntüsü	111
Resim 34d	Distile su ile hazırlanan MTA örneğinin SEM görüntüsü	112
Resim 34e	%5 CaCl ₂ ile hazırlanan MTA örneğinin SEM görüntüsü	113
Resim 35a	Gümüş nitrat solüsyonu sonrası kalsiyum depozitlerinin oluşturduğu siyah görüntü.	121
Resim 35b	MTAörneklerinin Von Kossa boyaması yapıldıktan sonraki görüntüsü....	121
Resim 36a	Odontoblast hücrelerinin DNA'sı üzerindeki DSPP'e ait olan özgül bölgenin çeşitli sıcaklıklarda çoğaltılan bant görüntüsü.	122
Resim 36b	Odontoblast hücrelerinin DNA'sı üzerindeki Kollajen Tip 1 ve β Aktin'e ait olan özgül bölgenin çeşitli sıcaklıklarda çoğaltılan bant görüntüsü..	122
Resim 37a	β Aktin ve Kollajen Tip 1'e ait 14. gün jel görüntüsü.....	123

Resim 37b β Aktin ve Kollajen Tip 1'e ait 21. gün jel görüntüsü.	123
Resim 37c DSPP primeri için 14. ve 21. gün jel görüntüsü.	124

TABLO LİSTESİ

Tablo 1 Kullanılan kök hücre belirteçleri için hücrelerin pozitiflik yüzdeleri	101
Tablo 2 Farklı hızlandırıcılar ve sıvılar hazırlanan MTA örneklerinin sertleşme sürelerinin minimum (min), maksimum (mak), ortalama (ort) ve standart sapma (SS) değerleri.....	102
Tablo 3 Kullanılan hızlandırıcıların ikili karşılaştırması	103
Tablo 4 Farklı hızlandırıcılar ile hazırlanan MTA örneklerinin MTS testi 1., 3. ve 7. gün minimum (min), maksimum (mak), ortalama (ort), standart sapma (SS) ve p değerleri	104
Tablo 5 MTS testi 1. günde grupların birbirleri ile karşılaştırılması.....	105
Tablo 6 MTS testi 3. günde grupların birbirleri ile karşılaştırılması.....	106
Tablo 7 MTS testi 7. günde grupların birbirleri ile karşılaştırılması.....	107
Tablo 8 Farklı hızlandırıcılar ile hazırlanan MTA örneklerinin MTS testi 1., 7. ve 21. gün minimum (min), maksimum (mak), ortalama (ort), standart sapma (SS) ve p değerleri.....	115
Tablo 9 MTS testi 1., 7. ve 21. gün sonuçlarının karşılaştırılması.....	115
Tablo 10 ALP aktivite minimum (min), maksimum (mak), ortalama (ort), standart sapma (SS) ve p değerleri	118
Tablo 11 ALP aktivite 7. ve 14. gün değerleri arasındaki farklılıklar.....	119
Tablo 12 MTA örnek grupları içinde 7. ve 14. gündeki ALP aktivitesinin değerlendirilmesi.....	119

Sertleşme Süresi Farklı Hızlandırıcılar ile Kısaltılan Mineral Trioksit Agregatın Daimi Diş Pulpa Kaynaklı Kök Hücreler Üzerindeki Sitotoksitesinin ve Rejeneratif Kapasitesinin İncelenmesi

Öğrencinin Adı: Pınar KULAN
Danışmanı: Prof.Dr. Betül KARGÜL
Anabilim Dalı: Pedodonti A.D.

1. ÖZET

Amaç: Farklı hızlandırıcılar (%10 kalsiyum klorid (CaCl_2), %5 CaCl_2 , K-Y Jelly, disodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4)) ile sertleşme süresi kısaltılan Beyaz ProRoot MTA'nın (Dentsply Tulsa Dental, Johnson City, TN) daimi diş pulpa kök hücreler üzerindeki sitotoksik ve osteo/odontojenik farklılaşma kapasitelerinin karşılaştırılmasıdır. **Gereç ve Yöntem:** Sertleşme süresi Vicat iğnesi ile ölçülen MTA'nın sitotoksitesi 1. 3. ve 7. günlerde MTS testi ile incelenmiştir. Rejeneratif kapasitesinin incelenmesi amacıyla Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (GZ-PZR) ile Kollajen Tip 1 ve Dentin Sialofosfoprotein (DSPP), Alkalen Fosfataz (ALP) analizi, Von Kossa görüntülemesi yapılmıştır. SPSS 18.0 programı kullanılarak Mann–Whitney ve Kruskal Wallis testi ile istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. **Bulgular:** %10 CaCl_2 ile hazırlanan MTA en kısa sertleşme süresi göstermiştir ($p<0.05$). %10 CaCl_2 , %5 CaCl_2 , Na_2HPO_4 ve distile su ile hazırlanan MTA örneklerinde hücre sayısı artış göstermiştir ($p<0.05$). MTS sonuçlarına göre en az hücre, K-Y Jelly ile hazırlanan MTA da görülmüştür ($p<0.05$). GZ-PZR ve ALP aktivitesi ile belirlenen farklılaşma kapasitesi, %5 CaCl_2 ve Na_2HPO_4 ile hazırlanan MTA distile su ile hazırlanan MTA'ya göre daha üstün bulunmuştur ($p<0.05$). **Sonuçlar:** Farklı hızlandırıcılar ile sertleşme süresi kısaltılan MTA'nın biyouyumluluğunun ve osteo/odontojenik farklılaşma kapasitesinin incelendiği bu ilk çalışmada %5 CaCl_2 ve Na_2HPO_4 'in alternatif olabileceği gösterilmiştir. Uzun takip süreli klinik çalışmalarla da bu sonuçlar desteklenmelidir. **Anahtar Kelimeler:** MTA, hızlandırıcı, sertleşme süresi, biyouyumluluk, odontojenik farklılaşma

The Evaluation of Biocompatibility and Odontogenic Differentiation of Accelerated Mineral Trioxide Aggregate on Stem Cells from Human Dental Pulp

Student's name: Pınar KULAN

Supervisor: Prof.Dr. Betül KARGÜL

Department: Pediatric Dentistry

2. SUMMARY

Aim: To compare the effect of white ProRoot MTA (Dentsply Tulsa Dental, Johnson City, TN), setting time of which has been reduced by adding certain types of accelerants including 10% calcium chloride (CaCl_2), 5% CaCl_2 , K-Y Jelly, disodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4), on human dental pulp stem cells in terms of cytotoxicity and odontogenic differentiation. Material-methods: Setting time of MTA samples has been determined with a Vicat apparatus. On the 1st, 3rd and 7th day, the cytotoxicity of MTA samples was analyzed with MTS assay. To compare the regenerative effect of MTA samples Type I Collagen and Dentin sialophosphoprotein (DSPP) analysis with RealTime-PCR, Von Kossa and Alkaline phosphatase (ALP) tests were performed. The results were statistically evaluated by SPSS 18.0 using Mann–Whitney test and Kruskal Wallis test. Results: MTA mixed with 10% CaCl_2 showed the lowest setting time ($p<0.05$). According to MTS results, MTA mixed with K-Y Jelly demonstrated the lowest cell viability ($p<0.05$). The cell viability of MTA mixed with distilled water, 5% CaCl_2 , 10% CaCl_2 and Na_2HPO_4 increased significantly through time ($p<0.05$). According to RealTime-PCR results and ALP activity, MTA mixed with 5% CaCl_2 and Na_2HPO_4 was superior to that of pure MTA ($p<0.05$). Conclusions: This study investigates the biocompatibility and odontogenic differentiation capability of MTA which is accelerated using different types of accelerators. %5 CaCl_2 ve Na_2HPO_4 are considered to be alternatives to those accelerators used in MTA. However, long-term follow-up clinical studies are also required for clinical use.

Key Words: MTA, accelerator, setting time, biocompatibility, odontogenic differentiation

3. GİRİŞ VE AMAÇ

Tüm dünyada koruyucu diş hekimliği uygulamaları yaygınlaşmasına rağmen süt dişi ve daimi dişler çürük veya travma nedeniyle erken dönemde kaybedilmektedir. (McDonald, 2000). Diş çürüğü, dişlerin yapısal bütünlüğünü geri dönüşümsüz olarak bozan genel bir problemdir. Çürük dişlerin restorasyonu sırasında kullanılan bazı dental materyaller diş pulpa hücrelerinin ölümüne neden olabilmektedir. Aşırı madde kaybı olan birçok dişte ise endodontik tedavinin yerine dişin çekimi tercih edilerek, diş kaybı protez veya implant uygulamaları ile telafi edilmektedir. Bu kayıpların önlenmesi amacıyla, pulpa-dentin kompleksinin rejenerasyonu diş hekimliğinin ve endodontinin temel hedeflerinden biri haline gelmiştir (Cristian ve ark., 2011; Murray ve ark., 2007). Diş pulpası tedavileri ardından pulpada meydana gelen sert doku bariyeri, kaybolan odontoblast hücrelerinin yeniden oluşması ve kaybedilmiş olan dentin dokusunun tekrar oluşması bir çeşit rejenerasyondur. Bu da günümüzde rejeneratif endodontik olarak tanımlanmaktadır (Estrela ve ark., 2011).

Kaybedilen dokunun tekrar geri kazanılmasını sağlayan kök hücreler son yıllarda diş hekimliği çalışmalarında kullanılmaya başlanmıştır (Shete ve ark., 2015). İlk kez 2000 yılında Gronthos ve arkadaşları tarafından tanımlanan diş pulpa kök hücreleri hücre kültür çalışmalarında insan dişindeki dentin-pulpa kompleksine benzer yapı oluşturabildiğinden araştırmacıları kök hücre araştırmalarına yönlendirmiştir (Gronthos ve ark., 2000).

Daimi dişlerde olduğu gibi süt dişlerinde de pulpanın uygun materyallerle tedavi edilirken öncelikle dişlerin vitalitesinin korunması amaçlanmaktadır (Canoğlu, 2008). Vital pulpa tedavilerinde pulpa dokusu üzerine sıklıkla kalsiyum hidroksit (Ca(OH)_2) içeren ve hızlı sertleşme özelliği olan patlar yerleştirilmektedir. Ancak bu materyallerin dentin yüzeyine zayıf bağlandıkları, mikro sızıntıyı önleyemedikleri ve bir süre sonra restorasyon altında çözündükleri görülmüştür (De Souza Costa ve ark., 2008; Ghoddusi ve ark., 2014; Rao A ve Shenoy, 2009; Roberts ve ark., 2008; Torabinejad ve ark.,

1995). Bu nedenlerle kalsiyum hidroksite alternatif olabilecek materyaller konusundaki arayışlar son 10 yıl içerisinde hız kazanmıştır. Araştırmacılar ideal bir pulpa kaplama materyalinin yaralanmış pulpanın bakteriyel kontaminasyonunu önleyebilmesi ve aynı zamanda da reperatif dentin oluşumunu teşvik edici dentinojenik özelliğinin bulunması gerektiğini belirtmektedirler (Parirokh ve Torabinejad, 2010a).

Mineral Trioksit Agregat (MTA) kalsiyum hidroksite alternatif olarak geliştirilmiş; yüksek fiziksel dayanıma sahip oldukça popüler biyouyumlu bir materyaldir. Başlangıçta kök ucu dolgu materyali olarak geliştirilen MTA, sahip olduğu özellikler sayesinde klinikte zamanla, vital pulpa tedavilerinde, apeksifikasyon işlemlerinde, kök perforasyonu tedavilerinde, rezorbsiyon tedavilerinde ve kök kanal dolgu maddesi olarak da tercih edilen bir materyal haline gelmiştir (Sarkar ve ark., 2005; Torabinejad ve ark., 1995).

Ancak sertleşmesi için uzun bir süre gerekmesi MTA'nın en büyük dezavantajlarından biri olarak kabul edilmektedir. Uzun sertleşme süresi klinik olarak pek çok probleme davetiye çıkarabilmektedir. Çünkü bu süre zarfında pulpanın ağız florasındaki iritanlarla karşı karşıya gelme riski artacaktır. Özellikle vital pulpa tedavilerinde MTA'nın üzerine hemen restoratif bir ajan yerleştirmesinin gerekli olduğu durumlarda bu süre problem yaratacaktır (Kayahan ve ark., 2009).

Bu klinik dezavantajı ortadan kaldırmak için MTA tozu farklı hızlandırıcılar ile karıştırılmaktadır ve materyalin sertleşme zamanında farklılıklar gözlenmektedir (Torabinejad ve ark., 2010). Hem doku uyumu hem de rejeneratif kapasitesi yüksek olan MTA'ya eklenen farklı hızlandırıcıların fiziksel özellikleri ve biyouyumluluğu ile ilgili çalışmalar olmakla birlikte (Jafarnia ve ark., 2009; Kang ve ark., 2013; Karimjee ve ark., 2006; McNamara ve ark., 2010; Mehrvarzfar ve ark., 2014) ancak hızlandırıcıların odontojenik farklılaşma kapasitesinin insan daimi diş pulpa kök hücresi üzerinde incelendiği herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu tez çalışmasında; farklı hızlandırıcılar (%10 CaCl₂, %5 CaCl₂, K-Y Jelly ve Na₂HPO₄) ile sertleşme süresi (Vicat iğnesi ile ölçülerek) kısaltılan Beyaz ProRoot MTA'nın (Dentsply Tulsa Dental, Johnson City, TN) daimi diş pulpasından elde edilen mezenkimal kök hücre üzerindeki sitotoksitesinin ve osteo/odontojenik farklılaşma kapasitesinin incelenmesi ve karşılaştırılması amaçlanmıştır.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Doku Mühendisliği

Doku mühendisliği ve yenileyici tedavi yaklaşımı genel olarak uygun biyomalzemeler ve uygun doku öncülleri ile doku hasarlarını onarma prensibine dayanmaktadır. Amerikan Ulusal Sağlık Örgütünün (NIH) tanımlamasına göre doku mühendisliği; dokunun içinde büyüyebileceği bir yapı iskeletinin oluşturulmasını takiben, hücrelerin buraya ekilmesi, bu yapının hücrelere besin ve oksijen desteği sağlayacak biyoreaktörlere yerleştirilmesi ve hücreler, iskeleti dolduracak kadar çoğaldığında yapının biyoreaktörden çıkarılarak vücuda yerleştirilmesidir (Howard ve ark., 2008).

Biyoloji, mühendislik ve tıp ilkelerini birleştirerek, doğumsal deformiteler, hastalıklar ya da travma sonucu kaybedilen dokuların tamirine olanak tanıyan doku mühendisliğinin asıl amacı, normal doku fonksiyonunun sağlanmasıdır (Saber Sel-D, 2009).

“Doku mühendisliği” kavramı ilk olarak 1993 yılında Langer ve Vacanti tarafından doku iskelesi ile veya doku iskele olmaksızın hücre nakli ile yeni doku ve organların oluşturulması süreci için kullanılmıştır (Langer ve ark., 1993). Diş hekimliğindeki doku mühendisliğinin amacı, konjenital anomaliler, travma ya da hastalıklar sebebiyle kaybedilen dental, oral ve kraniofasial dokuların onarılması ya da yeniden oluşturulmasıdır. Vücudun diğer bölümlerinden farklı olarak ağız boşluğu ve diş, doku mühendisleri için rahat inceleme ve ulaşım kolaylığı gibi açık avantajlar sunmaktadır (Nakashima ve ark., 2005; Nakashima ve ark., 2003; Wang Y ve ark., 2012).

Doku mühendisliğinin üç ana unsuru; kök hücreler, doku iskelesi ve indükleyici morfojenetik sinyaller şeklinde tanımlanabilir (Nakashima ve ark., 2005). Diş ve periodonsiyumun oluşumunu başlatmak için tüm bu elemanların birleşerek, örnek

oluşumunu başlatmaları gerekmektedir (Nakashima ve ark., 2005; Saber Sel-D, 2009; Tabata, 2005).

Morfojenler, epitelyal-mezenşimal etkileşim sırasında morfogenezi düzenleyen ve ekstrasellüler olarak sentezlenen sinyallerdir. Morfojenetik sinyal ağı, BMP (Bone morphogenetic protein) gibi proteinleri ve FGF (Fibroblast growth factor), TNF (Tumor necrosis factor), TGF- β (Transforming growth factor- β) gibi büyüme faktörlerini içerir (Nakashima, 2005; Ohazama ve ark., 2004; Thesleff ve ark., 2002).

Ekstrasellüler matriksin taklidi olan doku iskeleleri, kök hücrelerin proliferasyonu ve farklılaşmasına yardımcı olması için büyüme faktörleri; beslenmeleri ve gelişmeleri için besin; bakteriyel gelişimi önlemek için de antibiyotik içermelidir. Bu özellikleri sağlayabilmek amacıyla yeterli poröziteye ve por genişliğine sahip olmalıdır. Doku iskelesinin istenilen en önemli özelliklerden biri ise, görevini yerine getirdikten sonra cerrahi olarak kaldırmaya gerek olmadan çözünür olmasıdır (Tabata, 2005).

Doğal ve sentetik biyomimetik olmak üzere iki çeşit doku iskelesi bulunmaktadır. Doğal yapı iskeleleri olarak kalsifiye donmuş kurutulmuş kemik, dekalsifiye donmuş kurutulmuş kemik, sığır mineral matriksi, sığırdan elde edilmiş hidroksiapatit kullanılırken, sentetik biyomimetik yapı iskelesi olarak hidroksiapatit (dense, poröz, rezorbe olabilen), trikalsiyum fosfat, sert doku replasman polimerleri, biyoaktif camlar (SiO_2 , CaO , Na_2O , P_2O_5), kalsiyum karbonat, kollajen, PLGA: poli(laktik-ko-glikolik asit), metil selüloz, kitosan ve mine matriks proteinleri kullanılmaktadır (Galler ve ark., 2011; Young ve ark., 2002).

4.2. Kök Hücre Tanımı ve Özellikleri

Kök hücre; kendi kendine devamlı bölünme yeteneğine sahip olan ve çeşitli doku hücrelerine farklılaşabilen özelleşmemiş hücre olarak tanımlanmaktadır (Blau ve ark., 2001; Gronthos ve ark., 2011; Kirschstein ve ark., 2001; Rimondini ve ark., 2009).

Kök hücrenin tanımlanması için kullanılan ölçütler:

- Kök hücreler bölünebilme ve kendilerini yenileyebilme yeteneğine sahiptir.
- Özelleşmemişlerdir.
- Kök hücreden elde edilen yavru hücre, özelleşmiş hücrelere kaynaklık edebilir.
- Hasar gören alıcıya nakledildikten sonra konak dokuyu işlevsel olarak çoğaltabilir.
- *In vivo* ortamda doku hasarı olmasa bile farklılaşmış kuşaklara katkı sağlama özelliği vardır (Karaöz ve ark., 2004; Kelly, 2007; Kirschstein ve ark., 2001; Morst, 2006).

Kök hücreleri laboratuvar çalışmalarında tanımlamak için kullanılan kriterler:

- 1) **Hücre yüzey belirteçleri:** Farklılaşma kümeleri ya da CD (Clusters of Differentiation) belirteçleri çoğunlukla kök hücrelerine özgün olarak bulunur.
- 2) **Belirli Enzimlerin Aktiviteleri:** Alkalen Fosfataz (ALP) ve Telomeraz gibi bazı enzimler kök hücrelerde normal hücrelerden daha fazla miktarlarda sentezlenmektedir.
- 3) **Gelişimsel süreçte önemli olan transkripsiyon faktörleri:** Kök hücreler devamlı çoğalabilme potansiyellerini koruyabilmek amacıyla bazı transkripsiyon faktörlerini daha fazla eksprese ederler.
- 4) **Farklılaşma Potansiyeli:** Kök hücrelerin *in vitro* ortamda uyarılarak farklı hücre tiplerine dönüşebildiklerinin tespit edilmesi gerekmektedir (Huang ve ark., 2011; Jiang ve ark., 2002; Thomson ve ark., 2011).

Kök hücrelerin, farklılaşma kapasiteleri farklılık gösterir (Şekil 1):

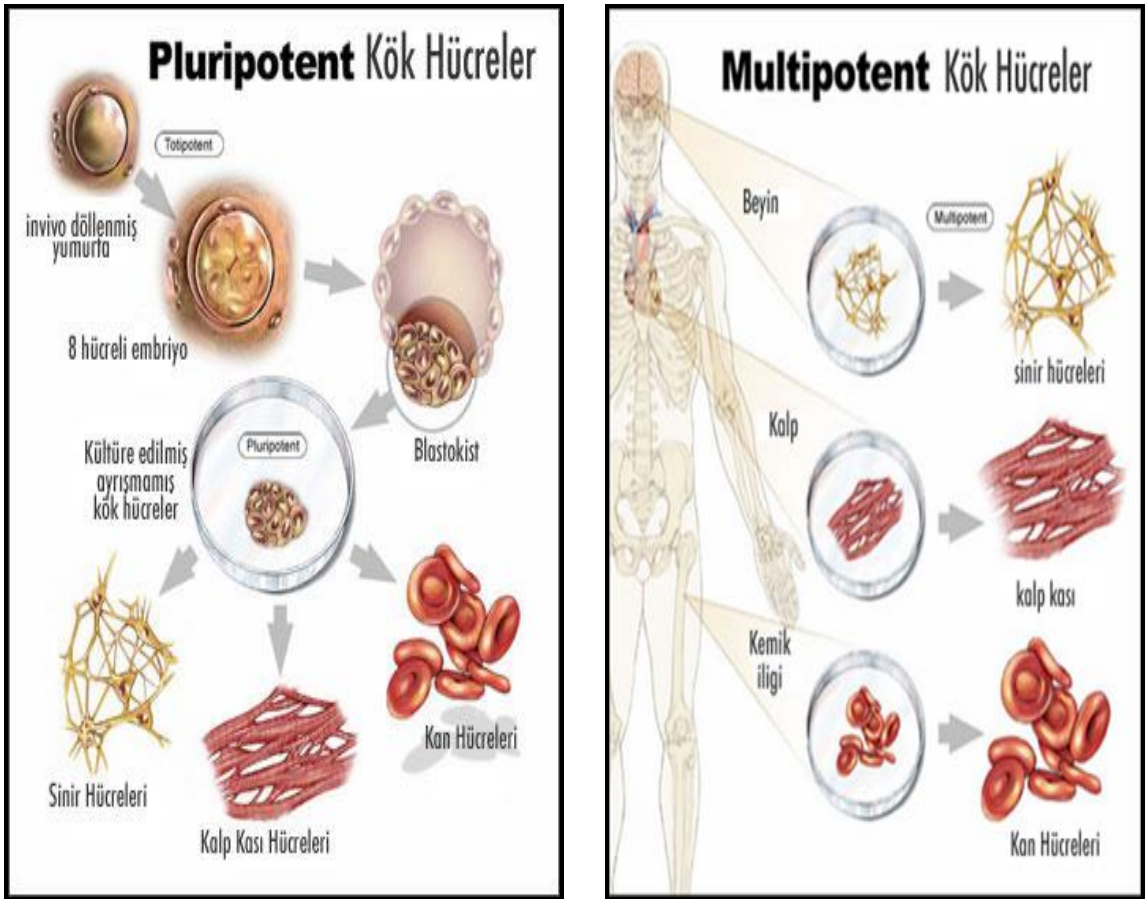
Totipotent kök hücreler, yumurta ve sperm hücresinin kaynaşmasıyla ortaya çıkar. Dölllenmiş yumurta hücresinin ilk birkaç bölünmesiyle oluşan hücreler totipotent hücrelerdir. Embriyonik hücre tiplerine dönüşebilirler.

Pluripotent kök hücreler, totipotent hücrelerin devamı şeklindedir. Mezodermal, ektodermal ve endodermal germ tabakalarından türeyen hücre tiplerine farklılaşabilirler.

Multipotent kök hücreler, sadece alındıkları doku tipiyle ilişkili belli sayıda hücrelere dönüşebilirler.

Oligopotent kök hücreler, lenfoid ve myeloid kök hücreler gibi az sayıda hücre grubuna dönüşebilirler.

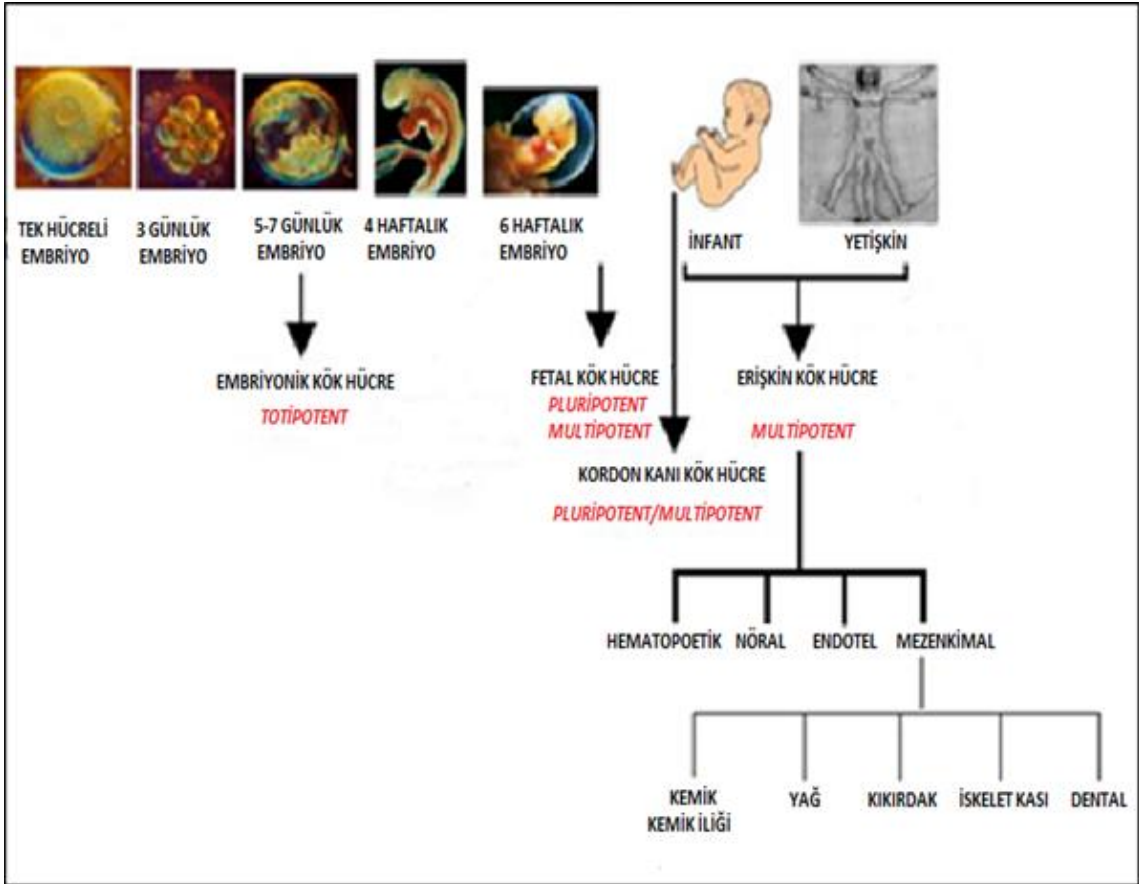
Unipotent kök hücreler, sadece tek hücre tipini kendileri oluşturabilirler (Karaöz, 2004; Kelly, 2007; Kirschstein ve ark., 2001).



Şekil 1 Totipotent, pluripotent ve multipotent kök hücreler (<http://www.kokhucrederneği.org.tr>, Erişim tarihi: 21.06.2014)

4.2.1. Kök hücre sınıflandırması

Kök hücreler kökenlerine göre embriyonik kök hücreler ve erişkin kök hücreler (dokuya özgü kök hücreler) olarak sınıflandırılmaktadır (Karaöz, 2004; Kelly, 2007; Rimondini ve ark., 2009) (Şekil 2).



Şekil 2 Kök hücre kaynakları (<http://www.celldiagram.net>, Erişim tarihi 30.06.2014)

4.2.1.1. Embriyonik kök hücreler (EKH): Gelişim sürecinin erken dönemindeki memeli embriyosundaki kök hücrelerden elde edilebilmektedir. Bu hücreler *in vitro* ortamda farklılaşma potansiyeline sahiptir. EKH fonksiyonel sinir hücreleri, pankreatik hücreler, kalp kası hücreleri, kan hücreleri, deri hücreleri, kemik ve kıkırdak hücreleri gibi birçok hücre tipine farklılaşabilmektedir (Hematti, 2011; Xu ve ark., 2011; Zabierowski ve ark., 2010).

Bazı etik sorunlar nedeniyle ülkemizde ve diğer bazı ülkelerde EKH'lerin kullanımının yasaklanmasından dolayı embriyonik kök hücrelerle ilgili bilimsel veriler yetersizdir (Thomson ve ark., 1998).

4.2.1.2. Erişkin (Somatik) kök hücreler: İnsanda farklı dokularda bulunan farklılaşmamış kök hücrelerdir. Bu hücreler kendilerini yenileyebilir ve bulundukları dokularda ihtiyaç duyulan hücrelere dönüşebilirler. Multipotent özellikte olup, sadece bulundukları doku ve organın tamirini ve devamlılığını sağlarlar (Alison ve ark., 2002; Can, 2008; Rao, 2004; Yu ve ark., 2007).

İzole edilen erişkin kök hücreleri:

- Kemik iliği (Batouli ve ark., 2003; Bianco ve ark., 2001; Iohara, 2004)
- Kordon kanı ve periferel kandan – Hematopoetik kök hücre (Bonnet, 2002; McCulloch EA, Till, 2005)
- Sinir dokusu (Fuchs ve ark., 2000; McCulloch E.A., Till, 2005; Muroyama ve ark., 2004; Sommer, 2004)
- Retina (Jasoni ve ark., 1996; McCulloch E.A., Till, 2005)
- İskelet kası (Lu ve ark., 2009; McCulloch, E.A., Till, 2005)
- Karaciğer, pankreas (Herrera ve ark., 2006; McCulloch, E.A., Till, 2005; Zulewski ve ark., 2001)
- Süt ve daimi diş pulpası (Gronthos ve ark., 2002; Huang ve ark., 2008; Huang GT-J ve ark., 2009; Iglesias-Linares ve ark., 2013; Jo ve ark., 2007; Song ve ark., 2012)
- Periodontal ligament (Huang GT-J ve ark., 2009; Iglesias-Linares ve ark., 2013; Tobita ve ark., 2008)
- Dişeti ve diş folikülü (Honda ve ark., 2010; Lindroos ve ark., 2008; Yao ve ark., 2008).

Erişkin kök hücre çalışmalarında mezenkimal kök hücreler (MKH) öne çıkmıştır. Kemik iliği stroması, mezenkimal kök hücrelerin elde edilmesinde en sık kullanılan doku kaynağıdır. Ancak kemik iliği dokusunun izolasyonu sırasında ve sonrasında

yaşanan güçlükler, araştırmacıları yeni bir kaynak arayışına sevk etmiştir. Bu nedenle, izolasyonu ve bulunması daha kolay olduğu düşünülen diş kökenli hücreler gündeme gelmiştir (Bianco ve ark., 2001; Gronthos ve ark., 2011; Huang GT-J ve ark., 2009).

ISCT (International Society of Cellular Therapy) tarafından MKH tanımlanmasında yaygın olarak kullanılan başlıca özellikler:

- ✓ Plastik yüzeye yapışması: Standart kültür koşulları altında plastik doku kültür kaplarına yapışmaktadır.
- ✓ Spesifik yüzey antijenlerinin ekspresyonu: MKH popülasyonunun %95 veya daha fazlasının CD105 (endoglin olarak bilinir), CD73 (ekto-5W'-nükleotidaz olarak bilinir), CD90 (Thy-1 olarak da bilinir) antijenleri için pozitif olması gerekmektedir. CD45, CD34, CD14 veya CD11b, HLA sınıf II, CD79 α veya CD19 ve gibi hematopoetik antijenlerdeki pozitiflik oranının %2'yi geçmemesi gerekmektedir.
- ✓ Multipotent farklılaşma potansiyeli: *In vitro* doku kültür ortamında osteoblast, nöron, adiposit ve kondroblastlara farklılaşmaktadır (Horwitz ve ark., 2005)

4.2.2. Dental dokulardan izole edilen kök hücreler

Dental kök hücreler (DKH) ektoderm ve mezodermin ortak oluşturduğu nöral-krest dokusundan köken almaktadır (Crane ve ark., 2006). Embriyonik dönemde diş tabakasının gelişimi ektodermden kaynaklanmaktadır. Ektodermal yapı diş germelerini oluştururken, nöral-krest hücreleri dental papil ve diş folikülüne farklılaşmaktadır (Crane ve ark., 2006; Gronthos ve ark., 2002).

Dental dokulardan elde edilen birçok kök hücrenin multipotent özellikte mezenkimal kök hücre karakterinde olduğu bildirilmiştir. MKH'lerin tanımlanmasında çeşitli belirteçler dikkat çekmektedir. Farklı dental doku ve gelişim dönemlerinde elde edilen DKH, kemik iliği mezenkimal kök hücre belirteçleri olan CD13, CD29, CD44, CD59, CD73, CD90, CD105, CD146 ve STRO-1'i ekspres ederken hematopoetik

belirteçler olan CD14, CD24, CD34, CD45, CD19 ve HLA-DR'yi ekspres etmemektedir (Gronthos ve ark., 2002; Huang GT-J ve ark., 2009).

DKH'in farklılaşma kapasiteleri birbirinden farklıdır. DKH'lerin, endotel (VCAM-1 ve MUC-18), düz kas (α -SM actin), kemik (alkalen fosfataz, tip1 kollajen, osteonektin, osteopontin, osteokalsin) ve fibroblastlar (tip III kollajen ve fibroblast büyüme faktörü 2) ile ilgili yüzey antijenlerine sahip olduğu tespit edilmiştir. DKH'in kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücre (KİMKH) gibi osteojenik, adipojenik, kondrojenik ve nörojenik hücrelere dönüşebildiği gösterilmiştir. Buna ek olarak DKH diş hücresine (odontoblast) dönüşebilme kabiliyetine sahiptir (Atalayin, 2012; Gronthos ve ark., 2002; Huang GT-J ve ark., 2009; Huang GT-J ve ark., 2006; Iglesias-Linares ve ark., 2013).

İnsan dental kök hücreleri bulundukları yere ve gelişim evresine göre (Şekil 3):

1. Periodontal ligament kök hücreleri (PDLKH)

2. Diş pulpa kök hücreleri (DPKH)

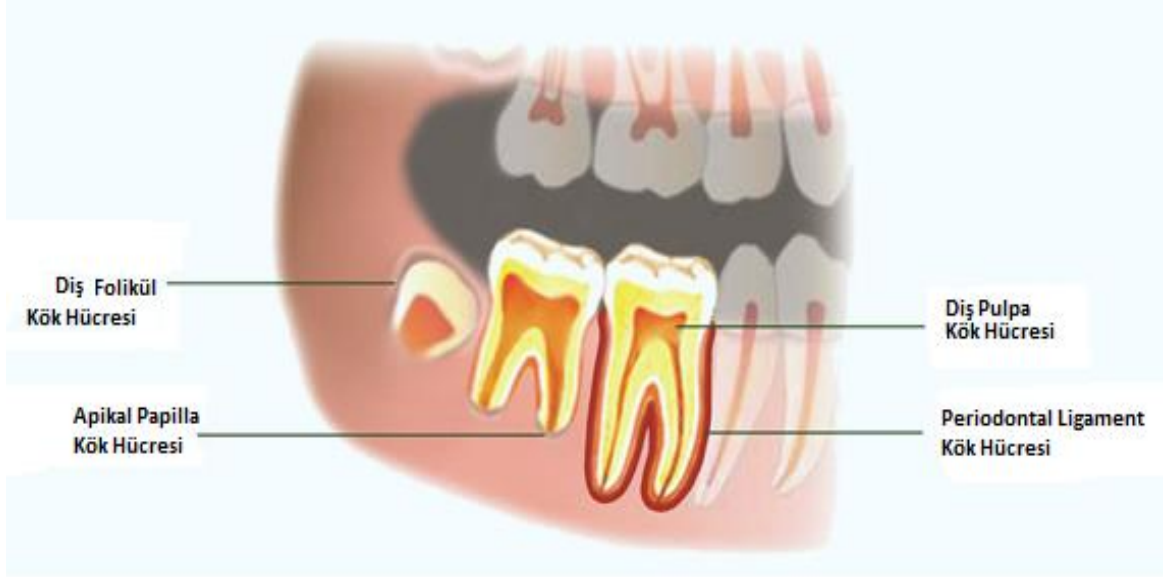
Diş pulpa kök hücreleri 3 ayrı grupta incelenmiştir:

- Süt dişlerinden alınan kök hücreler (SDKH)
- Gelişimini tamamlamış daimi dişlerden alınan kök hücreleri (DPKH)
- Gelişimi devam etmekte olan daimi dişlerden alınan kök hücreler

-Apikal papilla kök hücreleri (APKH)

-Diş folikül kök hücreleri (DFKH)

-Diş germ kök hücreleri (DGKH) olarak sınıflandırılmaktadır (Abe ve ark., 2007; Honda ve ark., 2010; Ji ve ark., 2013; Park ve ark., 2011; Gronthos ve ark., 2002; Huang GT-J, Sonoyama ve ark., 2009).



Şekil 3 Dental kaynaklı kök hücreler (<http://www.provialabs.com>, Erişim tarihi 03.07.2014)

4.2.2.1. Periodontal ligament kök hücreleri (PDLKH)

Periodontal ligament, sement ile alveol kemiğinin iç duvarı arasında bulunan ve dişi çeneler içinde destekleyen yumuşak bağ dokudur (Rimondini ve ark., 2009).

Seo ve arkadaşları (2004) tarafından yapılan bir çalışmada insan periodontal ligamentinde bulunan multipotent postnatal kök hücrelerin varlığından bahsedilmiştir. Periodontal ligament kök hücreleri, çekilmiş dişlerin kök yüzeylerinden elde edilirler ve periodonsiyum benzeri doku ve hücrelere farklılaşabilirler. Bu hücrelerin koloni oluşturabildikleri, ancak *in vitro* osteojenik farklılaşma kapasitesinin düşük olduğu, ancak farelere transplante edildiklerinde doku rejenerasyonu ve periodontal tamir sağladıkları bildirilmiştir (Morsezck ve ark., 2008; Seo ve ark., 2004).

4.2.2.2. Diş pulpa kök hücreleri (DPKH)

Gronthos ve arkadaşlarının yaptıkları araştırmada gömülü 3. molar dişlerin diş pulpa dokusundan elde ettikleri MKH'lerin klonojenik ve yüksek proliferasyon yeteneğine sahip olduğunu saptamışlardır. Elde ettikleri diş pulpa kök hücrelerinin; mineralize matriks içerisinde odontoblastların uzandığı tubulleri ve kan damarlarını içeren fibröz dokudan oluşan normal insan dişindeki dentin-pulpa kompleksine benzer bir yapıyı oluşturduğunu bulmuşlardır (Gronthos ve ark., 2002).

Genel olarak fibroblast benzeri görünümde olan DPKH'lerin kendi kendini yenileme özelliği olan ve *in vitro* ortamlarda kemik, kıkırdak, yağ doku, kas hücreleri, sinir hücresi gibi farklı tür hücrelere farklılaşma yeteneği olan hücreler olduğu saptanmıştır (Gronthos ve ark., 2002; Huang AH-C ve ark., 2008; Huang GT-J ve ark., 2009; Sonoyama ve ark., 2006). Diş pulpa kök hücrelerinin odontoblastik farklılaşmalarına ek olarak vasküler endotelial hücrelere de farklılaşma özelliği vardır (Casagrande ve ark., 2011).

DPKH'ler güvenle dondurularak saklanabilen, farklı yapı iskelelerine uyum sağlayabilen, uzun ömürlü, immünolojik olarak baskılanmış özellikler gösteren ve dentin benzeri mineralize dokular oluşturabilen hücreler olarak tanımlanmıştır (Agha-Hosseini F ve ark., 2010; Gronthos ve ark., 2002; Huang AH-C ve ark., 2008; Huang GT-J ve ark., 2009; Huang GT-J ve ark., 2006; Jo ve ark., 2007).

Diş pulpası kök hücreleri, tedavi amaçlı uygulamalar için gerekli bütün özellikleri taşımaktadır:

- 1) Bu hücrelerin elde edilebilmesi oldukça kolaydır,
- 2) Pulpa dokusundan elde edilen kök hücreler yüksek etkinlik göstermektedir,
- 3) Yüksek farklılaşma yeteneğine sahiptirler,

4) Biyomateryallerle birlikte gerçekleştirilen uygulamalarda dokuların yeniden yapılandırılması mümkündür,

5) Yaşam süreleri uzundur,

6) Güvenli olarak dondurulup saklanmaları mümkündür (Todorovic ve ark., 2008).

- **Süt dişlerinden alınan kök hücreler (SDKH)**

Fizyolojik düşme zamanı gelmiş süt dişlerinin pulpalarından kök hücre elde edilmesi ilk olarak 2003 yılında gerçekleştirilmiştir. Süt dişlerinden elde edilen kök hücrelerin, kemik iliği ve yetişkin diş pulpa dokusu kaynaklı MKH'lere kıyasla, proliferasyon oranının daha fazla olduğu görülmüştür (Miura ve ark., 2003). Miura ve ark. (2003), SDKH'in *in vivo* transplantasyonundan sonra yeni kemik oluşturduğunu ve dentin yapımını indükleyebildiğini, fakat dentin-pulpa kompleksini oluşturamadığını bildirmişlerdir.

Yapılan çalışmalar SDKH'in; diğer kök hücre tiplerinden çok daha yüksek vücut hücrelerine dönüşebilme potansiyaline sahip olduklarını göstermiştir. Tüm bu hücre tiplerinin alzheimer, parkinson gibi nöral dejeneratif hastalıklarda, konjektif kalp yetmezliği gibi hastalıkların tedavisinde etkili olduğu ve bunlara ek olarak diş ve kemiğin yapılanması sırasında potansiyele de sahip oldukları gösterilmiştir (Miura ve ark., 2003; Wang X ve ark., 2012; Yamaza ve ark., 2010; Zhu ve ark., 2013).

- **Apikal papilla kök hücreleri (APKH)**

Apikal papilla, gelişen daimi dişlerin apikal forameninde bulunan dokudur (Huang G T-J, Sonoyama ve ark., 2009). Apikal papilladan elde edilen kök hücreler, diş gelişiminin oldukça erken evrelerinde gömülü dişler, fazla dişler veya keser dişlerin dental papilinden elde edilir (Huang AH-C ve ark., 2008). Diş pulpası kök hücrelerine oranla daha fazla dentin oluşturabilme (rejenerasyon) kapasitesine sahiptir (Abe ve ark., 2007; Bakopoulou ve ark., 2011; Degistirici ve ark., 2008; Lei ve ark., 2011; Huang GT-

J,Sonoyoma ve ark., 2009; Sonoyoma ve ark., 2006). Apikal papillada proliferasyon ve farklılaşmayı da içine alan dinamik reaksiyonlar sonucu kök gelişimi tamamlanmaktadır. Bu nedenle kök gelişimini tamamlanmamış dişte bu kök hücrelerin varlığından bahsedilmiştir (Abe ve ark., 2007; Huang GT-J,Sonoyoma ve ark., 2009).

Diş pulpası ile apikal papilla arasındaki fark, apikal papillanın radiküler pulpanın öncüsü olmasıdır. APKH'lerin kök dentininin oluşumundan sorumlu olan primer odontoblastların kaynağı olduğu, DPKH'lerin ise reperatif dentin üretmekten sorumlu olan odontoblastların kaynağı olduğu düşünülmektedir (Huang GT-J, Sonoyoma ve ark., 2009).

- **Diş folikül kök hücreleri (DFKH)**

Diş folikülü, gelişen diş germinin mine organı ve dental papillasının etrafını çevreleyen ektomezenşimal dokudur. Morszeck ve arkadaşları, insanlarda gömülü 3. molar dişlerden elde ettikleri diş folikül dokusunda prekürsör hücreler olduğunu bildirmişlerdir (Morsezck ve ark., 2008). Diş folikül öncü hücreleri uygun kültür ortamlarında yağ hücrelerine, kemik hücrelerine, sement hücrelerine ve sinir hücrelerine dönüşebilmektedir (Honda ve ark., 2010; Yao ve ark., 2008).

Diş folikül kök hücrelerinin fibroblast benzeri, koloni oluşturabilen ve plastik adherent hücreleri olduğu ve kök hücre markerları olduğu varsayılan Notch-1 ve Nestin'i eksprese ettiği belirtilmiştir. Taşıyıcı matriks olarak hidroksiapatit/trikalsiyum fosfat toz ile karıştırılıp immun sistemi baskılanmış farelere implante edildikten 8 hafta sonraki incelemelerde, rijid veya fibröz bağ dokusunu oluşturduğu, osteoblastik antijen ekspresyonunu arttırdığı, ancak sement veya kemik formasyonu oluşturamadığı görülmüştür (Morsezck ve ark., 2008).

- **Diş germ kök hücreleri (DGKH)**

Kuronu tamamlanmış ancak henüz sürmemiş, germ halindeki dişlerden alınan kök hücreler, gelişimi tamamlanmış dişlerden elde edilen hücrelere göre, çoğalmaya daha meyilli bulunmuştur. Kök gelişimi tamamlanmamış dişlerden alınan hücrelerin, kollateral dolaşıma sahip olması ve kök hücrelerin dolaşımdan zengin bölgelerde daha fazla bulunmasından dolayı apeksi açık dişten elde edilen kök hücrelerinin rejenerasyona yatkınlığını açıklamaktadır (Takeda ve ark., 2008). Erken evredeki DPKH Takeda ve ark. tarafından tanımlanarak, " Kron gelişimi tamamlanmış diş germinden alınan diş pulpası kök hücreleri (DPKH) " olarak ifade edilmiştir (Takeda ve ark., 2008). Yalvac ve ark. ise aynı hücre grubunu, " Diş germi kök hücreleri- (DGKH) " olarak isimlendirmektedir (Yalvac ve ark., 2010).

4.3. Rejeneratif Tedaviler ve Kök Hücrelerin Pulpa - Dentin Kompleksindeki Etkisi

Histolojik olarak dentin pulpanın çevresinde yer almaktadır ve birbirleriyle yakından bağlantılıdır. Fonksiyonel olarak diş pulpa hücreleri dentini rejenere edebilir ve dentin dokusunun oksijen, beslenme ve innervasyonunu sağlar. Dentin dokusu da yumuşak pulpa dokusunu korur ve birlikte dişin şeklinin ve fonksiyonunun devamlılığını sağlar. Travma, çürük veya kavite preparasyonu gibi fizyolojik veya patolojik bir reaksiyon gerçekleştiğinde hasar gören doku diğerini de etkiler (Smith ve ark., 1995).

Dentin-pulpa kompleksinde yaralanma durumunda 3 farklı fizyopatolojik değişiklik meydana gelmektedir (Fuks, 2008; Özbay G, 2013):

1. Minede kavitasyon oluşturmayan veya yavaş ilerleyen kabul edebileceğimiz çürüklerde, odontoblastlar yaşam süreçlerine devam etmekte ve odontoblastik tabaka uyarılarak yaralanma sahasının altında tersiyer dentin matriksi (reaksiyoner dentin) oluşmaktadır. Reaksiyoner dentin primer ve sekonder dentin ile benzerlikler

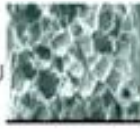
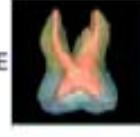
göstermekte, pulpayı dış etkenlere karşı (bakteriyel invazyon, kimyasal/termal zarar) korumaktadır (Smith ve ark., 1995).

2. Kavite preperasyonu sırasında meydana gelen, pulpanın açığa çıkmadığı şiddetli yaralanmalarda veya hızlı ilerleyen çürüklerde, etkilenen dentin altındaki odontoblastlar yıkıma uğramaktadır. Bunun sonucunda var olan mezenkimal kök hücreler odontoblast benzeri hücrelere farklılaşırlar ve tübüler tersiyer dentin oluştururlar (reperatif dentin). Reaksiyoner cevabın tersine, reperatif dentinogenezis daha karmaşık bir biyolojiye sahiptir. Pulpal bağ dokusunda enflamatuvar ve vasküler cevabı da içeren yara iyileşme reaksiyonları oluşur (Smith ve ark., 1995).

3. Pulpanın açığa çıktığı durumlarda, pulpa kendi kendine veya kaplama materyalinin uygulanmasından sonra onarılabilmektedir. Çürük nedeniyle pulpanın açığa çıktığı durumlarda pulpanın iyileşme potansiyeli bakteriyel invazyondan ötürü sınırlıdır. Mezenkimal kök hücrelerin proliferasyonu, migrasyonu ve farklılaşması odontoblast benzeri hücrelerin oluşmasını, pulpa-dentin sınırının kaybolan bütünlüğünün yeniden şekillenmesini sağlamaktadır (Fuks, 2008).

Pulpada meydana gelen sert doku bariyerinin ve kaybedilmiş olan dentin dokusunun tekrar oluşması bir çeşit rejenerasyondur. Bu da günümüzde rejeneratif endodontik olarak tanımlanmaktadır (Estrela ve ark., 2011). Rejeneratif endodontik uygulamalarda amaç; pulpa-dentin kompleksinin, çürük, travma veya diğer nedenlerle açığa çıkmış olan koronal dentin dokusunun, rezorbe olmuş apikal kök dentininin ya da servikal dentinin yenilenmesidir. Endodontide rejeneratif tedavilerin uygulamaya aktarılabilmesi için doku mühendisliği uygulamalarına gereksinim vardır (Murray ve ark., 2007).

Rejeneratif endodontide geliştirilen yöntemler; kök kanalının revaskülarizasyonu, kök hücre tedavisi, pulpa implantı, scaffold (iskelet) implantı, enjekte edilebilir scaffold uygulamaları, üç boyutlu hücre yazılımı ve gen terapisi şeklinde sıralanabilir (Murray ve ark., 2007; Sarang ve ark., 2010; Simon ve ark., 2014) (Şekil 4).

TEKNİK	AVANTAJ	DEZAVANTAJ
KÖK KANAL REVASKÜLARİZASYONU 	*Düşük immün ret riski *Düşük patojen geçiş riski	*Çok az yayınlanmış vaka raporu *Tekrar enfekte olması halinde dokuda nekroz riski
KÖK HÜCRE TEDAVİSİ 	*Hızlı *Kolay nakil *En az ağrılı *Hücreleri toplama kolaylığı	*Hücrelerin düşük yaşama şansı *Hücrelerin yeni fonksiyonel pulpa yaratamaması *Komplikasyon riski yüksek
PULPA İMPLANTASYONU 	*Hücre tabakasını yetiştirmek kolay *Çözünür hücrelerin enjeksiyonundan daha stabil	*Tabaka damarsız olduğundan, sadece küçük yapı oluşturma olasılığı *Kök kanalının şekline tam olarak uydurarak yapılandırılmalı
İSKELE İMPLANTASYONU 	*Hücreleri destekleyen yapı varlığı *Bazı materyaller damarlanmayı hızlandırabilir	*İmplantasyondan sonra hücrelerin düşük yaşama şansı *Kök kanalının şekline tam olarak uydurarak yapılandırılmalı
ÜÇ BOYUTLU HÜCRE YAYMASI 	*Çok sayıda hücre tipi tam olarak yerleştirilebilir	*Kök kanalının şekline tam olarak uydurarak yapılandırılmalı *Başlangıç araştırmaları fonksiyonel in vivo'yu henüz desteklemiyor
ENJEKTE EDİLEBİLİR İSKELE 	*Kolay nakil *Ekstrasellüler matriks yerine geçerek rejenerasyonu hızlandırabilir	*Doku formasyonu üzerinde sınırlı kontrol *Hücrelerin düşük yaşama şansı *Başlangıç araştırmaları fonksiyonel in vivo'yu henüz desteklemiyor
GEN TERAPİ 	*Kök kanalının temizleme ve şekillendirmesi yapılmayabilir *Kök hücre nakline gerek olmayabilir	*Nekrotik dışteki çoğu hücre zaten ölü *Kontrolü zor *Sağlığa zarar riski *FDA onaylamıyor

Şekil 4 Rejeneratif endodonti teknikleri (Murray ve ark., 2007)

1952 yılında, Hermann tarafından, kalsiyum hidroksitin pulpa amputasyonu tedavisinde kullanılması, rejeneratif endodontiye ait ilk girişim olarak kabul edilmektedir (Murray ve ark., 2007).

Rejeneratif endodontik tedavilerden en yaygın kullanım alanına sahip olan revaskularizasyon işlemi periradiküler enfekte dişlerde var olduğu düşünülen apikal papilla kök hücrelerinin, pulpa nekrozunu iyileştirerek pulpa dokusunun rejenere olmasını sağlamasıdır (Huang G T-J, Sonoyama ve ark., 2009). Bu tedavi şeklinde apikal papilla kök hücrelerinin canlı olarak korunması çok önemlidir. Bu amaçla yapılan çalışmalarda, herhangi bir kanal aleti kullanılmayarak, enfeksiyon kontrolü ise üçlü antibiyotik kombinasyonu (Metranidazol/Minosiklin/Siprofloksasin) sağlanmaktadır. 2. basamak olarak kalan pulpa dokusuna adaptasyonu ve biyoyumluluğu iyi olduğu düşünülen Mineral Trioksit Agregat (MTA), dişin pulpa sınırına yerleştirilmektedir. Ayrıca MTA'nın pulpa hücrelerinde proliferasyona sebep olması da tercih edilmesini sağlamaktadır (Huang GT-J, Sonoyoma ve ark., 2009; Huang GT-J, 2008; Shin, Albert ve ark., 2009).

4.3.1. Rejeneratif tedavilerde biyoaktif molekül ve MTA kullanımı

Günümüzde dentin-pulpa kompleksinin rejenerasyonunda kullanılacak olan ideal bir ajanın, antienflamatuar ve antibakteriyel etkisi olmasının yanı sıra pulpa kök hücrelerinin proliferasyonlarını ve odontoblastlara farklılaşmalarını stimüle etmesi gerekmektedir (Yıldırım ve ark., 2007). Pulpanın farklılaşmamış mezenkimal hücrelerinin farklılaşmasını tetikleyen faktörler; fibroblast büyüme faktörü 2 (FGF 2), dönüştürücü büyüme faktörü beta 1 (TGF- β 1), kemik morfogenetik proteini 2 (BMP 2), büyüme farklılaştırma faktörü 11 (GDF 11), dentin matriks protein 1 (DMP 1), interlekin 1 (IL 1) ve tümör nekroz faktör (TNF) gibi enflamasyon öncesi sitokinler, Mineral Trioksit Agregat (MTA), kalsiyum hidroksit, mine matriks türevlerinin birleşimi, simvastatin ve ağız içi bakteri ürünleri olarak sıralanabilir (Yıldırım, 2013).

Günümüzde, çeşitli dokulardan elde edilen kök hücrelerin, büyüme faktörleri ile uyarılarak odontoblast ve osteoblast hücrelerine farklılaşmasına ilişkin çalışmalar yapılmaktadır. Kemik oluşumu için gerekli olan büyüme faktörleri gibi düzenleyiciler, odontoblast gelişimini de desteklemektedir (Shiba ve ark., 1998). Kemik ve dentin dokusundaki ayırıcı faktör, dentinde bulunan ve sadece odontoblastlara özgü olan Dentin

Sialofosfoprotein (DSPP) sentezinin belirlenmesidir (Bleicher ve ark., 2001). Çalışmalar, dentin sialoprotein (DSP) ve dentin fosfoprotein (DPP)'in sadece odontoblastlar için özel proteinler olduğunu göstermektedir (MacDougall ve ark., 1997). Bu iki protein, tek bir gende kodlanarak Dentin Sialofosfoproteini (DSPP) oluşturmaktadır (Bleicher ve ark., 2001).

Mizuno ve ark. (2008), mezenkimal diş pulpa hücrelerinin odontoblast hücrelerine farklılaşmasında büyüme faktörleri dışında etken olarak, kalsiyum hidroksitten salınan kalsiyum iyonlarının pulpadaki fibronektin sentezi ile farklılaşmasını sağladığını belirlemişlerdir. Fibronektin, fibroblastlar ve osteoblastlar tarafından salgılanarak, pulpanın farklılaşmamış mezenkim hücrelerini, sert doku oluşumu sağlayan hücrelere (odontoblastlara) dönüştürmektedir. Başka bir çalışmada da, yüzeysel nekrotik tabaka ile canlı pulpa dokusu arasında fibronektin varlığı tespit edilmiştir (Yoshida ve ark., 1996). Yoshida'ya göre, fibronektinden zengin bu tabaka, tamir dentininin oluşumu sırasında büyüme faktörleri için kaynak oluşturmaktadır (Yoshida ve ark., 1996). Büyüme faktörleri, hücrelerin göçü ve tutunmasından sorumlu olarak tamir olayına tetiklemektedir. Aynı zamanda kollajen sentezi ile sert doku oluşumu olduğu düşünülmektedir (Nakashima, 2005). Odontoblast hücrelerine farklılaşan pulpanın öncü hücreleri, matriks sentezi ve mineralizasyonu ile dentin benzeri sert dokuyu oluşturmaktadır (Kuratate ve ark., 2008).

MTA açığa çıkmış olan pulpa dokusu üzerinde kristalin bir yapı oluşturmakta, kristalin yapının pulpa tarafına bakan kısmında ise fibronektinden zengin bir tabaka oluşmaktadır. Bu tabaka sayesinde dentinden salınan büyüme faktörleri ile sert doku oluşumu sağlanmaktadır. Ayrıca kalsiyum hidroksit ve MTA'nın ortamda yarattığı alkali özelliğin büyüme faktörlerinin salınımını sağladığı da bildirilmektedir (Kuratate ve ark., 2008; Tziafas ve ark., 2002).

Günümüzde rejeneratif endodontik işlemler adı altında yapılan son dönem çalışmalarda, kısmen veya tamamen canlılığını yitirmiş pulpa dokusunun proliferasyonu, hatta yeniden oluşumu sağlanmaya çalışılmaktadır. Bu durumun sağlanabilmesi, tercih

edilen materyeller kadar pulpa içinde bulunan ve rejenerasyona yatkın olan kök hücrelerin uyarılmasıyla da ilişkilidir. Bu nedenle kök hücrelerin uyarılması için başta MTA olmak üzere sement yapısında materyeller yanında bazı biyoaktif moleküller denenmektedir (Huang GT-J, 2008; Okiji ve Yoshiba, 2009).

4.4. MTA'nın Genel Özellikleri

MTA, ilk defa diş hekimliği literatürüne Loma Linda Üniversitesi'nde 1993 yılında Lee ve Torabinejad'ın yaptıkları araştırma ile girmiş ve 1998'den sonra ise ABD'de diş hekimliğinde yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. MTA dolgu materyali, Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) onayı alınca kadar Loma Linda Üniversitesinde deneysel olarak kullanılmış ve başarılı sonuçlar elde edildiği bildirilmiştir (Schwartz ve ark.,1999; Torabinejad ve ark.,1995).

1998 yılında FDA tarafından onaylanmasıyla, tüm dünyada yaygın bir şekilde kullanılmaya başlanmıştır. MTA hem cerrahi hem de cerrahi olmayan; retrograd dolgu, direk pulpa kuafajı, kök ve furkasyon perforasyonlarının onarımı ve apeksifikasyon gibi endodontik tedavilerde de kullanım alanı bulmuştur (Akyüz ve ark., 2012; Roberts ve ark., 2008; Torabinejad ve ark., 1995).

MTA, ticari olarak farklı isimlerde bulunmaktadır: Gri ProRoot MTA (Dentsply), Beyaz ProRoot MTA (Dentsply), MTA-Angelus (Solucos Odontologicas), MTA-Angelus Blanco (Solucos Odontologicas), MTA Bio (Solucos Odontologicas).

4.4.1. MTA'nın kimyasal yapısı

MTA tozu nem varlığında sertleşen hidrofilik partiküller içeren gri renkli bir tozdur. MTA; American Standards for Testing Materials (ASTM) tarafından radyoopasiteyi sağlamak amacıyla 4:1 oranında bizmut oksit eklenmiş Tip-1 Portland simanı kategorisinde yer almaktadır (Torabinejad ve ark., 1995).

Materyalin ana bileşeni olan Portland simanı; trikalsiyum silikat ($3\text{CaO}\cdot\text{SiO}_2$), dikalsiyum silikat ($2\text{CaO}\cdot\text{SiO}_2$), trikalsiyum alüminat ($3\text{CaO}\cdot\text{Al}_2\text{O}_3$), trikalsiyum oksit (Ca_2O_3), silikat oksit (SiO_2), alüminoferrit ($4\text{CaO}\cdot\text{Al}_2\text{O}_3\cdot\text{Fe}_2\text{O}_3$) ve alçıtaşı ($\text{CaSO}_4\cdot 4\text{H}_2\text{O}$) ana bileşenlerinden oluşmaktadır (Asgary ve ark., 2004; Torabinejad ve ark., 1995). Portland simanı, içeriğindeki işlenmemiş materyallerin kısmi füzyonu sayesinde oluşur. Bu işlem 400 ile 600 °C arasında alçıtaşının dekarbonizasyonunu, 800 ile 1200 °C arasında dikalsiyum silikat, trikalsiyum alüminat ve trikalsiyum alüminoferrit oluşumunu ve 1400 °C sıcaklıkta ise trikalsiyum silikat oluşumunu kapsar (Lea ve ark., 1998).

MTA ile Portland simanının temel element kompozisyonunun benzer olduğu ve ikisinin de hidrasyon reaksiyonunun yan ürünü olarak kalsiyum hidroksit oluşturdıkları belirtilmiştir (Camilleri, 2008a).

MTA'nın içeriği trikalsiyum silikat ($3\text{CaO}\cdot\text{SiO}_2$), dikalsiyum silikat ($2\text{CaO}\cdot\text{SiO}_2$), kalsiyum karbonat (CaCO_3), kalsiyum sülfat (CaSO_4) ve kalsiyum alüminat (CaAl_2O_4) olarak açıklanmıştır. MTA'nın radyoopasitesini sağlamak amacıyla, bizmut oksit (Bi_2O_3) eklenmiştir. Ayrıca içerdiği diğer mineral oksitler (SiO_2 , CaO , MgO) sayesinde, fiziksel ve kimyasal özellikleri geliştirilmiştir. MTA'nın spektrometrik incelemesinde amorf yapısının %49'u fosfat, %33'ü kalsiyum, %6'sı silika, %3'ü klorit ve %2'si karbondan oluştuğu ve MTA'nın ana iyonların kalsiyum ve fosfor olduğu belirtilmiştir. (Camilleri, 2008a; Parirokh ve Torabinejad, 2010a).

Portland siman ile aralarındaki en önemli farklar Portland simanda potasyum bulunması, ancak bizmut oksitin bulunmamasıdır. Bizmut oksit MTA'ya radyoopasite verilmesi amaçlanarak katılmıştır (Islam ve ark., 2006b; Torabinejad ve ark., 1995). Bununla birlikte MTA parçacıkları küçük ve homojen olacak şekilde üretilmekte, Portland simanda ise parçacık büyüklükleri değişkenlik göstermektedir (Damaschke ve ark., 2005).

MTA'nın gri ve beyaz olmak üzere iki formu vardır. Gri MTA'nın ön dişlerde istenmeyen renklenmelere neden olmasından dolayı beyaz MTA üretilmiştir. Yapılan çalışmalar, beyaz renkli MTA'da gri renkli olan MTA'dan farklı olarak tetrakalsiyum aluminoferrit'in ($4\text{CaO}\cdot\text{Al}_2\text{O}_3\cdot\text{Fe}_2\text{O}_3$) bulunmadığını göstermiştir (Parirokh ve Torabinejad, 2010a). Her iki tip MTA da ağırlık açısından kabaca %75 Portland simanı, %20 bizmut oksit ve %5 alçı taşından oluşmaktadır. Angelus MTA ise %80 Portland simanı ve %20 BiO_2 'ten oluşmaktadır (Ferris ve ark., 2004).

MTA'nın kimyasal yapısının incelenmesi için çeşitli metotlar kullanılmaktadır. Bunlar; X-Ray'li enerji dispersiv analiz (EDAX), inductively coupled plasma optical emission spectroscopy (ICP-OES), X-Ray difraksiyon analizi (XRD), X-Ray floresans spektrometri (XRF), enerji X-Ray spektrometri ve enerji dispersiv spektroskopidir (Parirokh ve Torabinejad, 2010a).

4.4.2. MTA'nın fiziksel özellikleri

MTA'nın fiziksel özelliklerini etkileyen faktörler; toz/likit oranı, karıştırma metodu, kondensasyon için kullanılan basınç, ortamdaki nem, materyalin tipi, saklama koşulları, ortamın pH'sı, karıştırılan sıvının cinsi, karıştırma ve uygulama arasında geçen süre, maddenin kalınlığı ve ortam ısısı olarak sayılabilir (Camilleri, 2008b; Dammaschke ve ark., 2005; Ferris ve ark., 2004; Islam ve ark., 2006b; Parirokh ve Torabinejad, 2010a).

4.4.2.1. Çözünürlük

MTA'nın çözünürlük derecesi çeşitli çalışmalarda araştırılmıştır, genellikle düşük çözünürlük gösterdiği ya da hiç çözünürlük göstermediği bildirilmiştir. Bunun nedeni, MTA'nın temel olarak çözünürlüğü olmayan silika matriksten oluşması ve bu yapı nedeniyle bütünlüğünü kaybetmemesi olarak açıklanmıştır (Parirokh ve Torabinejad, 2010a). MTA yapısına suda çözünmeyen bizmut oksit eklenmesi de MTA'nın düşük çözünürlüğünün sebeplerindendir. Toz ve likit oranı da MTA çözünürlüğü üzerinde etkilidir. Yüksek likit oranı çözünürlüğü ve poröziteyi artırmaktadır. Ayrıca MTA'nın

özünen kısmının kalsiyum hidroksit kaynaklı olduğunu ve karışımnda daha fazla likit kullanımının MTA'dan kalsiyum salımını artırdığını bildirmişlerdir (Fridland ve Rosado, 2003).

MTA özünürlüğü ile ilgili farklı sonuçlar elde edilmesinin nedeni, araştırmaların farklı metodlarla yapılmasına, materyalin bekletilme süresine, MTA tipine ve farklı toz/likit oranlarında karıştırma yapılmasına bağlanmıştır (Bodanezi ve ark., 2008; Fridland ve Rosado, 2003; Parirokh ve Torabinejad, 2010a).

4.4.2.2. Sıkıştırma dayanıklılığı

Torabinejad ve ark., MTA'nın sıkıştırma dayanıklılığının 24 saat sonunda amalgam, IRM, Super EBA'ya göre anlamlı derecede düşük olduğunu rapor etmişlerdir. Fakat 3 hafta sonunda MTA, IRM, Super EBA'nın sıkıştırma dayanıklılıkları arasında anlamlı bir farklılık olmadığı ancak amalgamdan anlamlı derecede düşük olduğu bildirilmiştir (Parirokh ve Torabinejad, 2010a).

Gri MTA ile beyaz MTA'nın basınca dayanıklılık özelliklerinin karşılaştırıldığı çalışmalarda birbiri ile çelişkili sonuçlar rapor edilmiştir. Oklüzal kuvvetlere maruz kalan bir kaviteye yerleştirilen dolgu maddeleri düşünülürse, sıkıştırma dayanımı oldukça önemli bir faktördür. Basma kuvveti değerleri kök ucu dolgu materyalleri için direkt oklüzal kuvvetler etkisinde kalmadıkları için önemli değildir. Bu nedenle MTA'nın basma kuvvetlerine direnci düşük olduğu için fonksiyonel alanlara yerleştirilmemelidir (Parirokh ve Torabinejad, 2010a).

MTA'nın tipi, karıştırmak için kullanılan likit, kondensasyon basıncı, likitin pH değeri ve saklama koşulları gibi birçok faktör de MTA'nın sıkışma dayanıklılığını değiştirebilmektedir (Islam ve ark., 2006a; Parirokh ve Torabinejad, 2010a).

4.4.2.3. Bükülme dayanıklılığı

Torabinejad ve Chivian, perforasyon tamiri, pulpa kaplaması ve apikal tıkaç olarak kullanıldığında MTA'nın üzerine nemli bir pamuk pelet koymayı önermektedir (Torabinejad ve Chivian, 1999). Çok az sayıda çalışma olmasına rağmen, MTA üzerine ilk 24 saat nemli pamuk pelet yerleştirmenin bükülme dayanıklılığını arttırdığı bildirilmektedir (Parirokh ve Torabinejad, 2010a).

4.4.2.4. pH

MTA'nın pH değeri karıştırmadan sonra 10,2'dir. Bu değer 3 saat sonunda 12,5'e yükselmektedir (Torabinejad ve ark., 1995). MTA, yüksek pH değerini uzun dönemli çalışma boyunca korumuştur. Araştırmacılar yüksek pH değerini MTA'dan sürekli kalsiyum salınımına ve kalsiyum hidroksit oluşumuna bağlamışlardır. Bu değerler, kalsiyum hidroksitin pH'sı ile benzerlik gösterir.

MTA ve kalsiyum hidroksit materyalinin benzer alkali pH derecelerine sahip olması, her iki materyalin de sert doku oluşumunu indüklemeye özelliğini artırmaktadır (Schwartz ve ark., 1999; Torabinejad ve ark., 1995).

4.4.2.5. Radyoopasite

İdeal kök kanal dolgu materyali, fiziksel ve kimyasal özelliklerinin yanı sıra diş ve kemik gibi komşu anatomik yapılardan ayırt edilebilmesi için radyoopasiteye sahip olmalıdır. Bu nedenle MTA'nın kimyasal yapısına bizmut oksit eklenerek radyoopak özellik kazandırılmıştır (Schwartz ve ark., 1999).

Radyoopasite değeri genellikle alüminyum kalınlık eşdeğeriyle ifade edilir. MTA'nın ortalama radyoopasitesi 7,17 mm kalınlığında alüminyum eşdeğeri olup bu değer, radyografik olarak kolayca görülebilmesine olanak sağlamaktadır. IRM, Super EBA ve amalgamla karşılaştırıldığında MTA'nın radyoopasitesi daha az olup,

çinkooksit öjenole benzer radyodensite göstermektedir (Rao A ve Shenoy, 2009; Torabinejad ve ark., 1995).

4.4.2.6. Sızdırmazlık özelliği

Sızdırmazlık özelliği restoratif maddelerden beklenen en önemli özelliklerden biridir. Apikal bariyerin sızdırmazlığını test etmek için kullanılan metotlar genellikle bakteri, boya veya diğer iz bırakan maddelerin kullanımını kapsamaktadır (Hachmeister ve ark., 2002; Torabinejad ve Parirokh, 2010a).

MTA'nın amalgam, IRM ve Super-EBA ile karşılaştırıldığı çalışmada, MTA'nın üstün sızdırmazlık özelliği gösterdiği ortaya koyulmuştur (Torabinejad ve ark., 1995; Torabinejad ve ark., 1993).

Özbay ve ark.'nın MTA Angelus ve BiodentineTM'nin apikal sızdırmazlığını araştırdıkları bir çalışmada MTA Angelus ile doldurulan köklerin, BiodentineTM ile doldurulan köklere göre daha az sızdırmazlık özelliği gösterdiğini tespit etmişlerdir (Özbay ve ark., 2012).

MTA'nın sertleşme sırasındaki genişmesinin, MTA'nın sergilediği üstün sızdırmazlık ve dentin adaptasyonu özelliklerinin nedeni olabileceği bildirilmiştir (Shipper ve ark., 2004).

4.4.2.7. Mikrosertlik

MTA'nın mikrosertliği; ortamın pH'ı, materyalin kalınlığı, kondensasyon basıncı, karışan hava miktarı, nem, materyalin asitle pürüzlendirilmesi ve ısı gibi faktörlerden etkilenebilir (Namazikhah ve ark., 2008; Torabinejad ve ark., 1995). Mikrosertlik açısından ProRoot MTA (Dentsply Tulsa Dental, Johnson City, TN), Portland simandan anlamlı ölçüde daha fazla ancak amalgamdan da anlamlı ölçüde daha az sert bulunmuştur. Torabinejad, MTA'nın mikrosertliğini 40.0 MPa olarak bulmuştur. (Torabinejad ve ark., 1995)

Apikal bariyer olarak kullanılan gri ve beyaz MTA'nın 2 mm ve 5 mm kalınlıklarının mikrosertliği araştırılmıştır. MTA tipi ve yerleştirme yöntemi dikkate alınmaksızın, 5 mm kalınlık 2 mm kalınlıktan anlamlı olarak daha serttir (Matt ve ark., 2004).

4.4.2.8. Antibakteriyel ve antifungal özellikleri

İdeal bir kök kanal simanı, antimikrobiyal özelliğe sahip olmalıdır. MTA'nın antibakteriyel ve antifungal özellikleri ayrıntılı olarak değerlendirilmiştir (Torabinejad ve ark., 1995a). Antimikrobiyal aktivite hidroksil iyonlarının artması ve pH'nın yükselmesi sonucu bakterilerin yaşaması için uygun olmayan bir ortam oluşmasıyla ilişkili bulunmuştur (Schwartz ve ark., 1999).

Torabinejad ve ark., MTA, amalgam, çinkooksit öjenol ve Super EBA'nın antimikrobiyal etkinliklerini incelemişlerdir. MTA'nın, çalışmalarında kullandıkları yedi farklı fakültatif bakteri grubundan (*S. faecalis*, *S. rnitis*, *S. mutans*, *S. salivarius*, *L. species*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *B. subtilis*, *E. coli* B.) sadece beşine (*S. mitis*, *S. mutans*, *S. salivarius*, *L. species*, *S. epidermidis*) antibakteriyel etkinliği olduğunu bildirmişlerdir. MTA'nın, anaerop gruplar (*P. (Bacteroides) buccae*, *B. fragilis*, *P. (Bacteroides) intermedia*, *P. (Bacteroides) melaninogenica* ve *P. anaerobius*) üzerine ise herhangi bir antibakteriyel etkinliği olmadığını bulmuşlardır (Torabinejad ve ark., 1995a).

MTA'nın antimikrobik etkisini arttırmak için 1:3 oranında % 0.12'lik klorheksidin (CHX) solüsyonu MTA tozuna karıştırılmıştır. Sonuçta MTA'nın distile su ile karıştırılmasına göre daha fazla antimikrobik etki elde edilmiştir. Ancak MTA-CHX kombinasyonun sertleşmediği ancak bu karışımın fiziksel özelliklerinin, kimyasal bileşenlerinin ve hücreler üzerindeki etkilerinin araştırılması gerektiği bildirilmiştir (Stowe ve ark., 2004).

Antifungal t p dilüsyonu metodu kullanılarak yapılan çalışmada, yeni karıştırılmış ve sertleşmiş gri MTA  rneklerinin *C. albicans*'a karşı inhibitör etki gösterdiği bildirilmiştir (Al-Nazhan S, Al-Judai, 2003).

Torabinejad ve arkadaşları, yaptıkları çalışmada MTA'nın kök kanal sisteminde antimikrobik bir etkiye sahip olmadığını bu nedenle MTA'nın kalsiyum hidroksite alternatif dezenfektan olarak düşünülmemesi gerektiğini ve kalsiyum hidroksit tedavisi sonrası daimi dolgu maddesi olarak kullanılması gerektiğini öne sürmüşlerdir. MTA'nın gösterdiği antimikrobiyal özelliklerini yüksek pH'ına ve ortama saldığı diffüze olabilen maddelere bağlamışlardır (Parirokh ve Torabinejad, 2010a; Torabinejad ve ark., 1995a).

4.5. MTA'nın Hazırlanması ve Sertleşmesi

Uygulama ve kullanım kolaylığı için 1 gram tek kullanımlık paketleri mevcuttur. Kullanım sonrası artan materyal, su ve hava geçirmez bir kap içerisinde saklanabilir.

MTA kullanılmadan hemen önce distile su ile 3:1 oranında cam veya kağıt üzerinde, metal ya da plastik spat ller ile karıştırılmalıdır. Karıştırma işleminin 4 dakikadan fazla olmaması gerektiği, uzayan karıştırma sürelerinde karışımın dehidrate olduğu bildirilmiştir. Karışımın küçük amalgam tabancası, Messing tabanca ile taşınması veya ufak uçlu el enstrümanlarıyla yerleştirilmesi uygun olmaktadır. Uygulamadan sonra materyale direk temas edecek şekilde geçici olarak nemli pamuk pelet yerleştirilmesi tavsiye edilmektedir (Sluyk ve ark., 1998; Torabinejad ve Chivian, 1999).

Tüm irrigasyon işlemleri, MTA yerleştirilmeden önce tamamlanmalıdır.     k materyal yerleştirildikten sonra, yapılacak en ufak irrigasyon materyalin akıp gitmesine neden olabilir (Torabinejad ve Chivian, 1999).

Araştırmalarda MTA'nın yerleştirilmesi sırasında ilave olarak ultrasoniklerin kullanılması ile çok daha iyi bir tıkanmanın sağlandığını ve ultrasoniklerle kondanse edilen MTA'da daha az boşluk kalmasından dolayı daha radyoopak görüntü elde edildiğini bildirmişlerdir (Lawley ve ark., 2004).

MTA karışımı hafif dehidrate olmuş ise su ile nemlendirilebileceği veya sulu olmuşsa kuru bir pamuk pelet vasıtası ile fazla neminin alınabileceği bildirilmiştir. Hazırlanış sırasında çok fazla veya yetersiz su ilavesi materyalin son sertliğini azaltmaktadır (Torabinejad ve Chivian, 1999). İlk 24 saat MTA üzerine nemli pamuk pelet yerleştirilmesinin materyalin esneme dayanıklılığını ve adaptasyonunu arttırdığını ama sertleşme zamanına etki etmediği ileri sürülmüştür (Parirokh ve Torabinejad, 2010a).

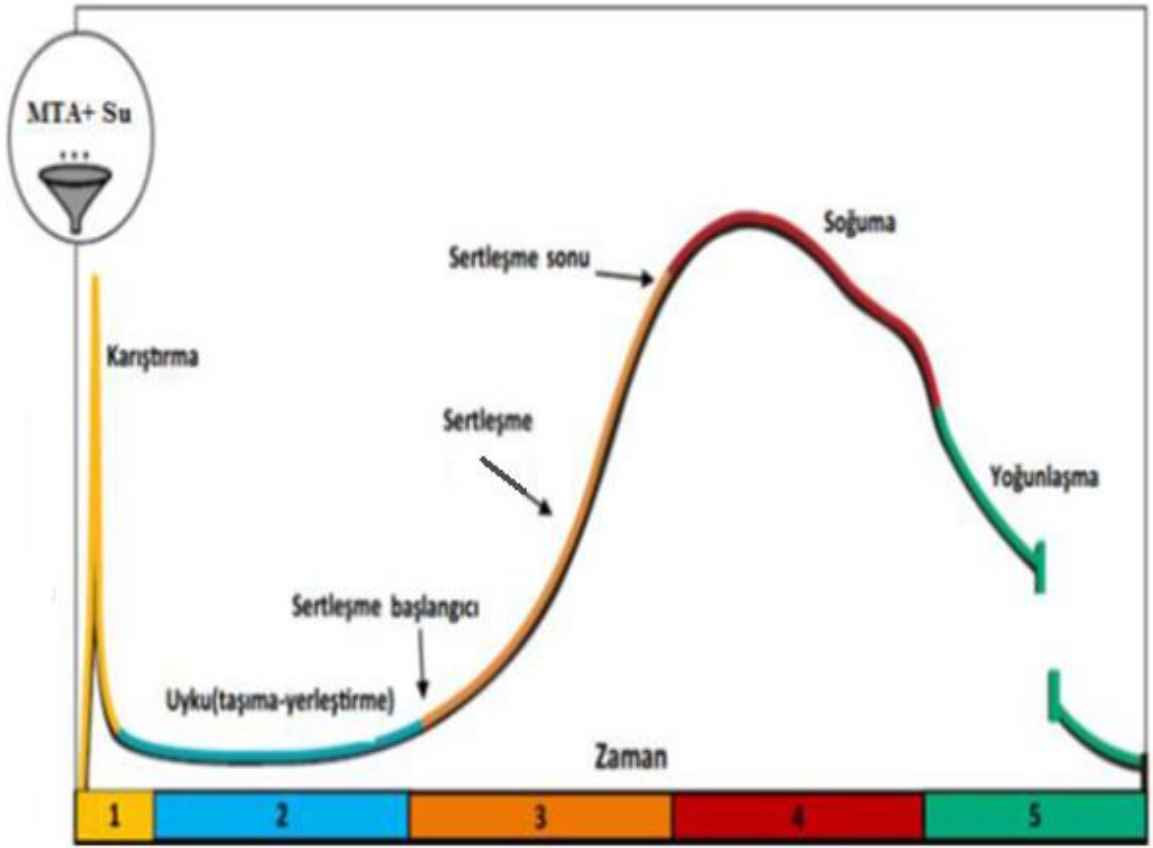
4.5.1. MTA'nın sertleşme mekanizması ve hidratasyonu

İnce hidrofilik partiküller içeren MTA tozunun suyla temas etmesiyle birlikte sertleşme reaksiyonu başlamaktadır (Parirokh ve Torabinejad, 2010a).

Hidrofilik simanın su teması ile başlayan sertleşmeyi sağlayan kimyasal reaksiyona “hidratasyon” denmektedir. MTA'nın su ile karışması sonucu çözünen bileşenler değişik hızlarda ve oranlarda reaksiyona girmekte, reaksiyon sırasında ısı açığa çıkmakta ve reaksiyon sonucunda yeni ürünler meydana gelmektedir. Oluşan ürünler MTA'nın sertleşmesini ve içeriğindeki bileşenlerin birbirine daha iyi bağlanmasını sağlamaktadır (Camilleri, 2007; Kosmatka ve ark., 2006).

Hidratasyon reaksiyonunun süreçleri: (Şekil 5)

1. Karıştırma süreci
2. Uyku süreci
3. Sertleşme süreci
4. Soğuma süreci
5. Yoğunlaşma sürecidir (Kosmatka ve ark., 2006).



Şekil 5 MTA'nın hidrasyon basamakları (Kosmatka ve ark., 2006)

MTA'nın yapısında bulunan kalsiyum silikatlar (C_3S , C_2S), kalsiyum alüminatlar (C_3A , C_4AF) ve kalsiyum sülfat (CS_2H) hidrasyon reaksiyonunu doğrudan etkilemektedir (Camilleri, 2007; Kosmatka ve ark., 2006; Lee ve ark., 2004).

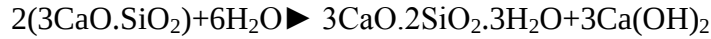
Trikalsiyum silikat MTA hacminin yaklaşık %55'ini oluşturur. MTA'nın hızlı bir şekilde nemlenmesini ve katılaşmasını sağlamaktadır. Başlangıç sertleşmesinden sorumlu tutulmaktadır. Dikalsiyum silikat ise MTA hacminin yaklaşık %20'sini oluşturur. Simanın yavaş bir şekilde nemlenmesini ve katılaşmasını sağlamaktadır. Tetrakalsiyum alüminat ise MTA'nın yaklaşık olarak %20'sini oluşturmaktadır. Hidrasyon sırasında alüminatlar çok hızlı reaksiyona girmekte ve sülfata (CS_2H) karşı direnç göstermektedir. Kalsiyum sülfat ise sertleşme reaksiyonuna hızlı bir şekilde giren alüminatların etkisini kontrol altına almakta ve reaksiyon hızını düşürmektedir (Camilleri, 2007, 2008a; Kosmatka ve ark., 2006).

4.5.1.1. Karıştırma süreci

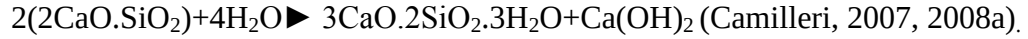
MTA yapısındaki alüminatlar ve alçıtaşı ($\text{CaSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) suda çok hızlı çözünür ve birkaç dakika içinde reaksiyona girer. MTA' nın içeriğindeki alçıtaşı miktarı az olduğu için bu reaksiyonlar daha yavaş görülür. MTA' nın sertleşme süresi bu yüzden daha uzundur (Camilleri, 2007).

Materyalin sertleşme sürecinde ilk faz trikalsiyum silikat ($3\text{CaO} \cdot \text{SiO}_2$) ve dikalsiyum silikatın ($2\text{CaO} \cdot \text{SiO}_2$) hidratasyon reaksiyonu ile başlar.

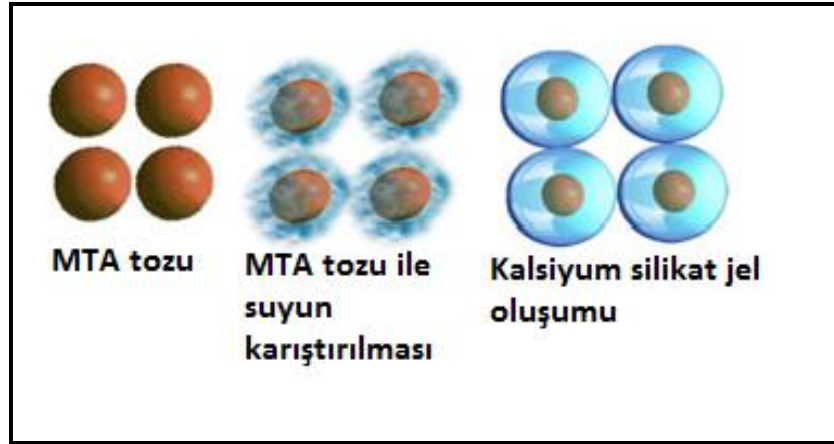
Trikalsiyum silikatın suyla tepkimesi aşağıdaki şekilde oluşur:



Dikalsiyum silikat suyla temas ettiğinde aşağıdaki şekilde tepkimeye girer:



Su içerisinde, kalsiyum silikatların hidrolizi sonucunda kalsiyum hidroksit ve bir miktar kalsiyum silikat hidrat jel oluşur (Şekil 5a). Bu jelimsi tabaka alüminatların hızlı bir şekilde tepkimeye girmesini ve MTA'nın ani sertleşme yapmasını engellemektedir (Camilleri, 2007; Kosmatka ve ark., 2006)

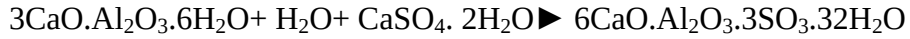


Şekil 5a Jelimsi tabaka oluşumu (Saghiri ve ark., 2015)

4.5.1.2. Uyku süreci

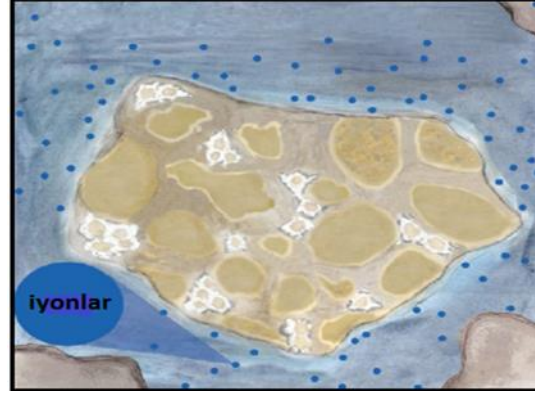
Uyku sürecinde MTA taşınabilmekte, yerleştirilebilmekte ve işlenebilmektedir. Bu süre kimyasal katkılarla değişebilmektedir (Camilleri, 2007).

Trikalsiyum alüminat ($3\text{CaO} \cdot \text{Al}_2\text{O}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) ise kalsiyum sülfat varlığında hidrate olarak, yüksek sülfatlı kalsiyum sülfat-alüminat ($6\text{CaO} \cdot \text{Al}_2\text{O}_3 \cdot 3\text{SO}_3 \cdot 32\text{H}_2\text{O}$) ya da diğer ismiyle etringite oluşturur. Sülfat iyonları tükenince etringite monosülfata dönüşür.



Oluşan etringite, siman yüzeyinde parçalanır ve silikat hidrat kaplama meydana gelir. Silikat hidrat kaplama hidrasyonu yavaşlattığından dolayı bu faza “inaktif faz” ismi de verilir (Camilleri, 2007, 2008a; Kosmatka ve ark., 2006).

MTA bileşenleri çözünmeye devam etmekte ve siman içerisindeki su, kalsiyum (Ca^{+2}) ve hidroksil (OH^-) iyonları ile doymaktadır (Kosmatka ve ark., 2006; Saghiri ve ark., 2015) (Şekil 5b).



Şekil 5b Uyku süreci (Kosmatka ve ark., 2006)

4.5.1.3. Sertleşme süreci

Simanın suyu, çözünen kalsiyum iyonları ile aşırı doygun hale ulaşınca, yeni hidratasyon ürünleri oluşur. Hidrate olmuş MTA'da ana reaksiyon ürünleri kalsiyum silikat hidrat ve kalsiyum hidroksittir. Bu durum sertleşmenin başlangıcıdır (Camilleri, 2007, 2008a) (Şekil 5c).



Şekil 5c Sertleşme süreci (Kosmatka ve ark., 2006)

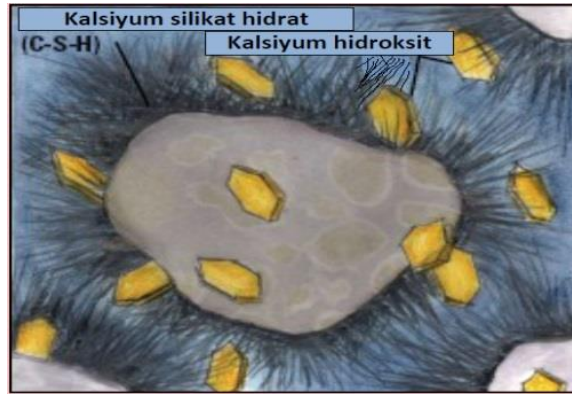
Sertleşmenin başlaması ile siman üzerinde vibratör uygulaması veya yüzey bitirme işlemi gibi uygulamalar artık yapılamaz. Bu süreçte simana yapılacak müdahaleler kalıcı ayrışmaya neden olarak simanın yapısını bozabilmektedir (Camilleri, 2007; Kosmatka ve ark., 2006).

Başlangıç sertleşme süresi, MTA tozunun su ile birleştiği an ile simanın fiziksel değişiklik göstererek çökmeye başladığı an arasında geçen süredir. Final sertleşme süresi ise, MTA tozunun su ile birleştiği an ile simanın tamamen katılaştığı an arasındaki süredir (Kosmatka ve ark., 2006).

4.5.1.4. Soğuma süreci

MTA bileşenler açısından doygun bir hale gelmiştir. Yüzeyde hidratasyon ürünleri olan kalsiyum silikat hidrat ve kalsiyum hidroksit oluşmaktadır.

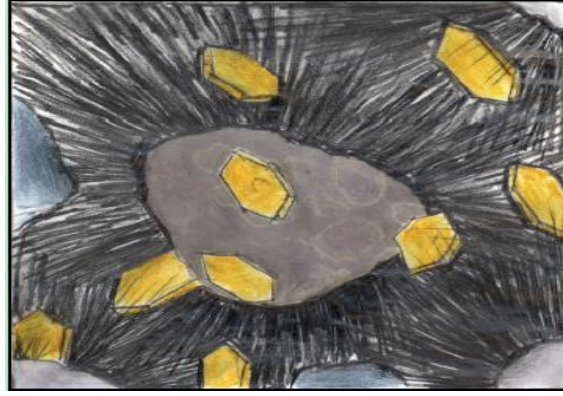
MTA'nın yüksek pH'nın kaynağı olan kalsiyum hidroksitin oluşumunu sağlar (Şekil 5d). MTA'nın dayanım kazanma süreci bu dönemde başlamaktadır (Camilleri, 2007; Kosmatka ve ark., 2006).



Şekil 5d Soğuma süreci (Kosmatka ve ark., 2006)

4.5.1.5. Yoğunlaşma süreci

Hidratasyon ürünleri yavaş da olsa artmaya devam etmektedir. Siman bu dönemde ulaşabileceği en sert ve sağlam yapıya kavuşmaktadır (Kosmatka ve ark., 2006) (Şekil 5e).



Şekil 5e Yoğunlaşma süreci (Kosmatka ve ark., 2006)

MTA'nın ağız ortamında yaklaşık olarak 3-4 saatte sertleştiği bildirilmiştir. Bu süre amalgam, Super EBA ve IRM ile karşılaştırıldığında daha uzundur (Torabinejad ve ark., 1995).

Farklı araştırmacılar MTA'nın sertleşme süresi konusunda farklı bulgular elde etmişlerdir. MTA'nın son sertleşme süresini, Torabinejad ve ark. (1995) 165 dk., Kogan ve ark. (2006) 50 dk., Ding ve ark. (2008) 220-250 dk., Huang ve ark. (2008) ise 151 dk., Islam ve ark. (2006a) MTA'nın başlangıç ve son sertleşme süresini 40-140 dk. olarak bildirmişlerdir.

Sonuç olarak sahip olduğu özellikler ve potansiyeli düşünülecek olursa, MTA'nın sertleşme süresinin uzun olması en büyük dezavantajlarından biridir (Bortoluzzi ve ark., 2009). Uzun sertleşme süresi klinik olarak pek çok probleme davetiye çıkarabilmektedir. Çünkü bu süre zarfında pulpa dokusunun ağız florasındaki iritanlarla karşı karşıya gelme riski artacaktır. Özellikle vital pulpa tedavileri gibi klinisyenin MTA'nın üzerine hemen restoratif bir ajan yerleştirmesinin gerekli olduğu durumlarda uzun sertleşme süresi problem yaratacak ve seans sayısının artmasına neden olacaktır (Kayahan ve ark., 2009).

MTA'nın taşınmasındaki zorlukların giderilmesi ve sertleşme süresinin kısaltılması amacıyla materyale bazı hızlandırıcıların eklenmesi gündeme gelmiştir (Parirokh ve Torabinejad, 2010a).

4.5.2. MTA'ya eklenen hızlandırıcılar (akseleratörler)

Hidrolik simanların özelliklerini istenilen yönde iyileştirmek, simanın yerleştirilmesinde, sıkıştırılmasında, yüzeyinin düzeltilmesinde kolaylık sağlamak için yapısına eklenen maddelere “katkı maddeleri” denmektedir (Erdoğan, 2007).

Kimyasal katkı maddeleri, ana işlevlerine göre dört grupta özetlemek mümkündür (ASTM, 2002):

- Sertleşme süresini hızlandıran
- Sertleşme süresini kısaltan
- Normal veya yüksek miktarda su azaltan
- Hava sürükleyen.

MTA'nın sertleşme süresi de diğer özellikleri gibi Portland simana benzemektedir (Torabinejad ve ark., 1993). Bu nedenle MTA'nın sertleşme süresini kısaltmak için öncelikli olarak Portland simanın sertleşme süresini kısaltmak için kullanılan kimyasallar kullanılmıştır (Darvell BW, Wu, 2011).

Sertleşme zamanını kısaltmak için kullanılan kimyasallara akseleratör denilmektedir. Çalışmalarda kullanılan akseleratörler kalsiyum klorid, sitrik asit, kalsiyum nitrit/nitrat, kalsiyum laktat glukonat, sodyum klorid, K-Y Jelly, disodyum hidrojen fosfattır (Bortoluzzi ve ark., 2008; Ding ve ark., 2008; Kogan ve ark., 2006; Parirokh ve Torabinejad, 2010a).

Ayrıca MTA'ya diş hekimliği kliniğinde bulunan sodyum hipoklorit jel (NaOCl), salin, lidokain ve klorheksidin glukonat solüsyonları eklenerek MTA'nın sertleşme süresine etkisi ölçülmüştür (Darvell BW, Wu, 2011; Kogan ve ark., 2006; Parirokh ve Torabinejad, 2010a).

4.5.2.1. Kalsiyum klorid (CaCl₂)

Kalsiyum klorid (CaCl₂), kalsiyum ve klorun tuz formudur. Bu bileşik, tipik iyonik yapıda bir tuzdur ve oda sıcaklığında katıdır. Kalsiyum klorid, çözelti içerisinde kalsiyum iyonu kaynağı olarak görev yapar.

CaCl₂, simanın porları içine penetre olup, silikatların hidrasyonunu hızlandırarak ve kristalizasyon sürecini kolaylaştırarak sertleşme süresini kısaltmaktadır (Abbaszadegan et al., 2015). MTA'nın yapısına katılan CaCl₂ sertleşme süresini kısaltma özelliği yanında, yüksek pH'ın korunmasında, kalsiyum salınım özeliğinin artmasında ve tıkama özelliğini iyileştirmesi gibi avantajlar sunmaktadır. Ayrıca MTA'nın fiziksel özellikleri üzerinde olumsuz etki yaratmamıştır (Bortoluzzi ve ark., 2009).

Farklı konsantrasyonlarda Portland simanı ve MTA yapısına eklenmiştir (%2-15) (Bortoluzzi ve ark., 2009; Bortoluzzi ve ark., 2006; Parirokh ve Torabinejad, 2010a). %3 konsantrasyonun sertleşme süresi üzerinde etkisi olmadığından kullanımı önerilmemektedir (Bortoluzzi ve ark., 2009). Yapılan çalışmalarda %5 ve %10 konsantrasyonun biyouyumlu olması, yerleştirilmesinde kolaylık sağlaması ve sertleşme süresini kısaltmasından dolayı MTA yapısına eklenebileceği bildirilmiştir (Bortoluzzi ve ark., 2006, 2009, 2008; Bortoluzzi, Broon ve ark., 2006; De Almeida ve ark., 2014; Jafarnia ve ark., 2009; Kogan ve ark., 2006). Araştırmamızda %5 ve %10 konsantrasyonunda CaCl₂ eklenen MTA örnekleri kullanılmıştır.

4.5.2.2. K-Y Jelly

Su bazlı bir lubrikanttır. K-Y Jelly'nin içeriğinde antiseptik ve koruyucu katkı maddeleri olarak saf su, klorheksidin glukonat, glukono delta-lakton, metilparaben ve sodyum hidroksit ile lubrikant olarak gliserin ve hidroksietil selüloz kullanılmıştır. Biyouyumlu olması, MTA'nın yerleştirilmesinde kolaylık sağlaması ve sertleşme süresini kısaltmasından dolayı MTA yapısına eklenebileceği bildirilmiştir (Jafarnia ve ark., 2009; Kogan ve ark., 2006; Mehrvarzfar ve ark., 2014).

Stowe ve ark. (2004), klorheksidin ile hazırlanan MTA'nın distile su ile hazırlanan MTA'ya göre antimikrobiyal etkinliğinin arttığını ancak sertleşmesinin zorlaştığını bildirmişlerdir. K-Y Jelly ile hazırlanan MTA örneklerinin antimikrobiyal etkinliğini araştırıldığı çalışmalarda K-Y Jelly'nin sertleşme süresini kısalttığı gibi yapısındaki klorheksidin glukonat ile antimikrobiyal aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Karimjee ve ark., 2006).

4.5.2.3. Disodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4)

Disodyum hidrojen fosfat beyaz, higroskopik, kokusuz bir tozudur. MTA'nın yapısına katılan Na_2HPO_4 sertleşme süresini kısaltma özelliği yanında, pH'ın korunmasında ve tıkama özelliğini iyileştirmesi gibi avantajlar sunmaktadır. MTA'nın fiziksel özellikleri üzerinde olumsuz etki yaratmamıştır (Ding ve ark., 2008; Lotfi ve ark., 2009; Parirokh ve Torabinejad, 2010a; Shie ve ark., 2009).

Yang ve arkadaşlarının (2011) Na_2HPO_4 ile hazırladıkları MTA örneklerini ratların abdominal kavitetlerine yerleştirdikleri ve 30 saat sonunda mutajenitesini değerlendirdikleri araştırmalarında; Na_2HPO_4 ratlarda mutajenite göstermemiştir. Araştırmalarda da Na_2HPO_4 'ın biyoyumlu olduğu bildirilmiştir (Lotfi ve ark., 2009; Yang ve ark., 2011).

Na_2HPO_4 ortamdaki fosfatın artışına bağlı olarak hidroksiapatit oluşum oranını arttırmaktadır (Chow ve ark., 1994). %15 konsantrasyonda kullanıldığı araştırmalarda başarılı sonuçlar alınmıştır (Ding ve ark., 2008; Lotfi ve ark., 2009; Parirokh ve Torabinejad, 2010a; Shie ve ark., 2009).

4.5.2.4. Kalsiyum laktat glukonat (CLG)

Kalsiyum laktat glukonat (CLG); laktik asit, çözülebilir bir kalsiyum tuzu ve glukonik asitten oluşan ek kalsiyum kaynağı sağlayan gıda endüstrisinde kullanılan bir malzemedir. CLG, hidrasyon geciktirici (kalsiyum glukonat) ve hızlandırıcıdan (laktik asit) oluşan bir çözeltidir (Hsieh ve ark., 2009). MTA'nın yapısına katılan CLG

sertleşme süresini kısaltma özelliği yanında antimikrobiyal özellik göstermektedir (Lee ve ark., 2011).

4.5.2.5. Sodyum hipoklorit jel

Diş hekimliği kliniğinde bulunan sodyum hipoklorit jelin, MTA'nın sertleşme süresini kısaltması bilinmesine rağmen, MTA ile karıştırıldığı zaman açığa çıkan serbest klorin toksik etki oluşturup, biyouyumluluğu olumsuz etkilediği bildirilmiştir (Jafarnia ve ark., 2009).

4.5.2.6. Kalsiyum nitrit/nitrat

Kalsiyum nitrit/nitrat, beyaz renkli tanecik yapısında, suda kolay çözünen ve MTA'nın sertleşme süresini kısaltan ancak yapılan çalışmalarda biyouyumlu olmadığı için tercih edilmeyen bir hızlandırıcıdır (Srivastava ve ark., 2014; Wiltbank ve ark., 2007).

4.5.3. MTA'nın sertleşme süresinin ölçülmesi

MTA ve Portland siman yapısında bulunan silika partiküllerinden dolayı sertleşme reaksiyonu suya temas etmesiyle başlamaktadır. Su ile sertleşme reaksiyonu başlayan simanlara “hidrolik siman” denmektedir. Hidrolik simanların sertleşme süresinin ölçümü “penetrasyon testi” ile yapılmaktadır. Sertleşme süresi test edilirken çeşitli aletler ve buna uygun standartlar kullanılmaktadır (Darvell Wu, 2011; Hsieh ve ark., 2009).

4.5.3.1. Gillmore aparatı (Gillmore iğnesi)

Gillmore aparatı hidrolik simanların “başlangıç” ve “final” sertleşme süresini test etmek için kullanılmaktadır. Yatay kollarında iki farklı ağırlığın olduğu, düz zeminli uçla sonlanan paslanmaz çelik silindirlere sahip bir alettir. Düz zeminle sonlanan silindirlere “Gillmore iğnesi” denmektedir (ASTM, 2004) (Şekil 6).



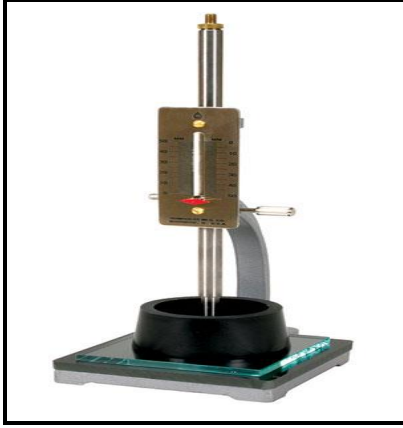
Şekil 6 Gillmore iğnesi (<http://www.testmark.net> , Erişim tarihi: 20.08.2014)

ASTM C266-04 standardına göre Gillmore iğnelerinden biri 113. 4 gr ağırlığında, 2.12 mm çapındadır ve “başlangıç sertleşme süresi” bu uç ile ölçülmektedir. İğnelerden diğeri ise 453. 6 gr ağırlığında, 1.06 mm çapındadır ve “final sertleşme süresi” bu uç ile ölçülmektedir. Final sertleşme süreleri iğnenin siman yüzeyinde iz bırakmadığı an olarak kabul edilmektedir (ASTM, 2004).

4.5.3.2. Vicat aparatu (Vicat iğnesi)

Vicat aparatu hidrolik simanların “başlangıç” ve “final” sertleşme süresini test etmek için kullanılan aletlerden biridir. Vicat iğnesi ile yapılacak sertleşme süresi testinde ASTM C191-04 standardı kullanılmaktadır (ASTM, 2008).

Geleneksel Vicat aparatu düz bir tabla ve tablanın eksenine dik gelecek şekilde ayarlanmış silindir mile sahip bir alettir. Silindirin üstünde gösterge bulunmaktadır. Milin alt ucuna Vicat iğnesi monte edilmiştir ve milin ağırlığı 300 gr’dır. Vicat iğnesi düz zeminli 1 mm çapa sahip bir iğnedir (ASTM, 2008) (Şekil 7).



Şekil 7 Vicat iğnesi (<http://www.testmark.net> , Erişim tarihi:20.08.2014)

Karıştırılan siman kalıba yerleştirildikten sonra Vicat iğnesi siman yüzeyine değdirilmesinin ardından serbest bırakılarak ölçüm yapılmaya başlanmaktadır. “Final sertleşme süresi” siman tozu ile suyun temas ettiği an ile iğnenin siman yüzeyinde dairesel iz bırakmadığı zaman arasında geçen süre olarak kabul edilmektedir (ASTM, 2008).

Torabinejad ve ark., (1995) Gilmore iğnesi kullanarak yaptıkları çalışmalarında MTA’nın sertleşme süresini 2 sa. 45 dk. olarak bildirmişlerdir. Ber ve ark., (2007) Vicat iğnesi kullanarak yaptıkları çalışmada bu süreyi 3 sa. 22 dk. olarak hesaplamışlardır. MTA’nın sertleşme zamanları arasındaki bu farkı, değişik ağırlıklarda iğnelerin kullanılması ile açıklamışlardır (Komabayashi T, Spangberg, 2008).

4.5.3.3. Otomatik Vicat iğnesi

Vicat iğnesinin siman yüzeyine kontrollü indiği otomatik Vicat iğnesi (Vicatronik) üretilmiştir (Şekil 8). Kullanılması istenen veriler seçildikten sonra sertleşme testi otomatik olarak başlatılabilir ve devam ettirilebilir. Elde edilen değerler cihazın ekranında görülür, testin sonunda cihazın içinde mevcut olan yazıcıdan çıktı alınabilir (Ylmén ve ark., 2009).



Şekil 8 Otomatik Vicat iğnesi (<http://www.worldoftest.com/vicatronic.htm>, Erişim tarihi:20.08.2014)

4.6. MTA'nın Klinik Kullanım Alanları

Kök ucu dolgu materyali olarak kullanıma sunulmuş olan MTA, zamanla pulpa kapaklaması, perforasyon tamiri ve apikal bariyer oluşturma gibi çok çeşitli klinik uygulamalarda kullanılmaya başlanmıştır. Bu uygulamaların temelini MTA'nın biyoyumluluğu, iyi sızdırmazlık yeteneği, pulpa ve periapikal dokuların rejenerasyonunu arttırma kapasitesi gibi özellikleri oluşturmaktadır (Parirokh ve Torabinejad, 2010b).

MTA'nın klinikte uygulama alanları şunlardır:

- Pulpa kuafajı
- Apeksifikasyon
- Apikal rezeksiyon
- Süt dişi amputasyonu
- Kök kırıkları
- Cerrahi ve cerrahi olmayan yaklaşımlarla kök ucu dolgusu olarak
- Cvek amputasyonu
- Dens invajinatusun profilaktik parsiyel pulpatomi tedavisi
- Daimi dişlerin kök kanal tedavisi

- Persiste süt dişlerinin kök kanal tedavisi
- Kök ve bifurkasyon perforasyonları
- Endodontik tedavili dişlerin kanal içi beyazlatma işlemlerinde bariyer materyali (Parirokh ve Torabinejad, 2010b; Rao A ve Shenoy, 2009).

4.7. MTA'nın Biyolojik Uyumu (Biyouyumluluk)

Endodontide kullanılan materyaller sıklıkla periodonsiyum ile yakın ilişki içerisinde olduklarından konak dokularla biyolojik olarak uyumlu olmalı ve toksisite göstermemelidirler (Parirokh ve Torabinejad, 2010a; Torabinejad ve Parirokh, 2010). Torabinejad ve arkadaşları, sitotoksiteleri test edilen dört farklı kök ucu dolgu materyalinden (MTA, amalgam, Super EBA, IRM) en iyi sonuçları MTA grubunda almışlardır. MTA'nın biyouyumluluğunun nedeni olarak MTA materyalinin diş sert dokularına benzer kimyasal içeriğinden ve materyalin hidratasyonu sonucu oluşan Ca(OH)_2 'den kaynaklandığı düşünülmektedir (Torabinejad ve ark., 1995b).

Bizmut oksitin (BiO_2) asidik ortamda çözünebilme özelliği, MTA'nın iltihabi bir dokuya yerleştirildiğinde, BiO_2 salınmasına neden olur. Bu durum MTA'nın biyouyumluluğunun azalmasına neden olabilir. Bu yüzden MTA'nın iltihabi bir ortamda kullanılmaması önerilmektedir (Parirokh ve Torabinejad, 2010a).

MTA'nın biyouyumluluğu *in vitro* hücre kültür çalışmalarında, *in vivo* insan ve hayvan çalışmalarında araştırılmaktadır. İnsan osteoblast hücreleri ile yapılmış *in vitro* çalışmalar, MTA'nın sitokin serbestleşmesini ve interlökin üretimini stimüle ettiğini; dolayısıyla MTA'nın inert bir materyal olmadığını, ancak sement ve kemik gibi sert doku oluşumu ile birlikte periodontal bağ dokusunun iyileşmesini etkili bir biçimde sağladığını belirlemişlerdir (Schwartz ve ark., 1999).

MTA biyouyumluluğunun belirlenmesi için, *in vivo* olarak köpek ve maymunlarda kök kanal dolgu materyali olarak kullanılmıştır. Bu çalışmalar MTA ile tatmin edici periapikal doku cevabı ve iyileşmesi bildirmiştir. Ayrıca yapılan hayvan çalışmaları,

travmatik ekspozları takiben uygun bir pulpa kaplama materyali olarak MTA kullanılabileceğini bildirmektedir (Torabinejad M, Hong ve ark., 1995; Torabinejad ve ark., 1997). Torabinejad ve ark., maymunlar üzerinde yaptıkları diğer bir çalışmada MTA ve amalgamın periapikal doku reaksiyonunu incelemişlerdir. 5. ayın sonunda MTA örneklerinin 6 tanesinin 5'inde periapikalinde iltihabi reaksiyon gözlenmediği, ayrıca dolgu materyalinin üzerinde yeni sert doku oluşumu gördüklerini ancak amalgam örneklerinin tamamında ise iltihap görüldüğünü ve yeni sert doku oluşmadığını bildirmişlerdir (Torabinejad ve ark., 1997).

Costa ve ark., kalsiyum hidroksit ve gri MTA'nın pulpa hücrelerine sitotoksitesini değerlendirdikleri *in vitro* ve pulpotomi sonrası pulpal cevabın değerlendirildiği *in vivo* çalışmalarının sonucunda kalsiyum hidroksitin daha sitotoksik olduğunu ve hücrelerde metabolik aktiviteyi gri MTA'ya kıyasla üç kat daha fazla düşürdüğünü tespit etmişlerdir (De Souza Costa ve ark., 2008).

McNamara ve ark., yaptıkları çalışmada MTA'yı çeşitli hızlandırıcılarla karıştırmışlar, örnekleri alt çene kemiği içine implante ederek biyouyumluluklarını karşılaştırmışlardır. Çalışmanın sonuçlarına göre CaCl_2 (kalsiyum klorid) ve CaN (kalsiyum nitrat) ile hazırlanan gri MTA'lar biyouyumlu bulunmuştur. CaF (kalsiyum format) ile hazırlanmış MTA haricinde diğer bütün gruplarda yeni sert doku oluşumuna rastlanmıştır. Çalışmada MTA'nın mevcut özellikleri korunmasının yanında sertleşme süresi de kısalmıştır (McNamara ve ark., 2010).

Süt dışından elde edilen diş pulpa kök hücreleri üzerinde yapılan sitotoksite deneyinden elde edilen veriler doğrultusunda ProRoot MTA BiodentineTM'e göre istatistiksel olarak biyouyumlu bulunmuştur. BiodentineTM, FK, FS ve Ca(OH)_2 arasında biyouyumluluk açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (Özbay G, 2013).

4.7.1. Biyouyumluluk ve biyouyumluluk testleri

Biyouyumluluk canlı dokularla temasta olan herhangi bir maddenin, sistemik ve lokal toksisite, alerjik, mutajenik ve karsinojenik etki yapmayan inert özelliklere sahip olması ve vücudun yumuşak ya da sert dokularında doku reaksiyonu oluşturmamasını ifade eder (Wataha, 2001).

Biyouyumlulukta konakçı, materyal ve materyalin fonksiyonu arasında bir kesişme olduğu görülür. Bir materyalin biyouyumlu olarak düşünülebilmesi için bu üç faktörün uyum içinde olması gerekmektedir. Biyouyumluluk dinamik bir olaydır, çünkü bu üç faktörden herhangi birinde değişiklik meydana gelirse biyouyum bozulur (Wataha, 2001).

Diş hekimliğinde kullanılan maddelerin biyouyumluluk değerlendirmelerinde çok sayıda teknik kullanma imkanı vardır. Ancak test yöntemlerinden uygulaması kolay, kısa sürede sonuç veren ve standart bir yöntem tercih edilmelidir. Testlerin standardize edilmesi en önemli kriter olduğundan FDI (Uluslararası Dişhekimliği Birliği)'nin onayladığı testler dikkate alınmalıdır (Hanks ve ark., 1991).

Biyouyumluluğun tespiti üç aşamada yapılır (ISO, 1997):

- Başlangıç testleri (*in vitro* testler) (sitotoksisite, mutajenite)
- İkincil testler (hayvan testleri) (duyarlılık, implantasyon testleri, mukozal irritasyonlar)
- Kullanım testleri
 - a) Restoratif materyaller için pulpa ve dentin testi,
 - b) Kuafaj ve pulpatomi materyalleri testi,
 - c) Endodontik materyal testi,
 - d) Kemik içi implant materyali testi.

Araştırmamızda hücre kültürleri üzerinde çalışılacağından dolayı biyolojik uyum testi başlangıç test çeşitlerinden sitotoksisite testleri tercih edilmiştir.

4.7.2. Sitotoksisite testleri

Sitotoksisite, *in vitro* biyouyumluluk değerlendirmelerinde en yaygın kullanılan test yöntemidir.

Farklı metotlara sahip çeşitli sitotoksisite testleri bulunmakla birlikte, her bir test başlıca üç bileşenden oluşmaktadır;

a-biyolojik sistem,

b-hücre/materyal teması,

c-değerlendirme metodudur (Schmalz, 1994).

Sitotoksisite testleri genellikle materyallerin,

- Hücre sayısı veya büyümesi,
- Hücre membran bütünlüğü,
- Biyosentez veya enzim aktivitesi,
- Hücre genetik materyali üzerindeki etkilerini ve
- Hücre morfolojisindeki değişiklikleri ölçer (Hanks ve ark., 1991; Schmalz, 1994).

Dental materyallerin sitotoksisitelerini değerlendirmek için çoğunlukla biyolojik sistem olarak hücre kültürleri kullanılmaktadır. Hücre kültürü ise canlı dokuların vücut dışında yaşatılmasını, sürekli üretimini ve gelişimini ifade etmektedir. Canlı yapılardan elde edilen dokular, vücut ısısında kültüre edilmekte ve vücudun özgün fizyolojik konumunu taklit eden besleyici sıvılarda beslenerek çoğaltılmaktadır. Kültür ortamında hücrelerin yaşaması, beslenmesi ve çoğalması için bazı şartların yerine getirilmesi

gerekmektedir. *In vitro* hücre kültürü deneylerinde, hücre ve dokuların yaşatılması için genellikle 37 °C, %5 CO₂'li ve %95 nemli ortam sağlanır (Schmalz, 1994).

Sitotoksitenin değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılan enzimatik test yöntemleri MTT [3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] testi veya MTS [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)- 5 -(3-carboxymethoxyphenyl)- 2 -(4-sulfophenyl)- 2H-tetrazolium] testidir.

MTT testi, sağlam hücrelerde mitokondrinin MTT boyasının tetrazolyum halkasını parçalayabilmesi ilkesine dayanmaktadır. Bu reaksiyon bir mitokondriyal enzim olan suksinat dehidrogenaz enziminin aktivitesine bağlıdır. Tetrazolyum halkası mitokondriyal hidrojenezle suda çözünmeyen formazana çevrilir ve kristaller halinde birikir. Formazanın çözünür hale getirilmesiyle soluk sarı renkli MTT boyası koyu mavi-mor formazan ürününe dönüşmektedir. Sonuç olarak canlı ve mitokondri fonksiyonu bozulmamış hücreler mor renkte boyanmakta, ölü ya da mitokondri fonksiyonu bozulmuş hücreler boyanmamaktadır. Bu yöntem; reaksiyon ürününün kolorimetrik olarak ölçümünden oluşmaktadır (Galluzzi ve ark., 2009).

MTS yöntemiyle de bir hücre topluluğundaki canlı hücrelerin oranı kolorimetrik olarak saptanabilir. MTS'in formazana dönüşümüne, metabolik olarak aktif olan hücrelerdeki dehidrogenaz enzimi neden olur. Tetrazolyum halkasının parçalanması sonucunda sarı renkli MTS boyası koyu mavi-mor formazan ürününe dönüşmektedir. 490 nm absorbansta ölçülen formazan miktarı direkt olarak kültürde bulunan yaşayan hücrelerin oranıdır (Cory ve ark., 1991).

4.8. MTA'nın Rejeneratif Potansiyeli

MTA kemik, dentin ve sement dokularının oluşumunu uyarır ve periapikal dokularda rejenerasyon potansiyeline ve osteokondüktif, osteoindüktif ve sementojenik özelliklerine sahiptir (Parirokh ve Torabinejad, 2010b).

MTA'nın çok çeşitli endodontik tedavilerde yaygın bir kullanım alanı bulmasının nedenleri arasında, sızdırmazlığının çok iyi olması, periapikal dokular üzerinde gösterdiği iyi biyouyumluluk özellikleri ve periapikal dokuların iyileşmesi ve rejenerasyonu üzerinde gösterdiği olumlu etkiler sayılabilir (Parirokh ve Torabinejad, 2010b; Torabinejad ve Parirokh, 2010).

MTA'nın dentin köprü oluşumunda, Nükleer Faktör kappa B (NF- κ B) aktivasyonunun etkili olduğu gösterilmiştir. Nükleer Faktör kappa B; sitokinler, büyüme faktörleri, hormonlar da dahil olmak üzere çeşitli hücre dışı sinyal faktörlere yanıt olarak pek çok hücre tiplerinde aktive edilen çok yönlü transkripsiyon faktörüdür (DiDonato ve ark., 2012).

NF- κ B aktivasyonu ile diş pulpa hücrelerin farklılaşmasında önemli rol oynadığı ve odontoblastik fenotipi teşvik ettiği tespit edilmiştir. Çalışmalar MTA'nın diş pulpa hücrelerinin NF- κ B yolunu aktive ettiğini ve diş pulpasındaki siklooksijenaz-2 mRNA regülasyonu ile prostaglandin E2 salınımı sağladığını, inflamatuvar proteinler ve inflamasyonu azalttığını ve dentin köprü oluşumunda önemli rol oynadığını göstermiştir (Minamikawa ve ark., 2009). Bu durum vital pulpa tedavilerinde MTA'nın antienflamatuvar etkisini açıklamaktadır. Prostaglandinin sadece enflamatuvar reaksiyonda rol almadığı aynı zamanda hücre proliferasyonu ve rejenerasyonunda da ilgili olduğu belirtilmektedir (Pistorius ve ark., 2003).

In vitro araştırmalarda MTA'nın, sert doku iyileşmesi sürecinde gerekli olan sitokin ve sinyal moleküllerinin üretimini teşvik ettiği bildirilmiştir. MTA'nın IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-18, osteokalsin, alkalen fosfataz, kemik sialoproteini, osteopontin ve BMP-2 gibi birçok sitokinin up-regülasyonuna neden olduğu çeşitli hücre kültürü çalışmalarında gösterilmiştir (Parirokh ve Torabinejad, 2010a, 2010b). Simon ve ark. pulpa hücre kültüründe MTA bulunduğunda, yoğun tip 1 kollajen ve dentin sialoprotein oluşumu bildirilmiştir. Pulpa kaplaması sonrasında dentin köprüsünde dentin sialoprotein varlığı da doğrulanmıştır (Simon ve ark., 2008).

MTA periodontal ligament fibroblastlarını, osteojenik fenotip sergilemesi ve osteonektin ve osteopontin üretimi için de uyarır (Bonson ve ark., 2004).

MTA'nın osteojenik aktivitesinin, materyalden salınan bol miktarda kalsiyum iyonunun, biyolojik ortamdaki fosfat grupları ile etkileşime girip hidroksiapatit oluşturması ile ilgili olduğu düşünülmektedir. MTA'nın bu yeteneği ona biyouyumluluğun yanı sıra aynı zamanda biyoaktif bir materyal özelliği de sağlamaktadır. Biyoaktivite çalışmaları, MTA'nın inert olmadığını, kalsiyum salımı ve bunu takiben hidroksiapatit oluşumu ile sert doku oluşumunu teşvik ettiğini göstermektedir (Parirokh ve Torabinejad, 2010b; Sarkar ve ark., 2005).

Köpeklerde (Torabinejad M, Hong ve ark., 1995) ve maymunlarda (Torabinejad ve ark., 1997) yapılan çalışmalar sonucunda MTA'ya komşu periapikal dokularda rejenerasyon meydana gelmesi ve özellikle apikal sementogenez oluşması sebebiyle, MTA'nın ideal kök kanal dolum materyali olduğu ileri sürülmektedir (Baek ve ark., 2005).

4.8.1. MTA'nın osteo/odontojenik farklılaşma belirteçleri

MTA osteojenik, dentinojenik ve sementojenik fenotip sergileyici potansiyele sahiptir. MTA'nın klinik uygulama sonucu hücrelerde meydana gelen değişimlerin tespiti için bazı biyokimyasal belirteçler testlerle belirlenmektedir.

Hücrelerin osteo/odontojenik farklılaşma tayini için kullanılan biyokimyasal belirteçler Alkalen fosfataz (ALP), kollajen tip 1, Dentin sialofosfoproteini (DSPP), osteokalsin, osteonektin ve kalsiyumdur (Parirokh ve Torabinejad, 2010a, 2010b). Biyokimyasal belirteçlerin tespiti için bazı testler gerekmektedir. Bu amaçla yapılan testlerden biri olan Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) aracılığıyla hücresel belirleyicilerin tayini ve dokuda meydana gelen farklılaşma tespit edilir.

➤ Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

PZR, dizisi bilinen bir DNA bölgesinin *in vitro* olarak çoğaltılmasını sağlayan ve DNA molekülünün kopyasını kısa zamanda yapmaya olanak sağlayan bir tekniktir (Birben, 2006).

PZR reaksiyonu; DNA' nın iki zincirinin yüksek sıcaklıkta birbirinden ayrılmasını (denatürasyon), sonra sırasıyla sentetik oligonükleotidlerin hedef DNA'ya bağlanmasını (hibridizasyon), zincirin uzamasını (polimerizasyon, çift iplikçikli DNA'ların sentezi), ve tüm bu siklusların belirli sayıda tekrarlanmasını kapsamaktadır (Strachan T, Read, 2004).

Denatürasyon, insan genomik DNA'sı için çoğunlukla 93-95°C arasındadır. Bu basamakta çift iplikçikli DNA birbirinden ayrılmaktadır. Primer bağlanması, çoğunlukla 50-70°C arasında değişmektedir. Bu derece primerlerin erime derecelerine göre değişkenlik göstermektedir. Uzama basamağında, DNA/primer solusyonu 72°C'ye ısıtılmaktadır (Strachan T, Read, 2004; Viljoen ve ark., 2005).

PZR'ın temel bileşenleri:

- 1) Çoğaltılacak DNA bölgesini içeren DNA kalıbı,
- 2) Çoğaltılacak bölgenin başını ve sonunu belirleyen iki primer,
- 3) Çoğaltılacak bölgeyi kopyalayacak olan DNA polimeraz enzimi,
- 4) Yeni zincirin yapımında kullanılacak olan nükleotid trifosfatlar,
- 5) DNA polimeraz enzimi için gerekli olan kimyasal ortamı sağlayan tampon sistemi (Birben, 2006).

Klonlama, genetik tiplendirme, dizileme ve diğer amaçlar için kullanılan çok sayıda PZR çeşitleri bulunmaktadır. Bunlar, Allele-spesifik PZR, Alu PZR, Anchored (Demirlenmiş) PZR, Differential-display PZR, DOP- PZR, Hot-Start PZR, Inverse (Ters) PZR, Island Rescue PZR, Linker-Primed PZR, Nested (Yuvalanmış) Primer PZR,

Asimetrik PZR, *In situ* PZR, Multiplex (Çoklu) PZR, Immuno PZR, RACE PZR, GZ-PZR, Touch Down PZR, Whole Genome PZR ve RT-PZR'dir (Strachan T, Read, 2004).

➤ Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (GZ-PZR)

Nükleik asit çoğalmasıyla eş zamanlı olarak artış gösteren floresans sinyalin ölçülmesiyle kantitatif sonuç verebilen bir PZR yöntemidir. PZR çoğaltımını görünür hale getiren ve monitorize edebilen floresan işaretli prob ve boyaların kullanıldığı, floresanın oluşan DNA ile doğru orantılı olarak arttığı bir çoğaltma yöntemidir. Bu yöntem “kinetik PZR”, “homojen PZR”, “kantitatif GZ-PZR” gibi çeşitli adlarla da isimlendirilmektedir (Gibson ve ark., 1996; Günel, 2007).

GZ-PZR'da oluşan ürünleri belirleme yöntemleri; haberci olarak özgül olmayan işaretlemeler ve diziye özel problemler gibi iki temel kimyasal sistemdir (Günel, 2007; Kubista ve ark., 2006).

GZ-PZR'da kullanılan prob sistemleri ve boyalar (Kubista ve ark., 2006):

A. Özgül Floresan İşaretli Problemler

- FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer)
- Taqman
- Molecular Beacons
- Scorpion Primerleri
- Hibridizasyon Problemleri

B. Özgül Olmayan Floresan İşaretli Problemler

- Syber Green I
- Etidyum Bromid

GZ-PZR ile patojen belirlenmesi, tek nükleotid polimorfizm analizi, kromozom anomalilik analizi, DNA hasarı belirleme, metilasyon tespiti, gen ekspresyon analizi, allelik ayırım denemeleri, özgül bağlantı değişikliklerinin ekspresyon analizi, parafine

gömülü dokulardaki gen ekspresyonu, lazer ile mikro parçalara ayrılmış hücrelerin analizi ve en son olarak real-time immuno PZR ile protein belirlenmesi rahatlıkla yapılabilmektedir (Arya ve ark., 2005; Kubista ve ark., 2006).

4.8.1.1. Alkalen fosfataz (ALP)

Kemik alkalen fosfataz osteoblastların hücre zarının dış yüzeyine glikozilfosfatidilinositol ile bağlanmış bir ektoenzimdir. Kemik alkalen fosfataz ve karaciğer alkalen fosfataz insan serumundaki total alkalen fosfatazın %95'ini oluşturmaktadır (Cremers ve ark., 2008).

Kemik oluşumu sırasında osteoblastik aktiviteyi gösteren ALP'nin üç farklı genden kaynaklanan plasental, karsinoplasental, intestinal ve hepatik-renal/iskelet olmak üzere dört adet izoenzimi bulunmaktadır. Yarı ömrü 1-2 gün olan ALP, osteokalsine göre osteoblastik aktiviteyi değerlendirmede daha kullanışlı bir parametredir (Beck ve ark., 2000; Cremers ve ark., 2008).

Alkalen fosfataz enzimi, fosfat naklini düzenleyerek, kalsifiye doku oluşumunu sağlar. Alkalen fosfataz aktivitesi, hücre kültür sistemlerinde, sert doku yapımını indükleyicidir ve osteoblast ve odontoblastlar için erken tanı işaretidir (Beck ve ark., 2000).

4.8.1.2. Kollajen Tip 1

Kollajen, kemik matriksinin yapısal proteinlerinin %90'ını oluşturmaktadır ve Tip 1 kollajen, kollajenin öncü formudur. Osteoblastlar tarafından Tip 1 kollajen sentezi sırasında amino (-N) ve karboksi (-C) propeptidleri ekstrasellüler endopeptidazlar tarafından koparılmaktadır. Serum Tip 1 kollajen karboksiterminal propeptid (PICP) ve aminoterminal propeptid (PINP) düzeyleri kemikte osteoblastlar ve bağ dokusundaki fibroblastlardaki kollajen sentezindeki değişiklikleri yansıtmaktadır. Her iki propeptid de (PICP, PINP) spesifik poliklonal immunassay yöntemleri ile ölçülebilmektedir (Cremers ve ark., 2008; Melkko ve ark., 1996).

Plazma total ALP aktivitesi ile serum prokollajen konsantrasyonu arasında iyi bir korelasyon olduğu bildirilmiştir. Ayrıca yapılan çalışmalarda serum PICP ve kemik yapımı arasında da iyi bir korelasyon saptanmıştır (Garnero ve ark., 1994).

4.8.1.3. Dentin sialofosfoproteini (DSPP)

Odontoblastlar tarafından sentezlenmektedir ve dentinin kollajen olmayan organik matriksinin önemli bir bileşenidir. Dentin sialoprotein (DSP) ve dentin fosfoprotein (DPP)'nin sadece odontoblastlar için özel proteinler olduğu ve bu proteinler tek bir gende kodlanarak (DSPP)- Dentin sialofosfoproteini oluşturmaktadır (Bleicher ve ark., 2001; MacDougall ve ark., 1997).

In vitro çalışmalarda, bir hücrenin odontoblast hücresi olduğunun anlaşılması için dentine özel protein olan DSPP sentezini gerçekleştiriyor olması şarttır. Kemik ve dentin dokusundaki ayırıcı faktör DSPP sentezidir (Bleicher ve ark., 2001).

4.8.1.4. Osteokalsin (Ocn)

Osteokalsin, kemik, dentin ve muhtemelen diğer mineralize dokuların organik matrikslerinde bol bulunan Ca bağlayan proteindir. İnsan osteokalsin proteini, tek polipeptid zinciri üzerindeki 49 amino asitten oluşmaktadır. Osteokalsin osteoblastik aktivitelere özgü belirteç olduğundan dolayı, kemik patolojilerinde klinik olarak önemli bir tanı aracı olarak kullanılmaktadır (Hauschka ve ark., 1989).

4.8.1.5. Osteonektin

Kemiğin ekstrasellüler matriksinde yer alan osteonektin, kollajenle bileşik oluşturarak kristal depozisyonunu teşvik eder (Kömürcü ve ark., 2011).

4.8.1.6. Kalsiyum (Ca)

İnsan vücudundaki kalsiyumun %99'u kemiklerde ve dişte bulunur. Kalsiyum iyonlarının temel rolü kemik mineralizasyonuna katılmaktır. Kemik mineralizasyonu,

kalsiyum tuzlarının hidroksiapatit kristalleri şeklinde kollajen fibriller üzerinde birikmesi ile gerçekleşmektedir (<http://tr.wikipedia.org/wiki/Kalsiyum>, Erişim tarihi:04.09.2014).

Alizarin Red S ve Von Kossa tekniği çoğunlukla kalsiyumun saptanması amacıyla kullanılmaktadır (Gregory ve ark., 2004). Von Kosa metodu, gümüş iyonlarının kalsiyum tuzlarındaki anyonlar ile bağlanması sonrasında meydana gelen reaksiyon sonucunda gümüş tuzlarının koyu kahverengi ya da siyah metalik gümüş renge boyanması prensibine dayanmaktadır (Wang ve ark., 2006).

Alizarin Red S kalsiyum katyonları ile reaksiyona girerek şelat oluşturmaktadır. Boyanma sonucunda kalsiyum tuzları turuncu/kırmızı renk almaktadır (Gregory ve ark., 2004).

Araştırmamızda; sertleşme süresi farklı hızlandırıcılar (%10 CaCl₂, %5 CaCl₂, K-Y Jelly ve Na₂HPO₄) ile kısaltılan Beyaz ProRoot MTA'nın (Dentsply Tulsa Dental, Johnson City, TN) daimi diş pulpasından elde edilen mezenkimal kök hücre üzerindeki sitotoksitesinin ve osteo/odontojenik farklılaşma kapasitesinin incelenmesi ve karşılaştırılması amaçlanmıştır.

5. GEREÇ VE YÖNTEM

5.1. Gereç

5.1.1. Materyal

- Beyaz ProRoot MTA (Dentsply Tulsa Dental, Johnson City, TN)

5.1.2. Sertleşme süresini kısaltmak için kullanılan hızlandırıcılar

- Serum fizyolojik (İzotonik %0.9 NaCl 500 ml, Eczacıbaşı Baxter)
- Anestezik solüsyon (%4 Artikain HCl ile 1: 200 000 epinefrin, Maxicaine, VEM İlaç)
- K-Y Jelly (Johnson & Johnson, Markham, Kanada)
- Kalsiyum klorid (Katolog No:1.02382.1000, Merck, Darmstadt, Almanya)
- Sodyum hidrojen fosfat (Katolog No:1.06586.0500, Merck, Darmstadt, Almanya)

5.1.3. Sertleşme süresi belirleme deneyinde kullanılan cihazlar

- Hassas terazi (Shimadzu AUX-220, Uni Bloc)
- Vicat test cihazı (Alşa Lab, İstanbul)

5.1.4. Dişlerin laboratuvara transferi için kullanılan gereçler

- Dulbecco's Modifiye Eagle Besiyeri (DMEM), Low Glucose, GlutaMAX™, pyruvate (Gibco Invitrogen, Grand Island, NY; 10567-022)
- Fetal Sığır Serum (FBS) (SIGMA-ALDRICH, Steinheim, Germany; F7524)
- Penisilin/streptomisin (SIGMA-ALDRICH, Steinheim, Germany; P4333)
- Vida Kapaklı PP Santrifüj Tüpü, 15 ml (ISOLAB Laborgerate GmbH, Wertheim, Germany; S.078.02.004)

5.1.5. İnsan diş pulpa kök hücrelerin izolasyonunda kullanılan gereçler

- Diş kesme seti (Aeratör, elmas frez) (Sinol, Germany)

- Steril ekskavatör ve steril pensler (Carl Martin GmbH, Solingen Germany)
- Minimum Essential Besiyeri (α -MEM), GlutaMAXTM, No Nucleosides (Gibco Invitrogen, Grand Island, NY;32567-037)
- Penisilin/streptomisin (SIGMA-ALDRICH, Steinheim, Germany; P4333)
- Fetal Sığır Serumu (FBS) (SIGMA-ALDRICH, Steinheim, Germany; F7524)
- Bistüri (Broche, Nurteks, İstanbul, Türkiye)
- 6 Kuyucuklu Kap (SIGMA-ALDRICH, Steinheim, Germany)

5.1.6. Alt-kültür (pasajlama) işleminde kullanılan gereçler

- Kalsiyum-Magnezyum içermeyen Dulbecco's Fosfat Buffered Tuz Solüsyonu (DPBS; Ca^{++} Mg^{++} - free-) (PAN-Biotech GmbH Aidenbach, Germany)
- Penisilin/streptomisin (SIGMA-ALDRICH, Steinheim, Germany; P4333)
- Minimum Essential Besiyeri (α -MEM), GlutaMAXTM, No Nucleosides (Gibco Invitrogen, Grand Island, NY;32567-037)
- Fetal Sığır Serumu (FBS) (SIGMA-ALDRICH, Steinheim, Germany; F7524)
- % 0,25 Trypsin-EDTA solüsyonu (SIGMA-ALDRICH, Steinheim, Germany; T4049)
- Vida Kapaklı PP Santrifüj Tüpü, 15 ml (ISOLAB Laborgerate GmbH, Wertheim, Germany; S.078.02.004)
- T-25 hücre kültür kabı (SIGMA-ALDRICH, Steinheim, Germany; C6231)

5.1.7. Hücre sayımında kullanılan gereçler

- Kalsiyum-Magnezyum içermeyen Dulbecco's Fosfat Buffered Tuz Solüsyonu (DPBS; Ca^{++} Mg^{++} - free-) (PAN-Biotech GmbH Aidenbach, Germany)
- Vida Kapaklı PP Santrifüj Tüpü, 15 ml (ISOLAB Laborgerate GmbH, Wertheim, Germany; S.078.02.004)
- Hemositometre (Reichert, Hauser Scientific Company, Horsham, PA)
- Mikroskop (Nikon T1-SM, Japan)
- Penisilin/streptomisin (SIGMA-ALDRICH, Steinheim, Germany; P4333)

- Minimum Essential Besiyeri (α -MEM), GlutaMAXTM, No Nucleosides (Gibco Invitrogen, Grand Island, NY; 32567-037)
- Fetal Sığır Serumı (FBS) (SIGMA-ALDRICH, Steinheim, Germany; F7524)

5.1.8. Diş pulpa kök hücrelerinin dondurulması işleminde kullanılan gereçler

- Kalsiyum-Magnezyum içermeyen Dulbecco's Fosfat Buffered Tuz Solüsyonu (DPBS; Ca^{++} Mg^{++} - free-) (PAN-Biotech GmbH Aidenbach, Germany)
- Fetal Sığır Serumı (FBS) (SIGMA-ALDRICH, Steinheim, Germany; F7524)
- % 0,25 Trypsin-EDTA solüsyonu (SIGMA-ALDRICH, Steinheim, Germany; T4049)
- Dimetilsülfoksit (DMSO; AppliChem, Darmstadt, Germany; D64291)
- Vidalı Kapaklı tüp 1,5 ml (Corning Axygen, Tewksbury, USA; SCT-150-C)

5.1.9. Akış sitometri analizlerinde kullanılan antikor ve gereçler

- Akış sitometri cihazı (BD FACSCalibur, BD Biosciences, California, USA)
- % 0,25 Trypsin-EDTA solüsyonu (SIGMA-ALDRICH, Steinheim, Germany; T4049)
- Fosfat Buffered Tuz Solüsyonu (PBS) (PAN-Biotech GmbH Aidenbach, Germany)
- CD 44 (BD Biosciences Pharmingen, California, USA; 555478)
- CD 90 (BD Biosciences Pharmingen, California, USA; 555596)
- CD 24 (BD Biosciences Pharmingen, California, USA; 555824)
- CD 45 (BD Biosciences Pharmingen, California, USA; 555484)
- CD 117 (BD Biosciences Pharmingen, California, USA; 340529)

5.1.10. Hücre canlılık ve çoğalma testlerinde kullanılan gereçler

- Penisilin/streptomisin (SIGMA-ALDRICH, Steinheim, Germany; P4333)
- Fetal Sığır Serumı (FBS) (SIGMA-ALDRICH, Steinheim, Germany; F7524)
- Minimum Essential Besiyeri (α -MEM), GlutaMAXTM, No Nucleosides (Gibco Invitrogen, Grand Island, NY; 32567-037)
- % 0,25 Trypsin-EDTA solüsyonu (SIGMA-ALDRICH, Steinheim, Germany; T4049)

- MTS (3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H- tetrazolium) test kiti (CellTiter96 Aqueous One Solution, Promega, UK)
- 96 Kuyucuklu Kap (SIGMA-ALDRICH, Steinheim, Germany)
- Monokromatik sistemli mikropilaka okuyucu (ELISA reader, Multiskan Plus MK, USA)

5.1.11. SEM (Taramalı Elektron Mikroskop) için gerekli gereçler

- Sodium Cacodylate Buffer pH 6.5 (SIGMA-ALDRICH, Steinheim, Germany)
- % 2,5 Glutaraldehit solüsyonu (SIGMA-ALDRICH, Steinheim, Germany)
- Taramalı Elektron Mikroskop (Carl Zeiss Microscope, Meditec AG Göschwitzer, Germany)

5.1.12. Alkalen Fosfataz (ALP) tayini için gereçler

- 24 Kuyucuklu Kap (SIGMA-ALDRICH, Steinheim, Germany)
- Tris Buffer (SIGMA-ALDRICH, Steinheim, Germany)
- Alkaline Phosphatase Detection Kit (Randox ALP kiti, U.K.)
- Hoechst Stock Solution (Hoechst 33342, Thermo Scientific, USA)
- Sonikasyon cihazı (Bandelin Electronic, Germany)
- Monokromatik sistemli mikropilaka okuyucu (ELISA reader, Multiskan Plus MK, USA)

5.1.13. Von Kossa boyaması için gerekli gereçler

- Yuvarlak lamel (Cover Glasses round) , 12 mm beyaz (Warner Instruments, Hamden, CT)
- 24 Kuyucuklu Kap (SIGMA-ALDRICH, Steinheim, Germany)
- Tween 20 (SIGMA-ALDRICH, Steinheim, Germany)
- Von-Kossa Kalsiyum Kit (Diagnostic BioSystems, California USA)
- Stereo Mikroskop (Nikon T1-SM, Japan)

5.1.14. Gerçek Zamanlı Polimer Zincir Reaksiyonu (GZ-PZR) için gerekli gereçler

- GeneJET RNA Purification Kit (Thermo Scientific, USA)
- qScript™ cDNA SuperMix (Quanta BioSciences, Inc., USA)
- FIREPol DNA Polymerase (Solis BioDyne, Estonia)
- Tris Borik Asit (TBE) (BIO-RAD, California, USA)
- Fermentas 6X DNA Loading Dye (Thermo Scientific, USA)
- Fermentas Generuler 50 bp DNA LADDER (Thermo Scientific, Massachusetts, USA)
- Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix(2X)(Thermo Scientific, USA)
- 96 Kuyucuklu PZR Kap (CORNING, AXYGEN, Union, CA)
- PZR tüp-0,2ml (CORNING, AXYGEN, Union, CA)
- GZ-PZR Cycler (iCycler, BIO-RAD, California, USA)

5.1.15. Araştırmada kullanılan diğer cihazlar

- CO₂ inkübatör (Binder GmbH, Tuttlingen, Germany)
- Laminar akışlı steril kabin (Telstar BIO II – A, Terrassa, Spain)
- Inverted mikroskop (Olympus, Tokyo, Japan; CKX41)
- Vorteks (Labart, Berlin, Germany; MVS1)
- Mikrosantrifuj (Sigma, Osterode, Germany; 1-14 ve Hettich, Gartenstr, Germany; Micro 120)
- Hassas terazi (Shimadzu, Makati, Philippines; AW120 model)
- 37 °C su banyosu (Nüve, Ankara, Türkiye; ST 402)

5.2. Yöntem

Araştırmamız, Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 1400002822 protokol kodu ile değerlendirilmiş ve 07.11.2014 tarihinde onaylanmış ve Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Komisyonu Başkanlığı tarafından SAG-C-DRP-280214-0036 numaralı proje ile desteklenmiştir.

Araştırmamızda; etik kurulu raporunda belirtildiği şekilde Marmara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi'ne başvuran ve herhangi bir sistemik hastalığı bulunmayan ortodontik tedavi amaçlı çekim endikasyonu konulmuş ve Marmara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı'nda hastaların onayı alınarak çekilmiş daimi dişler kullanılmıştır.

Farklı hızlandırıcılar ile hazırlanan MTA'nın daimi diş pulpasından elde edilen mezenkimal kök hücreler üzerindeki sitotoksitesinin ve rejeneratif kapasitesinin incelenmesi amaçlandığı araştırmamız temel olarak dört aşamada gerçekleştirildi. Bu aşamalar:

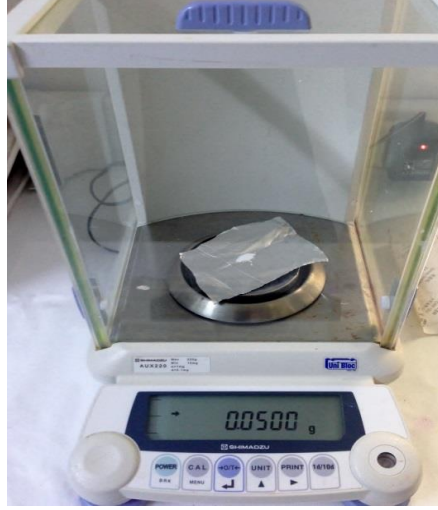
- Sertleşme süresinin belirlenmesi
- Mezenkimal kök hücre izolasyonu
- Farklı hızlandırıcılar ile hazırlanan MTA örneklerinin sitotoksite tayini
- Farklı hızlandırıcılar ile hazırlanan MTA örneklerinin farklılaşma kapasitesinin tayini

5.2.1. Farklı hızlandırıcılar ile hazırlanan MTA örneklerinin sertleşme süresinin belirlenmesi

5.2.1.1. Sertleşme süresinin belirleneceği MTA örneklerinin hazırlanması

Deney materyali olarak kullanılan Beyaz ProRoot MTA (Dentsply Tulsa Dental, Johnson City, TN) üretici firmanın talimatlarına uygun olarak toz/likit oranı 3 olacak

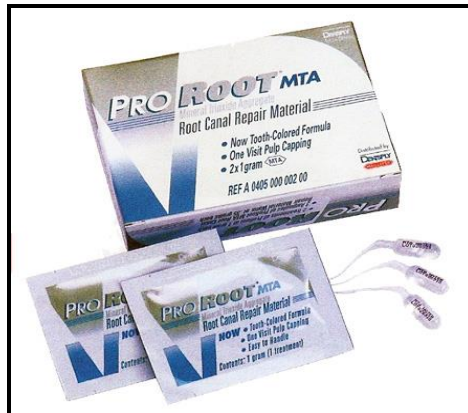
şekilde cam üzerinde, spatüllerle karıştırıldı. Örnekler için Beyaz ProRoot MTA farklı hızlandırıcılar ile karıştırılarak hazırlandı. MTA örneklerin yapısına eklenecek hızlandırıcıların ağırlığı hassas terazi (Shimadzu AUX-220, Uni Bloc) kullanılarak tartıldı (Resim 1).



Resim 1 Hassas terazi ile hızlandırıcıların ağırlığının ölçülmesi

Toplamda yedi adet grup oluşturuldu. Gruplar şu şekildedir;

Grup 1: 1 gram ProRoot MTA tozu, 0,3 ml distile su (Resim 2)



Resim 2 Beyaz ProRoot MTA (Dentsply Tulsa Dental, Johnson City, TN)

Grup 2: 1 gram ProRoot MTA tozu, 0,3 ml serum fizyolojik (İzotonik % 0,9 NaCl 500 ml, Eczacıbaşı Baxter) (Kogan ve ark., 2006) (Resim 3)



Resim 3 İzotonik serum fizyolojik

Grup 3: 1 gram ProRoot MTA tozu, 0,3 ml anestezik solüsyon (2 mL artikain hidroklorür + 0,010 mg epinefrin, Maxicaine, VEM İlaç) (Kogan ve ark., 2006) (Resim 4)



Resim 4 Anestezik solüsyon (Maxicaine)

Grup 4: 1 gram ProRoot MTA tozu, 0,25 ml K-Y Jelly (Johnson & Johnson, Markham, Kanada) (Mehrvarzfar ve ark., 2014) (Resim 5)



Resim 5 K-Y Jelly

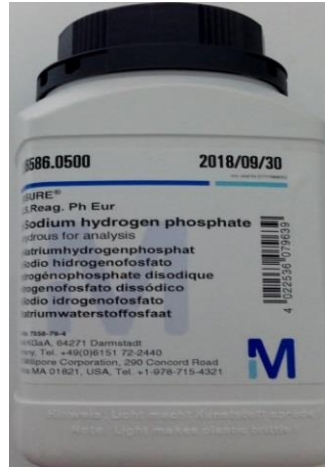
Grup 5: 1 gram ProRoot MTA tozu, 0,1 gram kalsiyum klorid (MTA ağırlığının %10 CaCl_2) (Katolog No:1.02382.1000, Merck, Darmstadt, Almanya) (Bortoluzzi ve ark., 2006) ile 0,3 ml distile su (Resim 6)



Resim 6 Kalsiyum klorid

Grup 6: 1 gram ProRoot MTA tozu, 0,05 gram kalsiyum klorid (MTA ağırlığının %5 CaCl_2) (Katolog No:1.02382.1000, Merck, Darmstadt, Almanya) (Kogan ve ark., 2006) ile 0,3 ml distile (Resim 6)

Grup 7: 1 gram ProRoot MTA tozu, 0,15 gram disodyum hidrojen fosfat (MTA ağırlığının %15 Na_2HPO_4) (Katolog No:1.06586.0500, Merck, Darmstadt, Almanya) (Ding ve ark., 2008) ile 0,3 ml distile su (Resim 7)



Resim 7 Disodyum hidrojen fosfat

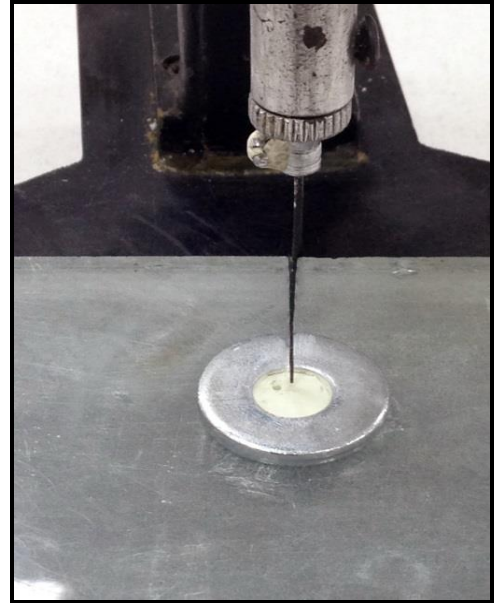
5.2.1.2. Sertleşme sürelerinin ölçülmesi

ANSI/ADA No:57 ve ISO 6876:2001 standartları doğrultusunda ProRoot MTA (Dentsply Maillefer, İsviçre) örneklerinin sertleşme süreleri kontrollü sıcaklık ($37 \pm 1^\circ\text{C}$) ve nispi nem ($\% 95 \pm 5$) altında ölçüldü (ANSI/ADA Spec. No., 2000; 6876. ISO, 2001). Sertleşme süresi Vicat Test Cihazı (Alşa Lab, İstanbul) (Resim7) ile belirlendi. Cihaz sarsıntısız, düz bir yüzeyde cam veya metal bir levha üzerine konuldu. Distile su (üretici talimatına göre) ve farklı hızlandırıcılar ile hazırlanan MTA örnekleri 10 mm çapında 2 mm yüksekliğinde paslanmaz çelikten yapılmış halkaya yerleştirildi (Resim 8).



Resim 8 Vicat cihazı ve Vicat halkası

Vicat halkası içersine konulan örneklerin yüzeyi spatula ile düzeltildi ve örnekler halkanın üst kenarı seviyesinden bırakıldı. Vicat iğnesi camın üzerine kadar indirilerek aletin göstergesi sıfırlandı. İğnenin ucu, hazırlanmış olan Vicat halkasının ortasında MTA örneklerinin üst yüzeyine dokunacak kadar indirilip serbest bırakıldı. İğne, kendi ağırlığı ile MTA örneklerinin içersine girdi (Resim 9).



Resim 9 Sertleşme süresinin belirlenmesi

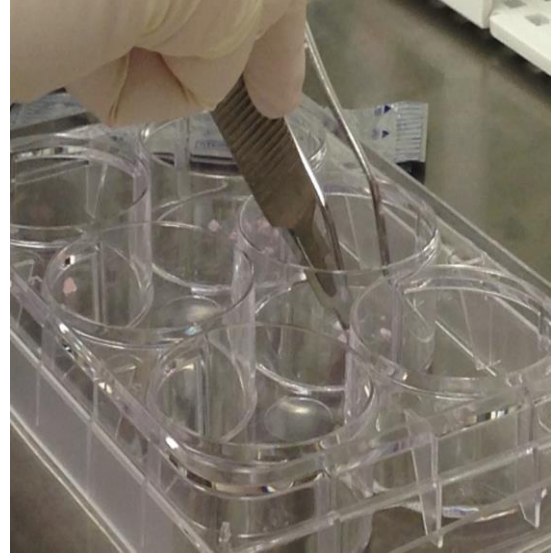
Sertleşme süresinin tespiti için iğne 5 dakikada bir örneklerle batırıldı. İğnenin bir defa girmiş olduğu yere bir daha girmemesi için Vicat halkasının durumu her batırılıştan sonra yeri değiştirildi. İğne her batırılıştan sonra nemli bir bez ile iyice silindi. İğnenin halka kalıp içindeki örnekte girinti oluşturmadığı zaman kaydedildi ve sertleşme süresi olarak belirlendi. Bu işlem her örnek için 2 kez tekrarlandı.

Sertleşme süresini kısaltan farklı hızlandırıcılar ile hazırlanan MTA örneklerinin sitotoksosite ve rejeneratif kapasitesini belirlemek için daimi diş pulpasından kök hücre izolasyon, pasajlama, hücre sayımı ve hücrelerin karakterizasyon işlemine geçildi.

5.2.2. Daimi diş pulpası kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin izolasyonu

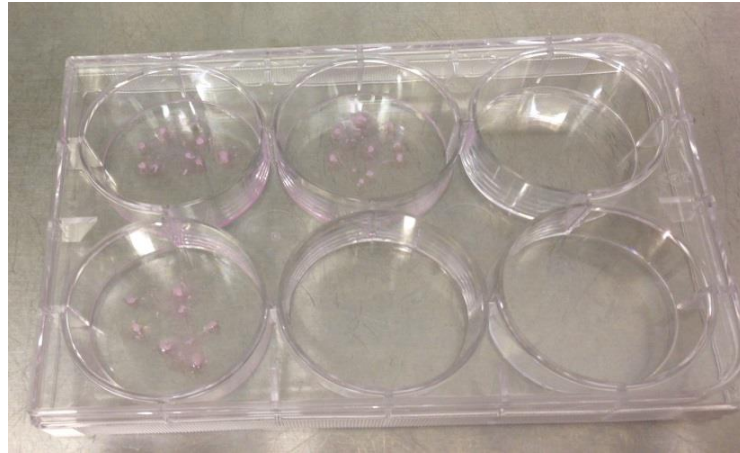
Araştırmamız, Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 1400002822 protokol kodu ile 07.11.2014 tarihinde onaylandıktan sonra çalışmaya dahil edilen tüm bireylere, hazırlanmış olan “Bilgilendirilmiş Onam Formu” imzalatıldı. Marmara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı’nda 16-18 yaş grubu hastalarda, herhangi bir sistemik hastalığı bulunmaması (diyabet, hipertansiyon vb sistemik rahatsızlıklar veya herhangi bir sendrom) ve çekimin diğer dişlere zarar vermemesi ve dişte enfeksiyon olmaması göz önüne alınarak toplam 10 hasta çalışma kapsamına alındı. Ortodontik tedavi amaçlı çekim (3. molar dişler) endikasyonu bulunan hastalarda dişlerin çekimi etik ve asepsi kurallarına uygun şekilde gerçekleştirildi. Dişler çekim sonrası konik kapaklı tüpler içindeki Harvest Besiyeri (%10 oranında penisilin/streptomisin içeren DMEM [Low Glukoz] ve %10 FBS) içine alınarak, buz kalıpları içinde, çalışmanın gerçekleştirildiği Yeditepe Üniversitesi Mühendislik ve Mimarlık Fakültesi Genetik ve Biyomühendislik Bölümü Laboratuvarına ulaştırıldı.

Dişlerin yüzeyindeki gingival ve periodontal dokular kazınarak uzaklaştırıldı. Sonrasında aeratör kullanılarak diş mine-sement birleşim bölgesinden ayrıldı ve pulpa dokusu steril bir ekskavatör ile çıkarıldı. Laminar akışlı steril kabinde pulpa dokusu bisturi yardımı ile küçük parçalar haline getirildi (Resim 10).



Resim 10 Pulpa dokusunun steril ekskavatör ile çıkarılması ve pulpa dokusunun parçalara ayrılması

Pulpa dokuları %10 penisilin/streptomisin içeren α -MEM (%10 FBS içerir) besiyerine alınarak (Resim 11), 2 saat beklendi ve sonrasında besiyeri arttırılarak 37 °C, %5 CO₂ ve nemli ortamda (CO₂ inkübatöründe) kültüre alındı.



Resim 11 Pulpa dokusunun penisilin/streptomisin içeren α -MEM (%10 FBS) besiyerine alınması

Yaklaşık 48 saat sonra besiyeri değiştirildi. Kök hücre proliferasyonları için beklendi, düzenli olarak inverted mikroskopta kontrol edildi ve haftada 2 kez olmak üzere besiyerleri değiştirildi.

5.2.3. Daimi diş pulpa kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin alt-kültür işlemi (Pasajlama)

Yaklaşık 16-18 gün sonra kültür kabının tabanı % 70-80 oranında hücrelerce doldurulduğunda alt-kültür işlemine geçildi. Birincil kültür sıfıncı pasaj (P0) kabul edilerek, birincil kültürü takip eden her alt-kültür işlemi sonrası pasaj sayıları P1, P2, P3, P4 şeklinde belirtildi.

Laminar akışlı steril kabinde gerçekleştirilen alt-kültür işleminde; besiyeri ve içindeki tutunmayan hücreler döküldükten sonra, kültür kabı yüzeyleri 3-4 ml Ca^{+2} ve Mg^{+2} içermeyen PBS ile 2 kere yıkandı. Tripsin-EDTA solüsyonu (1,5-2 ml % 0,25) eklenerek, CO_2 inkübatörde 5 dk. inkübe edildi. Zıt faz mikroskopta hücrelerin tümünün yüzeyden ayrıldığı gözlemlendikten sonra, tripsinin inaktivasyonu için flasklara, tripsinle aynı miktarda FBS içeren α -MEM eklendi. Daha sonra hücreler 15 ml'lik konik tabanlı tüplere alındı ve 1800 rpm'de 5 dk. santrifüj (Hettich Centrifuge Rotofix 32A, Germany) edildi (Resim 12).



Resim 12 Mezenkimal kök hücrelerin 1800 rpm'de santrifügasyonu

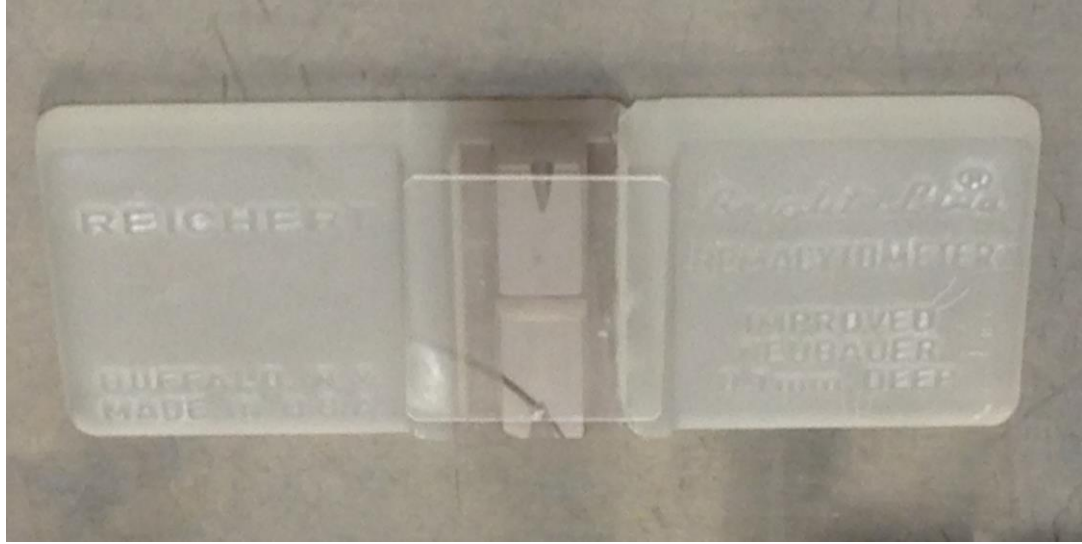
Süpernatant atıldıktan sonra, pelete 1 ml besiyeri eklenip, pipetlenerek homojenizasyonun sağlanmasının ardından, hücreler kültür flasklarına (T-25 kültür

kaplarına) ekildi ve 3 günde bir besiyeri değiştirilerek, kültür işlemi devam ettirildi (Freshney ve ark., 2007).

5.2.4. Daimi diş pulpa kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin sayımı

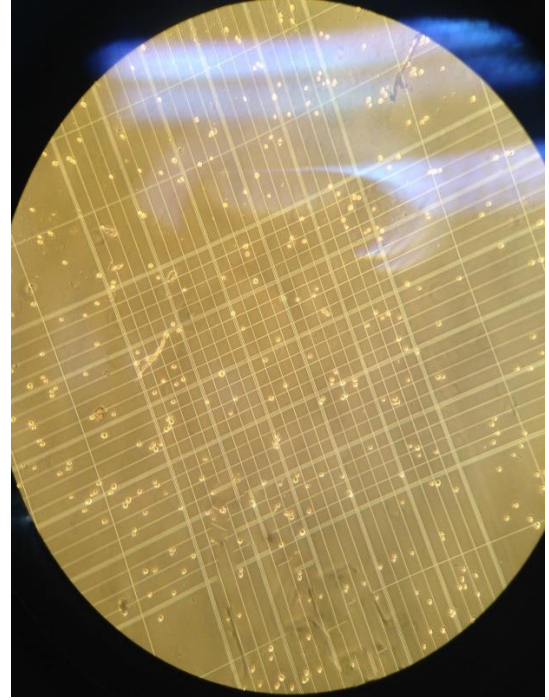
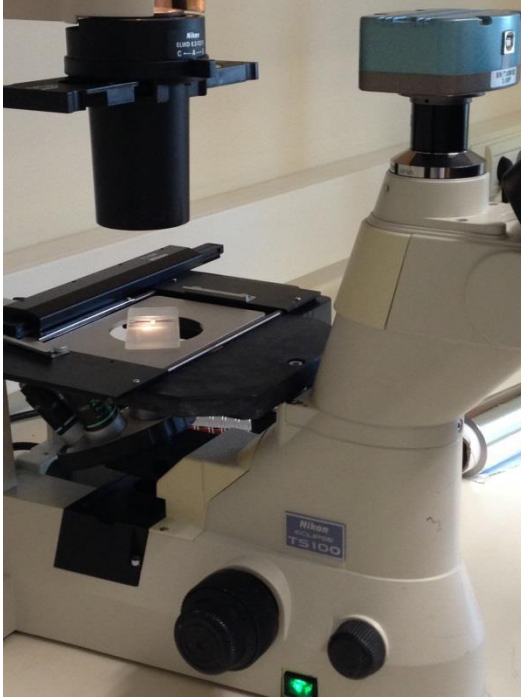
İnsan daimi diş pulpasından izole edilen kök hücreler için her alt-kültür işlemi sırasında ve karakterizasyon işlemleri öncesinde gerçekleştirilen hücre sayımları için tripsinizasyon işlemi ile tutunan hücreler yüzeyden kaldırıldıktan sonra süpernatant atılarak, pelete 1 ml besiyeri eklendi ve pipetle homojenizasyon sağlandı. Eppendorf tüplerine 100 µl hücre süspansiyonu alındı.

Sayım için hemositometre (Reichert, Hausser Scientific Company, Horsham, PA) kullanıldı. Hemositometre düz zemin üzerine alınarak, lamelin yapışması gereken sayım alanı çerçevesi üzerine lamel kapatıldı (Resim 13).



Resim 13 Hemositometre

Hücrelerin 10 µl'si, Thoma lamının her iki yanında bulunan kanalların ortasında kalan sayım alanına pipetlendi. Hücre sayımı, ışık mikroskopunda (Nikon T1-SM, Japan), 10x büyütmede 2 defa gerçekleştirildi (Resim 14).



Resim 14 Işık mikroskobunda hücre sayımı

Toplam hücre sayıları aşağıdaki formüle göre hesaplandı;

$$Hs \times Do \times Ss$$

Hs : Sayılan hücre sayısı

Do : Seyreltme oranı

Ss : 0,1 mm³ deki sayım sonucu 1ml'deki sayıya dönüştürmek ve standart sonuç elde etmek için kullanılır. Sabit sayı 10 000'dir.

5.2.5. Daimi diş pulpa kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin dondurularak saklanması

İnsan daimi diş pulpasından izole edilen hücreler her alt-kültür işlemi sonrası dondurularak saklandı. Dondurma işlemi öncesinde toplam 5ml olacak şekilde 4,75ml fetal sığır serum (FBS) ve 250 µl dimetilsülfoksit (DMSO) içeren dondurma besiyeri

hazırlandı. Hücreler tripsinizasyon işlemi ile kaldırılıp santrifüj edildikten sonra, daha önce hazırlanan dondurma ortamına eklendi ve hücre peleti ile karıştırılarak, pipetle homojenizasyonu sağlandı. İleri aşamalarda kullanılmak üzere kriyo tüpler -80°C’de dondurulmaya bırakıldı.

5.2.6. Daimi diş pulpa kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin karakterizasyon çalışmaları

İnsan daimi diş pulpasından izole edilen ve kültür kabının tabanına yapışan hücrelerin immunofenotipik özelliklerin belirlenmesi için akış sitometrik analizler yapıldı.

5.2.6.1. Akış sitometrik analizler

İzole edilen hücreler akış sitometri cihazı (BD FACSCalibur, BD Biosciences, California, USA) ile yüzey antijenlerine göre uygun antikorlar ile tanımlandı.

Pasajlama işlemi sırasında P2’den P3’e geçerken hücreler tripsinizasyon işlemi ile kaldırılıp, hücre sayımı yapılarak hücre sayısı belirlendikten sonra 100 µl (yaklaşık olarak 2×10^5 hücre) PBS içinde homojenize edildi. Daha sonra belirlenen hücre yüzey işaretleyicilerine özel fluoresan izotiyosiyonat (FITC)- ve fikoeritrin (PE)-konjuge monoklonal antikorlar (CD24, CD44, CD45, CD90 ve CD117) 20 µl eklenerek inkübe edildi (4°C karanlıkta - 60 dakika). İnkübasyon sonrası santrifüj edilip (5 dk., 1800 rpm) boyalı sıvı çekildi. Sonrasında içerisine 1000 µl PBS konulup tekrar santrifüj edilerek artefaktlardan temizlendi ve 500 µl hücre yıkama solüsyonu ile resüspanse edildi. Hazırlanan hücre süspansiyonu FACS Calibur akış sitometri cihazında (Resim 15) okutuldu ve analizi BD Cell Quest TM software programı ile gerçekleştirildi (Gronthos ve ark., 2002).



Resim 15 Akış sitometri cihazı

5.2.7. Canlılık ve çoğalma deneyi

5.2.7.1. Canlılık ve çoğalma deneyi için farklı hızlandırıcılar ile MTA örneklerinin hazırlanması

Sitotoksosite testi için ProRoot MTA farklı hızlandırıcılar ile karıştırılarak hazırlandı. Araştırmamızda kullanılan tüm el aletleri, siman camları otoklavda (Cominox Sterilclave®) sterilize edildi. Herhangi bir kontaminasyon olmaması için tüm malzemelerin hazırlanması laminar akışlı steril kabinde, steril koşullar altında gerçekleştirildi.

Üretici firmanın önerileri doğrultusunda ProRoot MTA (Dentsply Tulsa Dental, Johnson City, TN) sıvısı tozun yanına boşaltıldı ve homojen kıvam elde edilinceye kadar yaklaşık 1 dk. karıştırıldı. Vicat test cihazı sonuçlarına göre serum fizyolojik ve anesteziik solüsyon çalışma grubundan çıkarıldı ve sertleşme süresini kısaltan farklı hızlandırıcılar ile toplam 5 grup oluşturuldu.

Gruplar:

Grup A: ProRoot MTA tozu + %10 CaCl_2

Grup B: ProRoot MTA tozu + K-Y Jelly

Grup C: ProRoot MTA tozu + Na_2HPO_4

Grup D: ProRoot MTA tozu + Distile su

Grup E: ProRoot MTA tozu + %5 CaCl_2

Hazırlanan karışım 48 kuyucuklu kap tabanına, yaklaşık 2 mm yüksekliğinde olacak şekilde sitotoksisite tayini yapılacak 1., 3. ve 7. günler için her bir güne her örnek için 4 adet olmak üzere toplam 60 kuyuya yerleştirildi (Resim 16).



Resim 16 Canlılık ve çoğalma deneyi için her bir güne 4 adet hazırlanan 2 mm yüksekliğindeki MTA örnekleri.

Farklı hızlandırıcılar ile hazırlanan MTA örneklerinin yerleştirildiği 48 kuyucuklu kap sterilizasyon amacıyla 30 dak. UV altında bekletildi ve tam polimerizasyon için 48 saat 37°C, %5 CO₂ ve nemli ortamda (CO₂ inkübatörü) bekletildi. Hücre ekimi öncesinde laminar flow içinde, kapakları açık bir şekilde UV altında 30 dakika tutuldu.

5.2.7.2. Canlılık ve çoğalma deneyi için hücre ekimi

Ekim günü üç kez pasajlanmış olan hücreler 10 ml PBS ile 2 kez yıkandı ve 1 dk. bekletilip PBS uzaklaştırıldı. Daha sonra, 10 ml tripsin eklendi ve örnekler 5-6 dk. inkübatörde bekletildi. Zıt faz mikroskobu ile hücrelerin yüzeyden ayrılıp ayrılmadığı kontrol edildi. Hücreler konik tabanlı 15 ml'lik tüpe alınıp üzerine tripsinle aynı miktarda besiyeri (FBS içeren) eklendi. 1800 rpm'de 5 dk. santrifügasyonun ardından süpernatant atıldı ve besiyeri eklenerek pipetlendi.

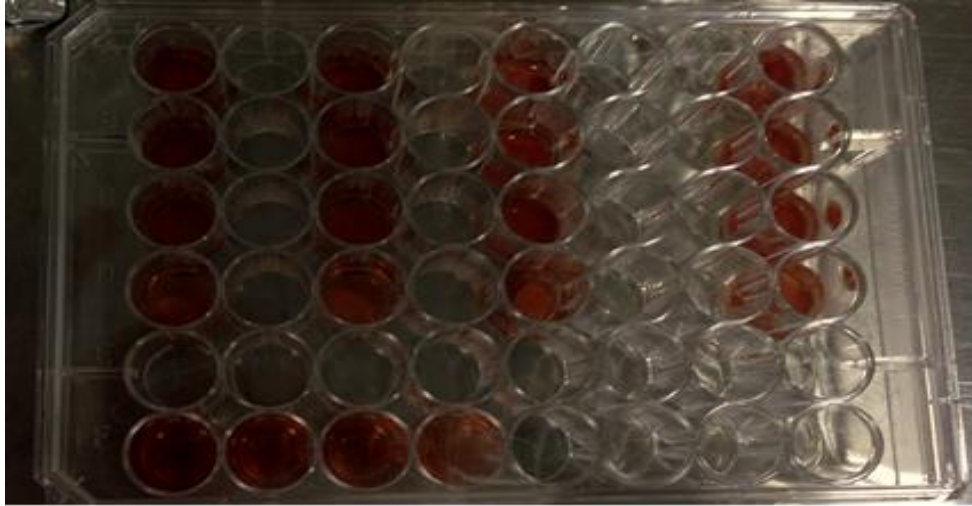
Farklı hızlandırıcılar ile hazırlanan MTA örneklerinin ve kontrolü hazırlanan her grup da MTS testi için 48 kuyucuklu kaplara 2000 hücre, SEM görüntülemesi içinde 24 kuyucuklu kaplar içerisine yerleştirilen lameller üzerindeki metal yüzüklere hazırlanan MTA örnekleri üzerine 3000 hücre ekildi. Kültür süresince tüm örnekler 37°C, %5 CO₂ ve nemli ortamda (CO₂ inkübatöründe) inkübe edildi.

5.2.7.3. Sitotoksisite (MTS) testi

Bu test hücre büyümesi için gerekli olan metabolik bileşenlerin fonksiyonlarını tespit ederek canlılığı ortaya koyar. Hücrede meydana gelen bir hasar, hücrenin hayati fonksiyonu ve büyümesi için lazım olan enerjinin sağlanması ve sürdürülmesine engel olur. MTS (3-(4, 5-dimethyl-thiazol-2-yl)-5-(3-carboxy-methoxy-phenyl)-2- (4-sulfo-phenyl)-2H-tetrazolium), mitokondride bulunan enzim aktivitesini tespit eden bir tetrazolium-tuz bazlı kolorimetrik yöntemdir. Canlı hücrelerde bulunan enzimlerin MTS'i formazana indirgemesi ile sarı renkte olan solüsyon mavi-mor renge dönüşür (Cory ve ark., 1991).

48 kuyucuklu kap için 2000 hücre/kuyucuk olacak şekilde, kullanılacak hücre miktarı hesaplandı ve ekimi yapıldı. Her bir materyalin 3 kuyucuğu üzerine 2000 hücre (DPKH) ekildi ve her bir örnek için hücresiz bir kuyucuk (blank; sadece materyal ve besiyeri) hazırlandı ve kontrol olarak her gün için en az 2 kuyucuğa hücre ekimi yapıldı.

1 gün süreyle inkübatörde bekletildi. MTS testinin yapılacağı 1., 3. ve 7. günlerde istenen kuyucuktaki hücreler PBS ile yıkandı ve 1 dk. bekletilip PBS uzaklaştırıldı ve totalde 250 µl olacak şekilde karanlık ortamda her bir kuyucuğa 210 µl besiyeri (% 10 FBS ve %10 Primosin içeren DMEM low Glucose) ve 40 µl MTS solüsyonu konuldu. Alüminyum folyoya sarılarak inkübatörde (37°C) 2 saat bekletildi (Resim 17).



Resim 17 MTS solüsyonu eklendikten 2 saat sonraki MTA örnekleri üzerindeki hücrelerin görüntüsü.

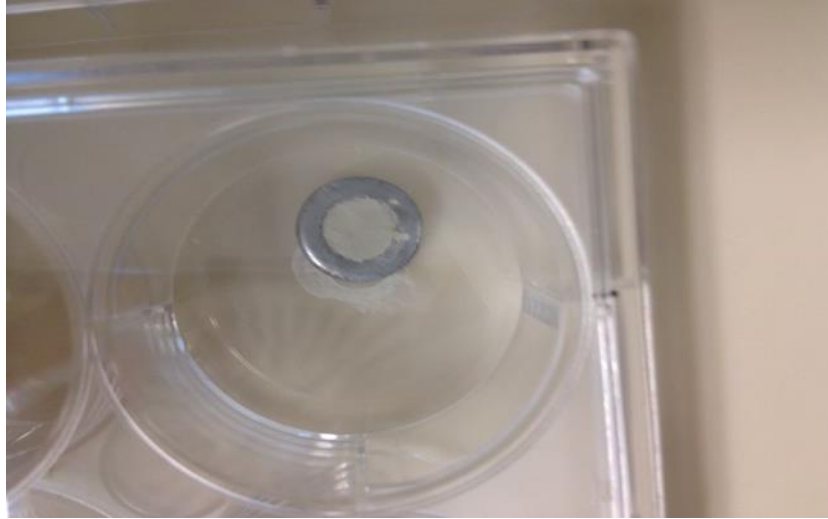
İnkübasyon sonrası her kuyucuk içerisindeki besiyeri yeni bir 96 kuyucuklu kaba yerleştirilerek 490 nm’de dalga boyu seçicisi (monokromatör) sistemli mikropilaka okuyucuda (ELISA reader, Multiskan Plus MK, USA) tespit edildi.

5.2.8. Taramalı elektron mikroskop (SEM) analizi

Taramalı elektron mikroskopu (Scanning Electron Microscope), örnekleri üç boyutlu inceleme imkanı sağlayan bir elektron mikroskobudur. Gerek ayırım gücü,

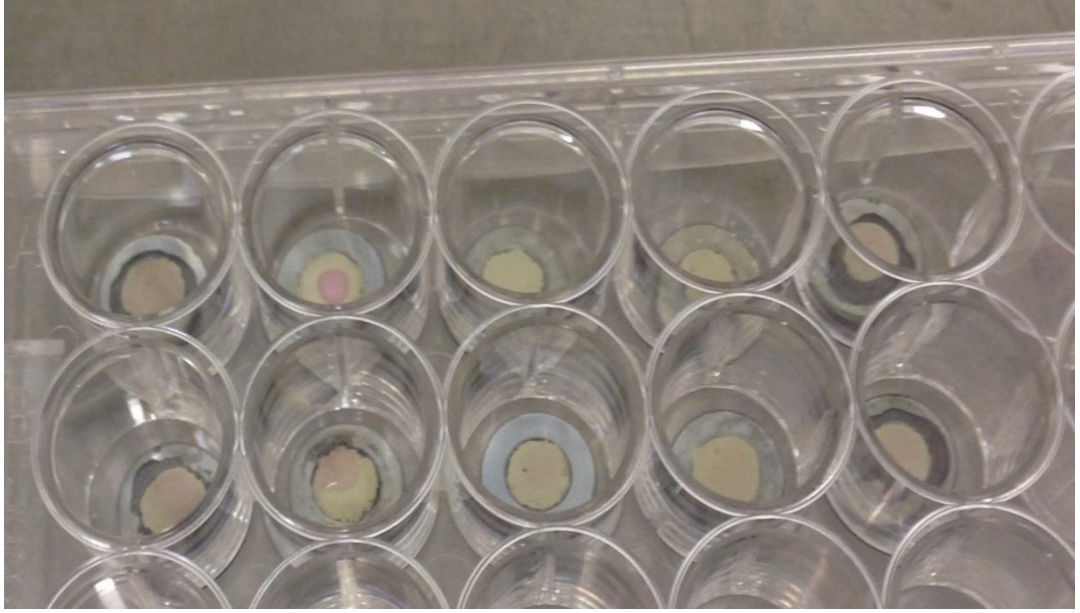
gerek odak derinliği ve gerek görüntü ve analizi birleştirme özelliği taramalı elektron mikroskopunu araştırma ve incelemelerde geniş ölçüde kullanılan bir aygıt haline getirmiştir. İncelenen numunelerin yüzey özellikleri daha kesin ve daha ayrıntılı olarak görüntülenebilmektedir (Hollenberg MJ, Erickson, 1973).

Farklı hızlandırıcılar ile hazırlanan MTA örneklerinin toplam 5 grup olacak şekilde karıştırılarak hazırlandı. SEM görüntülemesi için 6 kuyucuklu kaplar içerisine lameller üzerine çapı 5 mm yüksekliği 2 mm olan metal yüzükler kullanılarak hazırlanan MTA örnekleri 1. ve 5. günlerde her gün için 1 örnek olmak üzere 5 grup için toplam 10 örnek hazırlandı (Resim 18). Malzemelerin yerleştirildiği 6 kuyucuklu kap sterilizasyon amacıyla 30 dak. UV altında tutuldu ve tam polimerizasyon için de 48 saat 37°C, %5 CO₂ ve nemli ortamda bekletildi. Hücre ekimi öncesinde laminar flow içinde, kapakları açık bir şekilde UV altında 30 dakika tutuldu.



Resim 18 SEM görüntülerinin alınması için farklı hızlandırıcılar ile MTA örneklerinin hazırlanması

24 kuyucuklu kaplar içerisine yerleştirilen lameller üzerindeki metal yüzüklere hazırlanan MTA örnekleri üzerine 3000 hücre (DPKH) ekildi (Resim 19). Araştırmada 1. ve 5. günlerde SEM için hazırlanmış olan örneklerdeki hücreleri sabitlemek amacıyla % 2,5'lik gluteraldehit solüsyonu ve kokodilat tamponu (cacodylate buffer) kullanıldı.

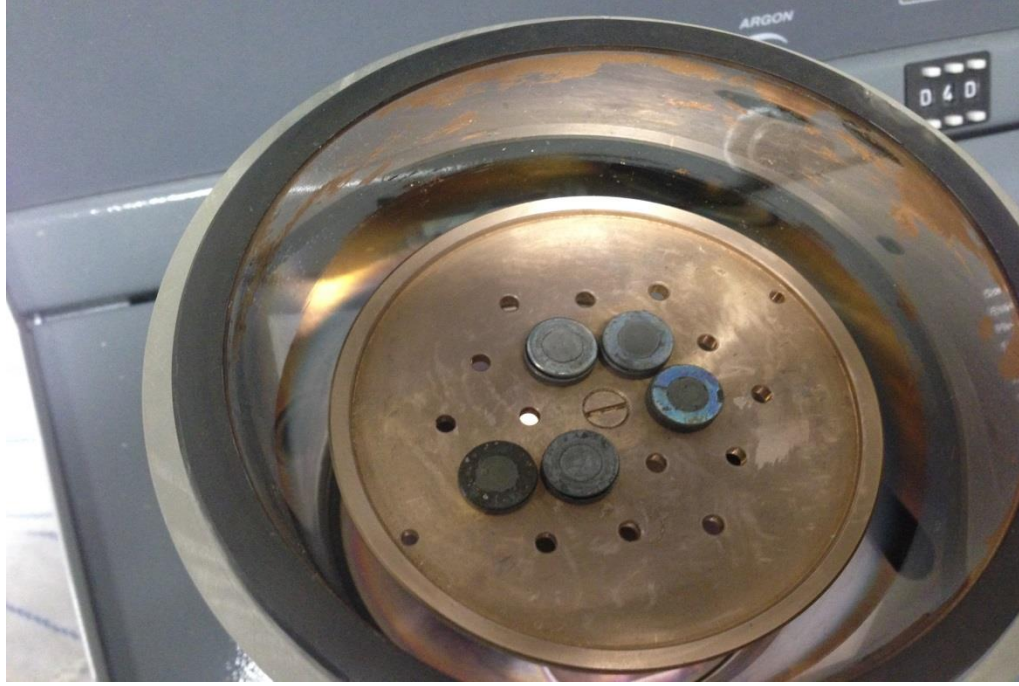


Resim 19 SEM görüntülemesi için hazırlanan MTA örnekleri üzerine DPKH hücrelerinin ekimi

Hücreler SEM’de görüntüyü engelleyebilecek tuzlardan kaçınmak amacıyla 2-3 kez kokodilat tamponu ile yıkandı ve üzerlerine 1 ml % 2,5’luk gluteraldehit solüsyonu konularak 1,5 saat oda sıcaklığında bekletildi.

1,5 saat sonunda solüsyon çekilip üzerine kokodilat tamponu koyuldu ve 4°C’de saklandı. Deney günü örnekler vakumla kurutulmak üzere 6 kuyucuklu kaptan lameller ile alınarak obje taşıyıcıya yerleştirildi.

Vakumla kurutulan örnekler, püskürtme yöntemi kullanılarak, 10 nm kalınlığında ile 50 A akım uygulanarak altın-palladyum (Au-Pd) ile kaplandı (Resim 20) (Baltec SCD 005, Bal-Tec, Pfaffikon, Zürih, Sweden) ve SEM ile değişen büyütme (250x –1000x) incelendi.



Resim 20 Altın-Palladyum ile kaplanmış SEM örnekleri

5.2.9. Farklılaşma deneyi

5.2.9.1. Farklılaşma deneyleri için osteo/odontojenik besiyerinin hazırlanması

Daimi diş pulpa kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin osteo/odontojenik hücelere farklılaştırılması için farklılaşma besiyeri (osteo/odontojenik besiyeri) hazırlandı.

Osteo/odontojenik Besiyeri:

50 ml DMEM besiyeri içerisine,

- 2,5 mg askorbik asit
- 108 mg β gliserofosfat
- 1 ml deksametazon ilave edildi.

Tek bir falkon tüp içinde 1 ml doksameton hassas terazide ölçülen 2,5 mg askorbik asit ve 108 mg β -gliserolfosfat ile çözündürüldü. Çözündürülen solüsyon filtreden geçirilerek DMEM ilavesi ile besiyeri hazırlandı.

5.2.9.2. Farklılaşma deneyleri için farklı hızlandırıcılar ile MTA örneklerinin hazırlanması

Sitotoksosite ve SEM deneyinden farklı olarak, bu deneyde 3 grup belirlendi. Bu gruplar:

Grup C: ProRoot MTA tozu + Na₂HPO₄

Grup D: ProRoot MTA tozu + Distile su

Grup E: ProRoot MTA tozu + %5 CaCl₂

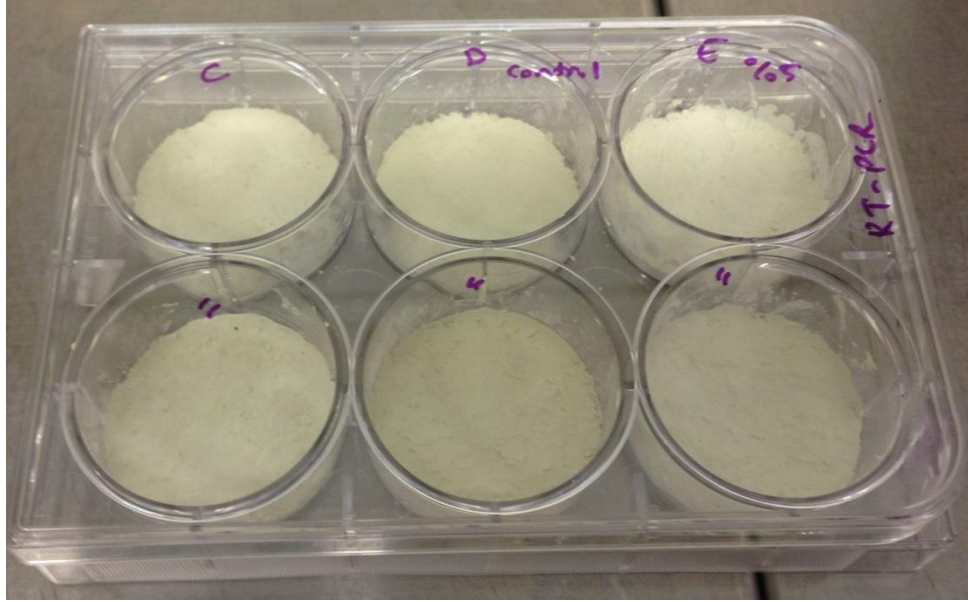
MTS deneyi ve SEM görüntü sonuçlarına göre, %10 CaCl₂ ve K-Y Jelly ile hazırlanan MTA gruplarının diğer gruplara göre daha başarısız bulunmasından dolayı farklılaşma deneylerinde yer verilmedi.

MTA örnekleri üretici firmanın belirlediği şekilde karıştırılarak hazırlandı. Malzemelerin yerleştirildiği kaplar sterilizasyon amacıyla 30 dak. UV altında tutuldu ve tam polimerizasyon için de 48 saat 37°C, %5 CO₂ ve nemli ortamda bekletildi. Hücre ekimi öncesinde laminar flow içinde, kapakları açık bir şekilde UV altında 30 dakika tutuldu.

MTA örneklerinin daimi dişi pulpası mezenkimal kök hücreler üzerindeki rejeneratif etkisinin incelenmesi amacıyla 1., 7. ve 21. günlerde MTS; 14. ve 21. günlerde GZ-PZR; 21. günde Von Kossa boyaması; 7. ve 14. günlerde ALP testi yapıldı.

İlk olarak MTA üretici firmanın belirttiği doğrultuda hazırlandı. MTS testi için 24 kuyucuklu kaplar içerisine üretici firmaların talimatları doğrultusunda karıştırılarak tabanı tamamen kaplayacak şekilde ve 2 mm yükseklikte her güne 4 adet olmak üzere her grup için toplam 12 MTA örnekleri hazırlandı.

GZ-PZR için 6 kuyucuklu kaplar içerisine üretici firmaların talimatları doğrultusunda karıştırılarak tabanı tamamen kaplayacak şekilde ve 2 mm yükseklikte her güne 1 adet olmak üzere her grup için toplam 2 MTA örneği hazırlandı (Resim 21).



Resim 21 GZ-PZR deneyi için, üretici firmanın tavsiyesi doğrultusunda hazırlanan MTA örnekleri

ALP testi için ise 24 kuyucuklu kap içerisine üretici firmaların talimatları doğrultusunda karıştırılarak tabanı tamamen kaplayacak şekilde ve yüksekliği 2 mm olacak şekilde her güne 2 adet olacak şekilde her grup için toplam 6 MTA örneği hazırlandı.

Von Kossa boyama için 24 kuyucuklu kap içerisine yerleştirilen yuvarlak lameller üzerine çapı 5 mm yüksekliği 2 mm olacak şekilde her grup için toplam 2 MTA örneği hazırlandı.

5.2.9.3. Farklılaşma deneyi için hücre ekimi

Deney günü 4. pasaj hücreler 10 ml PBS ile 2 kez yıkandı ve 1dk. bekletilip PBS uzaklaştırıldı. Daha sonra, 10 ml tripsin eklendi ve örnekler 5-6 dk. inkübatörde bekletildi. Zıt faz mikroskobu ile hücrelerin yüzeyden ayrılıp ayrılmadığı kontrol edildi. Hücreler konik tabanlı 15 ml'lik tüpe alınıp üzerine tripsinle aynı miktarda besiyeri (FBS içeren) eklendi. 1800 rpm'de 5 dk. santrifügasyonun ardından süpernatant atıldı ve besiyeri eklenerek pipetlendi.

MTA örnekleri ve kontrolü hazırlanan her grup da MTS testi için 24 kuyucuklu kaplara 5000 hücre, ALP testi için 24 kuyucuklu kaplara 20 000 hücre, GZ-PZR deneyi için 6 kuyucuklu kaplara 100 000 hücre, Von Kossa boyaması için 24 kuyucuklu kaplar içine yerleştirilmiş yuvarlak lameller üzerine ise 2000 hücre ekildi. Kültür süresince tüm örnekler 37°C, %5 CO₂ ve nemli ortamda (CO₂ inkübatöründe) inkübe edildi.

5.2.9.4. Farklılaşma deneyi öncesi hücre canlılık ve çoğalma testi (MTS)

Daimi diş pulpa kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin osteo/odontojenik besiyeri içeren kaplardaki MTA örnekleri ile teması sonucu canlılık ve çoğalmalarını tespit etmek amacıyla 1., 7. ve 21. günlerde "MTS testi" uygulandı.

24 kuyucuklu kap için 5000 hücre/kuyucuk olacak şekilde, kullanılacak hücre miktarı hesaplandı ve ekimi yapıldı. Her bir dental materyalin 3 kuyucuğu üzerine 5000 hücre DPKH ekildi ve her bir örnek için hücresiz bir kuyucuk (sadece materyal ve osteo/odontojenik besiyeri) hazırlandı ve kontrol olarak her gün için en az 2 kuyucuğa hücre ekimi yapıldı. 1 gün süreyle inkübatörde bekletildi.

MTS testinin yapılacağı 1., 7. ve 21. günlerde istenen kuyucuktaki hücreler PBS ile yıkandı ve 1 dk. bekletilip PBS uzaklaştırıldı ve totalde 250 µl olacak şekilde karanlık ortamda her bir kuyucuğa 210 µl besiyeri (%10 FBS ve %10 Primosin içeren DMEM low Glucose) 40 µl MTS solüsyonu konuldu. Alüminyum folyoya sarılarak inkübatörde (37°C) 2 saat bekletildi (Resim 22).



Resim 22 MTS solüsyonu eklendikten 2 saat sonraki osteo/odontojenik besiyeri içeren kaplardaki MTA örnekleri üzerindeki hücrelerin görüntüsü

İnkübasyon sonrası her kuyucuk içerisindeki besiyeri yeni bir 96 kuyucuklu kaba yerleştirilerek 490 nm’de dalga boyu seçicisi sistemli mikroparka okuyucuda (ELISA reader, Multiskan Plus MK, USA) tespit edildi.

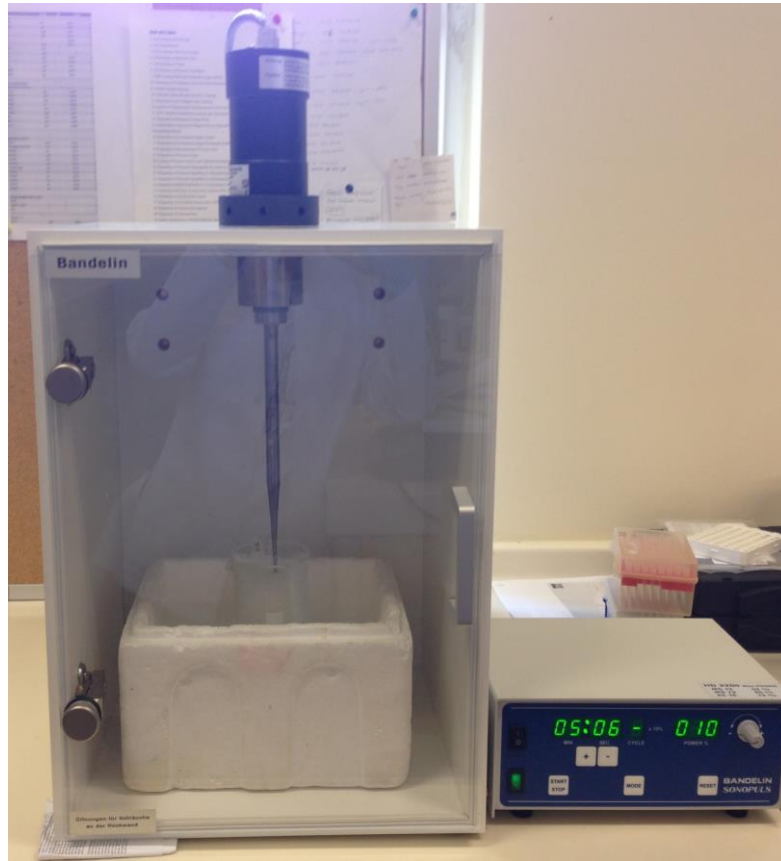
5.2.9.5. Alkalen Fosfataz (ALP) tayini

Alkalen fosfataz aktivitesi, hücre kültür sistemlerinde sert doku yapımı indükleyicisidir ve osteoblast ve odontoblastlar için erken tanı işaretidir (Beck ve ark., 2000).

Osteo/odontojenik farklılaşmasının belirlenmesinde önemli bir rol oynayan ALP tayini 7. ve 14. günlerde yapıldı. 24 kuyucuklu kap için 20 000 hücre/kuyucuk olacak şekilde, kullanılacak hücre miktarı hesaplandı ve ekimi yapıldı. Her bir MTA örneğinin her kuyucuğu üzerine 20 000 hücre DPKH ekildi, pozitif kontrol (osteo/odontojenik besiyerine ekilen DPKH) hazırlandı.

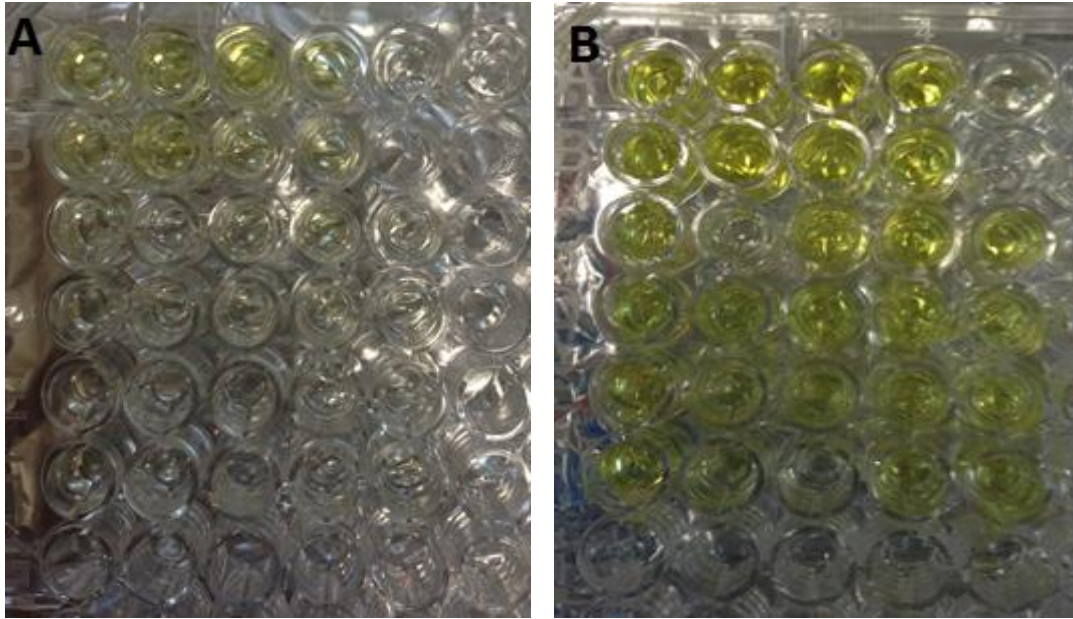
ALP tayininin yapılacağı 7. ve 14. günlerde istenen kuyucuktaki hücreler PBS ile 3 kere yıkandı ve 1 dk. bekletilip PBS uzaklaştırıldı. 500 µl Tris Buffer eklendi, pipetaj yapıldı. Okumaların yapılacağı güne kadar, eppendorf tüpüne alınan solüsyonlar -20°C’de bekletildi.

Deney günü -20°C’de bekletilen eppendorf tüpleri 37°C çözdürüldü, tekrar -20°C’de donduruldu ve bu işlem 3 kez tekrarlandı. Örnekler sonikasyon cihazında (Bandelin Electronic, Germany) 30 saniye hücreleri yüksek frekansta ses dalgaları etkisine bırakarak parçalama, 30 saniye buzda bekleme şeklinde her örnek için toplam 10 dakika olacak şekilde bu işlem tekrarlandı (Resim 23). Tüm örneklerin sonikasyon işleminden sonra örnekler 10 dakika 2000 rpm’de santrifügasyon yapıldı.



Resim 23 ALP örneklerinin sonikasyon işlemi

96 kuyucuklu kap içerisine her bir örnekten 100µl alındı, üzerine 100µl p-nitrofenil fosfat çözdürülen tampon solüsyonu (Randox ALP kiti, U.K.) eklendi (Resim 24). 405 nm’de 2 dakika aralıklarla 16 dakika boyunca 96 well plate reader ile absorbans değeri ölçümü yapıldı (ELISA reader, Multiskan Plus MK, USA).



Resim 24 A. Hücrelerin proteinleri parçalandıktan sonra üzerine ALP belirleme solüsyonu eklendikten sonraki görüntüsü **B.** ALP belirleme solüsyonu eklendikten 30 dakika sonraki görüntüsü.

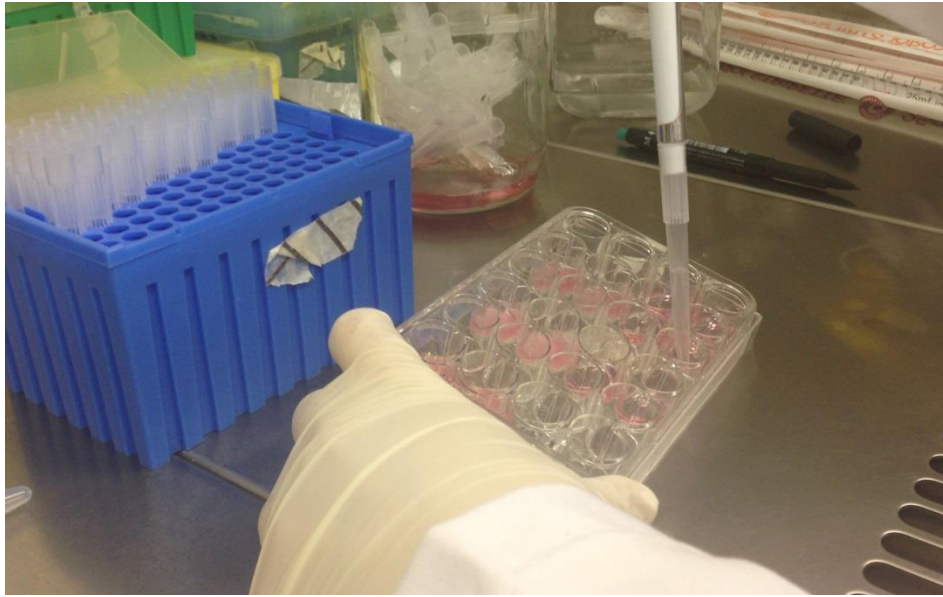
Normalizasyon için Hoechst boyası yapıldı. Hoechst boyaları floresans mikroskopisinde ve akış sitometresinde DNA'yı işaretlemek için kullanılan floresan boyadır. Hoechst boyama için 96 kuyucuklu kap içerisine her bir örnekten 100µl alındı, üzerine 100µl Hoechst boya koyuldu ve karıştırıldı. 340 nm eksitasyon dalga boyu ile 465 nm emisyon dalga boyunda ölçüm yapıldı ve grafikleri çizildi.

5.2.9.6. Von Kossa boyaması

Osteo/odontoblastik farklılaşmanın en önemli belirteçlerinden olan kalsiyum araştırmamızda Von Kossa testi (Kalsiyum boyama testi) ile belirlenmiştir.

24 kuyucuklu kap içerisine yerleştirilen yuvarlak lameller üzerine çapı 5 mm yüksekliği 2 mm olarak hazırlanan MTA örnekleri üzerine 2000 hücre/kuyucuk olacak şekilde, kullanılacak hücre miktarı hesaplandı ve ekimi yapıldı

Deneyin yapılacağı 21. günde yuvarlak lamelli kuyular görüntülemenin yapılacağı güne kadar hücreleri sabitlemek amacıyla fiksasyon solüsyonuna tabi tutuldu. Fiksasyon için 21. günde istenen kuyucuktaki hücreler PBS ile 3 kere yıkandı ve 1 dk. bekletilip PBS uzaklaştırıldı (Resim 25). PBS ile sulandırılmış % 3,7'lik metanol içermeyen formaldehit ve Tween 20 solüsyonu yuvarlak lamelli kuyular üzerine eklendi. 40 dk. oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon sonrası 3 kere PBS ile yıkandı ve PBS konularak + 4 °C'de saklandı.



Resim 25 Fiksasyon işlemleri için yuvarlak lameller üzerindeki farklı hızlandırıcılar ile hazırlanan MTA örneklerinin PBS ile yıkanması

Görüntülemenin yapılacağı gün;

- ✓ Kuyular içerisindeki PBS çekildi.
- ✓ Distile su ile yıkama yapıldı.

- ✓ Her kuyucuğa kit içerisinde (Diagnostic BioSystems, California USA) bulunan 500 µl silver nitrat koyularak 45 dk. UV altında bekletildi.
- ✓ 2 kez distile su ile yıkama yapıldı.
- ✓ Silver Nitrat etkisinin durdurulabilmesi için 500 µl yine kit içerisinde bulunan Sodyum Tiosülfat konulmuş ve 3 dk. bekletildi.
- ✓ 2 kez distile su ile yıkama yapıldı.
- ✓ Kit içerisinde bulunan Nuclear Fast Red solüsyonundan 500 µl konuldu ve 5 dk. bekletildi.
- ✓ 2 kez distile su ile yıkama yapıldı.
- ✓ Alkol kondu. Alkol aspire edilerek ışık mikroskobu altında oluşan kalsiyum depozitleri incelendi.

5.2.9.7. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Farklı hızlandırıcılar ile hazırlanan MTA örneklerinin hücrelerin farklılaşmasına olan etkisini değerlendirmek amacıyla PZR yapıldı.

6 kuyucuklu kap için 100 000 hücre/kuyucuk olacak şekilde, kullanılacak hücre miktarı hesaplandı ve ekimi yapıldı 14. ve 21. günler için MTA örnekleri ile kültüre edilmiş kök hücreler ile negatif kontrol 3T3 hücresi (fare fibroblast hücresi) ve pozitif kontrol olarak kullanılan insan osteoblast hücreleri (hOB) deney günü geldiğinde kültür kaplarından ayrılarak RNA izolasyonu ve ters transkripsiyonu işlemine tabi tutuldu.

PZR – Polimeraz zincir reaksiyonunun aşamaları:

1. RNA izolasyonu
2. cDNA sentezi
3. Primerlerin hazırlanması
4. Jelde yürütme işlemi

5.2.9.7.1. RNA izolasyonu

Çalışmanın her günü için hazırlanmış hücreler total RNA izolasyonu için kaldırılmıştır. Hücreler kaldırılmadan önce PBS ile yıkanmış, tripsin ile muameleden sonra yine besiyeri eklenip 1800 rpm’de 5 dk. santrifügasyonun ardından süpernatant atıldı.

Total RNA izolasyonu için GeneJET RNA Purification Kit (Thermo Scientific, USA) kullanıldı (Resim 26).



Resim 26 GeneJET RNA purification kit

- Tüp içerisindeki hücre süspansiyonu içerisine β -mercaptoetanol içeren 600 μ l Lysis Buffer eklendi ve karışım 10 saniye vortekslendi.
- 360 μ l etanol eklenen karışım santrifüj yapılmadan pipetlenerek homojenize edildi.

- Örnekler, RNA izolasyon kitinde bulunan filtre tüpü içerisine konarak 1 dk. 12 000 rpm de santrifüj edildi ve toplama tüpündeki atık dökülerek filtre tüpü tekrardan toplama tüpü içine yerleştirildi (Resim 27).



Resim 27 MTA örneklerinden elde edilen hücre süspansiyonunun santrifügasyonu

- Etanol içeren 700 μ L Wash Buffer 1 tüp içerisine konarak 1 dk. 12 000 rpm de santrifüj edildi ve toplama tüpündeki atık dökülerek filtre tüpü tekrardan toplama tüpü içine yerleştirildi.
- Etanol içeren 600 μ L Wash Buffer 2 tüp içerisine konarak 1 dk. 12 000 rpm de santrifüj edildi ve toplama tüpündeki atık dökülerek filtre tüpü tekrardan toplama tüpü içine yerleştirildi.
- Etanol içeren 250 μ L Wash Buffer 2 tüp içerisine konarak 2 dk. 12 000 rpm de santrifüj edildi ve toplama tüpündeki atık dökülerek filtre tüpü eppendorf tüp içine yerleştirildi.
- 40 μ l nükleaz içermeyen su konulmuş ve 1 dk. 12 000 rpm de santrifüj edilmiş ve total RNA elde edilmiştir.

- RNA konsantrasyonlarını ölçmek için istenen örnekten 1 µl alınarak yoğunluk ölçümü nanodrop cihazı kullanılarak yapıldı. Bunu yapmaktaki amaç, cDNA sentezi için yeterli yoğunlukta ve saflıkta RNA izolasyonu sağlanıp sağlanmadığının görülmesidir.

5.2.9.7.2. cDNA sentezinin yapılması

Total RNA qScript™ cDNA SuperMix (Quanta BioSciences, Inc.,USA) kiti kullanılarak cDNA elde edildi. Bütün örneklerden cDNA sentezi için aynı miktarda RNA alındı (15 µl).

Toplam 20 µl karışım:

- 4 µl cDNA SuperMix
- 15 µl RNA
- 1 µl nükleaz içermeyen su ile hazırlandı ve dikkatli bir şekilde 5 sn vortekslendi.

Karışım PZR tüpleri içerisinde, PZR cihazında (My cyclers, BIO-RAD, California, USA)

- 5 dk. 22°C,
- 30 dk. 42°C,
- 5 dk. 85°C ve
- son olarak 4°C inkübe edildi (Resim 28). Yaklaşık 40 dk. sonunda elde ettiğimiz cDNA deney günü kullanılmak üzere -20 °C de saklandı.



Resim 28 PZR cihazında cDNA sentezinin yapılması

5.2.9.7.3. Primerlerin hazırlanması

Her primer, üretici firmanın talimatları doğrultusunda nükleaz içermeyen ultra saf distile su ile sulandırılarak hazır hale getirilmiştir. GZ-PZR için kullanılacak primerlerin çalışıp çalışmadığının tespiti ve optimum çalışma sıcaklığının tespiti için DSPP, Kollajen Tip 1 ve β Aktin primerlerinin optimizasyonu için, 55 °C - 66 °C arasındaki sıcaklığın denendiği bir gradyan PZR yapıldı.

Deney için kullanılan primerler:

Kollajen Tip 1 Forward: 5'-CCACGCATGAGCGGACGCTAA-3'

Reverse: 5'-ATTGGTGGGATGTCTTCGTCTTGG-3' (Macrogen, Europe)

DSPP Forward: 5'-GGCAGTGA CTCAA AAGGAGC-3'

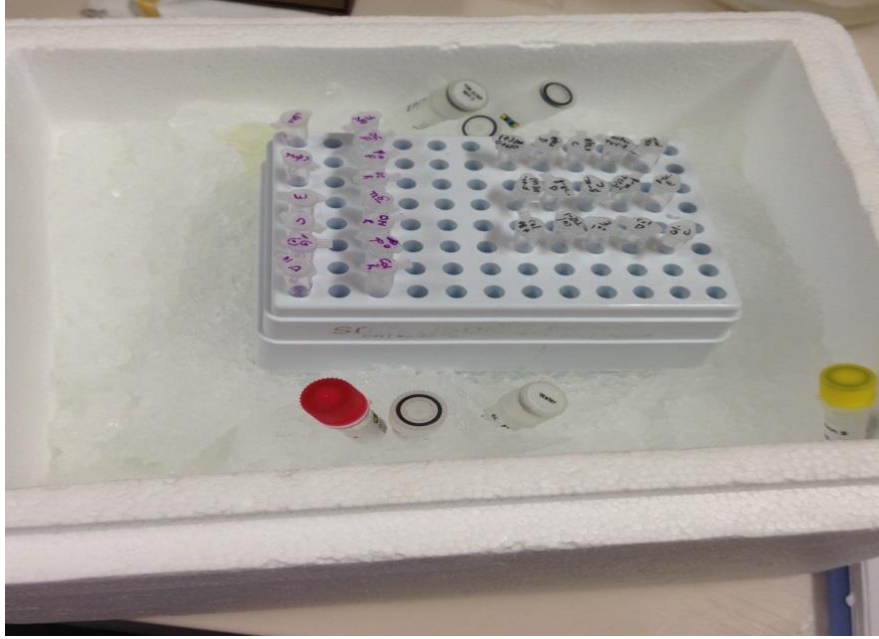
Reverse: 5'-TGCTGTCA CTGTCA CTGCTG-3' (İontek, Türkiye)

β Aktin Forward: 5'- GACAGGATGCAGAAGGAGATTACT-3'

Reverse: 5'- TGATCCACATCTGCTGGAAGGT-3'(Macrogen, Europe)

PZR karışımının (FIREPol DNA Polymerase; Solis BioDyne, Estonia) hazırlanması
(Resim 29):

- 10X Taq Buffer (2 μ l)
- 20 mM dNTP mix (2 μ l)
- Forward primer (0,4 μ l)
- Reverse primer (0,4 μ l)
- 25 mM MgCl₂ (1,6 μ l)
- cDNA (1,5 μ l)
- Taq DNA Polymerase (0.16 μ l)
- Nükleaz içermeyen su (11,94 μ l)



Resim 29 PZR için hazırlanmış karışımın buz içerisinde bekletilmesi

Tüm genler için buz içerisinde hazırlanan 20 μ l hacminde 10 ayrı tüp PZR cihazında 55 °C ile 66 °C arasındaki farklı sıcaklıklara ayarlanmış kuyucuklara yerleştirildikten sonra, PZR şartları cihaza (My cycler, BIO-RAD, California, USA) girildi.

- 94°C’ de 2 dakika 1 kez (denatürasyon basamağı için)
- 94°C’ de 20 saniye + 55-66°C’de 10 saniye + 72°C’de 30 saniye 35 kez (amplifikasyon basamağı için)
- 72°C de 5 dakika 1 kez (son uzama basamağı için)
- 4°C’de bekleme (Örnekler jele yüklenene kadar cihazda +4°C’ de tutuldu) işlemlerinden oluşan ısı döngüleri uygulandı (Resim 30).



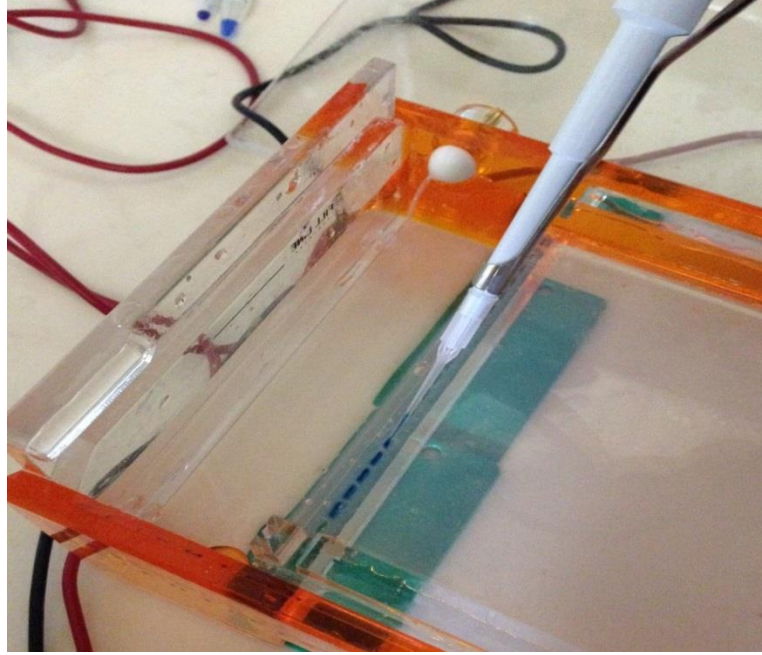
Resim 30 Primerlerin optimum sıcaklıklarını belirlemek için yapılan Gradyan PZR

5.2.9.7.4. Jelin hazırlanması

1 gram toz halindeki Agaroz + 100 ml Tris Borik Asit (TBE) tamponu ile bir şişe içerisinde karıştırıldıktan sonra mikrodalga fırında 600°C’de 3 dakika bekletildi. Üç dakikalık beklemenin ardından şişe içine 2,5 µl Etidyum bromid koyulup karıştırıldı. 5 dakika soğumaya bırakıldı. Soğumayı takiben, karışım tarakların bulunduğu jel tankı içine döküldü. Tank içindeki karışım donduktan sonra, taraklar çıkarıldı. Jel, 900 ml distile su ve 100 ml TBE karışımı içeren jel tankına tamamen gömüldü.

10 µl PZR tüpündeki karışım ile 2 µl Fermentas 6X DNA Loading Dye (Thermo Scientific, USA) karıştırıldı. Jel üstünde kalan kuyucuklara bu karışımın 10 µl’si ve primerler arasına 5 µl Fermentas GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Scientific, USA) yerleştirildi (Resim 31). Jel tankı, güç kaynağının artı ve eksi kutuplarına bağlandıktan sonra, örneklerin 100 Watt 45 dakika boyunca, jelde yürütmesi sağlandı. Jel

elektroforez işleminden elde edilen DNA bantları UV transiluminatörde görüntülendi. Alınan sonuçlar doğrultusunda GZ-PZR hazırlığına geçildi.



Resim 31 Örneklerin jel elektroforezinde yürütülmesi

5.2.9.8. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (GZ-PZR)

PZR ve jel elektroforez işlemleri, kullanılan primerin cDNA üzerindeki ilgili bölgeyi çoğaltıp çoğaltmadığını gösterirken; GZ-PZR, primerin etkisiyle çoğalan cDNA'nın miktarı ile ilgili bilgi sahibi olmamızı sağlayacaktır. SYBR green boyası, yeni oluşan DNA moleküllerine bağlanarak floresan ışıma yapar. Bu ışıma, GZ-PZR cihazı tarafından algılanarak ışımanın şiddetine rakamsal değer verilir, böylece sentez edilen DNA'nın miktarı ölçülür.

GZ-PZR için Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix(2X)(Thermo Scientific, USA) kullanılmış ve GZ-PZR karışımı hazırlandı. Bu çalışmada örneklerinin ekspres ettikleri DSPP, β Aktin ve Kollajen Tip 1 miktarları GZ-PZR yöntemiyle analiz

edildi. β Aktin geni, örneklerden alınan RNA'ların normalizasyonu için standart olarak kullanılmaktadır.

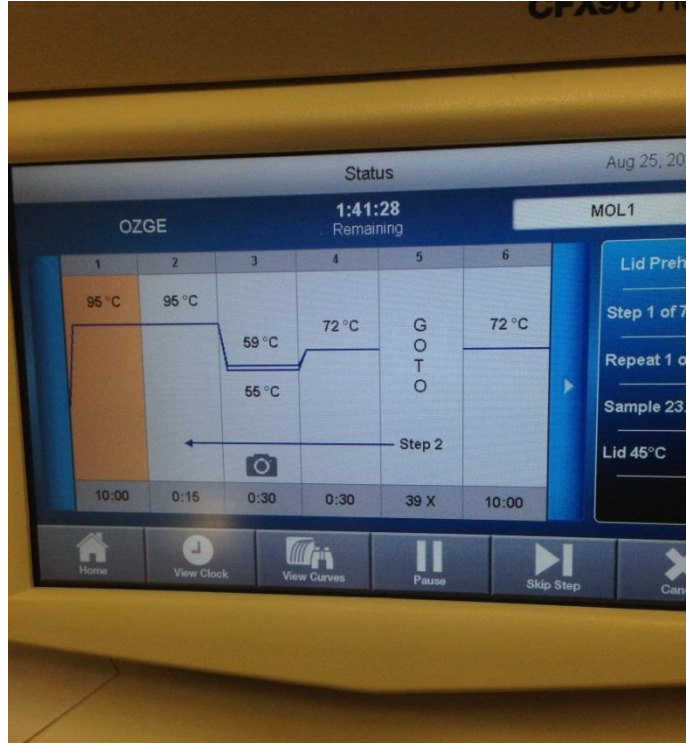
Her örnek için:

- SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X) (12,5 μ l)
- PZR Forward Primer (0,5 μ l)
- PZR Reverse Primer (0,5 μ l)
- Template cDNA (2 μ l)
- dH₂O (distile su) (9,5 μ l)

içeren toplamda 25 μ l olacak şekilde karışım hazırlandı. Hazırlanan karışımlar 96 kuyucuklu GZ-PZR plağına yerleştirildi.

Cihaza yerleştirilmeden önce 1000 rpm'de 2 dk. santrifüj yapıldı. GZ-PZR şartları cihaza (CFX96 Touch RealTime-PCR Detection System, BIO-RAD, USA) girildi.

- 95°C' de 10 dakika 1 kez (denatürasyon basamağı için)
- 95°C' de 15 saniye + 55-59°C'de 30 saniye + 72°C'de 30 saniye 40 kez (amplifikasyon basamağı için)
- 72°C de 10 dakika 1 kez (son uzama basamağı için)
- 4°C'de bekleme (Örnekler jele yüklenene kadar cihazda +4°C' de tutuldu) işlemlerinden oluşan ısı döngüleri uygulandı (Resim 32).



Resim 32 Hazırlanan karışımın GZ-PZR cihazında okutulması

İşlem sonucu PZR kuantifikasyon raporu ile alındı ve excell dosyasına aktarıldı.

5.3. İstatistiksel İncelemeler

Çalışmada elde edilen veriler değerlendirilirken, istatistiksel analizler için SPSS 18.0 (Statistical Package for the Social Sciences) Software programı kullanıldı. Çalışma verileri değerlendirilirken tanımlayıcı istatistiksel metodlar (ortalama, standart sapma) yapıldı. Her gün için materyallerin birbirleri ile ölçüm değerlerinin karşılaştırılmasında Kruskal-Wallis Test (Nonparametric ANOVA); ve rejenerasyon tayininde her bir günde materyallerin birbirleri ile farklılıklarını belirlemek için ise Mann-Whitney U Test kullanılarak tanımlayıcı istatistiksel sonuçlar verildi. Tek bir gruptaki iki farklı zamandaki ölçümleri karşılaştırmak için Wilcoxon Signed Rank Test kullanıldı. Sonuçlar %95’lik güven aralığında, anlamlılık $p < 0.05$ düzeyinde değerlendirildi.

6. BULGULAR

6.1. Hücre Morfolojisi ve Çoğalma Özellikleri

İnsan daimi yirmi yaş diş pulpasından izole edilen ve kültür kabının tabanına yapışan hücrelerin morfolojik özellikleri, çalışma süresince zıt faz mikroskobu ile incelendi. Birincil kültürün ilk günlerinde gözlenen iğ şeklinde ve fibroblast benzeri hücrelerin, sonraki günlerde koloniler oluşturmaya başladığı ve yaklaşık 16.-18. günlerde T25 kültür kabının yüzeyinin, %70-80 oranında hücrelerce dolduğu gözlemlendi. 2-3 hafta içinde hücreler ilk subkültürü yapılabilecek düzeye erişti (Resim 33).

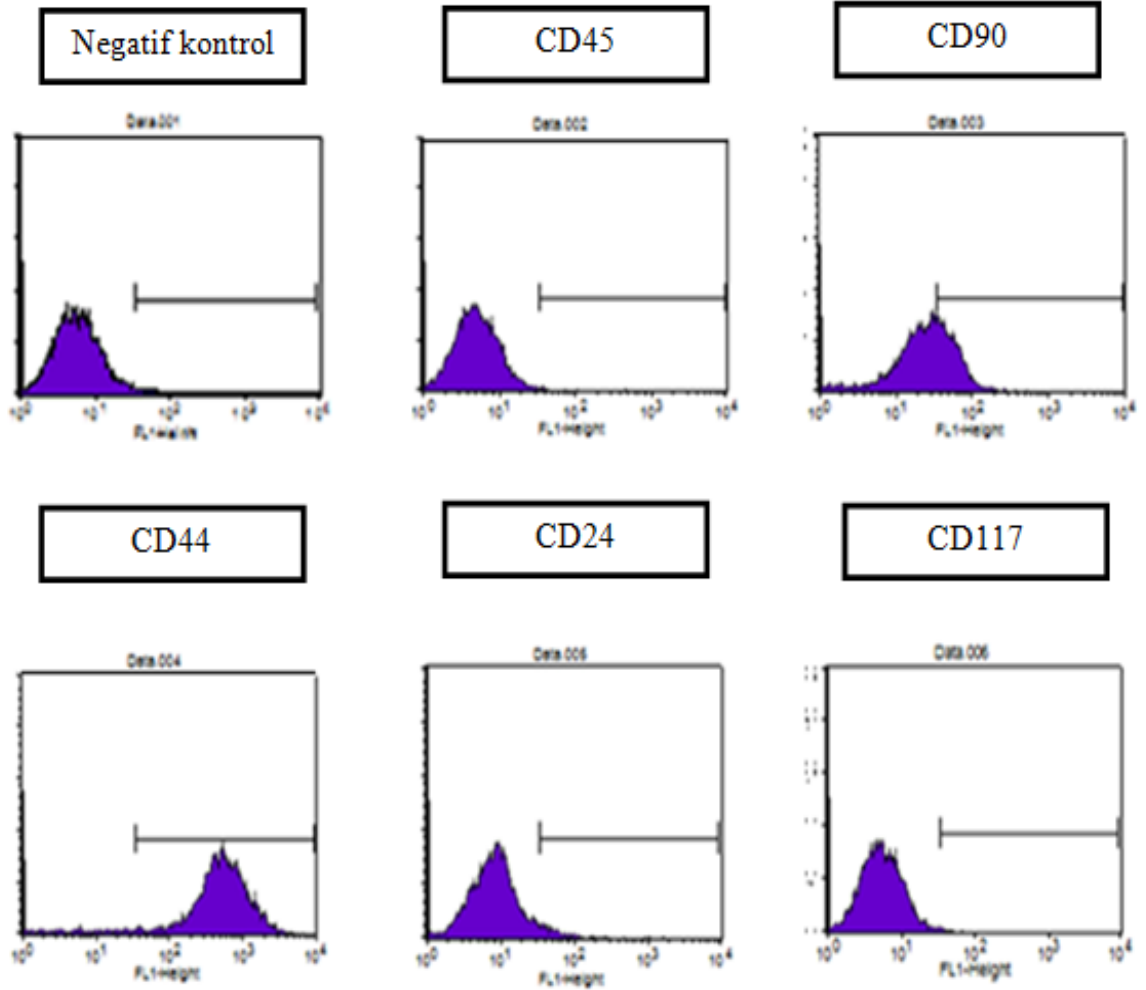


Resim 33 Hücre popülasyonunun oluşturduğu kolonilerin inverted mikroskop ile alınan görüntüleri

Pasaj sayısı arttıkça hücrelerin flask yüzeyini kaplama sürelerinde artış ve hücre morfolojisinde değişiklikler gözlemlendi. İlk pasajlarda hücrelerin boyutu daha küçük iken hücreler yaşlandıkça boyutlarında büyüme saptandı.

6.2. Hücrelerin İmmunofenotipik Özellikleri

Kültüre edilmiş DPKH'in P4'e geçerken gerçekleştirilen akış sitometri incelemeleri sonucunda, DPKH'nin hematopoetik hücre belirteçlerini (CD24, CD45, CD117) eksprese etmedikleri, buna karşın MKH'ler için sıklıkla kullanılan CD44, CD90 için yüksek düzeyde pozitif oldukları tespit edildi. Hücrelerin immunofenotipik özelliklerini gösteren akış sitometri sonuçları görülmektedir (Şekil 9).



Şekil 9 İnsan daimi diş pulpasından izole edilen MKH'lerin P3'deki immunofenotipik özelliklerinin akış sitometri sonuçları

Akış sitometri diyagramlarındaki doğru kök hücre belirteci ve doğru florasan dedektör yüksekliği seçimi eşleşmesindeki % geçit değerleri kullanılarak oluşturulmuştur. Kullanılan kök hücre belirteçleri için hücrelerin pozitiflik yüzdesi Tablo 1’de gösterilmiştir.

Tablo 1 Kullanılan kök hücre belirteçleri için hücrelerin pozitiflik yüzdeleri

	CD45+PE	CD24+FITC	CD90+PE	CD44+FITC	CD117+PE
Pozitif %	0.02	0.07	97.70	94.08	0.17

6.3. MTA Örneklerinin Sertleşme Süresi

Farklı hızlandırıcılar (%10 CaCl₂, %5 CaCl₂, K-Y Jelly, Na₂HPO₄) ile hazırlanan MTA örneklerinin sertleşme süreleri her gruptan ikişer örnek alınarak incelendi.

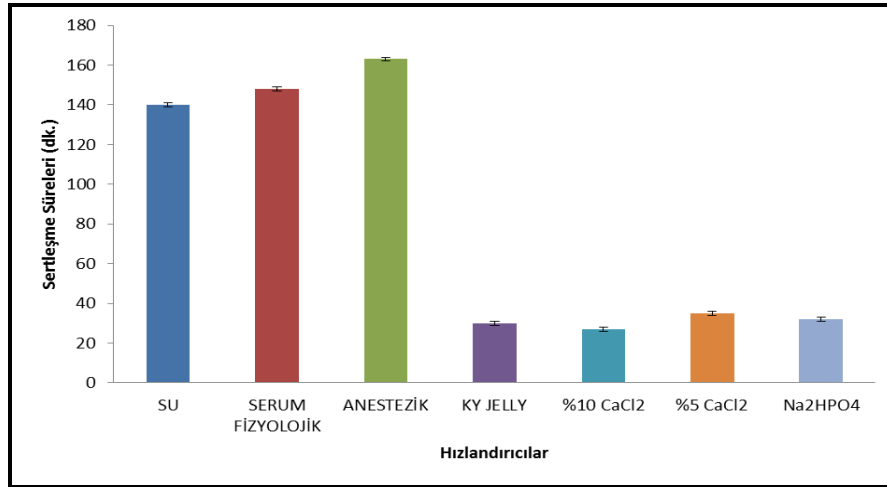
%10 CaCl₂ ile hazırlanan MTA’nın sertleşme süresi ortalaması 27±2,828, %5 CaCl₂ ile hazırlanan MTA’nın sertleşme süresi ortalaması 35±2,828, anestezi solüsyon ile hazırlanan MTA’nın sertleşme süresi ortalaması 163±2,828, distile su ile hazırlanan MTA’nın sertleşme süresi ortalaması 140±2,828, K-Y Jelly ile hazırlanan MTA’nın sertleşme süresi ortalaması 30±1,414, serum fizyolojik ile hazırlanan MTA’nın sertleşme süresi ortalaması 148±4,243 iken Na₂HPO₄ ile hazırlanan MTA’nın sertleşme süresi ortalaması 32±2,828 olarak bulunmuştur (Tablo 2).

Tablo 2 Farklı hızlandırıcılar ve sıvılar hazırlanan MTA örneklerinin sertleşme sürelerinin minimum (min), maksimum (mak), ortalama (ort) ve standart sapma (SS) değerleri

	Min	Mak	Ort	SS
%10 CaCl ₂	25	29	27,0	2,828
%5 CaCl ₂	33	37	35,0	2,828
Anestezik Solüsyon	161	165	163,0	2,828
Distile Su	138	142	140,0	2,828
K-Y Jelly	29	31	30,0	1,414
Serum Fizyolojik	145	151	148,0	4,243
Na ₂ HPO ₄	30	34	32,0	2,828

*Kruskal Wallis Test

Şekil 10’da gösterildiği gibi % 10 CaCl₂ ile hazırlanan MTA en kısa sertleşme süresi gösterirken; anestezik solüsyon ve serum fizyolojik ile hazırlanan MTA’nın ise sertleşme süresi uzamıştır.



Şekil 10 Farklı hızlandırıcılar ve sıvılar ile hazırlanan MTA örneklerinin sertleşme süreleri

% 10 CaCl₂, %5 CaCl₂, Na₂HPO₄ ve K-Y Jelly gruplarının sertleşme süreleri ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmazken (p>0.05);

distile su ile diğer hızlandırıcılar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p<0.05$) (Tablo 3). Anestezik solüsyon ve serum fizyolojik ile distile su gruplarının sertleşme süreleri ortalamaları arasında ise istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$).

Tablo 3 Kullanılan hızlandırıcıların ikili karşılaştırması

	%10 CaCl₂	%5 CaCl₂	K-Y Jelly	Na₂HPO₄
Distile su	0,012	0,012	0,012	0,012
%10 CaCl₂		0,121	0,221	0,121
%5 CaCl₂			0,121	0,439
K-Y Jelly				0,439

*Mann Whitney U Test

6.4. Hücrelerin Canlılık ve Çoğalma Özellikleri

Farklı hızlandırıcılar ile hazırlanan MTA örnekleri ile temasta bulunan diş pulpa kök hücrelerinin canlılığı ve çoğalma özelliklerinin belirlenmesi için 1., 3. ve 7. günlerde MTS testi uygulandı. Araştırma verileri, her bir örnekten üç kez ölçüm alındıktan sonra elde edilen ortalama değerleri alınarak istatistiksel olarak değerlendirildi. Elde edilen sonuçlar için $p<0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Grupların MTS 1. gün, 3. gün ve 7. gün değerlerinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmaktadır ($p<0.05$) (Tablo 4).

Tablo 4 Farklı hızlandırıcılar ile hazırlanan MTA örneklerinin MTS testi 1., 3. ve 7. gün minimum (min), maksimum (mak), ortalama (ort) ve standart sapma (SS) değerleri ve p değerleri

		Min	Mak	Ort	SS	p ^a
MTS 1. Gün	%10 CaCl ₂	0,096	0,134	0,11	0,019	0,024
	%5 CaCl ₂	0,127	0,157	0,14	0,015	
	Distile Su	0,142	0,156	0,15	0,008	
	K-Y Jelly	0,088	0,131	0,11	0,03	
	Na ₂ HPO ₄	0,092	0,107	0,1	0,008	
	Kontrol (Sadece Kök Hücre)	0,207	0,237	0,22	0,015	
MTS 3. Gün	%10 CaCl ₂	0,118	0,13	0,12	0,008	0,028
	%5 CaCl ₂	0,129	0,142	0,14	0,009	
	Distile Su	0,165	0,183	0,17	0,009	
	K-Y Jelly	0,048	0,061	0,05	0,007	
	Na ₂ HPO ₄	0,127	0,147	0,13	0,011	
	Kontrol (Sadece Kök Hücre)	0,234	0,258	0,25	0,017	
MTS 7. Gün	%10 CaCl ₂	0,125	0,15	0,14	0,013	0,018
	%5 CaCl ₂	0,264	0,265	0,26	0,001	
	Distile Su	0,264	0,293	0,28	0,015	
	K-Y Jelly	0,021	0,054	0,03	0,018	
	Na ₂ HPO ₄	0,233	0,32	0,28	0,062	
	Kontrol (Sadece Kök Hücre)	0,383	0,541	0,48	0,086	

a. Kruskal Wallis Test

MTS testi sonuçlarında 1.günde %10 CaCl₂ ve distile su ile hazırlanan MTA örnekleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunurken (p=0.049); %10 CaCl₂ grubu ile diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır (p>0.05). %5 CaCl₂ ve Na₂HPO₄ ile hazırlanan MTA örnekleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunurken (p=0.049); %5 CaCl₂ ile hazırlanan MTA grubu ile diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı

bulunmuştur ($p>0.05$). Distile su ve Na_2HPO_4 ile hazırlanan MTA örnekleri arasında istatistiksel olarak anlamlı ($p=0.049$); distile su grubu ile diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı ($p>0.05$), kontrol grubu ile %10 CaCl_2 , %5 CaCl_2 , distile su ve Na_2HPO_4 ile hazırlanan MTA örnekleri arasında ise istatistiksel olarak anlamlı farklılık ($p=0.049$); kontrol grubu ile K-Y Jelly arasında ise istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı tespit edilmiştir ($p>0.05$) (Tablo 5).

Tablo 5 MTS testi 1. günde grupların birbirleri ile karşılaştırılması

	%10 CaCl_2	%5 CaCl_2	Distile su	K-Y Jelly	Na_2HPO_4
%5 CaCl_2	0,127				
Distile su	0,049	0,827			
K-Y Jelly	0,564	0,248	0,083		
Na_2HPO_4	0,275	0,049	0,049	1	
Kontrol	0,049	0,049	0,049	0,083	0,049

*Mann Whitney U Test

MTS testi sonuçlarında 3.günde distile su ve K-Y Jelly ile hazırlanan MTA örnekleri, distile su ve Na_2HPO_4 ile hazırlanan MTA örnekleri, K-Y Jelly ve Na_2HPO_4 ile hazırlanan MTA örnekleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunurken ($p=0.049$); diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı bulunmuştur ($p>0.05$). Kontrol grubu ile diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı tespit edilmiştir ($p>0.05$) (Tablo 6).

Tablo 6 MTS testi 3. günde grupların birbirleri ile karşılaştırılması

	%10 CaCl₂	%5 CaCl₂	Distile su	K-Y Jelly	Na₂HPO₄
%5 CaCl₂	0,439				
Distile su	0,083	0,083			
K-Y Jelly	0,083	0,083	0,049		
Na₂HPO₄	0,564	0,767	0,049	0,049	
Kontrol	0,121	0,121	0,083	0,083	0,083

*Mann Whitney U Test

MTS testi sonuçlarında 7.günde %10 CaCl₂ ve distile su ile hazırlanan MTA, %10 CaCl₂ ve K-Y Jelly ile hazırlanan MTA örnekleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık varken (p=0.049); %10 CaCl₂ grubu ile diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı bulunmuştur (p>0.05). Distile su ve K-Y Jelly ile hazırlanan MTA örnekleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunurken (p=0.049); diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı (p>0.05), kontrol grubu ile %10 CaCl₂, distile su ve K-Y Jelly ile hazırlanan MTA örnekleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunurken (p=0.049); kontrol grubu ile diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı tespit edilmiştir (p>0.05) (Tablo 7).

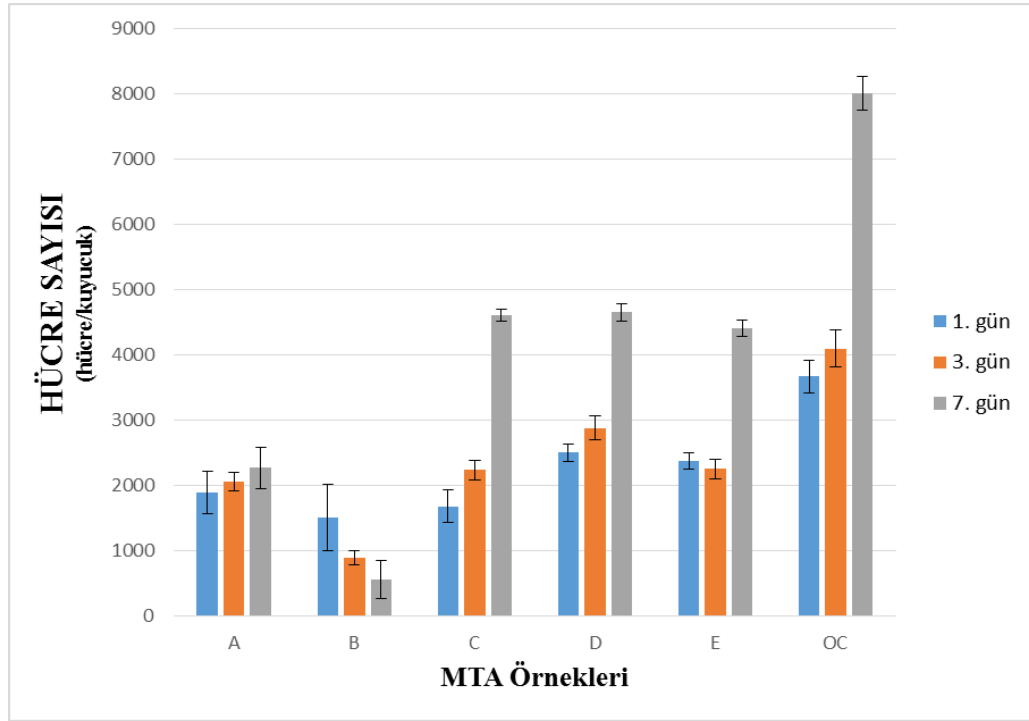
Tablo 7 MTS testi 7. günde grupların birbirleri ile karşılaştırılması

	%10 CaCl₂	%5 CaCl₂	Distile su	K-Y Jelly	Na₂HPO₄
%5 CaCl₂	0,083				
Distile su	0,049	0,374			
K-Y Jelly	0,049	0,083	0,049		
Na₂HPO₄	0,083	1	1	0,083	
Kontrol	0,049	0,083	0,049	0,049	0,083

*Mann Whitney U Test

Farklı hızlandırıcılar ile hazırlanan MTA örnekleri kendi içlerinde günler arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermemiştir. Bu sonuca göre 1. günden 7. güne doğru kontrol için hazırlanan hücre kültüründe ve K-Y Jelly hariç tüm gruplarda artış gözlenirken, K-Y Jelly grubunda ise düşüş gözlenmiştir (Şekil 11). %5 CaCl₂, %10 CaCl₂, Na₂HPO₄ ve distile su ile hazırlanan MTA grupları kontrol grubu ile benzerlik göstererek daimi diş pulpa kök hücrelerinin sayısında anlamlı olarak artış göstermiş ancak K- Y Jelly grubunda düşüş gözlenmiştir.

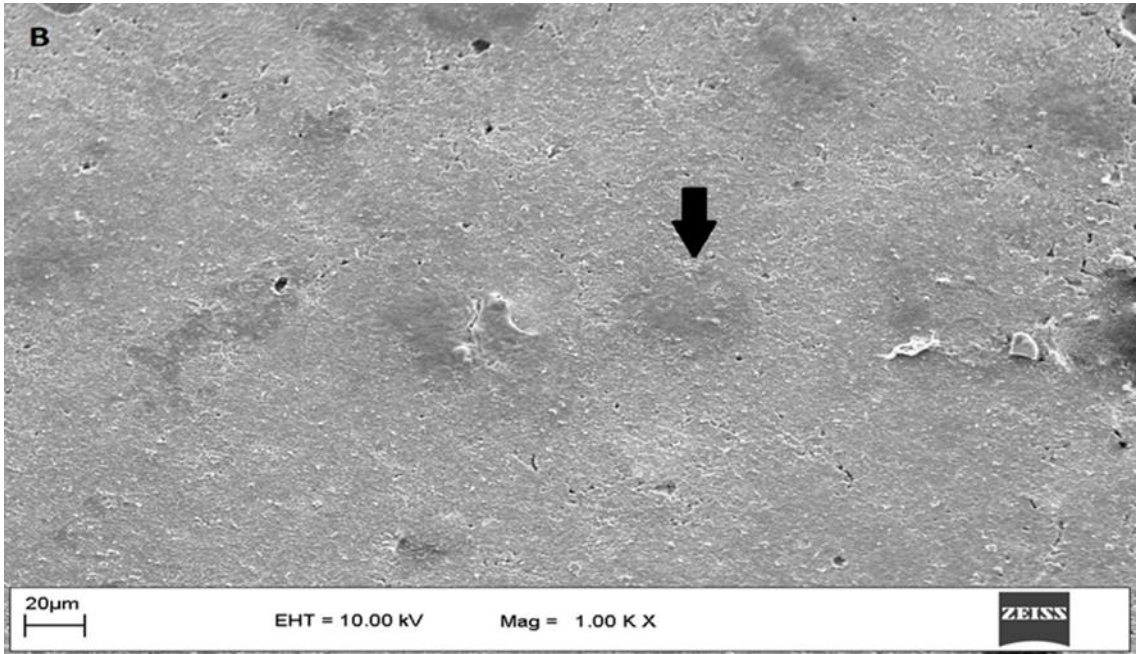
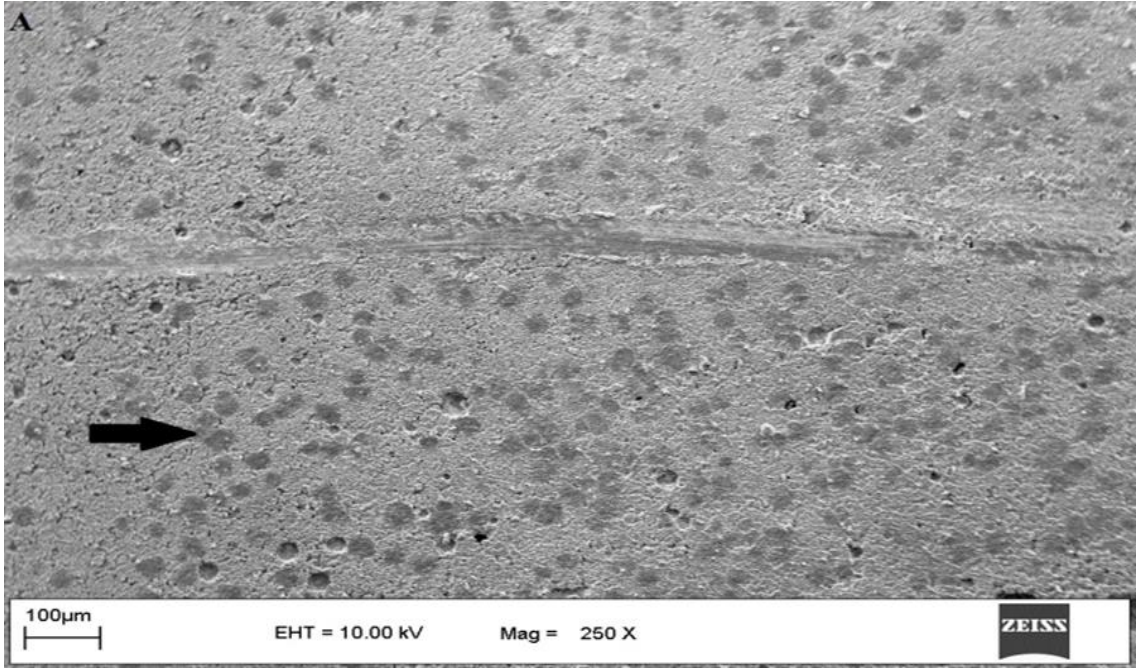
MTS testinde %5 CaCl₂, Na₂HPO₄ ve distile su ile hazırlanan MTA örneklerinin, %10 CaCl₂ ve K-Y Jelly ile hazırlanan MTA örneklerine göre biyoyumumluluğu istatistiksel olarak anlamlıdır (p<0.05).



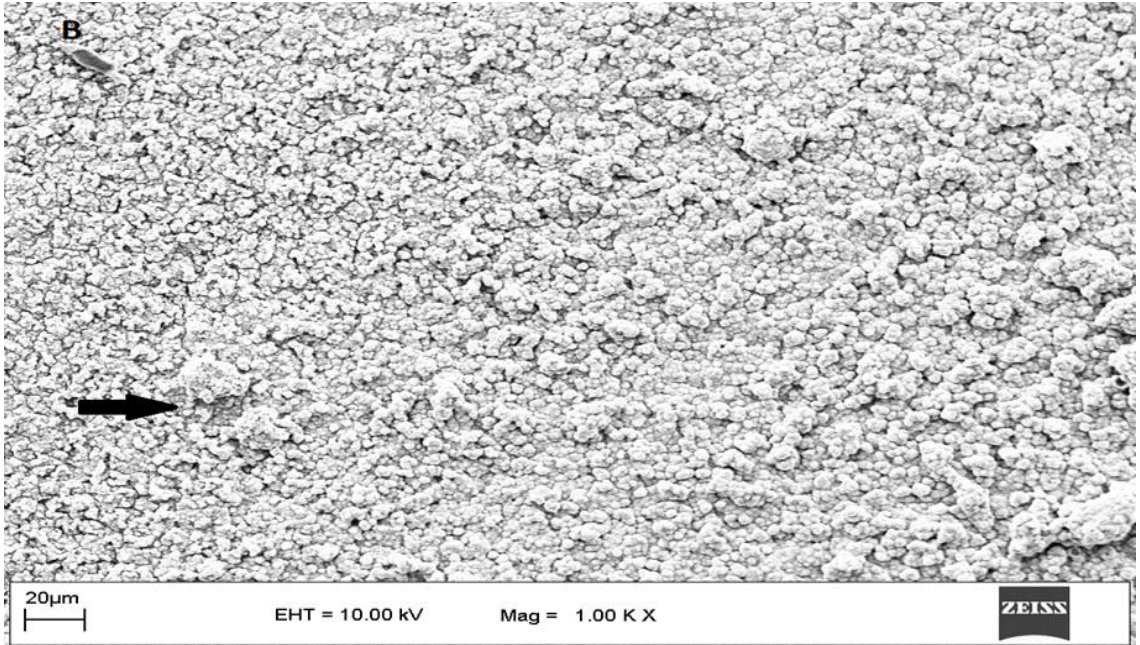
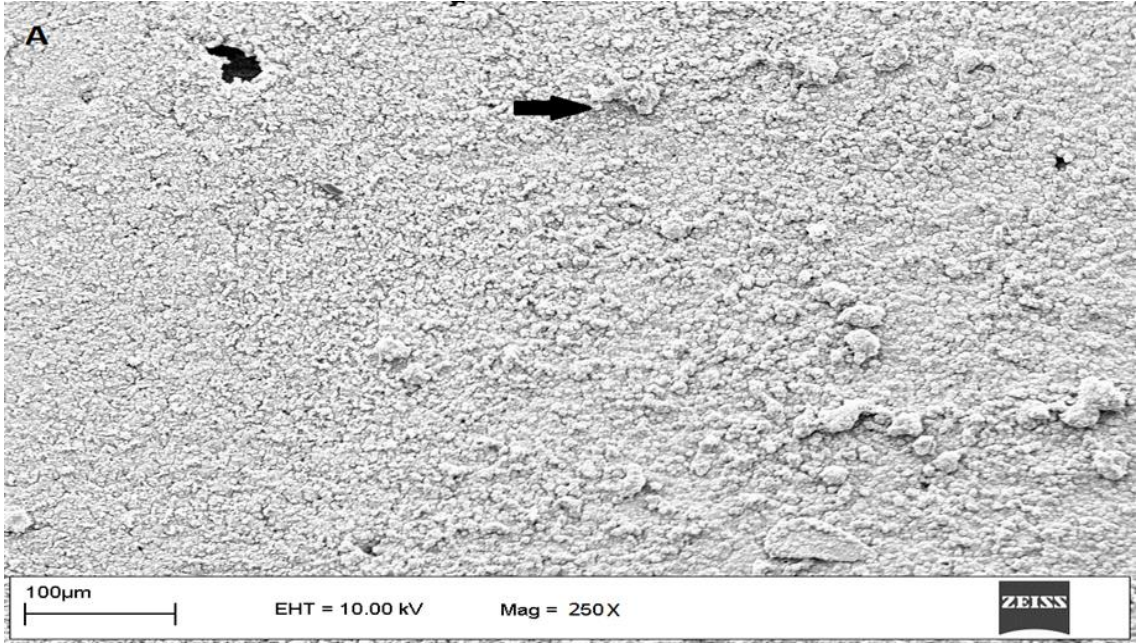
Şekil 11 MTS ile 1., 3. ve 7. günlerde hücre sayısında çoğalma analizi. A) %10 CaCl_2 , B) K-Y Jelly, C) Na_2HPO_4 , D) Distile su, E) %5 CaCl_2 , OC) Sadece kök hücre (kontrol). 48 kuyucuklu kap için 2000 hücre/kuyucuk ekimi yapıldı.

6.5. SEM Görüntü Sonuçları

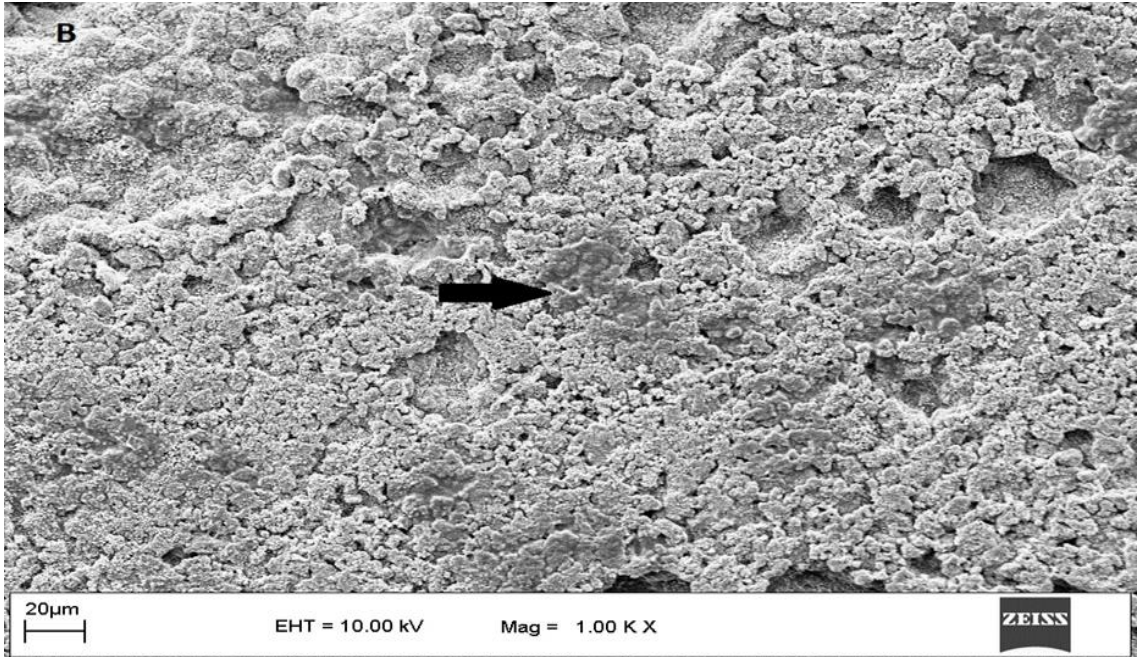
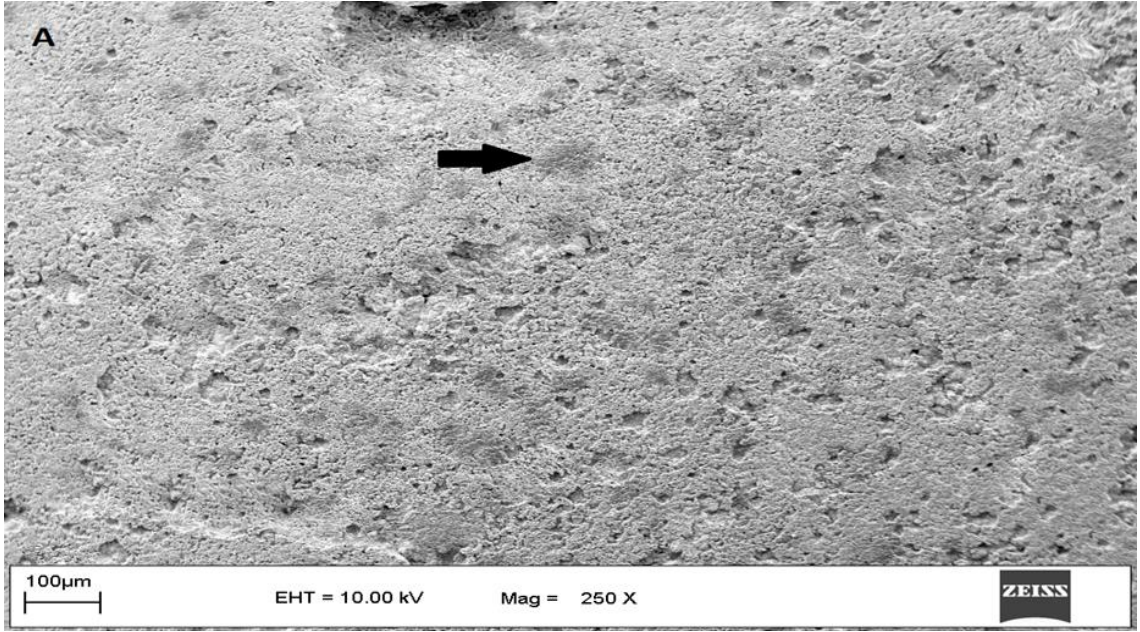
Altın palladyum ile kaplanan MTA örnekleri 1. ve 5. günlerde SEM ile incelendi. SEM ile inceleme sırasında görüntüler her bir örnek için 250 X ve 1.00 K X büyütme ile alındı. MTA örneklerinin yüzey özellikleri ve hücrelerin şekilleri izlenmektedir Resim 34a %10 CaCl_2 , 34b K-Y Jelly, 34c Na_2HPO_4 , 34d Distile su, 34e %5 CaCl_2 ile hazırlanan MTA örneklerini göstermektedir.



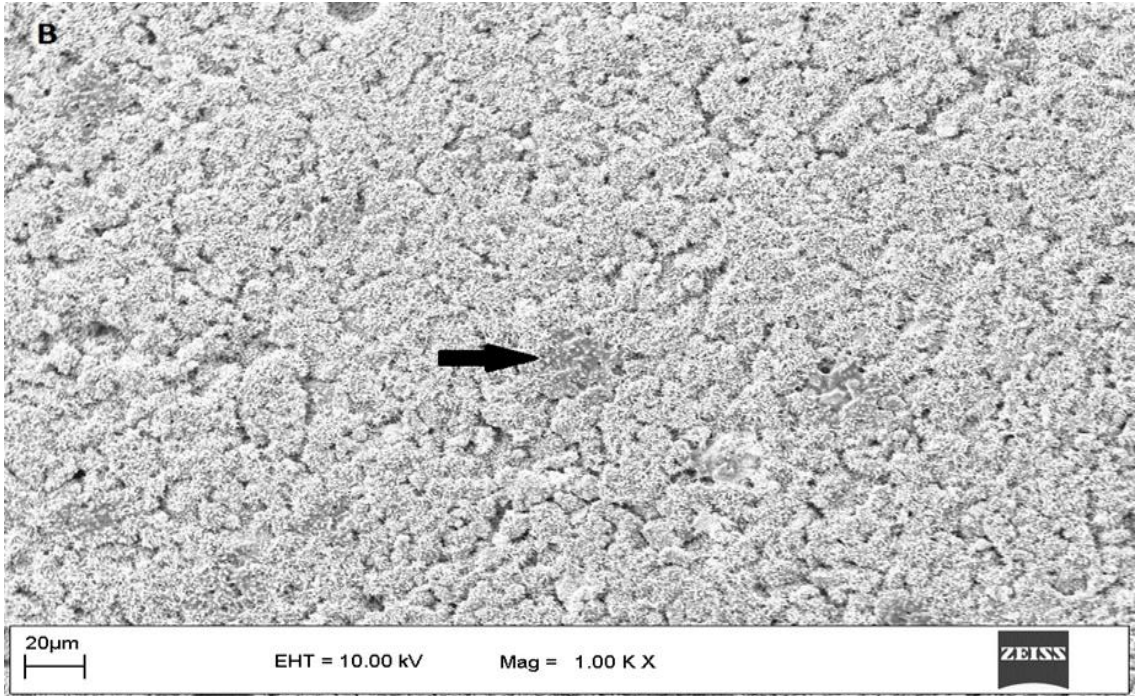
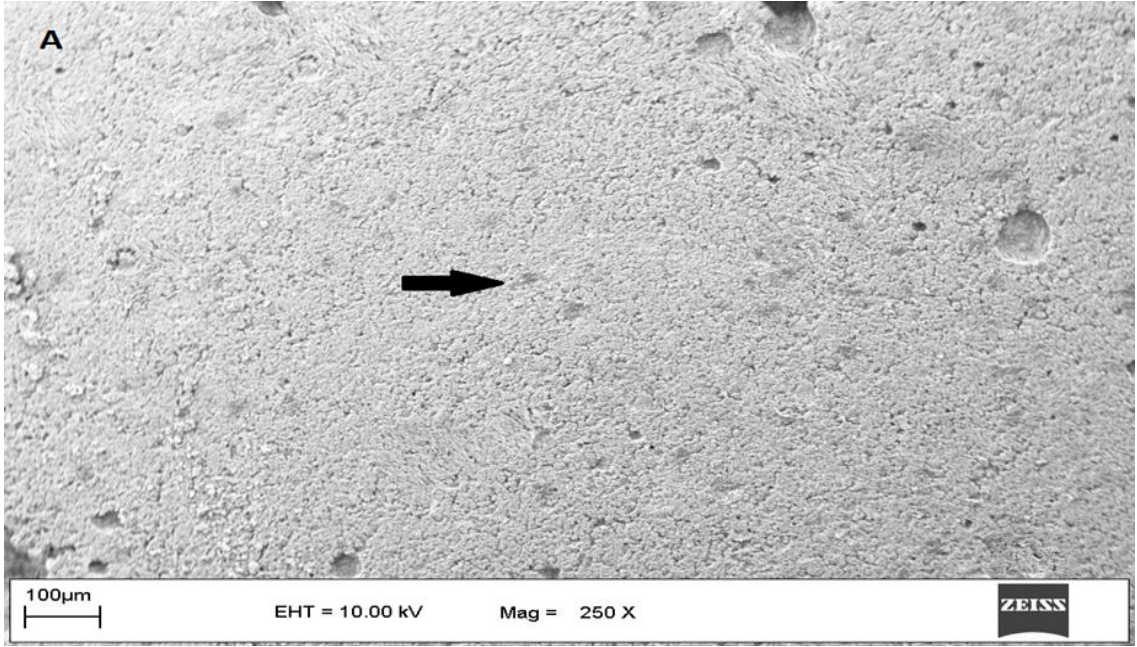
Resim 34a **A.** %10 CaCl_2 ile hazırlanan MTA örneği yüzeyine tutunan diş pulpa kök hücrelerinin 250x büyütmeyle görüntüsü izlenmektedir. **B.** %10 CaCl_2 ile hazırlanan MTA örneği yüzeyine tutunan diş pulpa kök hücrelerinin 1000x büyütmeyle görüntüsü izlenmektedir. Siyah ok materyal üzerine tutunan hücreleri ve bir hücrenin belirgin sınırlarını göstermektedir.



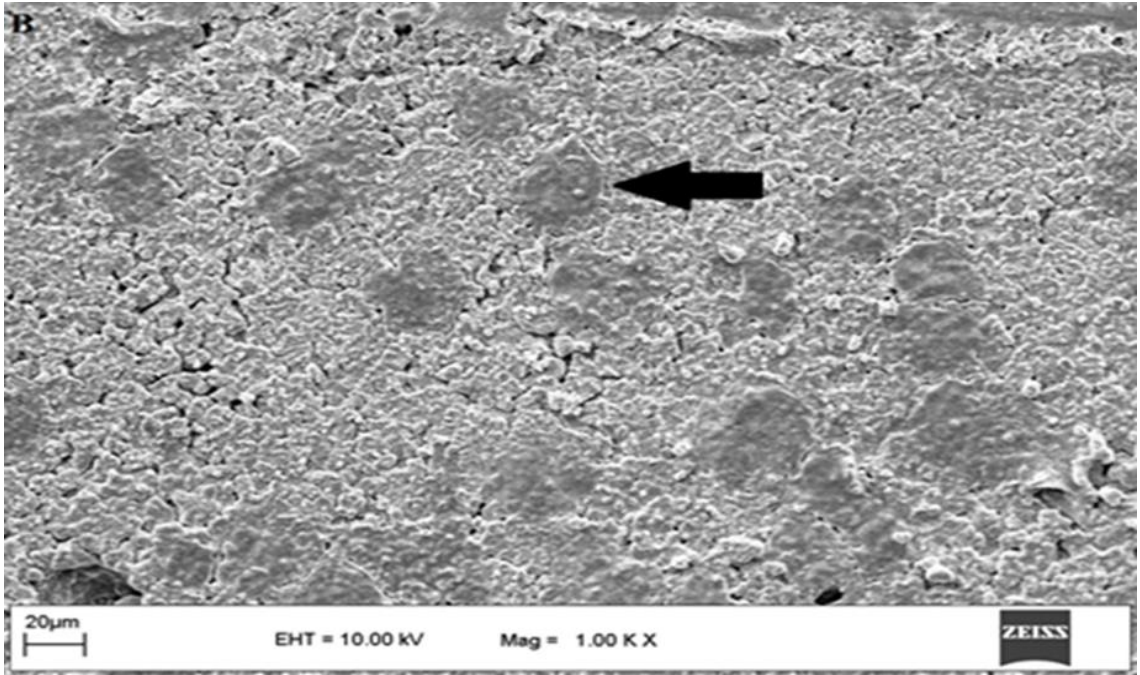
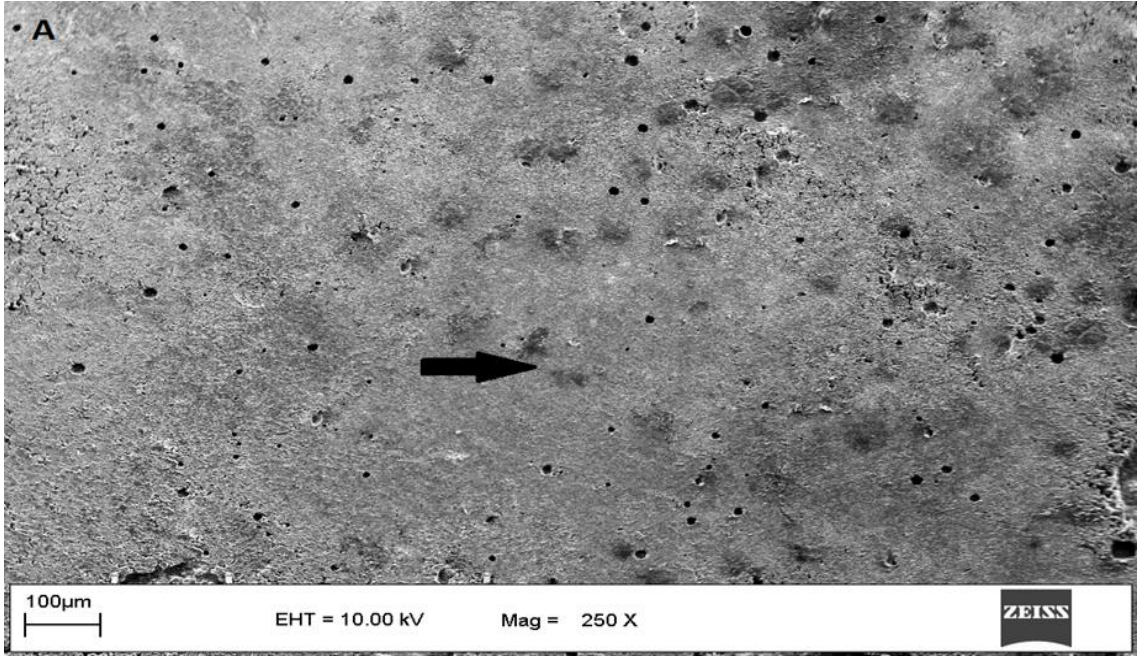
Resim 34b A. K-Y Jelly ile hazırlanan MTA örneği yüzeyine tutunan diş pulpa kök hücrelerinin 250x büyütmeyle görüntüsü izlenmektedir. B. K-Y Jelly ile hazırlanan MTA örneği yüzeyine tutunan diş pulpa kök hücrelerinin 1000x büyütmeyle görüntüsü izlenmektedir. Siyah ok materyal üzerine tutunan hücreleri ve bir hücrenin belirgin sınırlarını göstermektedir.



Resim 34c **A.** Na_2HPO_4 ile hazırlanan MTA örneği yüzeyine tutunan diş pulpa kök hücrelerinin 250x büyütmeyle görüntüsü izlenmektedir. **B.** Na_2HPO_4 ile hazırlanan MTA örneği yüzeyine tutunan diş pulpa kök hücrelerinin 1000x büyütmeyle görüntüsü izlenmektedir. Siyah ok materyal üzerine tutunan hücreleri ve bir hücrenin belirgin sınırlarını göstermektedir.



Resim 34d A. Distile su ile hazırlanan MTA örneği yüzeyine tutunan diş pulpa kök hücrelerinin 250x büyütmeyle görüntüsü izlenmektedir. **B.** Distile su ile hazırlanan MTA örneği yüzeyine tutunan diş pulpa kök hücrelerinin 1000x büyütmeyle görüntüsü izlenmektedir. Siyah ok materyal üzerine tutunan hücreleri ve bir hücrenin belirgin sınırlarını göstermektedir.



Resim 34e **A.** %5 CaCl_2 ile hazırlanan MTA örneği yüzeyine tutunan diş pulpa kök hücrelerinin 250x büyütmeyle görüntüsü izlenmektedir. **B.** %5 CaCl_2 ile hazırlanan MTA örneği yüzeyine tutunan diş pulpa kök hücrelerinin 1000x büyütmeyle görüntüsü izlenmektedir. Siyah ok materyal üzerine tutunan hücreleri ve bir hücrenin belirgin sınırlarını göstermektedir.

K-Y Jelly ile hazırlanan MTA hariç diğer hızlandırıcılarla hazırlanan MTA örnekleri üzerinde DPKH tek tek hücreler halinde görülebilmektedir. K-Y Jelly ile hazırlanan MTA hariç diğer MTA örnekleri üzerindeki hücrelerin sağlıklı olduğu ve bölünebildiği gözlemlendi. SEM görüntü sonuçlarının MTS sonuçları ile uyumlu olduğu tespit edilmiştir.

Araştırmamızın sitotoksosite tayininde biyouyumluluğu yüksek olarak bulunan %5 CaCl_2 , Na_2HPO_4 ve kontrol grubu olarak distile su ile hazırlanan MTA örneklerinin rejeneratif kapasitelerini tespit etmek amacıyla farklılaşma çalışmaları yapıldı.

6.6. Hücrelerin Osteo/odontojenik Ortamda Canlılık ve Çoğalma Özellikleri

Araştırmamızda %5 CaCl_2 , Na_2HPO_4 ve distile su ile hazırlanan MTA örneklerinin daimi diş pulpa kaynaklı mezenkimal kök hücreler üzerindeki rejeneratif etkisinin incelenmesi amacıyla öncelikle hücrelerin canlılık ve çoğalma tayini için 1., 7. ve 21. günlerde MTS testi uygulandı. Araştırma verileri, her bir örnekten üç kez ölçüm yapıldıktan sonra elde edilen ortalama değerler istatistiksel olarak değerlendirildi. Elde edilen sonuçlar için $p < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

MTS testi 1. gün ve 7.gün değerlerinin ortalamalarında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmaktadır ($p < 0.05$). Grupların MTS 21. gün değerlerinin ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı bulunmuştur ($p > 0.05$) (Tablo 8).

Tablo 8 Farklı hızlandırıcılar ile hazırlanan MTA örneklerinin MTS testi 1., 7. ve 21. gün minimum (min), maksimum (mak), ortalama (ort), standart sapma (SS) ve p değerleri

		Min	Mak	Ort	SS	p ^a
MTS 1. Gün	%5 CaCl ₂	0,44	0,473	0,46	0,017	0,024
	Distile Su	0,481	0,49	0,49	0,005	
	Na ₂ HPO ₄	0,319	0,421	0,37	0,072	
	Kontrol (Sadece Kök Hücre)	0,491	0,506	0,5	0,008	
MTS 7. Gün	%5 CaCl ₂	0,741	0,813	0,77	0,039	0,025
	Distile Su	0,716	0,817	0,78	0,053	
	Na ₂ HPO ₄	0,551	0,58	0,57	0,015	
	Kontrol (Sadece Kök Hücre)	1,048	1,054	1,05	0,003	
MTS 21. Gün	%5 CaCl ₂	0,134	1,485	0,99	0,741	0,075
	Distile Su	0,054	1,066	0,64	0,524	
	Na ₂ HPO ₄	0,282	0,913	0,69	0,357	
	Kontrol (Sadece Kök Hücre)	1,862	2,102	1,99	0,121	

a. Kruskal Wallis Test

MTS testinde 1.günde %5 CaCl₂ ve distile su ile hazırlanan MTA örnekleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunurken (p=0.049); %5 CaCl₂ grubu ile Na₂HPO₄ grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı bulunmuştur (p>0.05). Kontrol grubu ile %5 CaCl₂ ve distile su ile hazırlanan MTA örnekleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık varken (p=0.049); Na₂HPO₄ grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı tespit edilmiştir (p>0.05) (Tablo 9).

MTS testinde 7. günde %5 CaCl₂ ve Na₂HPO₄ ile hazırlanan MTA örnekleri, distile su ve Na₂HPO₄ ile hazırlanan MTA örnekleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunurken (p=0.049); %5 CaCl₂ grubu ile distile su arasında istatistiksel olarak

anlamlı bir farklılık olmadığı ($p>0.05$), kontrol grubu ile %5 CaCl_2 , Na_2HPO_4 ve distile su ile hazırlanan MTA örnekleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olduğu bulunmuştur ($p<0.05$) (Tablo 9).

MTS testi 21. gün sonuçlarında MTA grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$). Kontrol grubu ile %5 CaCl_2 , Na_2HPO_4 ve distile su ile hazırlanan MTA örnekleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmaktadır ($p<0.05$) (Tablo 9).

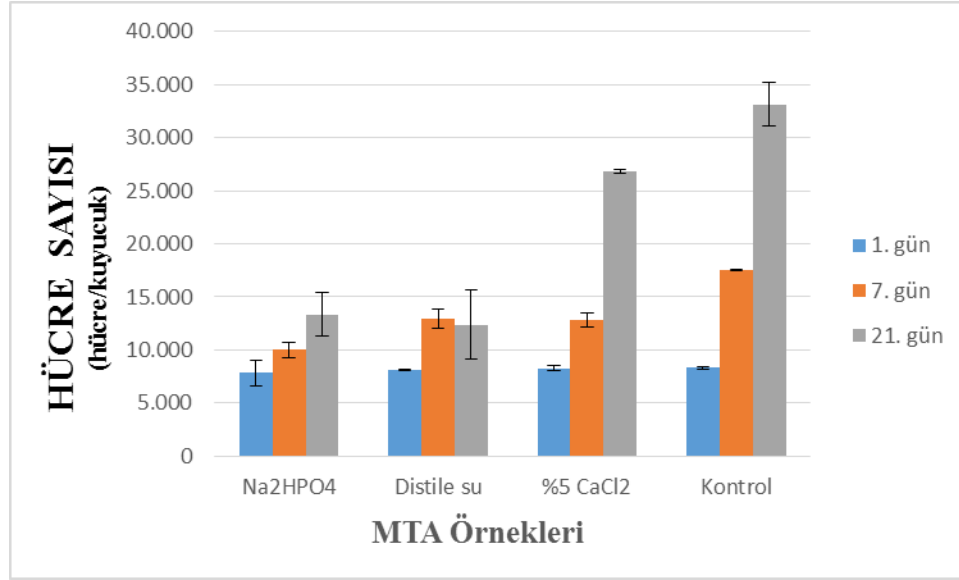
Tablo 9 MTS testi 1., 7. ve 21. gün sonuçlarının karşılaştırılması

	%5 CaCl_2			Distile su			Na_2HPO_4		
	1.gün	7.gün	21.gün	1.gün	7.gün	21.gün	1.gün	7.gün	21.gün
Distile su	0,049	0,827	0,275						
Na_2HPO_4	0,083	0,049	0,513	0,083	0,049	0,827			
Kontrol	0,049	0,049	0,049	0,049	0,049	0,049	0,083	0,049	0,049

*Mann Whitney U Test

Farklı hızlandırıcılar ile hazırlanan MTA örnekleri kendi içlerinde günler arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermemiştir. Bu sonuca göre 1. günden 21. güne doğru kontrol için hazırlanan hücre kültüründe beklendiği gibi artış gözlenirken, distile su grubunun 21. günü hariç tüm gruplarda artış gözlenmiştir. %5 CaCl_2 ve Na_2HPO_4 ile hazırlanan MTA örnekleri kontrol grubu ile benzerlik göstererek daimi diş pulpa kök

hücrelerinin sayısında istatistiksel olarak anlamlı bir artış göstermiştir ve en biyoyumlu materyal %5 CaCl₂ ile hazırlanan MTA örneği olduğu belirlenmiştir (p<0.05) (Şekil 12).



Şekil 12 MTS ile 1., 7. ve 21. günlerde hücre sayısında çoğalma analizi. 24 kuyucuklu kap için 5000 hücre/kuyucuk ekimi yapıldı.

6.7. Hücrelerin Osteo/odontojenik Hücrelere Farklılaşma Potansiyeli

6.7.1. ALP testi sonuçları

Hücrelerinin odontojenik besiyeri ile 7. ve 14 günlerde uyarılmasını takiben sert doku oluşturabilme özelliklerinin incelenmesi için ALP testi uygulandı.

Farklı hızlandırıcılar ile hazırlanan MTA örneklerinin ALP 7. gün ve 14. gün değerlerinde istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı farklılık bulunmaktadır (p=0.001) (Tablo 10).

Tablo 10 ALP aktivite minimum (min), maksimum (mak), ortalama (ort), standart sapma (SS) ve p değerleri

		Min	Mak	Ort	SS	p ^a
ALP 7. Gün	%5 CaCl ₂	0,099	0,147	0,13	0,012	0,001
	Distile Su	0,002	0,089	0,04	0,04	
	Na ₂ HPO ₄	0,086	0,132	0,11	0,011	
	Kontrol (Sadece Kök Hücre)	0,038	0,102	0,07	0,02	
ALP 14. Gün	%5 CaCl ₂	0,04	0,096	0,07	0,017	0,001
	Distile Su	0,007	0,039	0,02	0,012	
	Na ₂ HPO ₄	0,048	0,094	0,07	0,015	
	Kontrol (Sadece Kök Hücre)	0,046	0,074	0,06	0,007	

a. Kruskal Wallis Test

7.günde ALP aktivitesinde %5 CaCl₂ ve distile su ile hazırlanan MTA örnekleri; %5 CaCl₂ ve Na₂HPO₄ ile hazırlanan MTA örnekleri arasında istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı bir farklılık bulunmaktadır (p=0.001). Distile su ve Na₂HPO₄ ile hazırlanan MTA örnekleri arasında istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı bir farklılık bulunmaktadır (p=0.001). Kontrol grubu ile %5 CaCl₂ ve Na₂HPO₄ ile hazırlanan MTA örnekleri arasında istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı bir farklılık bulunurken (p<0.01); kontrol grubu ile distile su grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır (p>0.05) (Tablo 11).

14.günde ALP aktivitesinde %5 CaCl₂ ve distile su ile hazırlanan MTA örnekleri arasında istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı bir farklılık varken (p=0.001); %5 CaCl₂ ile hazırlanan MTA ile Na₂HPO₄ ile hazırlanan MTA örnekleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı bulunmuştur (p>0.05). Distile su ve Na₂HPO₄ ile hazırlanan MTA örnekleri arasında istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı bir farklılık bulunmaktadır (p=0.001). Kontrol grubu ile %5 CaCl₂, distile su ve

Na₂HPO₄ ile hazırlanan MTA örnekleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmaktadır (p<0.05) (Tablo 11).

Tablo 11 ALP aktivite 7. ve 14. gün değerleri arasındaki farklılıklar

	%5 CaCl ₂		Distile su		Na ₂ HPO ₄	
	7.gün	14.gün	7.gün	14.gün	7.gün	14.gün
Distile su	0,001	0,001				
Na₂HPO₄	0,001	0,419	0,001	0,001		
Kontrol	0,001	0,01	0,106	0,001	0,001	0,03

*Mann Whitney U Test

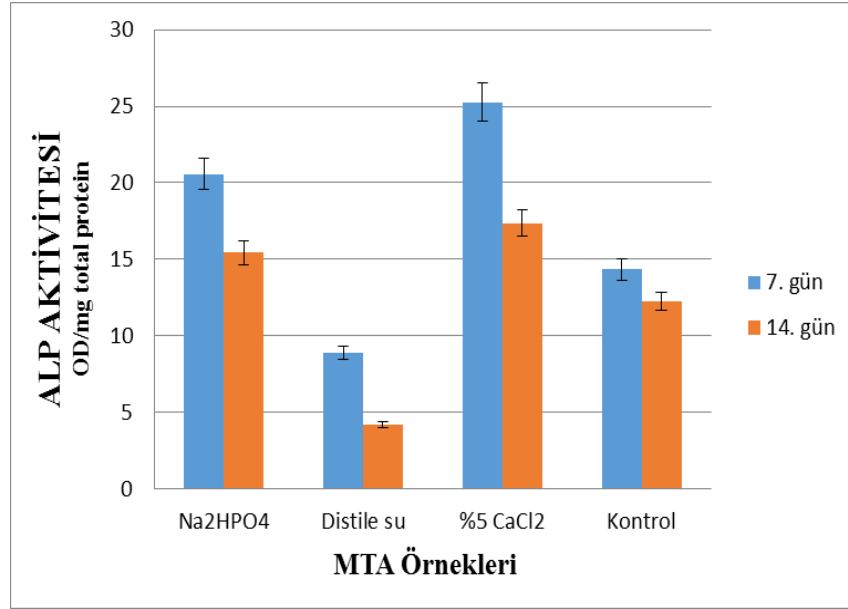
%5 CaCl₂ ve Na₂HPO₄ ile hazırlanan MTA örneklerinin ALP aktivitesinde 7.gün-14.gün değerlerinde istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı bir farklılık bulunmaktadır (p=0.001). Distile su ile hazırlanan MTA örneğinin ve kontrol (sadece kök hücre) grubunun ALP aktivitesinde 7.gün-14.gün değerlerinde ise istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır (p>0.05) (Tablo 12).

Tablo 12 MTA örnek grupları içinde 7. ve 14. gündeki ALP aktivitesinin değerlendirilmesi

		p*
%5 CaCl ₂	ALP 7. Gün- 14. Gün	0,001
Distile Su	ALP 7. Gün- 14. Gün	0,089
Na ₂ HPO ₄	ALP 7. Gün- 14. Gün	0,001
Kontrol (Sadece Kök Hücre)	ALP 7. Gün- 14. Gün	0,055

* Wilcoxon Signed Rank Test

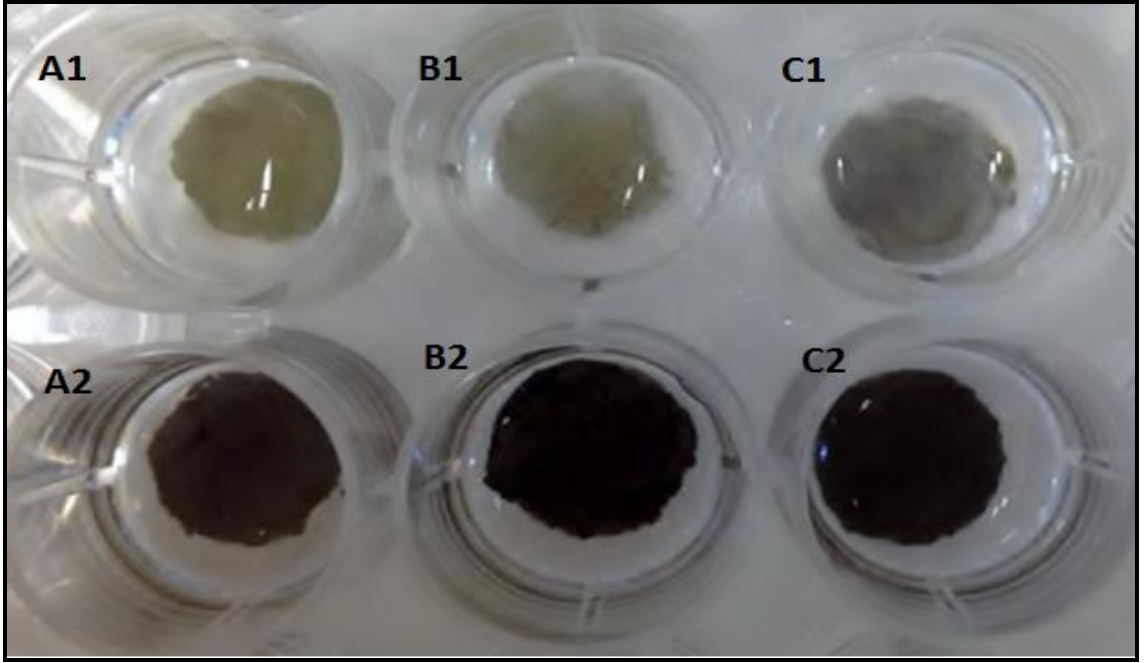
ALP enzimi osteoblast ve odontoblast hücreleri için erken tanı işareti olduğu için 7. günde artış göstermiş, farklılaşmanın 14. gününde yapılan ölçümlerde ise tüm gruplarda düşük ALP aktivitesi gösterdiği belirlenmiştir. %5 CaCl₂ ile hazırlanan MTA örneği en yüksek ALP aktivitesi gösterirken; distile su ile hazırlanan MTA örneği en düşük ALP aktivitesi göstermiştir (p<0.05) (Şekil 13).



Şekil 13 ALP aktivite değerlerinin 7.ve 14. gün karşılaştırması

6.7.2. Von Kossa boyaması

Von Kossa boyaması yapılarak 21.günde tespit edilen kalsiyum depozit oluşumu stereo mikroskopla alınan görüntüler ile belirlendi. Odontojenik besiyeri içeren hücreler Von Kossa boyaması yapıldıktan sonra, stereo mikroskobu altında bakıldığında tüm gruplarda kalsifiye nodül oluşumu izlendi (Resim 35a, 35b).



Resim 35a Gümüş nitrat solüsyonu sonrası kalsiyum depozitlerinin oluşturduğu siyah görüntü. **A1.** Na_2HPO_4 ile hazırlanan MTA örneği (kontrol grubu; hücre ekimi yapılmadı) **A2.** Na_2HPO_4 ile hazırlanan MTA'nın Von Kossa boyaması yapıldıktan sonraki kalsiyum depozitlerinin oluşturduğu görüntü **B1.** Distile su ile hazırlanan MTA örneği (kontrol grubu; hücre ekimi yapılmadı) **B2.** Distile su ile hazırlanan MTA'nın Von Kossa boyaması yapıldıktan sonraki kalsiyum depozitlerinin oluşturduğu görüntü **C1.** %5 CaCl_2 ile hazırlanan MTA örneği (kontrol grubu; hücre ekimi yapılmadı) **C2.** %5 CaCl_2 ile hazırlanan MTA'nın Von Kossa boyaması yapıldıktan sonraki kalsiyum depozitlerinin oluşturduğu görüntü.

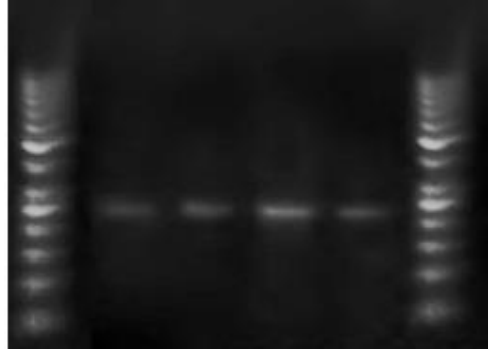


Resim 35b **A.** Na_2HPO_4 ; **B.** Distile su; **C.** %5 CaCl_2 ile hazırlanan MTA'nın Von Kossa boyaması yapıldıktan sonraki görüntüsü

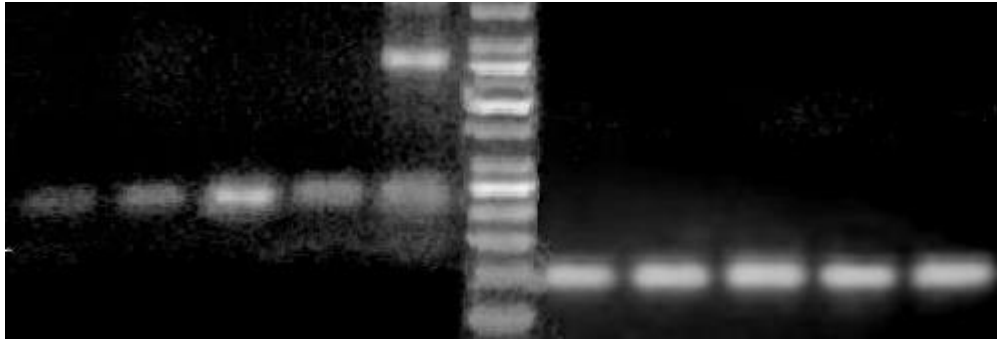
Von Kossa boyaması sonrası kalsifiye nodül oluşumu Na₂HPO₄, distile su ve %5 CaCl₂ ile hazırlanan MTA gruplarının tümünde gözlemlendi.

6.7.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) sonuçları

GZ-PZR için kullanılacak primerlerin çalışıp çalışmadığının tespiti ve optimum çalışma sıcaklığının tespiti için yapılan gradyan PZR sonucunda DSPP, Kollajen Tip 1 ve β Aktin primerlerinin optimum çalışma sıcaklıkları tespit edildi DSPP primer için en iyi sıcaklık 55,7°C olarak kabul edildi. Kollajen Tip 1 ve β Aktin primerleri için en iyi sıcaklık sırasıyla 55,1 ve 57,1°C olarak kabul edildi. (Resim 36a, 36b). β Aktin gen ekspresyonu çalışmalarında en yaygın olarak kullanılan referans genlerden biridir ve bu gen örneklerden alınan RNA'ların normalizasyonu için standart olarak kullanılmıştır.

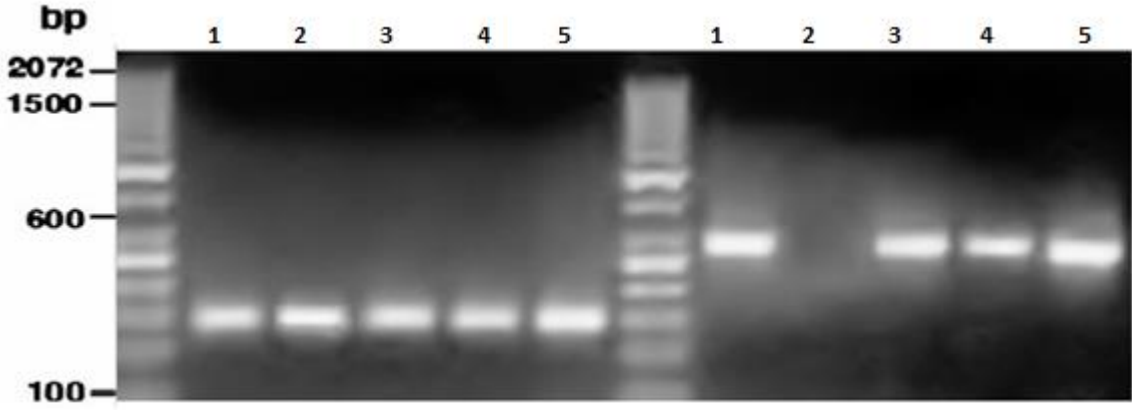


Resim 36a Odontoblast hücrelerinin DNA'sı üzerindeki DSPP'e ait olan özgül bölgenin çeşitli sıcaklıklarda çoğaltılan bant görüntüsü.

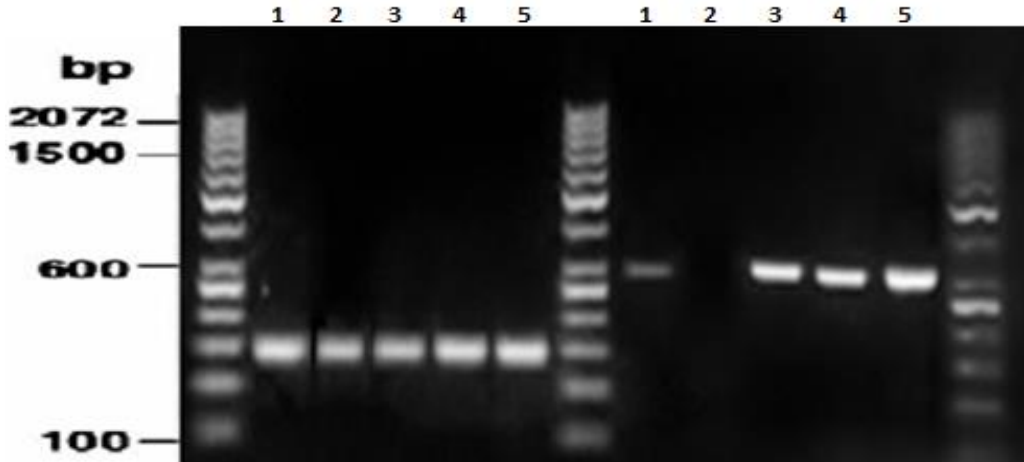


Resim 36b Odontoblast hücrelerinin DNA'sı üzerindeki Kollajen Tip 1 ve β Aktin'e ait olan özgül bölgenin çeşitli sıcaklıklarda çoğaltılan bant görüntüsü.

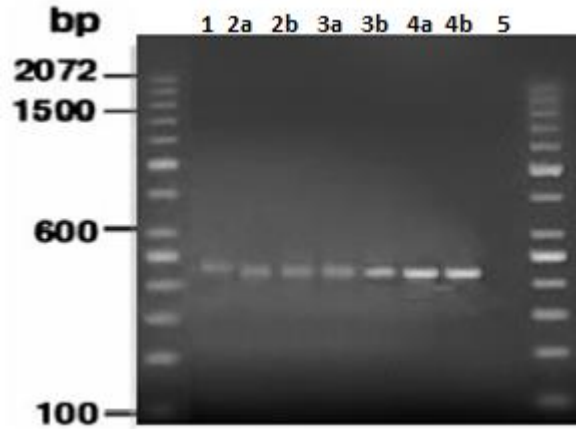
Farklı hızlandırıcılar ile hazırlanan MTA örnekleri ile kültüre edilmiş diş pulpa kök hücrelerinin 14. ve 21. günlerde odontojenik besiyeri ile uyarılması sonucunda elde edilen odontoblast hücrelerinin DNA' sı üzerinde DSPP, Kollajen Tip 1 ve β Aktin'e ait olan özgül bölgenin çoğaltılan bant görüntüleri Resim 37a, 37b ve 37c'de görülmektedir.



Resim 37a β Aktin ve Kollajen Tip 1'e ait 14. gün jel görüntüsü. 1) distile su ile hazırlanan MTA örneği, 2) negatif kontrol (3T3 hücresi), 3) Na_2HPO_4 ile hazırlanan MTA örneği, 4) %5 CaCl_2 ile hazırlanan MTA örneği, 5) pozitif kontrol (osteoblast hücresi).



Resim 37b β Aktin ve Kollajen Tip 1'e ait 21. gün jel görüntüsü. 1) distile su ile hazırlanan MTA örneği, 2) negatif kontrol (3T3 hücresi), 3) Na_2HPO_4 ile hazırlanan MTA örneği, 4) %5 CaCl_2 ile hazırlanan MTA örneği 5) pozitif kontrol (osteoblast hücresi).

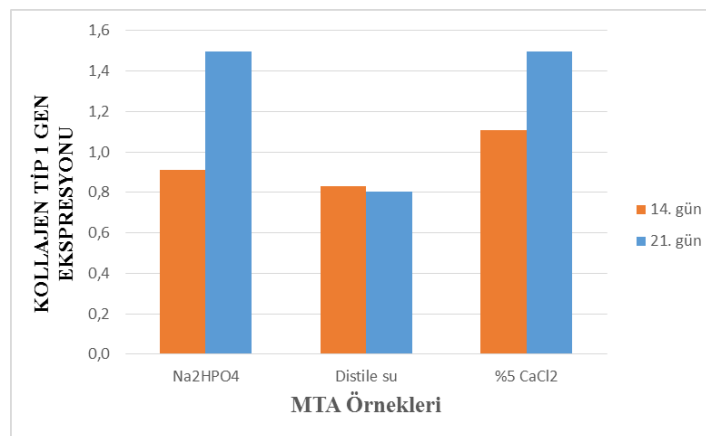


Resim 37c DSPP primeri için 14. ve 21. gün jel görüntüsü. 1) pozitif kontrol (osteoblast hücresi), 2a) 14.gün distile su, 2b) 21.gün distile su ile hazırlanan MTA örneği, 3a) 14. gün Na_2HPO_4 , 3b) 21. gün Na_2HPO_4 ile hazırlanan MTA örneği, 4a) 14.gün %5 CaCl_2 , 4b) 21. gün %5 CaCl_2 ile hazırlanan MTA örneği, 5) negatif kontrol (3T3 hücresi)

6.7.4. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (GZ-PZR) sonuçları

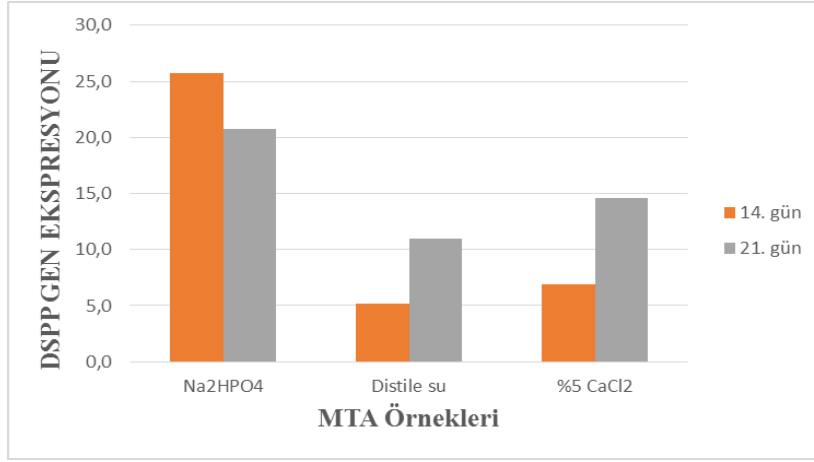
GZ-PZR analizinde, odontoblast hücrelerinin DSPP, β Aktin ve Kollajen Tip 1 varlığında sentezledikleri DNA miktarı rakamsal olarak saptandı.

Kollajen Tip 1 aktivitesi; distile su ile hazırlanan MTA grubu hariç diğer MTA gruplarında 14. günden 21. güne doğru artış göstermiştir (Şekil 14).



Şekil 14 MTA örneklerinin 14. ve 21. günlerdeki Kollajen Tip 1 aktivitesi.

DSPP aktivitesi; distile su ve %5 CaCl₂ ile hazırlanan MTA gruplarında 14. günden 21. güne doğru artış göstermiştir. Na₂HPO₄ ile hazırlanan MTA örneğinde DSPP gen salınımı en fazla görülmüştür (Şekil 15).



Şekil 15 MTA örneklerinin 14. ve 21. günlerdeki DSPP aktivitesi.

GZ-PZR bulgularına göre Na₂HPO₄ ve %5 CaCl₂ ile hazırlanan MTA örneği distile su ile hazırlanan MTA örneğine göre daha iyi farklılaşabilme yeteneği göstermiştir.

MTA'nın sertleşme süresini kısaltmasının yanı sıra %5 CaCl₂ ve Na₂HPO₄ ile hazırlanan MTA örneklerinin daimi diş pulpa kök hücreleri üzerindeki biyouyumluluğu ve osteo/odontojenik farklılaşma kapasitesi distile su ile hazırlanan MTA'ya göre daha başarılı bulunmuştur.

7. TARTIŞMA VE SONUÇ

Rejeneratif tıp ve doku mühendisliğindeki gelişmeler, diş hekimliğinde rejeneratif tedavilerin gündeme gelmesini sağlamıştır. Kök hücreler; doku rejenerasyonu ve rejeneratif tıp uygulamaları açısından önemli bir alan haline gelmiştir. Hastalık sonucunda kaybedilen dokunun tekrar geri kazanılmasını sağlayan kök hücreler son yıllarda diş hekimliği çalışmalarında da kullanılmaya başlanmıştır (Cristian ve ark., 2011; Howard ve ark., 2008; Shete ve ark., 2015).

Kök hücreler, yüksek çoğalma ve farklılaşma kapasiteleri nedeniyle rejeneratif tedaviler için uygun kaynaklardır (Bianco P, Robey, 2001; Shete ve ark., 2015). Tedavi amaçlı kullanımda esas sorunlardan biri kök hücre kaynaklarının zor elde edilebilir olmasıdır. Ancak son yıllarda yapılan çalışmalar sonucunda kemik iliği, kıkırdak dokusu, yağ dokusu, diş dokusu gibi dokularda kök hücre varlığı tespit edilmiştir (Howard ve ark., 2008; Jain ve Bansal, 2015; Shete ve ark., 2015).

Kök hücre çalışmaları; kas, kıkırdak, kemik, yağ dokusu, diş pulpası, periodontal ligament, diş folikülü, apikal papilla gibi birçok hücre çeşidine farklılaşabilen mezenkimal kök hücreler üzerinde yoğunlaşmıştır. Mezenkimal kök hücreler, diş dokularından kolaylıkla elde edilebildiği için diş hekimliğinde kök hücre biyolojisi ve doku mühendisliği çalışmalarına olan ilgiyi arttırmıştır (Estrela ve ark., 2011; Huang GT-J ve ark., 2009). Diş dokularından elde edilen kök hücreler diş, sinir, kemik, dokuya farklılaşabilmesinden dolayı doku mühendisliği çalışmaları için potansiyel oluşturmaktadır (Estrela ve ark., 2011).

Pek çok araştırmacı tarafından diş doku kaynaklı mezenkimal kök hücreler elde edilmiştir (Honda ve ark., 2010; Huang GT-J ve ark., 2009; Iglesias-Linares ve ark., 2013; Miura ve ark., 2003).

İlk kez Gronthos ve ark. (2000), tarafından tanımlanan diş pulpası kök hücrelerinin mineralize dentin matriksi oluşumundan sorumlu odontoblast hücrelerine

farklılaşabildiğini göstermiştir. Bu araştırmanın sonucunda ise diş pulpa kök hücrelerinin, kemik iliği kökenli kök hücrelerle benzerlik gösterdiğini belirlemişlerdir. Diş pulpa kaynaklı kök hücreler; kolay erişilebilirliği ve gelecekteki çalışmalarda kullanmak amacıyla minimal invaziv yollarla elde edilip saklanabilmesi açısından oldukça önemli bir kaynak olarak görülmektedir (Shete ve ark., 2015).

Kolay ulaşılabilir bir kaynaktan izole edilmesine ek olarak süt diş pulpasından elde edilen kök hücrelerin yetişkin diş pulpasına oranla daha fazla proliferasyon oranına ve hücre popülasyonuna sahip olması ve daha immatür özellikteki multipotent hücrelerden oluşmasından dolayı eksfoliye süt dişlerindeki kök hücreler araştırmalarda kullanılmıştır, ancak daimi diş pulpası kök hücreleri gibi kompleks pulpa-dentin yapısı oluşturamadığı bildirilmiştir (Miura ve ark., 2003; Shi ve ark., 2005).

Apikal papilladan elde edilen kök hücreler, diş pulpası kök hücrelerine oranla daha fazla dentin oluşturabilme kapasitesine sahiptir, ancak gelişimin erken evresindeki dişlerin bulunmasının zor olmasından dolayı elde edilmesi zordur. Matur pulpaya oranla daha fazla kök hücre içerdikleri ve periodontal ligament kök hücreleri ile birlikte kullanıldığında bağ doku oluşturdıkları gözlenmiştir (Huang GT-J, Sonoyama ve ark., 2009; Jo ve ark., 2007).

Diş pulpası kök hücreleri yüksek proliferasyon gösterebilen, klonlanabilen, yüksek plastisite yeteneğine sahip, mezenkimal kök hücreler olduğu için çalışmalarda tercih edilmiştir (Gronthos ve ark., 2000). Sağlıklı insan dişinden elde edilen diş pulpası kök hücrelerinin dondurularak saklandıktan sonra çözündürülmesiyle elde edilen yüksek canlılık oranları, bu hücrelerin gerektiğinde kullanılmak üzere örnek kök hücre bankalarında da saklanabileceğini ortaya koymuştur (Zhang ve ark., 2006).

Araştırmamızda da sert doku oluşumu için kaynağını daimi diş pulpasından alan kök hücreler kullanılmıştır. Kolaylıkla elde edilebilmesi ve yüksek çoğalma kapasitesi ve yukarıda sayılan özellikleri göz önüne alınarak kullanımı tercih edilmiştir.

Başlıca pulpa kök hücre kaynakları çekilmiş 20 yaş dişleri, fazla dişler, çekilmiş/sürmüş süt dişleri ve ortodontik tedavi veya periodontal hastalık nedeniyle çekilen dişlerdir. Diş pulpası kök hücre çalışmalarında, çekim endikasyonu bulunması ve kolayca elde edilebilmesinden dolayı sıklıkla 20 yaş dişleri kullanılmaktadır. Ayrıca bu dişlerin en son gelişen dişler olması nedeniyle, gelişimin erken döneminde çekildiğinde pulpa dokusu açısından zengin olduğu da bilinmektedir (Graziano ve ark., 2008; Gronthos ve ark., 2002). Araştırmamızda da ortodontik tedavi amaçlı çekim endikasyonu konulmuş 20 yaş dişleri kullanılmıştır.

Yapılan araştırmalarda diş pulpasındaki kök hücrelerin canlılık, çoğalma ve osteo/odontojenik farklılaşma kapasitesi ile ilgili immünofenotipik, morfolojik ve büyüme karakteristiklerini analiz etmek için enzimatik ayrıştırma ve direkt pulpa dokusundan mekanik ayrıştırma yöntemleri kullanarak bu hücreleri izole etmişlerdir (Gronthos ve ark., 2000; Huang GT-J ve ark., 2006; Park ve ark., 2004).

Mekanik ayrıştırma yöntemi ile elde edilen doku aseptik şartlarda olabilecek en küçük parçalara ayrılarak besiyeri içeren bir hücre kültür plağına yerleştirilir. Zamanla öncü hücreler parçalanan doku parçasından ayrılarak hücre kültür plağında göç ederler ve kültür plağına yapışırlar. Mekanik ayrıştırma yönteminde avantaj; göç eden hücrelerin ayrıldıkları doku ile yakın doku birliği oluşturabilmeleri ve ayrıldıkları dokudaki hücreler ile haberleşebilmeleridir (Huang GT-J ve ark., 2006; Park ve ark., 2004; Yıldırım, 2013).

Enzimatik ayrıştırma metodu ise; enzim aracılığıyla hücrelerarası bağların sindirilerek ortadan kaldırılması ve böylece hücrelerin tek tek serbestlenmesi esasına dayanır (Slocum ve ark., 1981; Yıldırım, 2013).

Araştırmacılar, enzimatik yöntem (Batouli ve ark., 2003; Gronthos ve ark., 2000; Huang GT-J ve ark., 2006; Yıldırım, 2013) ya da mekanik ayrıştırma yöntemi (Huang GT-J ve ark., 2006; Park ve ark., 2004; Saito ve ark., 2004) kullanılarak izolasyonu sağlanan diş pulpası hücrelerinin farklılaşma potansiyeline sahip olduklarını, odontoblast

benzeri hücelere dönüşebildiklerini ve pulpa-dentin benzeri yapılar oluşturdıklarını göstermişlerdir.

Yoon ve ark. (2013), her iki izolasyon yöntemini karşılaştırdıkları çalışmalarında, mezenkimal kök hücrelerin canlılığı değerlendirildiğinde mekanik ayrıştırma yönteminin enzimatik yöntemle göre daha başarılı olduğunu ifade etmişlerdir.

Bakopoulou ve ark. (2011), iki ayrı metodun süt dişi pulpası kök hücrelerinin çoğalma ve osteo/odontojenik farklılaşma kapasitesine etkisini değerlendirdikleri araştırmalarında, enzimatik ayrıştırma yöntemi ile heterojen hücre popülasyonu elde edildiğini, mekanik ayrıştırma yönteminde ise daha homojen hücrelerin olduğunu göstermişlerdir. Enzimatik ayrıştırma yönteminde kök hücre belirteçlerinden olan STRO-1 ve CD34+ hücre yüzdesinin mekanik ayrıştırma yöntemine oranla daha fazla olduğu tespit etmişlerdir. Her iki yöntemle elde edilen hücrelerin kültür ortamına osteo/odontojenik indükleyicilerin eklenmesi ile oluşturulan kültür ortamında enzimatik ayrıştırma yönteminde mineralizasyon seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı derecede artış olduğunu ifade etmişlerdir.

Huang GT-J ve ark. (2006), tarafından yapılan insan daimi diş pulpa kök hücrelerinin izolasyonunda kullanılan iki ayrı metodun hücrelerin karakterizasyonuna ve rejeneratif potansiyeline etkisini araştırdıkları çalışmalarında enzimatik yöntemde farklı popülasyonda hücre oluştuğunu, proliferasyon oranının enzimatik yöntemle elde edilen hücrelerde daha başarılı olduğunu ve her iki yöntemle elde edilen hücrelerin farklılaşma potansiyeli gösterdiğini belirtmişlerdir.

Couple ve ark. (2000), çalışmalarında insan daimi diş pulpa kök hücrelerini mekanik ayrıştırma yöntemi ile izole ederek, elde edilen hücrelerin odontoblast karakterli hücre gelişimini sağladığını ve dentin benzeri mineralize matriks organize ettiğini göstermişlerdir.

Mekanik ayrıştırma yönteminde odontoblastik farklılaşma sürecinde *in vivo* odontoblastik tabakaya benzer şekilde hücreler arası desmozomal bağların meydana geldiğini, polarize hücrelerin bir hatta dizildiklerini ve dentin matriks oluşturmada önce bağlantılarını oluşturdıklarını (Couble ve ark., 2000; Ruch LV, Lesot H, 1995); enzimatik ayrıştırma yönteminde ise çok katmanlı hücresel birleşmeyle meydana gelen nodül formasyonunda odontoblast benzeri hücreler ve mineralize matrix oluşumu gerçekleştirdiklerini göstermişlerdir (Andrews ve ark., 1993; Kasugai ve ark., 1993; Nakashima, 1991).

Araştırmamızda daimi diş pulpa mezenkimal kök hücrelerin canlılığı, çoğalması, rejeneratif potansiyeli, homojen popülasyon oluşturmaları ve *in vivo* koşullara daha yakın hücre dizilimleri ve bağlantıları oluşturmaları nedeniyle diş pulpa hücrelerinin izolasyonu için mekanik ayrıştırma yöntemi kullanılmıştır. Mekanik olarak küçültülen ve direkt hücre kültür plağına ekilen pulpanın kabın yüzeyine tutunduğu ve hücrelerin çoğalmaya başladığı gözlemlenmiştir.

Mezenkimal kök hücreler farklı doku kaynaklarından elde edilebildiği gibi farklılaşabilme, doku kültür kaplarına yapışma ve spesifik bazı kök hücre belirteci taşıma gibi ortak özelliklere sahiptir ve kök hücre belirteci analizleri ile MKH'lerin karakterizasyonu yapılmakta ve bu amaçla çalışmalarda akış sitometrik analizler kullanılmaktadır (Horwitz ve ark., 2005).

Mezenkimal kök hücrelerin tanımlanmasında kök hücre belirteci olarak STRO-1 kullanılmaktadır. STRO-1'in mezenkimal kök hücre varlığının doğrulanması ve tanımlanması için kullanılan mezenkimal kök hücrelere özgü tek belirteç olduğu tespit edilmiştir (Gronthos ve ark., 2000; He ve ark., 2008). Dominici ve ark. (2006), MKH'lerin tanımlanması için CD73, CD90, CD105 kök hücre belirteçlerinin pozitif hücre popülasyonunun %95'in üzerinde olması gerektiğini ancak bu belirteçlerin homojen bir MKH popülasyonu elde etmede tam olarak yeterli olamayacağını belirtmişlerdir. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda CD146 belirtecine de dikkat çekilmektedir. CD 146 pozitif hücre popülasyonunun özellikle osteojenik farklılaşma

potansiyelinin daha üstün olduğu belirtilmiştir (Xu ve ark., 2009). Shi ve ark. (2005), daimi diş pulpasından ve kemik iliğinden elde ettikleri MKH'lerin CD44, CD106, CD16 ve STRO-1 eksprese ettiklerini; Gronthos ve ark. (2000), ise elde ettikleri hücrelerin CD34, CD45 ve CD14 gibi hematopoetik hücre belirteçlerini taşımadığını ancak MKH'lere özgün STRO-1, CD29, CD44 ve CD13 gibi belirteçleri taşıdıklarını göstermişlerdir.

Araştırmamızda gerçekleştirilen akış sitometrik analiz sonuçlarına göre pulpadan elde ettiğimiz mezenkimal kök hücrelerin CD24, CD45, CD117 eksprese etmedikleri, buna karşın MKH'ler için sıklıkla kullanılan CD44, CD90 için yüksek düzeyde pozitif oldukları tespit edilmiştir.

MKH tanımlamasının yapılabilmesi için elde edilen hücrelerin *in vitro* koşullarda farklılaşma potansiyellerinin (osteojenik, adipojenik, nörojenik, kondrojenik gibi) de gösterilmesi gerekmektedir (Karaöz E, Ovalı, 2004). Diş pulpa kök hücreleri *in vitro* ve *in vivo* koşullarda osteojenik ve adipojenik farklılaşma göstermektedir (Gronthos ve ark., 2002; Jo ve ark., 2007). Osteojenik farklılaştırma deneyleri sonucunda, diş pulpasından kaynaklanan osteoblastlarda hücre dışı matrikste artmış düzeylerde osteonektin, osteokalsin ve BMP4 dağılımı gözlenmiştir. Adipojenik farklılaştırma deneylerinde, oil red boyamaları ile pulpa kaynaklı kök hücre sitoplazmalarında yağ damlacıkları görülmüştür (Gronthos ve ark., 2002; Yalvac ve ark., 2010). Gronthos ve ark. (2000), 20 yaş dışından elde edilen diş pulpa kök hücrelerinin nestin ekspresyonunu gerçekleştirdiğini bildirmiştir.

Diş pulpa kök hücrelerinin dentin-yapıcı odontoblastlara farklılaşabildiği bildirilmiştir. Farklılaşmanın sağlanabilmesi için 'osteo/odontojenik diferansiyasyon kültür ortamı' oluşturulmalıdır. Hücre kültür ortamına askorbik asit, β -gliserofosfat, penisilin, streptomisin ve fetal sığır serumuna ilave olarak; büyüme faktörleri (FGF-2, TGF- β 1, BMP-2), retinoik asit ya da sert doku indükleyicilerinin (Deksametazon, D3 vitamini) eklenmesi gerekmektedir (Gronthos ve ark., 2002; Gronthos ve ark., 2000; Miura ve ark., 2003; Zhang ve ark., 2006).

Kültür ortamındaki bu bileşenlerin varlığı hücrelerin osteo/odontoblastik fenotipe farklılaşmasını sağlamaktadır (Rattner ve ark., 1997). Kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücreleri deksametazon, askorbik asit ve β -gliserofosfat içeren besi ortamında kültüre edildiklerinde osteoblastlara ve odontoblastlara farklılaşabildikleri bilinmektedir. Hücre morfolojisi, kültürün ilk günlerinde izlenen fibroblastik görünümünü kaybedip osteoblastik farklılaşma göstergesi olan poligonal yapıya dönüşür (Coelho MJ, Fernandes, 2000).

Deksametazon, hücrelerin büyümesini arttırır ve kalsiyum fosfat birikimini uyarır (Coelho MJ, Fernandes, 2000). Askorbik asit, hücre dışı kollajen kemik matriks üretiminde ve hücrelerin mineralizasyonunda önemli rol oynar (Franceschi, 1992). Hücrelerin osteo/odontoblastik farklılaştırmasında kültüre eklenen β -gliserofosfatın, osteogenezi tetikleyip kalsiyum fosfat birikimini uyardığını ve mineralizasyonda etkin olduğu bilinmektedir (Chung ve ark., 1992).

Birçok çalışmada, mezenkimal kök hücrelerin osteo/odontojenik diferansiyasyonunda bir glikokortikosteroid olan deksametazonun mineralizasyonu indüklemek için kullanıldığı gösterilmiştir (Gronthos ve ark., 2000; Lee ve ark., 2009; Miura ve ark., 2003). Alliot-Litch ve ark. (2005), mekanik ayrıştırma yöntemi ile izole edilen insan daimi diş pulpa kaynaklı hücrelerin deksametazon ile indüklenmesi sonucunda; hücrelerin proliferasyonunda ve odontoblastik farklılaşmasında artış görüldüğünü bildirmişlerdir.

Araştırmamızda da daimi diş pulpa kaynaklı kök hücreler askorbik asit, β -gliserofosfat ve deksametazon içeren besi ortamında kültüre edilmiş ve kültür sonucunda hücrelerin osteo/odontoblastlara farklılaştığı tespit edilmiştir.

Rejeneratif endodontide; biyoaktif ve biyouyumlu materyallerin geliştirilmeleri ile birlikte, materyallerin fiziksel ve kimyasal özellikleri güçlendirilerek klinik kullanıma sunulmaktadır. Rejeneratif endodontide $\text{Ca}(\text{OH})_2$, MTA, BiodentineTM, Biosealer, CEM

Cement ve DiaRoot BioAggregate materyallerinin kullanımı ön plana çıkmıştır (Nowicka ve ark., 2013).

Kalsiyum hidroksite alternatif materyal olarak piyasaya sunulan MTA'nın hücreler üzerindeki olumlu etkisi yanında pulpa dokusuyla karşılaştığı anda biyolojik aktif maddelerin salınımını tetikleyerek bariyer oluşturması, kalsiyum hidroksit yerine kullanılmasını sağlamaktadır (Kuratate ve ark., 2008).

İlk üretilen ve orjinal kimyasal yapıya sahip olan ProRoot MTA ile ProRoot MTA'ya alternatif olarak üretilen Angelus MTA'nın kimyasal yapısı farklılık göstermektedir (Prati ve Gandolfi, 2015). Her iki MTA'nın kimyasal yapısındaki farklılıktan dolayı sertleşme süreleri birbirinden farklıdır, Angelus MTA'nın daha kısa sürede sertleştiği üretici firma tarafından bildirilmiştir ve bu farklılık Angelus MTA'nın yapısına daha az kalsiyum sülfat eklenmesiyle ve sertleşme süresini kısaltmasıyla ilişkili bulunmuştur (Darvell BW, Wu, 2011; Khalil ve ark., 2014). Kimyasal yapısındaki farklılık malzemenin biyouyumluluğunu da etkilemiştir ve çalışmalarda ProRoot MTA'nın daha iyi biyouyumluluk özelliği gösterdiği bulunmuştur (Parirokh ve Torabinejad, 2010a; Viana Viola ve ark., 2012). Angelus MTA ve ProRoot MTA'nın diş pulpa kök hücreler üzerindeki sitotoksik etkisinin değerlendirildiği çalışmada 72 saat sonunda ProRoot MTA'nın Angelus MTA'ya göre daha biyouyumlu olduğu bildirilmiştir (Jaberiansari ve ark., 2014).

Araştırmamızda da orjinal kimyasal yapıya sahip olan ve sertleşme süresi dezavantaj olarak gösterilen ProRoot MTA (Dentsply Tulsa Dental, Johnson City, TN) kullanılmıştır.

ProRoot MTA ince hidrofilik partiküllerden oluşan toz ve suyun birleşimiyle çamur kıvamına gelen ve ağız ortamında yaklaşık 4 saat içerisinde sertleşmesini tamamlayan bir materyaldir (Sarkar ve ark., 2005). MTA'nın; biyouyumluluk (McNamara ve ark., 2010) ve sızdırmazlık (Hashem AR, Hassanien, 2008) gibi avantajlarına rağmen sertleşme süresinin uzunluğu, taşınma ve yerleştirme işlemlerinin zor olması, düşük

viskozite, pahalı olması gibi dezavantajları mevcuttur (Bortoluzzi ve ark., 2006; Kogan ve ark., 2006).

MTA'nın sertleşme süresinin uzun olması en büyük dezavantajlarından biridir (Bortoluzzi ve ark., 2009). Simanların sertleşme sürelerini belirlemek için Vicat iğnesi, Gilmore iğnesi, otomatik Vicat iğnesi veya çapı 2 mm ağırlığı 100 gr olan iğneler kullanılmaktadır (Hsieh ve ark., 2009). Torabinejad ve ark. (1995), Gilmore iğnesi kullanarak yaptıkları çalışmalarında sertleşme süresini 2 sa 45 dk (± 5) olarak, Ber ve ark. (2007), Vicat iğnesi kullanarak bu süreyi 3 sa 22 dk olarak hesaplamışlardır. Islam ve ark. (2006a), Gilmore iğnesi ile sertleşme süresini beyaz MTA için 2 sa 25 dk gri MTA içinse 2 sa 50 dk olarak ölçmüştür. Gandolfi ve ark. (2009), da Gilmore iğnesiyle gri MTA'nın sertleşme süresini 2 sa 50 dk olarak hesaplamıştır. Bütün simanlar için belirlenmiş özel bir teknik bulunmamaktadır (Ber ve ark., 2007; Torabinejad ve ark., 1995). MTA'nın sertleşme zamanları arasındaki bu fark, değişik ağırlıklarda iğnelerin kullanılması ve indentasyon yaratmak üzere örneğin üzerinde tutulma sürelerinin farklılığıyla açıklanmaktadır (Ber ve ark., 2007; Komabayashi T, Spångberg, 2008).

Sertleşme süresi siman tozu ile suyun temas ettiği an ile iğnenin siman yüzeyinde dairesel iz bırakmadığı zaman arasında geçen süredir ve belirlenmesi için ASTM C266-08 (ASTM, 2008) standartları kullanılırken; sertleşme süresinin tespiti için yapılan deneylerde ISO 6876 standartlarına uygun kalıpların kullanılması gerektiği bildirilmiştir (2001). ISO (2001) standartlarına göre simanın 10 mm çapında 2 mm yüksekliğinde paslanmaz çelikten yapılmış halkaya yerleştirilmesi, sertleşme süresinin tespiti için yapılan deneylerde de vücut ısını taklit edecek şekilde ortamın sıcaklığının 37°C ve nispi nemin % 95 olması gerektiği vurgulanmıştır (ANSI/ADA Specification, 2008).

Araştırmamızda da Vicat iğnesi ile yapılan deneylerde ANSI/ADA No:57 ve ISO 6876:2001 standartları doğrultusunda ProRoot MTA (Dentsply Maillefer, İsviçre) örneklerinin sertleşme süreleri kontrollü sıcaklık ($37 \pm 1^\circ\text{C}$) ve nispi nem ($\% 95 \pm 5$) altında ölçülmüştür.

Uzun sertleşme süresi klinik olarak birçok probleme neden olmaktadır (Prati ve Gandolfi, 2015). Özellikle vital pulpa tedavileri gibi klinisyenin MTA'nın üzerine hemen restoratif bir ajan yerleştirmesinin gerekli olduğu durumlarda sertleşme süresi içinde pulpanın ağız florasındaki irritanlarla karşı karşıya gelme riski artacak, bu süre problem yaratacak ve seans sayısının artmasına neden olacaktır (Kayahan ve ark., 2009). Ayrıca henüz sertleşmemiş materyal canlı dokularla birebir temasta olacaktır. Bu süre zarfında simanın stresler altında şeklini koruyabilme yeteneği de bozulacak ve simanın ortamdan uzaklaşabilmesi gibi bir ihtimal meydana gelecektir (Ber ve ark., 2007; Kao ve ark., 2009). MTA'nın sertleşme süresini hızlandırmak ve maniplasyonu kolaylaştırmak için farklı sıvıların kullanılması gündeme gelmiş ve bu sıvılar ile hazırlanan MTA örneklerinin sertleşme sürelerinin kıyaslandığı çalışmalar yapılmıştır (Ber ve ark., 2007; Hsieh ve ark., 2009; Kogan ve ark., 2006; Lotfi ve ark., 2009). MTA'nın uzun sertleşme süresini kısaltmak, kumsu ve düşük yoğunluktaki yapısını güçlendirmek amacıyla MTA'nın yapısına eklenen hızlandırıcılar genellikle kalsiyum içeren yüksek çözünürlüğe sahip sertleşme sırasında kalsiyum iyonu desteği sağlayan bileşiklerdir (Hsieh ve ark., 2009). Araştırmamızda MTA serum fizyolojik, anesteziik solüsyon ve çalışmalarda etkinliği belirlenmiş hızlandırıcılar olan CaCl_2 , Na_2HPO_4 ve K-Y Jelly ile karıştırılmış ve sertleşme süresine etkisi araştırılmıştır.

MTA, klinik koşullarda distile suyun yokluğunda serum fizyolojik veya anesteziik solüsyonla karıştırılmaktadır. Kogan ve ark. (2006), serum fizyolojik ile karıştırılması durumunda sertleşme zamanının uzadığını ve %2'lik lidokain ile karıştırılması durumunda ise bu sürenin iki katına çıktığını; MTA ile klorheksidin (CHX)'in karıştırıldığı çalışmalarda ise MTA'nın 7 günün sonunda bile sertleşmesini tamamlamadığı bildirilmiştir. Gandolfi ve ark. (2008), Portland simanı ile artikaini (%4 Artikain HCl+1/100 000 epinefrin, Alfacaine SP, Dentsply) karıştırmış ve SEM görüntülerinde hücre yüzeyi ile materyal yüzeyinin bağlantısının hücre canlılığını olumsuz etkilemediğini ve biyouyumlu olduğunu göstermiştir. Al-Rabeah ve ark. (2006), ise MTA ile karıştırılan lidokainin (%2 Lidokain HCl+1/100 000 epinefrin, Xylocaine Dental) sertleşme süresini uzatmasına rağmen biyouyumlu olduğunu distile

su olmadığı durumda kullanılabileceğini belirtmiştir. Kogan ve ark. (2006) ve Rabeah ve ark. (2006), sonuçlarıyla uyumlu olarak araştırmamızda serum fizyolojik ve anesteziik solüsyon sertleşme süresini uzatmıştır.

CaCl_2 , MTA'nın sertleşme süresini kısaltmakta etkili olduğu, pH'yı ve kalsiyum salımını arttırdığı; higroskopik (nem çekebilme özelliği) yapıya sahip olduğu için siman hazırlanırken daha az su kullanılması ile siman yapısındaki poröziteyi azaltıp, çözünürlüğü ve mekanik direnci arttırdığı bildirilmiştir (Bortoluzzi ve ark., 2009). CaCl_2 'nin etki mekanizması tam olarak anlaşılmış değildir, ancak trikalsiyum alüminat ile reaksiyona girip kloroalüminat oluşturması, silikatların hidrasyonunu artırması ve kristilazasyonu hızlandırması ile sertleşmeyi hızlandırdığı ve CaCl_2 'in kısmen hidrasyon esnasında tüketildiğine inanılmaktadır (Kosmatka S, 1988). CaCl_2 MTA'nın sertleşme süresini hızlandırmasına rağmen uygun konsantrasyonu bilinmemektedir, %5 ve %10 konsantrasyonun MTA'nın özelliklerini olumsuz etkilemediği ancak ideal oran için çalışmalara ihtiyaç duyulduğu bildirilmiştir (Bortoluzzi ve ark., 2009; Kogan ve ark., 2006).

Bortoluzzi ve ark. (2009), bulgularında araştırmamıza benzer olarak %10 konsantrasyonda kullanıldığında CaCl_2 , MTA'nın sertleşme süresini (31 dk) azalttığı ifade edilmiştir. Ancak bu konuda Kogan ve ark. (2006), %3'lük CaCl_2 'ün herhangi bir değişiklik yaratmadığını, %5 CaCl_2 'nin ise MTA'nın sertleşme süresini kısalttığını bildirmişlerdir. Ber ve ark. (2007), %1 metilselülöz ve %2 CaCl_2 kullanılarak sertleşme süresinin kısaltılabileceğini ve manipülasyonun kolaylaşacağını iddia etmiştir. Farklı konsantrasyonlarda CaCl_2 ve kalsiyum nitrit-kalsiyum nitrat karışımı, MTA ve Portland siman ile karıştırılmış ve sertleşme süreleri Vicat iğnesi ile ölçülen çalışmada %10 CaCl_2 ile hazırlanan MTA'nın 26 dakikada sertleştiği ve %10 CaCl_2 grubunun en kısa sertleşme süresi gösterdiği bildirilmiştir. %15 CaCl_2 ile hazırlanan MTA'nın ise sertleşme süresi kısalmamıştır. %15 konsantrasyondaki CaCl_2 'in sertleşme süresi için geciktirici olarak etki ettiği ve kristalleşme çekirdeğinin büyümesini engellediği düşünülmüştür. Kalsiyum nitrit-kalsiyum nitrat karışımının ise MTA'nın sertleşme

süresi üzerinde herhangi bir değişiklik yaratmadığını göstermişlerdir (Srivastava ve ark., 2014).

MTA'nın yapısına eklenen CaCl_2 'in fiziksel özellikleri olumsuz etkilemediği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Wiltbank ve ark. (2007), Portland siman ve MTA yapısına eklenen kalsiyum nitrat, %5 CaCl_2 ve kalsiyum formatın sertleşme süresi, pH, sertleşme sırasında oluşan ekzotermik ısı ve sıkıştırma dayanıklılığına etkisini araştırmışlardır. Bu çalışmada, özellikle sertleşme sürelerinin kısaltıldığını araştırılan diğer özelliklerde ise istatistiksel olarak farklılık bulunmadığını ve bu hızlandırıcıların biyoyumluğunun araştırılması gerekliliğini vurgulamışlardır. Hong ve ark. (2008), %10 CaCl_2 ile karıştırılan MTA'nın *in vitro* apeksifikasyon modelinde sızdırmazlığını araştırdıkları çalışmalarında, %10 CaCl_2 'in sertleşmeyi hızlandığı gibi sızdırmazlığının distile su ile hazırlanan MTA'ya göre daha üstün olduğunu göstermişlerdir. Bortoluzzi ve ark. (2006), %10 CaCl_2 ile hazırlanan MTA ve Portland simanın sızdırmazlığını araştırdıkları çalışmalarında CaCl_2 'in her iki materyalin de sertleşme süresini kısaltıp sızdırmazlığı iyileştirdiğini tespit etmişlerdir.

K-Y Jelly ise klorheksidin içermesi nedeniyle antibakteriyel aktiviteye sahip ve sertleşme süresini kısaltma özelliğinden dolayı araştırmalarda kullanılmıştır (Karimjee ve ark., 2006; Mehrvarzfar ve ark., 2014). K-Y sıvısı, %3 konsantrasyonda sodyum hipoklorit jel ve %5 CaCl_2 ile hazırlanan MTA örneklerinin sertleşme süreleri Gilmore iğnesi ile ölçülmüş ve tüm hızlandırıcılar sertleşme süresini kısaltmış ancak K-Y sıvısı 70 dk ile en kısa sertleşme süresi göstermiştir. (AlAnezi ve ark., 2011). Mikrosızıntının araştırıldığı bir çalışmada %5 CaCl_2 ve K-Y Jelly ile hazırlanan MTA örnekleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığını ve sertleşme süresini kısalttığını bildirmişlerdir (Mehrvarzfar ve ark., 2014).

Na_2HPO_4 'ın MTA yüzeyinde hidroksiapatiti erken çöktürerek sertleşme mekanizmasını hızlandığı ve biyoyumlu olduğu için çalışmalarda kullanılmıştır. Huang ve ark. (2008), Na_2HPO_4 ile karıştırılan MTA'nın Gilmore iğnesi ile yapılan ölçümde sertleşme süresinin kısaltıldığını (26 dk), Na_2HPO_4 'ın sıkıştırma dayanıklılığı ve

pH gibi fiziksel özelliklerini ise olumlu yönde etkilediğini ve klinik kullanım için uygun olabileceğini bildirmişlerdir. %5 CaCl_2 ve Na_2HPO_4 ile hazırlanan MTA örneklerinin fiziksel özelliklerini özellikle de sıkıştırma dayanıklılığını etkilemediğini bildirmişlerdir (Oloomi ve ark., 2013). Na_2HPO_4 ile hazırlanan MTA'nın fiziksel özelliklerinin araştırıldığı başka bir çalışmada Na_2HPO_4 'ın sertleşme süresini kısalttığını (38 dk), pH'ı koruduğunu, X-Ray difraksiyon analizi ile kimyasal yapısı incelendiğinde distile su ile hazırlanan MTA ile benzer kimyasal bileşikler oluşturduğunu belirlemişlerdir (Ding ve ark., 2008). Anand ve ark. (2014); Na_2HPO_4 , %10 CaCl_2 ve kalsiyum laktat glukonatın sızdırmazlığını araştırdıkları çalışmalarında, bu hızlandırıcıların MTA'nın sertleşme süresini kısalttığını ve sızdırmazlığı olumsuz etkilemediğini bildirmişlerdir.

MTA'nın doku sıvısı veya kan ile uzun süreli temasının sertleşme mekanizmasını bozduğu bilinmektedir (Nekoofar ve ark., 2010). Kim ve ark. (2012), fetal sığır serumu ile 4 gün temasta bıraktığı MTA örneklerinin sertleşmediğini, MTA yapısına eklenen %10 CaCl_2 'in ise sertleşmeye yardımcı olduğunu göstermişlerdir. Asidik ortam da MTA'nın sertleşmesini ve fiziksel özelliklerini olumsuz yönde etkilemektedir (Lee ve ark., 2004; Watts ve ark., 2007). Watts ve ark. (2007), da MTA'yı distile su ve lokal anestezik ile hazırlamışlar, asidik ortamda fiziksel özelliklerinin özellikle sıkıştırma dayanıklılığının olumsuz etkilendiğini göstermişlerdir. Shie ve ark. (2009), Na_2HPO_4 ile hazırladıkları MTA'nın asidik ortamda fiziksel özelliklerinin etkilenmediğini; çözünürlüğünün ve dayanıklılığının değişmediğini ve sertleşme süresinin kısaldığını göstermişlerdir.

Araştırmamızda kullanılan hızlandırıcılar, yapılan çalışmalarda biyouyumluluğu ve etkinliği tespit edilmiş olması dikkate alınarak seçilmiştir. Bu amaçla farklı konsantrasyonda CaCl_2 (%5 ve %10), Na_2HPO_4 ve K-Y Jelly ile diş hekimliği kliniğinde bulunan serum fizyolojik ve anestezik solüsyon kullanılmıştır. Araştırmamızda bu konuda yapılan diğer çalışmaların sonuçlarıyla uyumlu olarak (Ber ve ark., 2007; Bortoluzzi ve ark., 2006; Ding ve ark., 2008; Huang ve ark., 2008; Karimjee ve ark., 2006; Kogan ve ark., 2006; Mehrvarzfar ve ark., 2014; Srivastava ve ark., 2014;

Wiltbank ve ark., 2007) %10 CaCl₂ en kısa sertleşme süresi gösterirken Na₂HPO₄, K-Y Jelly, %5 CaCl₂ sertleşme süresini kısalttığı ancak anesteziik solüsyon ve serum fizyolojiğın sertleşme süresini uzattığı tespit edilmiştir. Araştırmamızda distile su ile hazırlanan MTA'ya alternatif bir materyal olabileceğı düşünölen sertleşme süresini kısaltan bu hızlandırıcılar ile hazırlanan MTA örneklerinin daimi diş pulpa MKH'lerin üzerindeki sitotoksik ve rejeneratif etkisinin tespiti amaçlanmıştır.

Endodontide ve vital diş pulpası tedavilerinde kullanılan materyallerin biyolojik uyumu çok büyük önem taşımaktadır. Endodonti alanında kullanılan materyallerin biyoyumluluğı üç aşamada değerlendirilmektedir. İlk aşamada laboratuvar sitotoksitate deneyleri yapılmaktadır. Materyalin *in vitro* şartlarda toksik olmadığı tespit edilirse cilt altı doku, kemik içi ya da kas içerisine implante edilip lokal doku reaksiyonu değerlendirilmektedir. Son olarak da test materyaline karşı hedef dokunun *in vivo* reaksiyonu hayvan ya da insan deneklerinde değerlendirilmektedir (Osorio ve ark., 1998). Sitotoksitate testleri, biyoyumluluğı değerlendiren *in vitro* testlerin yaygın olarak kullanılanlarından bir tanesidir. Sitotoksitate hangi materyalin çalışmadan çıkartılacağı ve hangi materyalin ileri testlere tabi tutulacağı konusunda bilgiler veren basit, hızlı, tekrar edilebilir ve pahalı olmayan bir test metodudur. *In vitro* sitotoksitate çalışmaları materyalin temel biyolojik karakterinin ve hücrel mekanizmaların analizine izin verir (Hirschman ve ark., 2012; Torabinejad ve ark., 1995b).

1970'li yıllardan günümüze kadar olan sitotoksitate çalışmaları incelendiğinde, kullanılan test materyellerinin hücreler üzerindeki etkisinin anlaşılmasında, model kavite methodu, agar overlay methodu, milipor filtre ve radyokrom gibi methotlar kullanılmaktadır. Ancak kullanılan bu yöntemlerin bazı dezavantajlara sahip olması araştırma bulgularını da olumsuz etkilemektedir (Koh ve ark., 1998). 2000'li yıllarda ise XTT, MTT ve MTS testleri biyoyumluluğı değerlendirmek için kullanılmaktadır. Bu fonksiyonel testler, tipik olarak hücrelerin anabolik aktiviteler için gerekli enerjiyi sağlayabilme yeteneklerini ölçmektedir (Berridge ve ark., 2005).

Materyallerin sitotoksitesinin belirlenmesinde kullanılan en yaygın yöntemlerden biri MTT testidir. Bu test spektrofotometre ile kesin ve hassas sonuçlar vermesi, hücre metabolizma değişikliklerini kesin olarak algılaması, kolay uygulanır olması ve cihazın her laboratuvarında kolaylıkla bulunabilmesi nedeniyle sıklıkla kullanılmaktadır (Silva ve ark., 2013; Zubaidah, 2007). MTS testi MTT testi gibi suda çözünme gibi ikinci bir reaksiyona ihtiyaç duymaz ve bu sayede hücre canlılığını tehlikeye atmaz. MTS testi, canlı hücrelerin içinde bulunan mitokondrilerin ürettiği suksinat dehidrogenaz enzim aktivitesini tespit ederek değerlendirir. Böylece kullanılan materyellerin, sadece canlı hücreler üzerindeki etkileri ortaya çıkar (Galluzzi ve ark., 2009).

Lee ve ark. (2010), kitosan içeren ve içermeyen kalsiyum fosfat simanın mekanik özellikleri ve dondurulmuş insan diş pulpası mezenkimal kök hücreler üzerinde meydana getirdikleri odontoblastik farklılaşmayı tespit etmeyi amaçladıkları çalışmada, materyallerin 1., 7. ve 14. günlerde sitotoksik etkilerinin belirlenmesinde MTS testini kullanmışlardır. Güven ve ark. (2011); MTA, Ca(OH)_2 ve mine matris materyallerinin diş germ kök hücreleri üzerindeki canlılıklarını belirlemek için tuz bazlı kromatik bir test olan MTS testini tercih etmişlerdir. Araştırmamızda farklı hızlandırıcılar ve distile su ile hazırlanan MTA örneklerinin sitotoksik etkilerinin belirlenmesi amacıyla MTS testi kullanılmıştır. Özbay (2013), amputasyon materyallerinin süt dişinden elde ettikleri kök hücreler üzerindeki sitotoksik etkisini araştırdıkları çalışmalarında MTS testini kullanmışlardır.

MTA 1. seviye testleri olarak tanımlanan çeşitli hücre kültürü ortamlarında *in vitro* olarak; 2. seviye testleri olarak tanımlanan deney hayvanları kullanılarak yapılan lokal toksisite testlerinde ve 3. seviye testlerinde ise *in vivo* olarak değerlendirilmiştir. Bu araştırmaların sonuçlarına bakıldığında hangi biyoyumluluk yöntemi kullanılırsa kullanılsın, MTA'nın biyoyumlu bir materyal olduğu sonucuna varılmıştır. Günümüzde yeni geliştirilen materyallerin biyoyumluluğu araştırılırken, MTA karşılaştırma gruplarında standart olarak kullanılmaktadır (Torabinejad ve Parirokh, 2010).

Yapılan çalışmaların çoğunda hücrelerin materyellerle direkt temas etmediği görülmektedir (Masuda-Murakami ve ark., 2010; Min ve ark., 2009; Takita ve ark., 2006). Hücrelerin işlem görmemiş kültür plaklarına direkt temas ettiği belirtilmekte ve bu uygulama şekli, kullanılan materyal ile hücrelerin temasını önleyerek klinik kullanımı yansıtmamaktadır (Takita ve ark., 2006). Thomson ve ark. (2003), fare sementoblastik hücreleriyle MTA'nın direkt temasını sağlayarak SEM analizi yapmışlardır. Araştırmamızda da klinik uygulamayı yansıtmaması açısından MTS ve SEM analizi, materyal-hücre temasıyla sağlanmıştır ve MTA biyouyumluluğunun araştırıldığı diğer çalışmalarda olduğu gibi hücrelerin tamamının eşit şekilde direk temas etmesini sağlamak amacıyla MTA kuyuların tabanını tamamen kaplayacak şekilde hazırlanmıştır (D'Antò ve ark., 2010; Guven ve ark., 2011). Araştırmamızda MTA örnekleri üretici firmanın talimatları doğrultusunda standardize olması için kullanılacak plağın tabanı tamamen kaplayacak şekilde ve yine dayanıklılığı için yeterli yükseklik (2 mm) göz önüne alarak hazırlanmıştır. Distile su ile hazırlanan MTA'nın biyouyumluluğu çalışmalarda ispatlandığından (Torabinejad ve Pariokh, 2010) araştırmamızda hızlandırıcılar ile hazırlanan gruplarla karşılaştırmak için standart olarak kullanılmıştır.

Araştırmamızda elde edilen MTS test sonuçları, DPKH'lerin oldukça yüksek çoğalma kapasitesine sahip olduklarını göstermektedir. %10 CaCl₂ ile hazırlanan MTA örneği biyouyumlu olmakla birlikte, %5 CaCl₂ ile hazırlanan MTA örneğinde ilk günden itibaren görülen yüksek orandaki hücre artışı daha biyouyumlu olduğunu göstermiştir (p<0.05).

Abdullah ve ark. (2002), yapısına %10 ve %15 konsantrasyonda CaCl₂ eklenmiş Portland siman, cam iyonomer siman ve MTA'nın biyouyumluluğunun araştırıldığı çalışmada CaCl₂'in Portland simanın biyouyumluluğunu olumsuz etkilemediğini ve MTA'ya alternatif bir materyal olabileceğini bildirmiştir.

McNamara ve ark. (2010), CaCl₂ (%5 konsantrasyon), kalsiyum format ve kalsiyum nitrat ile hazırlanmış MTA örneklerini ratların mandibulasına implante etmiş ve histolojik analiz ile biyouyumluluğunu araştırmışlar ve CaCl₂ ve kalsiyum nitratın

istatistiksel olarak fark göstermediğini klinik kullanım için insan çalışmalarına ihtiyaç olduğunu belirtmişlerdir. CaCl_2 ile hazırlanmış MTA ve Portland simanın süt dışından elde edilen kök hücreler üzerindeki biyouyumluluğu araştırılmış ve CaCl_2 'in her iki materyalinde biyouyumluluğunu olumsuz etkilemediği bildirilmiştir (Ong ve ark., 2012).

Schneider ve ark. (2014), apikal papilla kök hücrelerinin CaCl_2 ile hazırlanan besiyerindeki proliferasyon oranına beyaz MTA'nın etkisinin araştırıldığı çalışmada kalsiyumdan zengin besiyerinin proliferasyonunu olumlu yönde etkilediğini göstermişlerdir.

Nunez ve ark. (2014), Biodentine™ ve MTA'ya maruz bırakılan hücrelerin canlılık açısından benzer sonuçlar gösterdiğini, Zhou ve ark. (2013), Biodentine™ ve MTA örneklerine maruz bırakılan insan gingival fibroblast hücrelerinin benzer derecede canlılık sergilediğini, Chang ve ark. (2014), da Biodentine™ ve MTA'nın benzer derecede hücre canlılığı sergilediğini tespit etmişlerdir. Biodentine™ ve MTA'nın tozu benzer kimyasal kompozisyona sahiptir. Ancak likitinde farklılık bulunmaktadır ve Biodentine™'nin likitinde kalsiyum klorid bulunurken MTA'nın likiti ise distile sudur. Araştırmamızda da MTA'nın sıvısı olarak farklı konsantrasyonlardaki kalsiyum klorid, distile su ile karıştırılıp kullanılmış ve CaCl_2 ile hazırlanan MTA örneklerinin biyouyumluluğunun olumsuz etkilenmediği belirlenmiştir. Poggio ve ark. (2014), rat odontoblast hücre hattı üzerinde biyouyumluluğu araştırdıkları bir çalışmada MTA ve Biodentine™'nin benzer biyouyumluluk gösterdiğini belirlemiştir ve bu çalışma araştırmamızın bulgularında yer alan CaCl_2 ve distile su ile hazırlanan MTA örneklerinin benzer biyouyumluluk göstermesi ile paralellik göstermiştir.

Kang ve ark. (2013), araştırmamızın sonuçlarımızdan farklı olarak %10 CaCl_2 , kalsiyum laktat glukonat ve sitrik asit ile hazırlanmış MTA örneklerinin osteosarkom hücreleri üzerindeki biyouyumluluğunu araştırdıkları çalışmalarında sitrik asit ve kalsiyum laktat glukonatın toksik olmadığını, CaCl_2 'in ise en düşük hücre canlılığı gösterdiğini ve toksik olduğunu bildirmişlerdir. CaCl_2 'in ortama diğer hızlandırıcılara

göre yüksek konsantrasyonda kalsiyum salımından dolayı hücreler üzerinde toksik etki yarattığını belirtmişlerdir.

Araştırmamızda K-Y Jelly ile hazırlanan MTA örneklerinin MTS sonuçlarında biyouyumlu olmadığı ve DPKH'lerin miktarında sürekli düşüş gözlenmiştir. Jafarnia ve ark. (2009), da K-Y Jelly ile hazırlanan MTA örneklerinin diğer hızlandırıcılara göre yapısındaki klorheksidinden dolayı biyouyumluluğu olumsuz yönde etkilediğini, ancak klorheksidinin antimikrobiyal aktivitesinden dolayı çalışmalarda kullanıldığını, *in vivo* ortamda kullanılabilmesi için araştırmalara ihtiyaç olduğu bildirilmiştir.

Karimjee ve ark. (2006), sonuçlarımızdan farklı olarak MTA/KY, MTA/Su, amalgam ve cam iyonomer simanların periodontal ligament hücreleri üzerindeki biyouyumluluğunu MTS ile araştırdığı çalışmalarında cam iyonomerlere göre; MTA/KY, MTA/Su, amalgamın benzer biyouyumluluk gösterdiğini, cam iyonomerin ise toksik olduğunu belirlemişlerdir. Başka bir araştırmada K-Y sıvısı, %3 konsantrasyonda sodyum hipoklorit jel ve %5 CaCl₂ ile hazırlanan MTA örneklerinin biyouyumluluklarının tespiti için yapılan araştırmada fare fibroblast ve osteoblast hücreleri kullanılmıştır. Sodyum hipoklorit jel hariç diğer hızlandırıcılar biyouyumlu bulunmuştur (AlAnezi ve ark., 2011). Sodyum hipoklorit jelin MTA'nın sertleşme süresini kısaltması bilinmesine rağmen, MTA ile karıştırıldığı zaman açığa çıkan serbest klorin toksik etki oluşturup, biyouyumluluğu olumsuz etkilediği bildirilmiştir (Jafarnia ve ark., 2009), bu sebepten dolayı sodyum hipoklorit jel araştırmamızda tercih edilmemiştir.

Araştırmamızda Na₂HPO₄ ile hazırlanan MTA örneğinin distile su ve %5 CaCl₂ ile hazırlanan MTA örneğine benzer biyouyumluluk göstermiş ve ilk günden son güne kadar DPKH sayısı anlamlı olarak artış göstermiştir. Araştırmamızın sonuçları ile paralellik gösteren başka bir çalışmada Na₂HPO₄ ile hazırlanan MTA'nın biyouyumluluğu araştırılmış, Na₂HPO₄'ın L929 hücreleri (fare fibroblast hücreleri) üzerinde distile su ile hazırlanan MTA ile aynı oranda biyouyumluluk gösterdiği tespit edilmiş klinik kullanım için daha fazla araştırma yapılması gerektiğini bildirilmiştir (Ding ve ark., 2008).

Lofti ve ark. (2009), da Na_2HPO_4 ve distile su ile hazırladıkları MTA örneklerini ratların deri altına implante edip biyouyumluluğunu ve inflamatuvar hücre cevabını araştırdıkları çalışmalarında Na_2HPO_4 ile hazırlanan MTA örneklerinin daha iyi biyouyumluluk gösterdiğini tespit etmişlerdir.

Hücrelerin proliferasyonu, farklılaşması ve mineralize matriks oluşturabilmesi için ortamdaki materyale adezyonu birinci şarttır. Hücrelerin üzerinde bulunduğu materyale adaptasyonu, bu materyalin toksik etkisiyle doğrudan ilişkilidir. SEM, kullanılan madde ile hücrenin temasını görüntülemektedir (Koh ve ark., 1998).

Min ve ark. (2007), yaptığı çalışmada Portland siman ve dycal üzerindeki insan pulpa kök hücrelerinin SEM görüntülerini MTT proliferasyon testiyle desteklemiştir. Araştırmamızda da SEM görüntüleri, MTS bulgularımız ile paralellik göstermektedir.

Araştırmamızın SEM bulguları; hücresel ataçmanın, K-Y Jelly hariç diğer hızlandıcılar ile hazırlanan MTA örneklerinin yüzeyinde gerçekleştiğini göstermektedir. K-Y Jelly hariç diğer hızlandıcılar ile hazırlanan MTA örneklerinin yüzeyinde daimi diş pulpa kök hücrelerinin daha fazla bölünerek çoğaldıkları gözlenmiştir.

Diş pulpa kök hücrelerinin iyi yayılması bu hücrelerin materyallere iyi ataçman gerçekleştirdiğini göstermektedir. Hiç yayılamayan ya da çok az yayılan yuvarlaklaşmış hücrelerin varlığı materyal yüzeyinin toksik olabileceğine işaret etmektedir (Zhu ve ark., 2000). MTA'dan salınan komponentlerden biri olan kalsiyum, hücre adezyonunda önemli rol oynamaktadır. MTA'nın yüksek orandaki kalsiyum içeriğinden ve pürüzlü yüzey yapısı ile hücreler arasında sıkı bir integrasyon oluşmasından dolayı en iyi hücresel ataçman sergileyen materyal olduğu bildirilmiştir (Al-Sa'eed ve ark., 2008). Araştırmamızda izole ve az sayıdaki yuvarlaklaşmış hücreler K-Y Jelly yüzeyinde gözlemlenmiştir. CaCl_2 ile karıştırılan MTA yüzeyindeki hücreler yuvarlak şekillidir. Distile su ile karıştırılan MTA yüzeyindeki hücreler, CaCl_2 ile karıştırılan MTA yüzeyindeki hücrelere göre daha ince uzun (iğ biçimli) hücreler şeklinde olup, CaCl_2 ile

kariştirılan MTA yüzeyleri düz, Na₂HPO₄ ile hazırlanan MTA yüzeyi ise pürüzlü ve yüzeyde kristal oluşumlar izlenmektedir.

Abdullah ve ark. (2002) ve Gandolfi ve ark. (2008), distile su ile hazırladıkları MTA'nın SEM bulgularında mercan görünümlü gibi pürüzlü olduğunu; Kang ve ark. (2013), %10 CaCl₂ ile hazırladıkları MTA yüzeyinde yuvarlak şekilli hücreler bulunduğunu; Shie ve ark. (2009), distile su ile hazırladıkları MTA yüzeyinde kristal oluşumlarının olduğunu; Ding ve ark. (2008), Na₂HPO₄ ile hazırladıkları MTA'nın yüzeyinde L929 hücrelerinin çoğalabildiklerini ve distile su ile hazırlanan MTA ile benzer kristal oluşumu ve yüzey pürüzlülüğü gösterdiğini gözlemlemişlerdir. SEM bulgularımız bu çalışmaların bulgularıyla paralellik göstermektedir.

Araştırmamızın rejenerasyon öncesinde yapılan sitotoksite deneyi SEM bulgularıyla paralellik göstermiştir. MTS sonuçlarına göre K-Y Jelly grubu sürekli düşüş gösterirken, diğer MTA gruplarında ilk günden itibaren hücre sayısında artış gözlemlenmiş (p<0.05) ancak %10 CaCl₂ grubunda ilk günden itibaren artış görülmesine rağmen distile su, Na₂HPO₄ ve %5 CaCl₂ grubunun biyouyumluluğu istatistiksel olarak daha anlamlı bulunmuştur (p<0.05).

Rejeneratif endodonti için diş pulpa kök hücrelerinin canlılığının devamlılığı ve odontojenik hücrelere dönüşebilme kabiliyeti en önemli kriterlerdendir (Paranjpe ve ark., 2010).

Araştırmamızda farklı hızlandırıcılar (%5 CaCl₂, Na₂HPO₄) ile hazırlanan MTA örneklerinin daimi diş pulpa kök hücrelerinde çoğalma ve farklılaşma kapasiteleri incelenmiştir. Yapılan literatür araştırmasında hızlandırıcılar ile sertleşme süresi kısaltılan MTA'nın DPKH'nin odontoblastik farklılaşmasındaki etkilerinin değerlendirildiği çalışma bulunmamasından dolayı araştırmamız önem taşımaktadır. Araştırmamız, sertleşme süresi dezavantaj olarak görülen MTA'nın farklı hızlandırıcılar ile hazırlanmasının klinik kullanıma alternatif olabileceği konusuna açıklık getirecek bir kaynak olması açısından da önemlidir.

Farklılaşma deneyleri öncesinde %5 CaCl_2 , Na_2HPO_4 ve distile su ile hazırlanan MTA örneklerinin canlılık ve çoğalma kapasitesi için MTS deneyi yapılmıştır. İlk MTS deneyinden farklı olarak osteo/odontojenik besiyeri (hücrelerin odontoblastlara farklılaşması için, içerisinde β gliserolfosfat, deksametazon ve askorbik asit bulunan bir besiyeri) hücrelerin canlılığı araştırılmıştır. Tüm MTA örnekleri biyouyumlu bulunmuş, %5 CaCl_2 grubu osteo/odontojenik besiyerinde ilk günden itibaren en fazla hücre canlılığı göstermiştir ($p < 0.05$).

MTA'nın sert doku oluşumunu uyararak sement ve dentin yapımını uyardığı, periodontal ligament rejenerasyonunu kolaylaştırdığı ve kemik iyileşmesini teşvik ettiği belirtilmiştir (Torabinejad ve ark., 1999). Hücre kültür çalışmalarında, MTA varlığında çeşitli sitokinler ve biyolojik belirleyicilerinde artış gözlenmiştir. Buna göre; interlökin, osteokalsin, alkalen fosfataz, kemik sialoprotein, osteopontin belirleyicileri artış göstermektedir (Abdullah ve ark., 2002; Chen ve ark., 2009; Min ve ark., 2009; Thomson ve ark., 2003).

Odontoblast ve osteoblast hücreleri, sert doku oluşturabilme özelliği ile dentin ve kemik yapımında rol oynarlar. Bakopoulou ve ark. (2011), insan gömük üçüncü azı dışından elde ettikleri pulpa kök hücrelerin DSPP, Osteokalsin ve ALP aktivitelerini analiz etmişler ve hücrelerin odontojenik farklılaşma potansiyellerinin olduğunu; Miura ve ark. (2003), düşmek üzere olan süt dişlerinden elde ettikleri kök hücrelerinin de ALP ve sialoprotein aktivitesini incelemişler ve hücrelerin odontoblast benzeri hücrelere farklılaşma kabiliyetlerinin olduğunu bulmuşlardır. Araştırmamızda GZ-PZR ile Kollajen Tip 1 ve DSPP; ALP tayini, kalsiyum analizleri ile diş pulpa kök hücrelerin odontojenik hücrelere dönüşebildikleri gösterilmiştir.

DPKH'nin odontoblastik hücre diferansiyasyon kapasitesinin değerlendirilmesinde sık kullanılan parametrelerden birisi de indüklenmiş hücrelerin ALP salınımıdır. ALP enzimi, kalsifiye doku oluşumunda önemli bir yere sahiptir ve ALP enzimi osteoblast ve odontoblast hücreleri için erken tanı işaretidir. Bu enzimin aktivitesi, osteoblast ve odontoblast hücreleri için belirleyicidir (Beck ve ark., 2000). ALP enzim aktivitesinin

tespiti, Von Kossa boyamasından farklı olarak ortamdaki hücrelerin odontoblast/osteoblast hücrelerine farklılaşmasını değerlendirir. Pulpadan alınan fibroblastlar, dişetindekilere göre alkalen fosfataz aktivitesini daha fazla göstermektedir (Tsukamoto ve ark., 1992). ALP'nin odontoblast diferansiyasyonunun belirteçlerinden biri olduğu bilinmektedir; diferansiye olmamış diş pulpa mezenkimal hücrelerine oranla odontoblastların ALP aktivitesi daha yüksektir (Yu ve ark., 2006).

Araştırmamızda ALP tayini sonuçları, daimi diş pulpa kök hücrelerinin başarılı şekilde uyarıldığını göstermektedir. ALP enzimi, erken tanı işareti olduğu için 7. günde artış göstermiştir.

Osteo/odontojenik farklılaşma başladıktan sonra ALP aktivitesinde azalma, osteokalsin aktivitesinde ise artış gözlenir (Park ve ark., 2007). Osteokalsin matriks mineralizasyonunun aşaması ile ilişkili iken; ALP osteoblast/odontoblast farklılaşması için erken bir bulgudur (Weinreb ve ark., 1990). Osteojenik indüksiyon sırasında ALP iki haftada maksimum seviyeye ulaşır sonra giderek azalır (Cao ve ark., 2005). Ancak araştırmamızda ise 7. günde artış olmuş 14. güne doğru azalma göstermiştir. ALP aktivitesindeki artışın olgun odontoblastların terminal belirteci, osteokalsin ise olgun odontoblastların spesifik belirteci olduğu bildirilmiştir (Alliot-Licht ve ark., 2005). Miller ve ark. (1976), bildirdiği gibi araştırmamızda da ALP enzim aktivitesinin subodontoblastik tabakada aktif olduğu matur odontoblast tabakada ise farklılaşmanın olmadığı gözlenmiştir.

Araştırmamızda 7. günden sonra görülen ALP aktivitesindeki azalma; diş pulpa kök hücrelerinin odontoblastik diferansiyasyonun erken dönemde olması ve odontoblastik olgunlaşma sürecine eriştikleri şeklinde açıklanabilir. Odontoblastik farklılaşma ve DSPP gen salınımı başladıktan sonra ALP aktivitesi azalmaktadır (Li ve ark., 2015). Odontoblast hücrelerinin olgunlaşmaya ve farklılaşma proliferasyonunu 7. günden sonra gerçekleştiğini göstermektedir. Yokose ve ark. (2000), fare kesici diş pulpasından izole ettikleri kök hücrelerin odontoblastik farklılaşmasını araştırmışlar ve ALP enzim aktivitesi araştırmamızla uyumlu olarak 5. günde pik yapmış, 5.günden sonra ALP

aktivitesi azalmıştır. Osteokalsin aktivitesi ve kalsiyum birikiminin ise 10. günden sonra ALP'nin azaldığı dönemde arttığını bildirmişlerdir. Özbay (2013), süt dişinden elde ettikleri kök hücrelerinin ALP aktivitesi, Biodentine™ ve MTA gruplarında 7. günde artış, 21. günde ise azalma göstermiştir. Eid ve ark. (2014) MTA'nın kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücreler üzerindeki osteojenik farklılaşmasını araştırmışlar ve osteojenik farklılaşma belirteçlerinden biri olan ALP aktivitesi araştırmamızla uyumlu olarak 7. günde pik yaptığını, 14. günde ise azaldığını bildirmişlerdir.

Diş pulpa kök hücrelerinin diferansiyasyon kapasitesindeki azalmada primer hücre kültüründen yapılan pasajlama sayısının önemli olduğunu ve osteo/odontoblastik hücre belirteçlerinin alt kültür pasajlarında azaldığı bildirilmiştir. Pasaj sayısı arttıkça ALP aktivitesi azalmaktadır (Lee ve ark., 2006). Lee ve ark. (2006), deksametazon ile indüklenen insan DPKH alt kültürlerinde en yüksek ALP değerlerinin 8. günün sonunda ve 1-5 arasındaki pasajlarda görüldüğünü, 9 pasaja kadar ise hücrelerin ALP aktivitesi gösterebildiğini ancak aktivitesinin azaldığını bildirmişlerdir. Araştırmamızda da benzer olarak 4. pasaj hücreler kullanılmış ve en yüksek ALP aktivitesini 7. günde göstermiştir.

Araştırmamızda farklı hızlandırıcılar ile hazırlanan MTA örnekleri hücreler üzerinde mineralize nodül oluşumunu ve ALP aktivitesini arttırarak osteojenik veya dentinojenik farklılaşmaya katılmıştır. CaCl_2 grubu en yüksek ALP aktivitesi gösterirken, distile su ile karıştırılan MTA örneği en düşük ALP aktivitesi göstermiştir. CaCl_2 'den salınan kalsiyum iyonunun, MTA'nın hücre proliferasyonunu arttırarak biyolojik özelliğini olumlu yönde etkilediği gösterilmiştir (Bortoluzzi ve ark., 2006). MTA'nın ana komponentlerinden olan kalsiyum oksit, doku sıvısı ile karşılaştığında Ca(OH)_2 açığa çıkar. Ca(OH)_2 kalsiyum ve hidroksil iyonlarına ayrışır, oluşan kalsiyum pH'ı arttırdığı gibi farklılaşmayı ve mineralizasyonu sağlar (Takita ve ark., 2006). Farklı hızlandırıcılar ile karıştırıldığında farklı oranda Ca(OH)_2 açığa çıkar. MTA'nın biyoaktivitesi Ca^{+2} salınımı ve Ca(OH)_2 formasyonu ile ilişkilidir. Kalsiyum ALP'yi aktive eder ve mineralizasyonda önemli rol oynar. CaCl_2 ile hazırlanan MTA ekstra

kalsiyum iyonu desteği sağladığı için proliferasyonu artırır, böylece salınan Ca^{+2} miktarı ve kalsifiye köprü oluşumu artar (Zapf ve ark., 2015).

CaCl_2 grubunun yüksek ALP aktivitesi salınan kalsiyum iyonu ile bağlantılıdır. Li ve ark. (2015), CaCl_2 ile hazırlanan diş pulpa kök hücre besiyerinde CaCl_2 'in ortama ekstra Ca^{+2} iyonu salınımından dolayı ALP aktivitesinin CaCl_2 ile hazırlanan besiyerinde arttığını bildirmişlerdir ve araştırmamızla uyumlu olarak ALP aktivitesi 3. günde pik yapıp, 14. günde azalmıştır.

Von Kossa tekniği, kalsiyum için dizayn edilmiş histokimyasal bir metottur ve oluşan sert doku Von Kossa boyaması ile değerlendirilir. Von Kossa boyama testi, hücrelerin meydana getirdiği kalsiyum iyonlarıyla gümüş katyonları yer değiştirir ve dışarıdan eklenen gümüş nitrat solüsyonu sayesinde gümüş tuzları oluşur ve siyah bir görüntü verir (Wang ve ark., 2006). Araştırmamız da kalsiyum tayini için yapılan Von Kossa boyamasında tüm MTA örneklerinin kalsifiye nodül oluşumu, ışık mikroskop görüntüsüyle de desteklenmiştir.

Çalışmalarda, MTA örnekleri çevresinde kalsifiye doku reaksiyonu görüldüğü bildirilmiştir. Bu çalışmaların çoğunda, kalsifiye yapıların tespiti için Von Kossa tekniği kullanılmış ve çalışmaların sonuçlarında, 1 haftalık süre sonunda MTA çevresinde Von Kossa pozitif yapıların varlığı görülmüştür (Torabinejad ve Parirokh, 2010). Gri MTA ve beyaz MTA'da implante edilmiş tüplerin çevresinde kalsifiye yapılar görülmüştür. Benzer subkütan reaksiyon Portland simanı ve kalsiyum hidroksitte de görülmüştür (Torabinejad ve Parirokh, 2010). Holland ve ark. (2002), göre MTA su ile temas ettiğinde, bileşimindeki kalsiyum oksit, kalsiyum hidroksite dönüşmektedir. Kalsiyum hidroksitten salınan kalsiyum iyonlarının dokudan gelen karbondioksit ile reaksiyona girerek kalsit kristalleri oluşturması, MTA'nın sert doku oluşumunu stimüle ettiğini ve formasyon mekanizmasını desteklediğini düşündürmektedir.

Araştırmamızla uyumlu olarak; Yaltırık ve ark. (2004), Coutinho-Filho ve ark. (2008) ve Danesh ve ark. (2010), bağ dokusu implantasyon çalışmalarında, bağ dokusu

içinde ProRoot MTA materyaline karşı kalsifik oluşumlar geliştiğini ve MTA örneğine karşı gelişen kalsifiye yapıların tespiti için Von Kossa tekniği kullanılmıştır.

Araştırmamızda osteo/odontojenik farklılaşmanın tespiti için Kollajen Tip 1'in tayininde GZ-PZR kullanılmıştır, %5 CaCl_2 ve Na_2HPO_4 ile hazırlanan MTA örnekleri distile su ile hazırlanan MTA'ya göre daha fazla kollajen tip 1 aktivitesi göstermiştir. Kollajen tip 1 aktivitesi farklılaşma sırasında kemik matriksinin belirteçlerindendir ve kemik yapımı boyunca hücreler tarafından sentezlenir (Téclès ve ark., 2008). Kollajen tip 1 kemiğe özel proteindir ve biyouyumluluk için önemli bir bulgudur (Green ve ark., 1995). Kollajen tip 1 ekstraselüler matriks proteinidir ve matriks mineralizasyonundan önce odontoblastlar tarafından salgılandığı bilinmektedir (Oncel ve ark., 2014). *In vitro* araştırmalarda MTA'nın kollajen tip 1 ve osteokalsin salınımını arttırdığı gösterilmiştir (Paranjpe ve ark., 2012).

Araştırmamız ile uyumlu olarak Hakkı ve ark. (2009), MTA'nın sementoblast hücrelerinin mineralizasyonuna etkisini araştırdıkları çalışmada MTA'nın Von kossa boyaması ile kalsifiye doku oluşturduğunu, kollajen tip 1, osteopontin, kemik sialoprotein genini arttırdığını göstermişlerdir.

Araştırmamızda osteo/odontojenik farklılaşmanın tespiti için yapılan DSPP tayininde GZ-PZR kullanılmıştır, Na_2HPO_4 ile hazırlanan MTA örnekleri en fazla DSPP aktivitesi gösterirken, %5 CaCl_2 ile hazırlanan MTA da distile su ile hazırlanan MTA'ya göre daha fazla DSPP aktivitesi göstermiştir. DSPP odontoblastik farklılaşma ve diş formasyonu için çok önemli rol oynar (Chen ve ark., 2009). DSPP, odontoblast tarafından salgılanan matriks içine hidroksiapatit tuzlarının birikerek, reperatif dentinin mineralizasyonunda önemli rol oynar ve odontoblast fenotipi için spesifik belirteçtir (Paranjpe ve ark., 2010).

Chow ve ark. (1994), hidroksiapatit formasyon oranının MTA'nın sertleşme mekanizmasının indikatörü olduğunu, ortamda fosfat olduğunda bu oranın daha da arttığını ifade etmişlerdir. Zapf ve ark. (2015), da MTA'dan salınan Ca^{+2} ortamda fosfat

bulunduğunda daha kaliteli ve muntazam kalınlıkta hidroksiapatit oluşturduğunu bildirmiştir. Na_2HPO_4 ile hazırlanan MTA'nın DSPP aktivitesinin fazla olması hızlandırıcının yapısındaki fosfattan ve MTA'nın yapısındaki Ca^{+2} ile bağlantılı olarak daha fazla hidroksiapatit oluşturması ile bağlantılı bulunmuştur. Ekstraselüler Ca^{+2} kaynağı olarak kullanılan CaCl_2 , diş pulpa kök hücre besiyerine eklenmiş ve DSPP aktivitesini arttırdığı bildirilmiştir. Bu artış, ortamdaki Ca^{+2} 'in Erk1/2 ve kalsiyum kanal yolu ile BMP2 genini aktive ettiğini, bu geninde DSPP genini aktive etmesi ile açıklanmıştır (Li ve ark., 2015). Elde edilen bulgular ile MTA örnekleri ile kültüre edilen hücrelerin odontoblast benzeri hücre diferansiyasyonu ve odontoblastik hücrelerin proliferasyonu üzerine etkili olduğu gözlemlenmiştir.

MTA'nın diş pulpa kaynaklı kök hücreler üzerinde etkisini inceleyen Yan ve ark. (2010), DSPP miktarının 14. günden sonra maksimum seviyeye ulaştığını belirlemişlerdir. Araştırmamızda da Na_2HPO_4 ile hazırlanan MTA 14. günde maksimum seviyeye ulaşmış, diğer gruplarda da 21.günde maksimum seviyeye ulaşmıştır. Araştırmamıza benzer olarak Bakopoulou ve ark. (2011), yaptıkları çalışmada osteokalsin, DSPP tayin ettikleri bir çalışmada osteokalsin ve DSPP başlangıçtan 15. güne doğru yükselme göstermiştir. Bu sonuç araştırmamızın sonuçları ile benzerlik göstermektedir.

Araştırmamızın MTA'nın farklılaşma kapasitesi bulgularıyla uyumlu olarak olarak Woo ve ark. (2013), kalsiyum kanal blokörü nifedipinin diş pulpa kök hücreleri ile kültüre edilen MTA'ya etkisini ve MTA'nın odontoblastik farklılaşması için GZ-PZR ile DSPP, ALP, osteokalsin genini, Alizarin Red S ile kalsiyum miktarını değerlendirmiştir. MTA'nın odontoblastik farklılaşma genlerini ve kalsiyum miktarını arttırdığı, ancak MTA'ya eklenen nifedipinin ise farklılaşmayı baskıladığı gösterilmiştir.

Min ve ark. (2009), radyoopak Portland simanın diş pulpa kök hücrelerin mineralizasyonuna etkisini araştırdıkları çalışmada ALP aktivitesi, DSPP gen ve Alizarin Red S ile kalsiyum miktarını değerlendirmişler ve ALP aktivitesinin 3. günde, kalsiyum salınımının 2.-3. haftada, DSPP geninin 14. günde pik yaptığını bildirmişlerdir.

Wang ve ark. (2014), MTA'nın fare kesici dişinden izole edilen inflamatuvar diş pulpa kök hücrelerinin odontoblastik aktivitesini ekilemediğini, ALP miktarını arttırdığını, mineralizasyonu ve DSPP, osteokalsin ve Runx genini arttırdığını bildirmişlerdir. Oncel ve ark. (2014), MTA'nın diş pulpa kök hücrelerinin odontoblastik aktivitesini değerlendirdiği çalışmasında MTA'nın kollajen tip1, DSPP, kemik sialoproteini, osteonektin, osteopontin genlerinin aktivitesini arttırdığını ve MTA'nın odontoblastik farklılaşmayı kolaylaştırdığını göstermişlerdir.

Asgary ve ark. da (2014), MTA'nın diş pulpa kök hücrelerinin odontojenik farklılaşmasını sağlayan DSPP ve dentin matriks protein gen salınımı ile büyüme faktörlerinin salınımını uyardığını ve biyomateriyal MTA'nın biyouyumlu, osteo/odontojenik ve sementojenik aktive gösterdiğini tespit etmişlerdir.

MTA'ya alternatif olarak piyasaya sunulan Biodentine™ (Active Biosilicate Technology, Septodont, Kent, UK) MTA ile benzer kimyasal içeriğe sahiptir ve tek farklılığı sertleşme süresini kısaltmak için sıvısına eklenen kalsiyum kloriddir ancak karıştırmak için özel cihaz gerektirmesi nedeniyle dezavantajlı bulunmaktadır. Biodentine™'nin de MTA gibi diş pulpa kök hücrelerinin proliferasyonunu ve farklılaşmasını sağladığı, biyoaktif bir malzeme olduğu bildirilmiştir (Luo ve ark., 2014). Perard ve ark. (2013), yapay odontoblastik hücreler ve pulpa hücreleri üzerinde yaptıkları bir çalışmada MTA ve Biodentine™'nin bu hücreler üzerindeki odontojenik farklılaşma, matriks sekresyonu ve mineralizasyon kapasitelerini karşılaştırmışlar ve farklılaşma aktivitesinin Biodentine™ grubunda MTA'ya benzer oranda olduğu görülmüştür.

Jung ve ark. (2015), Biodentine™ ve MTA'nın diş pulpa kök hücreleri üzerindeki odontoblastik farklılaşma ve mineralizasyon kapasitesini karşılaştırdıkları araştırmalarında, Biodentine™ ve MTA'nın farklılaşma kapasitesinin benzer olduğunu bildirmişlerdir. Özbay (2013), süt dişinden elde ettikleri kök hücrelerinin osteo/odontojenik farklılaşma kapasitesinin araştırıldığı çalışmada, Biodentine™ ProRoot MTA'ya göre daha üstün bulunmuştur. Araştırmamızda da MTA'nın sertleşme

süresini kısaltmak için eklediğimiz CaCl_2 'in MTA'nın biyoaktivitesini olumsuz etkilememiş, farklılaşmayı sağladığı gözlenmiştir. Na_2HPO_4 ile hazırlanan MTA da farklılaşmayı sağlamıştır.

Araştırmamıza benzer olarak Lee ve ark. (2014), %10 CaCl_2 ve düşük dozda sitrik asit ile hazırlanan MTA'nın fare osteoblast hücreleri üzerindeki biyouyumluluğunu ve osteoblastik farklılaşmasını değerlendirmişlerdir. Hızlandırıclar, distile su ile hazırlanan MTA'ya göre biyouyumluluğu olumsuz etkilememiş ve osteokalsin, kemik sialoprotein ve kalsiyum miktarı ise distile su grubuna benzer aktivite göstermiş ve klinik kullanım için uygun olabileceğini bildirmişlerdir.

Bortoluzzi ve ark. (2008), %10 CaCl_2 ve distile su ile hazırlanan MTA örnekleri ile yapılan köpek dişlerindeki amputasyon tedavisinin başarısını araştırdıkları çalışmalarında %10 CaCl_2 'in pulpa tamir dokusu ve kalsifiye köprü oluşumunu olumsuz etkilemediğini, MTA'nın biyolojik özelliğinin değişmediğini bildirmişlerdir. Juarez ve ark. (2006), MTA ve Portland simana eklenen CaCl_2 'in köpek dişinin kök perforasyon tamirinde kullanıldığında sement formasyonu ve periodontal ligament rejenerasyonu yaptığını göstermişlerdir.

Bu tez araştırması, sertleşme süresini kısaltmak için farklı hızlandırıclar ile hazırlanmış MTA örneklerinin insan daimi diş pulpa kök hücrelerinin izolasyonu ile osteo/odontoblastik diferansiyasyon kültüründe hücrelerin proliferasyon ve farklılaşma kapasitelerinin immunohistokimyasal ve mikroskopik olarak incelenip karşılaştırılmasını sağlayan ilk araştırma olması açısından önem taşımaktadır. Araştırmamız, MTA'nın biyouyumluluk, sızdırmazlık ve rejenerasyon gibi klinik kullanım için birçok avantaja sahip olmasına rağmen, sertleşme süresinin dezavantaj olarak görüldüğü MTA'nın %5 CaCl_2 ve Na_2HPO_4 ile hazırlanmasının klinik kullanıma alternatif olabileceği konusuna açıklık getirecek bir kaynak olması açısından da önemlidir.

7.1. Sonuçlar

Endodontide devrim niteliğinde bir materyal olan MTA, biyouyumluluk ve rejenerasyon açısından altın standart olarak kabul edilmektedir. En büyük dezavantajlarından biri olan uzun sertleşme süresini kısaltmak amacıyla çeşitli hızlandırıcılar kullanılmaktadır. %5 CaCl_2 , %10 CaCl_2 , K-Y Jelly ve Na_2HPO_4 ile hazırlanan MTA örneklerinin insan daimi diş pulpa kaynaklı mezenkimal kök hücreler üzerindeki sitotoksik ve osteo/odontojenik farklılaşma kapasitesinin incelendiği bu tez çalışmasının sonuçları:

1. Beyaz ProRoot MTA'nın sertleşme süresini kısaltmak amacıyla farklı hızlandırıcılar ile hazırlanan MTA örnekleri arasında en kısa sertleşme süresini %10 CaCl_2 ile hazırlanan MTA örneği göstermiştir ($p<0.05$). K-Y Jelly, %5 CaCl_2 ve Na_2HPO_4 ile hazırlanan MTA örnekleri de distile su ile hazırlanan MTA ile kıyaslandığında sertleşme süresini kısaltmıştır.
2. K-Y Jelly, %5 CaCl_2 , %10 CaCl_2 ve Na_2HPO_4 ile hazırlanan MTA örneklerinin sertleşme süreleri ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmazken ($p>0.05$); distile su ile hızlandırıcılar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p<0.05$).
3. Dişhekimliği kliniğinde rutin olarak kullanılan anestezi solüsyon (%4 Artikain HCl ile 1: 200 000 epinefrin) ve serum fizyolojik MTA ile karıştırıldığında ise sertleşme süresini uzatmıştır. Anestezi solüsyon ve serum fizyolojik ile distile su gruplarının sertleşme süreleri ortalamaları arasında ise istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$).
4. Mekanik ayrıştırma yöntemi ile daimi diş pulpasından izole edilen kök hücrelerinin kültür ortamında canlılığının ve farklılaşma kapasitesinin yüksek olduğu görülmüştür.
5. Daimi diş pulpasından elde edilen kök hücrelerin immunofenotipik özellikleri akış sitometrik analiz sonucunda kök hücre belirteçleri için yüksek düzeyde pozitiflik gösterdiği tespit edilmiştir.

6. İlk sitotoksosite deneyinden elde edilen veriler doğrultusunda K-Y Jelly hariç tüm MTA örneklerinin biyouyumluluğu istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). K-Y Jelly, distile su, %5 CaCl_2 , %10 CaCl_2 ve Na_2HPO_4 ile hazırlanan MTA örneklerinin 1., 3. ve 7. gün hücre sayılarında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar bulunmaktadır ($p<0.05$). MTS bulgularına göre distile su, %5 CaCl_2 , %10 CaCl_2 ve Na_2HPO_4 ile hazırlanan MTA örnekleri 1. günden, 7. güne doğru hücre sayısında artış göstermiştir.
7. Distile su, %5 CaCl_2 ve Na_2HPO_4 ile hazırlanan MTA örnekleri daimi diş pulpa kök hücreleri üzerinde benzer derecede canlılık sergilemiş ve gruplar arasında biyouyumluluk açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$); ancak %10 CaCl_2 'in biyouyumluluğunun diğer gruplara göre daha düşük olduğu gösterilmiştir ($p<0.05$).
8. K-Y Jelly ile hazırlanan MTA, MTS testinde ortaya çıkan sitotoksik etkisi nedeniyle daimi diş pulpa kök hücreleri ile biyouyumluluğu en az olan grup olmuştur ($p<0.05$).
9. SEM analizi sonucuna göre hücrelerin morfolojik yapısı incelendiğinde K-Y Jelly hariç tüm hızlandırıcılar ile hazırlanan Beyaz ProRoot MTA ile hazırlanan örnekler üzerinde hücrelerin rahatça çoğalabildiği tespit edilmiştir. Ancak, SEM analizine göre K-Y Jelly ile hazırlanan MTA örnekleri üzerinde daimi diş pulpa kök hücrelerinin çoğalamadığı gözlenmiş ve SEM bulgularının MTS sonuçlarını desteklediği belirlenmiştir.
10. Osteo/odontoblastik diferansiyasyon kültür ortamında yapılan ikinci MTS testinde distile su, %5 CaCl_2 ve Na_2HPO_4 ile hazırlanan MTA örneklerinin 1. ve 7. gün değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunurken ($p<0.05$); 21. günde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$).
11. İkinci MTS testinde en biyouyumlu materyal %5 CaCl_2 ile hazırlanan MTA örneğidir ($p<0.05$). Na_2HPO_4 ve distile su ile hazırlanan MTA örnekleri daimi diş pulpa kök hücreleri üzerinde benzer derecede canlılık sergilemiştir.

12. Rejenerasyon kapasitelerinin belirlenmesi amacıyla osteo/odontoblastik diferansiyasyon kültüründeki hücrelerle yapılan, erken dönem belirteci olan Alkalen Fosfataz (ALP) aktivitesinin; distile su, %5 CaCl₂ ve Na₂HPO₄ ile hazırlanan MTA örneklerinin 7. ve 14. gün değerleri arasında istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı bir farklılık bulunmaktadır (p<0.01).
13. ALP aktivitesi 7. günde en fazla %5 CaCl₂ ile hazırlanan MTA örneğinde gözlenmiştir (p<0.05). %5 CaCl₂ ve Na₂HPO₄ ile hazırlanan MTA örnekleri, kontrol grubuna benzer ALP aktivitesi gösterirken, distile su ile karıştırılan MTA örneği en düşük ALP aktivitesi göstermiştir (p<0.05).
14. Osteo/odontoblastik besiyeri içeren hücrelere 21. günde Von Kossa boyaması yapıldıktan sonra, ışık mikroskobu altında incelendiğinde tüm hızlandırıcılar ile hazırlanan MTA örneklerinde kalsifiye nodül oluşumu izlenmiştir.
15. GZ-PZR analizi sonuçlarına göre Kollajen Tip 1 aktivitesi ise %5 CaCl₂ ve Na₂HPO₄ ile hazırlanan MTA örneklerinde 14. günden 21. güne doğru artış göstermiştir. %5 CaCl₂ ve Na₂HPO₄ grubu, distile su ile hazırlanan MTA'ya göre daha başarılı bulunmuştur.
16. GZ-PZR analizi sonuçlarına göre DSPP aktivitesi 14. günde en fazla, Na₂HPO₄ ile hazırlanan MTA örneğinde gözlenmiştir. %5 CaCl₂ grubu, distile su ile hazırlanan MTA'ya göre daha başarılı bulunmuştur.
17. Osteo/odontojenik farklılaşma kapasitesi değerlendirildiğinde %5 CaCl₂ ve Na₂HPO₄ ile hazırlanan MTA örnekleri distile su ile hazırlanan MTA'ya göre daha başarılı bulunmuştur (p<0.05).
18. MTA'nın sertleşme süresini kısaltmasının yanı sıra daimi diş pulpa kök hücreleri üzerindeki biyoyumluluğunun ve rejeneratif kapasitesinin %5 CaCl₂ ve Na₂HPO₄ ile hazırlanan MTA örneklerinin distile su ile hazırlanan MTA'ya göre daha başarılı bulunması, alternatif hızlandırıcılar olarak kullanılabileceğini göstermiştir.

Rejeneratif endodontik uygulamalar, sürekli geliştirilen dişin yapısal bütünlüğünün korunmasını sağlayan, zarar görmüş pulpa ve dentin yapılarının yenilenmesini hedef alan, etkili ve güvenli uygulama potansiyeline sahip, özellikle son dönemlerde diş

pulpasından elde edilen kök hücrelerin rejeneratif yetenekleri ile diş hekimliği uygulamalarında yardımcı olacağı düşünülen tedavi yöntemidir. Dişten elde edilen kök hücrelerin hızlı çoğalabilme ve farklılaşabilme gerçeğinden yola çıkarak dişlerin kök hücre kaynağı olarak kullanıma sunulmaları hem diş hekimliği hem de tıp alanında kök hücrelerinin önemini giderek arttırmaktadır. Rejeneratif endodonti uygulamalarının ilerleme hızı göz önüne alındığında yakın zamanda diş kayıplarının kök hücre tedavisi yoluyla giderileceği söylenebilir. Rejeneratif uygulamalarda kullanılan malzemelerdeki gelişmelerle de diş hekimliği klinik pratiğinde avantaj sağlayacağı bilinmektedir.

Araştırmamızın sonuçlarının rejeneratif diş hekimliğinde MTA ile yapılan çalışmalara katkı sağlaması açısından önemli olduğu düşünülmektedir. MTA'nın en büyük dezavantajı olan sertleşme süresinin uzunluğu çeşitli hızlandırıcılar ile ortadan kaldırılmaya çalışılmaktadır. Araştırmamızda kullanılan hızlandırıcılardan %5 CaCl_2 ve Na_2HPO_4 ile hazırlanan MTA'nın daimi diş pulpa kök hücrelerinin çoğalma ve odontoblastik farklılaşmasındaki olumlu etkileri nedeniyle distile suya alternatif olabileceğinin gösterildiği ilk çalışma olması bakımından önem taşımaktadır. *In vitro* olarak değerlendirdiğimiz çalışmamızın sonuçlarının klinik diş hekimliği rutinine sokulması için bu hızlandırıcıların klinik başarısının değerlendirildiği uzun dönemli takip çalışmaları ile desteklenmesi gerekmektedir.

8. KAYNAKLAR

Abbaszadegan A, Sedigh Shams M, Jamshidi Y, Parashos P, Bagheri R. (2015). Effect of calcium chloride on physical properties of calcium-enriched mixture cement. *Australian Endo J*, 12, 1–5.

Abdullah D, Ford TRP, Papaioannou S, Nicholson J, McDonald F. (2002). An evaluation of accelerated Portland cement as a restorative material. *Biomaterials*, 23, 4001–10.

Abe S, Yamaguchi S, Amagasa T. (2007). Multilineage Cells from Apical Pulp of Human Tooth with Immature Apex. *Oral Sci Int*, 4, 45–58.

Agha-Hosseini F, Jahani M-A, Jahani M, Mirzaii-Dizgah I, Ali-Moghaddam K. (2010). In vitro isolation of stem cells derived from human dental pulp. *Clin Transplant*, 24, E23–8.

Akyüz S, Kaya MS, Demirel S. (2012). Çocuk Diş Hekimliğinde MTA: Bir Literatür Güncellemesi. *Türkiye Klinikleri*, 3(1), 6–12.

AlAnezi AZ, Zhu Q, Wang Y-H, Safavi KE, Jiang J. (2011). Effect of selected accelerants on setting time and biocompatibility of mineral trioxide aggregate (MTA). *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 111, 122–7.

Alison MR, Poulson R, Forbes S, Wright N. (2002). An introduction to stem cells. *J Pathol.*, 197, 419–423.

Alliot-Licht B, Bluteau G, Magne D, Lopez-Cazaux S, Lieubeau B, Daculsi G, Guicheux J. (2005). Dexamethasone stimulates differentiation of odontoblast-like cells in human dental pulp cultures. *Cell Tissue Res*, 321, 391–400.

Al-Nazhan S, Al-Judai A. (2003). Evaluation of antifungal activity of mineral trioxide aggregate. *J Endod*, 29(12), 826–827.

Al-Rabeah E, Perinpanayagam H, MacFarland D. (2006). Human alveolar bone cells interact with ProRoot and Tooth-colored MTA. *J Endod*, 32, 872–875.

Al-Sa'eed OR, Al-Hiyasat AS, Darmani H. (2008). The effects of six root-end filling materials and their leachable components on cell viability. *J Endod*, 34, 1410–1414.

Anand S, Taneja S, Kumari M. (2014). Effect of accelerants on the immediate and the delayed sealing ability of mineral trioxide aggregate when used as an apical plug: An in vitro study. *Conserv Dent*, 17(1), 45–48.

Andrews PB, Ten Cate AR, Davies JE. (1993). Mineralized matrix synthesis by isolated Mouse odontoblast-like cells in vitro. *Cells Materials*, 3, 67–74.

ANSI/ADA Spec. No. (2000). 57-2000 for Endodontic Sealing Materials.

ANSI/ADA Specification N. (2008). Laboratory Testing Methods: Endodontic Filling and Sealing Materials.

Arya M, Shergill IS, Williamson M, Gommersall L, Arya N, Patel HR. (2005). Basic Principles of Real-Time Quantitative PCR. *Expert Rev Mol Diagn*, 5(2), 209–219.

Asgary S, Nazarian H, Khojasteh A, Shokouhinejad N. (2014). Gene expression and cytokine release during odontogenic differentiation of human dental pulp stem cells induced by 2 endodontic biomaterials. *J Endod*, 40, 387–92.

Asgary S, Parirokh M, Eghbal MJ, Brink F. (2004). A Comparative Study Of White Mineral Trioxide Aggregate And White Portland Cements Using X-ray Microanalysis. *Australian Endo J*, 30, 89–92.

ASTM C. (2002). Standard Specification for Chemical Admixtures for Concrete. *Annual Book of ASTM Standards* 494.

ASTM C. (2004). Time of Setting of Hydraulic Cement Paste by Gillmore Needles. *Annual Book of ASTM Standards* 266-04, 1–6.

ASTM C. (2008). Time of Setting of Hydraulic Cement by Vicat Needle. *Annual Book of ASTM Standards* 191-04, 1–10.

Atalayın Ç. (2012). Diş hekimliğinde kök hücre ve dental pulpa kök hücreleri. *G.Ü. Diş Hek. Fak. Derg*, 29, 115–120.

Baek S, Plenk H, Kim S. (2005). Periapical tissue responses and cementum regeneration with amalgam, SuperEBA, and MTA as root-end filling materials. *J Endod*, 31, 444–449.

Bakopoulou A, Leyhausen G VJ, Tsiftoglou A, Garefis P, Koidis P, Geurtsen W. (2011). Comparative analysis of in vitro osteo/odontogenic differentiation potential of human dental pulp stem cells (DPSCs) and stem cells from the apical papilla (SCAP). *Arch. Oral Biol*, 56, 709–21.

Bakopoulou A, Leyhausen G, Volk J, Tsiftoglou A, Pavlos G, Petros K, Werner G. (2011). Assessment of the impact of two different isolation methods on the osteo/odontogenic differentiation potential of human dental stem cells derived from deciduous teeth. *Calcif Tissue Int*, 88, 130–141.

- Batouli S, Miura M, Brahim J, Tsutsui TW, Fisher LW, Gronthos S, Robey PG, Shi S. (2003). Comparison of stem-cell-mediated osteogenesis and dentinogenesis. *J Dent Res*, 82, 976–981.
- Beck GR, Zerler JrB, Moran E. (2000). Phosphate is a specific signal for induction of osteopontin gene expression. *Proc Natl Acad Sci*, 97, 8352 – 8357.
- Ber BS, Hatton JF, Stewart GP. (2007). Chemical modification of proroot mta to improve handling characteristics and decrease setting time. *J Endod*, 33, 1231–4.
- Berridge MV, Herst PM, Tan AS. (2005). Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. *Biotechnol Annu Rev*, 11, 127–152.
- Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, Robey P. (2001). Bone marrow stromal stem cells: nature, biology and potential applications. *Stem Cells*, 19, 180–192.
- Bianco P, Robey PG. (2001). Stem cells in tissue engineering. *Nature*, 414, 118–121.
- Birben E. (2006). Laboratuvar Teknikleri Polimeraz Zincir Reaksiyonu [Polymerase Chain Reaction (PCR)]. *Astım Alerji İmmünoloji*, 4, 92–94.
- Blau HM, Brazelton TR, Weimann R. (2001). The evolving concept of a stem cell: Entity or Function? *Cell Journal*, 105, 829–841.
- Bleicher F, Couble ML, Buchaille R, Farges JC, Magloire H. (2001). New genes involved in odontoblast differentiation. *Adv Dent Res*, 15, 30–33.
- Bodanezi A, Carvalho N, Silva D, Bernardineli N, Bramante CM, Garcia RB. (2008). Immediate and delayed solubility of mineral trioxide aggregate and Portland cement. *J Appl Oral Sci*, 16(2), 127–131.
- Bonnet D. (2002). Haematopoietic stem cells. *J Pathol*, 197, 430–440.
- Bonson S, Jeanson BG, Lallier TE. (2004). Root-end filling materials alter fibroblast differentiation. *J Dent Res*, 83(5), 408–413.
- Bortoluzzi EA, Broon NJ, Bramante CM, Consolaro A, Garcia RB, de Moraes IG, Bernadineli N. (2008). Mineral Trioxide Aggregate with or without Calcium Chloride in Pulpotomy. *J Endod*, 34, 172–5.
- Bortoluzzi EA, Broon NJ, Bramante CM, Garcia RB, de Moraes IG, Bernardineli N. (2006). Sealing ability of MTA and radiopaque Portland cement with or without calcium chloride for root-end filling. *J Endod*, 32, 897–900.

Bortoluzzi EA, Juárez Broon N, Antonio Hungaro Duarte M, de Oliveira Demarchi ACC, Monteiro Bramante C. (2006). The use of a setting accelerator and its effect on pH and calcium ion release of mineral trioxide aggregate and white Portland cement. *J Endod*, 32, 1194–7.

Bortoluzzi EA, Broon NJ, Bramante CM, Felipe WT, Tanomaru Filho M, Esberard RM. (2009). The Influence of Calcium Chloride on the Setting Time , Solubility , Disintegration , and pH of Mineral Trioxide Aggregate and White Portland Cement with a Radiopacifier. *J Endod*, 35, 550–554.

Camilleri J. (2007). Hydration mechanisms of mineral trioxide aggregate. *Int Endod J*, 40, 462–70.

Camilleri J. (2008a). Characterization of hydration products of mineral trioxide aggregate. *Int Endod J*, 41, 408–417.

Camilleri J. (2008b). Modification of mineral trioxide aggregate. Physical and mechanical properties. *Int Endod J*, 41, 843–9.

Can A. (2008). A Concise Review on the Classification and Nomenclature of Stem Cells. *Turk J Hematol*, 25, 57–59.

Canoglu E, Çehreli Z. (2008). Rejeneratif Pulpa Tedavilerinde Bir Güncelleme An Update of Regenerative Pulp Therapies. *Hacettepe Diş Hek Fak Derg*, 32, 21–27.

Cao T, Heng BC, Ye CP, Liu H, Toh WS, Robson P. (2005). Osteogenic differentiation within intact human embryoid bodies result in a marked increase in osteocalcin secretion after 12 days of in vitro culture, and formation of morphologically distinct nodule-like structures. *Tissue Cell*, 37(4), 325–334.

Casagrande L, Cordeiro MM, Nör S, Nör JE. (2011). Dental pulp stem cells in regenerative dentistry. *Odontology*, 99, 1–7.

Chang SW, Lee SY, Ann HJ, Kum KY, Kim EC. (2014). Effects of calcium silicate endodontic cements on biocompatibility and mineralization-inducing potentials in human dental pulp cells. *J Endod*, 40, 1194–1200.

Chen CL, Huang TH, Ding SJ, Shie MY, Kao CT. (2009). Comparison of calcium and silicate cement and mineral trioxide aggregate biologic effects and bone markers expression in MG63 cells. *J Endod*, 35(5), 682–685.

Chen S, Gluhak-Heinrich J, Wang YH, Wu YM, Chuang HH, Chen L, MacDougall M. (2009). Runx2, osx, and dspp in tooth development. *J Dent Res*, 88, 904–9.

Chow LC, Takagi S, Ishikawa K. (1994). Formation of hydroxyapatite in cement systems. *CRC Press*, 127–37.

Chung CH, Golub EE, Forbes E, Tokuoka T, Shapiro IM. (1992). Mechanism of action of beta-glycerophosphate on bone cell mineralization. *Calcif Tissue Int*, 51(4), 305–311.

Coelho MJ, Fernandes MH. (2000). Human bone cell cultures in biocompatibility testing. Part II: Effect of ascorbic acid, beta-glycerophosphate and dexamethasone on osteoblastic differentiation. *Biomaterials*, 21(11), 1095–10102.

Cory AH, Owen TC, Barltrop JA, Cory JG. (1991). Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture. *Cancer Commun*, 3(7), 207–212.

Couble ML, Farges JC, Bleicher F, Perrat-Mabillon B, Boudeulle M, Magloire H. (2000). Odontoblast differentiation of human dental pulp cells in explants cultures. *Calcif Tissue Int*, 66, 129–138.

Coutinho-Filho T, De-Deus G, Klein, L, Manera G, Peixoto C, Gurgel-Filho ED. (2008). Radiopacity and histological assessment of Portland cement plus bismuth oxide. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 106(6), 69–77.

Crane JF, Trainor P. (2006). Neural crest stem and progenitor cells. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 22, 267–286.

Cremers S, Garneo P, Seibel MJ. (2008). *Biochemical Markers of Bone Metabolism*. 3rd Ed.: Elsevier inc, chapter 87.

Cristian MD, Casagrande M, Nör L, Eduardo J. (2011). Dental Pulp Tissue Engineering. *Braz Dent J*, 22, 3–13.

D'Antò V, Di Caprio MP, Ametrano G, Simeone M, Rengo S. (2010). Effect of mineral trioxide aggregate on mesenchymal stem cells. *J Endod*, 36(11), 1839–1843.

Dammaschke T, Gerth, HU, Zuchner H, Schafer E. (2005). Chemical and physical surface and bulk material characterization of white ProRoot MTA and two Portland cements. *Dental Mater*, 21, 731–738.

Danesh F, Tootian Z, Jahanbani J, Rabiee M, Fazelipour S, Taghva O. (2010). Biocompatibility and mineralization activity of fresh or set white mineral trioxide aggregate, biomimetic carbonated apatite, and synthetic hydroxyapatite. *J Endod*, 36(6), 1036–1041.

- Darvell BW, Wu RCT. (2011). “MTA”-an Hydraulic Silicate Cement: review update and setting reaction. *Dent Mater*, 27, 407–22.
- De Almeida J, Felipe MCS, Bortoluzzi E, Teixeira CS, Felipe WT. (2014). Influence of the exposure of MTA with and without calcium chloride to phosphate-buffered saline on the push-out bond strength to dentine. *Int Endod J*, 47, 449–53.
- De Souza Costa CA, Duarte PT, De Souza PP, Giro EM, Hebling J. (2008). Cytotoxic effects and pulpal response caused by a mineral trioxide aggregate formulation and calcium hydroxide. *American J Dent*, 21(4), 255–261.
- Degistirici O, Jaquiere C, Schönebeck B, Siemonsmeier J, Götz W, Martin I, Michael T. (2008). Defining properties of neural crest-derived progenitor cells from the apex of human developing tooth. *Tissue Eng*, 14, 317–30.
- DiDonato JA, Mercurio F, Karin M. (2012). NF-kappaB and the link between inflammation and cancer. *Immunol Rev*, 246, 379–400.
- Ding SJ, Kao CT, Shie MY, Hung C, Huang TH. (2008). The physical and cytological properties of white MTA mixed with Na₂HPO₄ as an accelerant. *J Endod*, 34, 748–51.
- Dominici M, Le Blanc K, Mueller I S-CI, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A PD, Horwitz E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8, 315–317.
- Eid A, Hussein K, Niu L, Li G, Watanabe I, Al-Shabrawey M, Tay FR. (2014). Effects of tricalcium silicate cements on osteogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in vitro. *Acta Biomaterialia*, 10, 3327–34.
- Erdoğan ST, Erdoğan TY. (2007). Kimyasal katkı maddeleri ve tarihi geçmişleri. *Yapılarda Kimyasal Katkılar Sempozyumu*, 21–34.
- Estrela C, Alencar AHG De, Kitten GT, Vencio EF, Gava E. (2011). Mesenchymal stem cells in the dental tissues: perspectives for tissue regeneration. *Braz Dent J*, 22, 91–8.
- Ferris DM, Baumgartner JC. (2004). Perforation repair comparing two types of mineral trioxide aggregate. *J Endod*, 30, 422–424.
- Franceschi RT. (1992). The role of ascorbic acid in mesenchymal differentiation. *Nutr Rev*, 50(3), 65–70.
- Freshney IA, Stacey GN, Auerbach JM. (2007). Culture of Human Stem Cells. *Wiley-Liss*, 5–18.

- Fridland M, Rosado R. (2003). Mineral trioxide aggregate (MTA) solubility and porosity with different water-to-powder ratios. *J Endod*, 29 (12), 814–817.
- Fuchs E, Segre J. (2000). Stem cells: a new lease on life. *Cell Journal*, 100, 143–155.
- Fuks AB. (2008). Vital pulp therapy with new materials for primary teeth: new directions and treatment perspectives. *Pediatr Dent*, 30, 211–219.
- Galler RN, D’Souza KM, Hartgerink JD, Schmalz G. (2011). Scaffolds for dental pulp tissue engineering. *Advances Dent Res*, 23, 333–9.
- Galluzzi L, Aaronson SA, Abrams J, Alnemri ES, Andrews DW, Baehrecke EH. (2009). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes. *Cell Death and Differentiation*, 16 (8), 1093–1107.
- Gandolfi MG, Iacono F, Agee K, Siboni F, Tay F, Pashley DH, Prati C. (2009). Setting time and expansion in different soaking media of experimental accelerated calcium-silicate cements and ProRoot MTA. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 108, e39–45.
- Gandolfi MG, Perut F, Ciapetti G, Mongiorgi R, Prati C. (2008). New Portland cement-based materials for endodontics mixed with articaine solution: a study of cellular response. *J Endod*, 34, 39–44.
- Garnero P, Gineyts E, Karpf DB. (1994). Comparison of new Biochemical Markers of Bone Turnover in Male Postmenopausal Osteoporotic Women in Response to Alendronate Treatment. *J Endocrinol Metab*, 79, 1693–1700.
- Ghoddusi J, Forghani M, Parisay I. (2014). New Approaches in Vital Pulp Therapy in Permanent Teeth. *Iranian Endo J*, 9, 15–22.
- Gibson UE, Heid CA, Williams PM. (1996). A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res*, 6, 995– 1001.
- Graziano A, d’Aquino R, Laino G, Papaccio G. (2008). Dental pulp stem cells: a promising tool for bone regeneration. *Stem Cell Reviews*, 4, 21–6.
- Green J, Schotland S, Stauber DJ, Kleeman CR, Clemens TL. (1995). Cell matrix interaction in bone: type I collagen modulates signal transduction in osteoblasts. *Am J Physiol*, 268, 1090–1103.
- Gregory CA, Gunn WG, Peister PDJ. (2004). An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. *Anal. Biochem*, 329, 77–84.

- Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. (2000). Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *PNAS*, 97, 13625–30.
- Gronthos S, Arthur A, Bartold PM, Shi S. (2011). *Mesenchymal Stem Cell Assays and Applications* (Vol. 698, pp. 107–121). Totowa, NJ: Humana Press.
- Gronthos S, Brahimi J, Fisher W, Cherman N, Boyde ADP, Robey PG, Shi S. (2002). Stem Cell Properties of Human Dental Pulp Stem Cells. *J Dent Res*, 81, 531–535.
- Güven EP, Yalvac ME, Sahin F, Yazici MM, Rizvanov AA, Bayirli G. (2011). Effect of dental Materials Calcium Hydroxide containing cement, mineral trioxide aggregate and enamel matrix derivative on proliferation and differentiation of human tooth germ stem cells. *J Endod*, 37(5), 650–656.
- Günel T. (2007). Gen Anlatımının Kantitatif Analizi “Real-Time PCR.” *Türkiye Klinikleri*, 27, 763–767.
- Hachmeister DR, Schindler WG, Walker WA, Denoe Thomas D. (2002). The Sealing Ability and Retention Characteristics of Mineral Trioxide Aggregate in a Model of Apexification. *J Endod*, 28, 386–390.
- Hakki SS, Bozkurt SB, Hakki EE, Belli S. (2009). Effects of mineral trioxide aggregate on cell survival, gene expression associated with mineralized tissues, and biomineralization of cementoblasts. *J Endod*, 35, 513–9.
- Hanks CT, Strawn SE, Wataha JC, Craig RG. (1991). Cytotoxic effects of resin components on cultured mammalian fibroblasts. *J Dent Res*, 70, 1450–1455.
- Hashem AR, Hassanien EE. (2008). ProRoot MTA, MTA-Angelus and IRM Used to Repair Large Furcation Perforations: Sealability Study. *J Endod*, 34, 59–61.
- Hauschka PV, Lian JB, Cole DE, Gundberg CM. (1989). Osteocalcin and matrix Gla protein: vitamin K-dependent proteins in bone. *Physiol Rev*, 69, 990–1047.
- He H, Yu J, Liu Y, Lu S, Liu H, Shi J, Jin Y. (2008). Effects of FGF2 and TGFβ1 on the differentiation of human dental pulp stem cells in vitro. *Cell Biology Int*, 32, 827–834.
- Hematti P. (2011). Human embryonic stem cell-derived mesenchymal progenitors: an overview. *Methods Mol Biol Mol Biol*, 690, 163–174.
- Herrera MB, Bruno S, Buttiglieri S, Tetta C, Gatti S, Deregibus MC, Bussolati B, Camussi G. (2006). Isolation and characterization of a stem cell population from adult human liver. *Stem Cells*, 24, 2840–2850.

- Hirschman WR, Wheeler MA, Bringas JS, Hoen MM. (2012). Cytotoxicity comparison of three current direct pulp-capping agents with a new bioceramic root repair putty. *J Endod*, 38, 385–388.
- Holland R, Arlindo J, Filho O. (2002). Reaction of Rat Connective Tissue to Implanted Dentin Tubes Filled with a White Mineral Trioxide Aggregate. *Braz Dent J*, 13, 23–26.
- Hollenberg MJ, Erickson AM. (1973). The Scanning Electron Microscope: Potential Usefulness To Biologists a Review. *J Histo & Cytoc*, 21, 109–130.
- Honda MJ, Imaizumi M, Tsuchiya S, Morsczeck C. (2010). Dental follicle stem cells and tissue engineering. *J Oral Science*, 52, 541–52.
- Hong S-T, Bae K-S, Baek S-H, Kum K-Y, Lee W. (2008). Microleakage of accelerated mineral trioxide aggregate and Portland cement in an in vitro apexification model. *J Endod*, 34, 56–8.
- Horwitz EM, LE Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slapercortenbanch I, Marini FC, Deans RJ, Krause DS, Keating A. (2005). Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 7, 393–395.
- Howard D, BATTERY LD, Shakesheff K, Roberts SJ. (2008). Tissue engineering: strategies, stem cells and scaffolds. *J Anatomy*, 213, 66–72.
- Hsieh S-C, Teng N-C, Lin Y-C, Lee P-Y, Ji D-Y, Chen C-C. (2009). A novel accelerator for improving the handling properties of dental filling materials. *J Endod*, 35, 1292–5.
- Huang AH-C, Chen Y-K, Lin L-M, Shieh T-Y, Chan AW-S. (2008). Isolation and characterization of dental pulp stem cells from a supernumerary tooth. *J Oral Pathol Med*, 37, 571–4.
- Huang G T-J, Sonoyama W, Liu Liu H, Wang S, Shi S. (2009). The Hidden Treasure in Apical Papilla: The Potential Role in Pulp/ Dentin Regeneration and BioRoot Engineering. *J Endod*, 34, 645–651.
- Huang GT-J. (2008). A paradigm shift in endodontic management of immature teeth: conservation of stem cells for regeneration. *J Dent*, 36, 379–86.
- Huang GT-J, Gronthos S, Shi S. (2009). Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *J Dent Res*, 88, 792–806.

- Huang GT-J, Sonoyama W, Chen J, Park SH. (2006). In vitro characterization of human dental pulp cells: various isolation methods and culturing environments. *Cell Tissue Res*, 324, 225–36.
- Huang J, Wang F, Okuka M, Liu N, Ji G, Ye X, Zuo B, Li M, Liang P, Ge WW, Tsibris JC, Keefe DL, Liu L. (2011). Association of telomere length with authentic pluripotency of ES/iPS cells. *Cell Tissue Res*, 21, 779–792.
- Huang T-H, Shie M-Y, Kao C-T, Ding S-J. (2008). The effect of setting accelerator on properties of mineral trioxide aggregate. *J Endod*, 34, 590–3.
- Iglesias-Linares A, Yáñez-Vico R-M, Sánchez-Borrego E, Moreno-Fernández AM, Solano-Reina E, Mendoza-Mendoza A. (2013). Stem cells in current paediatric dentistry practice. *Arch. Oral Biol*, 58, 227–38.
- Iohara K. (2004). Dentin regeneration by dental pulp stem cell therapy with recombinant human bone morphogenetic protein 2. *J Dent Res*, 83, 590–595.
- Islam I, Chng HK, Yap AUJ. (2006a). Comparison of the physical and mechanical properties of MTA and portland cement. *J Endod*, 32(3), 193–197.
- Islam I, Chng HK, Yap AUJ. (2006b). X-ray diffraction analysis of mineral trioxide aggregate and Portland cement. *Int Endod J*, 39, 220–225.
- ISO 6876. (2001). International Standard 6876. “Dental root canal sealing materials.” *International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland*.
- ISO 7405. (1997). International Standard 7405. “Dentistry- preclinical evaluation of biocompatibility of medical devices used in dentistry – test methods for dental materials.” *International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland*.
- Jaberiansari Z, Naderi S, Tabatabaei FS. (2014). Cytotoxic Effects of Various Mineral Trioxide Aggregate Formulations, Calcium-Enriched Mixture and a New Cement on Human Pulp Stem Cells. *Iranian Endo J*, 9, 271–276.
- Jafarnia B, Jiang J, He J, Wang Y-H, Safavi KE, Zhu Q. (2009). Evaluation of cytotoxicity of MTA employing various additives. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 107, 739–44.
- Jain A, Bansal R. (2015). Current overview on dental stem cells applications in regenerative dentistry. *J Natural Sci*, 6, 29.

Jasoni CL, Reh TA. (1996). Temporal and spatial pattern of MASHI expression in the developing rat retina demonstrates progenitor cell heterogeneity. *J Comp Neurol*, 369, 319–327.

Ji K, Liu Y, Lu W, Yang F, Yu J, Wang X, Ma Q, Yang Z, Wen L, Xuan K. (2013). Periodontal tissue engineering with stem cells from the periodontal ligament of human retained deciduous teeth. *J Periodontal Res*, 48, 105–16.

Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada DA, Verfaillie CM. (2002). Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*, 418, 41–49.

Jo Y-Y, Lee H-J, Kook S-Y, Choung H-W, Park J-Y, Chung J-H, Choung U-H, Kim E-S, Yang H-C, Choung P-H. (2007). Isolation and characterization of postnatal stem cells from human dental tissues. *Tissue Eng*, 13, 767–73.

Juarez-Broon N, Antunes-Bortoluzzi E, Monteiro-Bramante C. (2006). Tratamiento de perforaciones radiculares con Agregado Trióxido Mineral (MTA) y cemento Portland blanco con cloruro de calcio al 10% en dientes de perros. *Rev Sanid Milit Mex*, 60, 94–102.

Jung J-Y, Woo S-M, Lee B-N, Koh J-T, Nör JE, Hwang Y-C. (2015). Effect of Biodentine and Bioaggregate on odontoblastic differentiation via mitogen-activated protein kinase pathway in human dental pulp cells. *Int Endod J*, 48, 177–84.

Kang JY, Lee BN, Son HJ KJ, Kang SS, Son HH CH, Hwang IN, Hwang YC, Oh WM. (2013). Biocompatibility of mineral trioxide aggregate mixed with hydration accelerators. *J Endod*, 39, 497–500.

Kao C-T, Shie M-Y, Huang T-H, Ding S-J. (2009). Properties of an accelerated mineral trioxide aggregate-like root-end filling material. *J Endod*, 35, 239–42.

Karaöz E, Ovalı E. (2004). *Kök hücreler. Atı Teknoloji Yayınları*.

Karimjee CK, Koka S, Rallis DM, Gound TG. (2006). Cellular toxicity of mineral trioxide aggregate mixed with an alternative delivery vehicle. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 102, e115–20.

Kasugai S, Shibata S, Suzuki S, Susami T, Ogura H. (1993). Characterization of a system of mineralized-tissue formation by rat dental pulp cells in culture. *Arch. Oral Biol*, 38, 769–777.

Kayahan MB, Nekoofar MH, Kazandağ M, Canpolat C, Malkondu O, Kaptan F, Dummer PMH. (2009). Effect of acid-etching procedure on selected physical properties of mineral trioxide aggregate. *Int Endod J*, 42, 1004–14.

Kelly EB. (2007). Stem Cells (Vol. Chapter1, pp. 3–13). Greenwood Publishing Group, inc., Westport.

Khalil I, Naaman A, Camilleri J. (2014). Investigation of a novel mechanically mixed mineral trioxide aggregate (MM-MTATM). *Int Endod J*, 1–11.

Kim Y, Kim S, Shin YS, Jung I-Y, Lee SJ. (2012). Failure of setting of mineral trioxide aggregate in the presence of fetal bovine serum and its prevention. *J Endod*, 38, 536–40.

Kirschstein RL, Skirboll LR. (2001). Stem cells: scientific progress and future research directions. *Department of Health and Human Services*, 1–25.

Kogan P, He J, Glickman GN, Watanabe I. (2006). The effects of various additives on setting properties of MTA. *J Endod*, 32, 569–72.

Koh ET, McDonald F, Pitt Ford TR, Torabinejad M. (1998). Cellular Response to Mineral Trioxide Aggregate. *J Endod*, 24, 543 – 547.

Komabayashi T, Spangberg LSW. (2008). Comparative Analysis of the Particle Size and Shape of Commercially Available Mineral Trioxide Aggregates and Portland Cement: A Study with a Flow Particle Image Analyzer. *J Endod*, 34, 94–98.

Kosmatka S PW. (1988). *Design and control of concrete mixtures* (pp. 7–12). 13th ed. Skokie, IL: Portland Cement Association.

Kosmatka SH, Voight GF, Taylor P. (2006). Integrated Materials and Construction Practices for Concrete Pavement: A State-of-the-Practice Manual. *Center for Transp Res Edu Iowa State Uni*, 360.

Kömürcü E, İnanmaz ME, Işık C, Akan B, Köse KC. (2011). Kemik yerine geçen biyomateryaller 2. Kısım : Hayvansal ve sentetik greftler. *Düzce Tıp Derg*, 13(3), 46–52.

Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J LK, Sindelka R, Sjöback R, Sjögreen B, Strömbom L, Ståhlberg A, Zoric N. (2006). The Real-Time Polymerase Chain Reaction. *Molecular Aspects of Medicine*, 27, 95–125.

Kuratate M, Yoshiba K, Shigetani Y, Yoshiba N, Ohshima H, Okiji T. (2008). Immunohistochemical Analysis of Nestin, Osteopontin and Proliferating Cells in the Reparative Process of Exposed Dental Pulp Capped with Mineral Trioxide Aggregate. *J Endod*, 34, 970–974.

Langer R, Vacanti JP. (1993). Tissue engineering. *Science*, 260, 920–926.

Lawley GR, Schindler WG, Walker WA, Kolodrubetz D. (2004). Evaluation of ultrasonically placed MTA and fracture resistance with intracanal composite resin in a model of apexification. *J Endod*, 30, 167–172.

Lea FM, Hewlett PC. (1998). *Chemistry of cement and concrete*. 4th ed. London: Arnold.

Lee B-N, Hwang Y-C, Jang J-H, Chang H-S, Hwang I-N, Yang S-Y, Oh W-M. (2011). Improvement of the properties of mineral trioxide aggregate by mixing with hydration accelerators. *J Endod*, 37, 1433–6.

Lee BN, Kim HJ, Chang HS, Hwang, IN, Oh WM, Kim JW Koh JT MK, Choi CH, Hwang YC. (2014). Effects of mineral trioxide aggregate mixed with hydration accelerators on osteoblastic differentiation. *J Endod*, 40, 2019–23.

Lee DH, Kim NR, Ahn SJ, Yang HC. (2006). Effect of Passage Number on Human Dental Pulp Cell Proliferation and Differentiation. *Biomaterials Res*, 10(2), 74–77.

Lee SK, Lee SK, Lee SI, Park JH, Jang JH, Kim HW, Kim EC. (2010). Effect of calcium phosphate cements on growth and odontoblastic differentiation in human dental pulp cells. *J Endod*, 36(9), 1537–1542.

Lee SY, Lim J, Khang G, Son Y, Choung PH, Kang SS. (2009). Enhanced ex vivo expansion of human adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells by fibroblast growth factor-2 and dexamethasone. *Tissue Eng*, 15(9), 2491–2499.

Lee YL, Lee BS, Lin FH, Yun Lin A, Lan WH, Lin CP. (2004). Effects of physiological environments on the hydration behavior of mineral trioxide. *Biomaterials*, 25(5), 787–793.

Lei G, Yan M, Wang Z, Yu Y TC, Wang Z, Yu J, Zhang G. (2011). Dentinogenic capacity: immature root papilla stem cells versus mature root pulp stem cells. *Biol Cell*, 103, 185–96.

Li S, Hu J, Zhang G, Zhang P, Tan Y. (2015). Extracellular Ca(2+) Promotes Odontoblastic Differentiation of Dental Pulp Stem Cells Via BMP2-Mediated Smad1/5/8 and Erk1/2 Pathways. *J Cell Physiol*, 1–27.

Lindroos B, Mäenpää K, Ylikomi T, Oja H, Suuronen R, Miettinen S. (2008). Characterisation of human dental stem cells and buccal mucosa fibroblasts. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 368, 329–35.

- Lotfi M, Vosoughhosseini S, Saghiri MA, Mesgariabbasi M, Ranjkesh B. (2009). Effect of white mineral trioxide aggregate mixed with disodium hydrogen phosphate on inflammatory cells. *J Endod*, 35, 703–5.
- Lu SH, Wei CF, Yang AH, Chancellor MB, Wang LS, Chen KK. (2009). Isolation and Characterization of Human Muscle-derived Cells. *Urology*, 74, 440–445.
- Luo Z, Li D, Kohli MR, Yu Q, Kim S, He W-X. (2014). Effect of Biodentine™ on the proliferation, migration and adhesion of human dental pulp stem cells. *J Endod*, 42, 490–7.
- MacDougall M, Simmons D, Luan X, Nydegger J, Feng J, Gu TT. (1997). Dentin Phosphoprotein and Dentin Sialoprotein Are Cleavage Products Expressed from a Single Transcript Coded by a Gene on Human Chromosome 4. *J. Biol. Chem*, 272, 835 – 842.
- Masuda-Murakami Y, Kobayashi M, Wang X, Yamada Y, Kimura Y, Hossain M, Matsumoto K. (2010). Effects of mineral trioxide aggregate on the differentiation of rat dental pulp cells. *Acta Histochemica*, 112, 452–8.
- Matt GD, Thorpe JR, Strother JM, McClanahan SB. (2004). Comparative study of white and gray mineral trioxide aggregate (MTA) simulating a one- or two-step apical barrier technique. *J Endod*, 30 (12), 876–879.
- McCulloch EA, Till JE. (2005). Perspectives on the properties of stem cells. *Nat. Med*, 11, 1026–1028.
- McDonald RE, Avery DR. (2000). *Dentistry for the child and the adolescent*, 7th ed., Mosby (Vol. Chapter 19, pp. 434–465).
- McNamara RP, Henry M, Schindler WG, Hargreaves KM. (2010). Biocompatibility of accelerated mineral trioxide aggregate in a rat model. *J Endod*, 36, 1851–5.
- Mehrvarzfar P, Akhavan H, Ghasemi S, Khodaei F, Tour Savadkouhi S, Dianat O. (2014). Mineral Trioxide Aggregate Mixed with Normal Saline, Calcium Chloride or KY Jelly as Apical Plug in Simulated Open Apices: An In vitro Microleakage Study. *Iranian Endo J*, 9, 45–9.
- Melkko J, Kauppila S, Niemi S. (1996). Immunassay for intact amino-terminal propeptide of human type 1 procollagen. *Clinical Chemistry*, 42, 947– 954.
- Miller WA, Everett MM, Cramer JF. (1976). Growth of bovine pulp cells in monolayer culture. *J Endod*, 2, 385–389.

Min K-S, Lee S-I, Lee Y, Kim E-C. (2009). Effect of radiopaque Portland cement on mineralization in human dental pulp cells. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 108, e82–6.

Min K-S, Yang S-H, Kim E-C. (2009). The combined effect of mineral trioxide aggregate and enamel matrix derivative on odontoblastic differentiation in human dental pulp cells. *J Endod*, 35, 847–51.

Min KS, Kim HI, Park HJ, Pi SH, Hong CU, Kim EC. (2007). Human Pulp Cells Response to Portland Cement In Vitro. *J Endod*, 33, 163–166.

Minamikawa H, Deyama Y, Nakamura K. (2009). Effect of mineral trioxide aggregate on rat clonal dental pulp cells: expression of cyclooxygenase-2 mRNA and inflammation-related protein via Nuclear Factor Kappa B signaling system. *J Endod*, 35, 843–846.

Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, Shi S. (2003). SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *PNAS*, 100, 5807–12.

Mizuno M, Banzai Y. (2008). Calcium ion release from calcium hydroxide stimulated fibronectin gene expression in dental pulp cells and the differentiation of dental pulp cells to mineralized tissue forming cells by fibronectin. *Int Endod J*, 41, 933–938.

Morsezck C, Schmalz G, Reichert TE, Vollner F, Galler K, Driemel O. (2008). Somatic stem cells for regenerative dentistry. *Clin Oral Investig.*, 12, 113–118.

Morst (Ministry of Research Science and Tecnology). (2006). Stem Cell Research in New Zealand. *Challenges and Opportunities for the Research Sector*, 13–16.

Muroyama Y, Kondoh H, Takada S. (2004). Wnt proteins promote neuronal differentiation in neural stem cell culture. *Biochem Biophys Res Commun*, 313, 915–921.

Murray PE, Garcia-Godoy F, Hargreaves KM. (2007). Regenerative endodontics: a review of current status and a call for action. *J Endod*, 33, 377–90.

Nakashima M. (1991). Establishment of primary cultures of pulp cells from bovine permanent incisors. *Arch. Oral Biol*, 36, 655–663.

Nakashima M. (2005). Bone morphogenetic proteins in dentin regeneration for potential use in endodontic therapy. *Cytokine Growth Factor Rev*, 16, 369–376.

Nakashima M, Akamine A. (2005). The application of tissue engineering to regeneration of pulp and dentin in endodontics. *J Endod*, 31, 711–718.

Nakashima M, Reddi AH. (2003). The application of tissue engineering to regeneration of pulp and dentin in endodontics. *Nat. Biotechnol*, 21, 1025–1032.

Namazikhah MS, Nekoofar MH, Sheykhrezae MS, Salariyeh S, Hayes SJ, Bryant ST. (2008). The effect of pH on surface hardness and microstructure of mineral trioxide aggregate. *Int Endod J*, 41(2), 108–116.

Nekoofar MH, Stone DF, Dummer PM. (2010). The effect of blood contamination on the compressive strength and surface microstructure of mineral trioxide aggregate. *Int Endod J*, 43, 782–791.

Nowicka A, Lipski M, Parafiniuk M, Sporniak-Tutak K, Lichota D, Kosierkiewicz A. (2013). Response of Human Dental Pulp Capped with Biodentine and Mineral Trioxide Aggregate. *J Endod*, 39, 743–747.

Nunez CM, Bosomworth HJ, Field C, Whitworth JM, Valentine RA. (2014). Biodentine and mineral trioxide aggregate induce similar cellular responses in a fibroblast cell line. *J Endod*, 40, 406–411.

Ohazama A, Sharpe PT. (2004). TNF signalling in tooth development. *Curr Opin Genet Dev*, 14, 513–519.

Okiji T, Yoshida K. (2009). Reparative dentinogenesis induced by mineral trioxide aggregate: a review from the biological and physicochemical points of view. *Int Endod J*, 2009, 1–12.

Oloomi K, Saberi E, Mokhtari H, Mokhtari Zonouzi HR, Nosrat A, Nekoofar MH, Dummer PMH. (2013). Evaluation of the effect of blood contamination on the compressive strength of MTA modified with hydration accelerators. *Restorative Dent & Endod*, 38, 128–33.

Oncel Torun Z, Torun D, Demirkaya K, Yavuz ST, Elçi MP, Sarper M, Avcu F. (2014). Effects of iRoot BP and white mineral trioxide aggregate on cell viability and the expression of genes associated with mineralization. *Int Endod J*, 1–8.

Ong RM, Luddin N, Ahmed HMA, Omar NS. (2012). Cytotoxicity of accelerated white MTA and Malaysian white Portland cement on stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED): An in vitro study. *Singapore Dent J*, 33, 19–23.

Osorio RM, Hefti A, Vertucci FJ, Shawley AL. (1998). Cytotoxicity of endodontic materials. *J Endod*, 24, 91–96.

Özbay G. (2013). Günümüzde kullanılan çeşitli amputasyon materyallerinin diş pulpası üzerindeki sitotoksik ve rejeneratif etkilerinin hücresel düzeyde incelenmesi. *Mar Üni Dişhek Fak Pedo. AD Doktora Tezi*, (Danışman: Prof.Dr. Betül Kargül).

Özbay G, Kıtık B, Peker S, Kargül B. (2012). Yeni Bir Bioagregat Materyalin Apikal Sızdırmazlığının MTA ile Karşılaştırmalı İncelenmesi. *Türkiye Klinikleri*, 3(1), 62–70.

Paranjpe A, Zhang H, Johnson JD. (2010). Effects of mineral trioxide aggregate on human dental pulp cells after pulp-capping procedures. *J Endod*, 36, 1042–7.

Paranjpe A, Smoot T, Zhang H, Johnson JD. (2012). Direct contact with mineral trioxide aggregate activates and differentiates human dental pulp cells. *J Endod*, 37, 1691–1695.

Parirokh M, Torabinejad M. (2010a). Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review--Part I: chemical, physical, and antibacterial properties. *J Endod*, 36, 16–27.

Parirokh M, Torabinejad M. (2010b). Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review--Part III: Clinical applications, drawbacks, and mechanism of action. *J Endod*, 36, 400–13.

Park B-W, Hah Y-S, Kim DR, Kim J-R, Byun J-H. (2007). Osteogenic phenotypes and mineralization of cultured human periosteal-derived cells. *Arch. Oral Biol*, 52, 983–9.

Park J-C, Kim J-M, Jung I-H, Kim JC, Choi S-H, Cho K-S, Kim C-S. (2011). Isolation and characterization of human periodontal ligament (PDL) stem cells (PDLSCs) from the inflamed PDL tissue: in vitro and in vivo evaluations. *J Clinical Periodontology*, 38, 721–31.

Park SH, Hsiao GY, Huang GT. (2004). Role of substance P and calcitonin gene-related peptide in the regulation of interleukin-8 and monocyte chemotactic protein-1 expression in human dental pulp. *Int Endod J*, 37, 185–192.

Pérard M, Le Clerc J, Meary F, Pérez F, Tricot-Doleux S, Pellen-Mussi P. (2013). Spheroid model study comparing the biocompatibility of Biodentine and MTA. *J Mater Sci Mater Med*, 24(6), 1527–1534.

Pistorius A, Willershausen B, Briseno Marroquin B. (2003). Effect of apical root-end filling materials on gingival fibroblasts. *Int Endod J*, 36, 610 – 615.

Poggio C, Arciola CR, Beltrami R, Monaco A, Dagna A, Lombardini M, Visai L. (2014). Cytocompatibility and antibacterial properties of capping materials. *The Scientific World J*, 2014, 1–10.

- Prati C, Gandolfi MG. (2015). Calcium silicate bioactive cements: Biological perspectives and clinical applications. *Dent Mater*, 24, 1–20.
- Rao A, Shenoy R. (2009). Mineral trioxide aggregate: a review. *J Clinical Pediatr Dent*, 34(1), 1–7.
- Rao MS. (2004). Stem sense: a proposal for the classification of stem cells. *Stem Cells Dev*, 13, 452–455.
- Rattner A, Sabido O, Massoubre C, Rascle F, Frey J. (1997). Characterization of human osteoblastic cells: influence of the culture conditions. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 33(10), 757–762.
- Rimondini L, Mele S. (2009). Stem cell technologies for tissue regeneration in dentistry. *Minerva Stomatol*, 58, 483–500.
- Roberts HW, Toth JM, Berzins DW, Charlton DG. (2008). Mineral trioxide aggregate material use in endodontic treatment: a review of the literature. *Dental Mater*, 24(2), 149–164.
- Ruch LV, Lesot H B –Kirn. (1995). Odontoblast differentiation. *Int J Dev Bio*, 39, 51–68.
- Saber Sel-D. (2009). Tissue engineering in endodontics. *J.Oral Sci*, 51, 495–507.
- Saghiri MA, Asatourian A, Orangi J, Lotfi M, Soukup JW, Garcia-Godoy F, Sheibani N. (2015). Effect of particle size on calcium release and elevation of pH of endodontic cements. *Dent Traumatology*, 11, 1–6.
- Saito T, Ogawa M, Hata Y, Bessho K. (2004). Acceleration effect of human recombinant bone morphogenetic protein-2 on differentiation of human pulp cells into odontoblasts. *J Endod*, 30, 205–208.
- Sarang S, Vimal S, Sharma NK, Sharma VS. (2010). Regeneration of tooth pulp and dentin: trends and advances. *Annals of Neurosciences*, 17, 31–42.
- Sarkar NK, Caicedo R, Ritwik P, Moiseyeva R, Kawashima I. (2005). Physicochemical basis of the biologic properties of mineral trioxide aggregate. *J Endod*, 31, 97–100.
- Schmalz G. (1994). Use of cell cultures for toxicity testing of dental materials-advantages and limitations. *J. Dent*, 22, 6–11.

Schneider R, Holland GR, Chiego D, Hu JCC, Nör JE, Botero TM. (2014). White mineral trioxide aggregate induces migration and proliferation of stem cells from the apical papilla. *J Endod*, 40, 931–6.

Schwartz RS, Mauger M, Clement DJ, Walker WA. (1999). Mineral trioxide aggregate: a new material for endodontics. *J Am Dent Assoc*, 130(7), 967–975.

Seo B-M, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahimi J, Young M, Robey PG, Wang CY, Shi S. (2004). Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet*, 364, 149–55.

Shete M, Byakodi R, Kshar A, Paranjpe A. (2015). Stem Cell Therapy in Dentistry : An Overview. *IJSS Case Reports & Reviews*, 1, 50–54.

Shi S, Bartold PM, Miura M, Seo BM, Robey PG, Gronthos S. (2005). The efficacy of mesenchymal stem cells to regenerate and repair dental structures. *Orthod Craniofac Res*, 8, 191–199.

Shiba H, Fujita T, Doi N, Nakamura S, Nakanishi K, Takemoto T, Hino T, Noshiro M, Kawamoto T, Kurihara H. (1998). Differential Effects of Various Growth Factors and Cytokines on the Syntheses of DNA, Type I Collagen, Laminin, Fibronectin, Osteonectin/Secreted Protein, Acidic and Rich in Cysteine (SPARC), and Alkaline Phosphatase by Human Pulp Cells in Culture. *J Cell Physiol*, 174, 194–205.

Shie M-Y, Huang T-H, Kao C-T, Huang C-H, Ding S-J. (2009). The effect of a physiologic solution pH on properties of white mineral trioxide aggregate. *J Endod*, 35, 98–101.

Shin SY, Albert JS, Mortman RE. (2009). One step pulp revascularization treatment of an immature permanent tooth with chronic apical abscess: a case report. *Int Endod J*, 42, 1118–26.

Shipper G, Grossman ES, Botha AJ, Cleaton-Jones PE. (2004). Marginal adaptation of mineral trioxide aggregate (MTA) compared with amalgam as a root-end filling material: a low-vacuum (LV) versus high-vacuum (HV) SEM study. *Int Endod J*, 37(5), 325–336.

Silva EJ, Santos CC, Zaia AA. (2013). Long term Cytotoxic effects of contemporary root canal sealers. *J Appl Oral Sci*, 21(1), 43–47.

Simon S, Cooper P, Smith A, Picard B, Ifi CN, Berdal A. (2008). Evaluation of a new laboratory model for pulp healing: preliminary study. *Int Endod J*, 41(9), 781–790.

Simon SRJ, Tomson PL, Berdal A. (2014). Regenerative endodontics: regeneration or repair? *J Endod*, 40, S70–5.

Slocum HK, Pavelic ZP, Rustum YM, Creaven PJ, Karakousis C, Takita H G, W.R. (1981). Characterization of Cells Obtained by Mechanical and Enzymatic Means from Human Melanoma, Sarcoma, and Lung Tumor. *Cancer Res*, 41, 1428–1434.

Sluyk SR, Moon PC, Hartwell GR. (1998). Evaluation of setting properties and retention characteristics of mineral trioxide aggregate when used as a furcation perforation repair material. *J Endod*, 24(11), 768–771.

Smith AJ, Cassidy N, Perry H, Bègue-Kirn C, Ruch JV, Lesot H. (1995). Reactionary dentinogenesis. *Int J Dev Biol*, 39, 273–280.

Sommer L. (2004). Multiple roles of canonical Wnt signaling in cell cycle progression and cell lineage specification in neural development. *Cell Cycle*, 3, 701–704.

Song J-S, Kim S-O, Kim S-Y, Choi H-J, Son H-K, Jung H-S, Kim C-S, Lee J-H. (2012). In Vitro and In Vivo Characteristics of Stem Cells Derived from the Periodontal Ligament of Human Deciduous and Permanent Teeth. *Tissue Eng*, 18, 2040–2051.

Sonoyama W, Liu Y, Fang D, Yamaza T, Seo B-M, Zhang C, Liu He, Gronthos S, Wang C-Y, Wang S, Shi S. (2006). Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in swine. *Plos One*, 1(e79), 1–8.

Srivastava S, Taneja S, Kumar M. (2014). Effect of accelerants on the setting time of white portland cement and white MTA: An in-vitro study. *IJOCR*, 2(5), 2–6.

Stowe TJ, Sedgley CM, Stowe B, Fenno JC. (2004). The effects of chlorhexidine gluconate (0.12%) on the antimicrobial properties of tooth-colored ProRoot mineral trioxide aggregate. *J Endod*, 30(6), 429–431.

Strachan T, Read AP. (2004). *Amplifying DNA: PCR and Cell- Based DNA Cloning. Human Molecular Genetics* (pp. 30–78). 3rd Ed. London, New York. Garland Publishing, Part 1.

Tabata Y. (2005). Nanomaterials of drug delivery systems for tissue regeneration. *Methods Mol Biol*, 300, 81–100.

Takeda T, Tezuka Y, Horiuchi M, Hosono K, Iida K, Hatakeyama D, Miyaki S, Kunisada T, Shibata T, Tezuka K. (2008). Characterization of dental pulp stem cells of human tooth germs. *J Dent Res*, 87, 676–81.

Takita T, Hayashi M, Takeichi O, Ogiso B, Suzuki N, Otsuka K, Ito K. (2006). Effect of mineral trioxide aggregate on proliferation of cultured human dental pulp cells. *Int Endod J*, 39, 415–22.

Téclès O, Laurent P, Aubut V, About I. (2008). Human tooth culture: a study model for reparative dentinogenesis and direct pulp capping materials biocompatibility. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 85(1), 180–187.

Thesleff I, Mikkola M. (2002). The role of growth factors in tooth development. *Int Rev Cytol*, 217, 93–135.

Thomson JA, Joseph E. (1998). Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. *Science*, 282, 1145–1147.

Thomson M, Liu SJ, Zou LN, Smith Z, Meissner A, Ramanathan S. (2011). Pluripotency factors in embryonic stem cells regulate differentiation into germ layers. *Cell*, 145, 875–889.

Thomson TS, Berry JE, Somerman MJ, Kirkwood KL. (2003). Cementoblasts Maintain Expression of Osteocalcin in the Presence of Mineral Trioxide Aggregate. *J Endod*, 29, 407 – 412.

Tobita M, Uysal AC, Ogawa R, Hyakusoku H, Mizuno H. (2008). Periodontal tissue regeneration with adipose-derived stem cells. *Tissue Eng*, 14, 945–53.

Todorovic V, Markovic D, Milosevic JovcicN, Petakov M, Balint B, Colic M, Milenkovic A, Colak I, Jokanovic V, Nikolic N. (2008). Dental pulp stem cells - potential significance in regenerative medicine. *Stom Glas*, 55, 170–178.

Torabinejad M, Parirokh M. (2010). Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review--part II: leakage and biocompatibility investigations. *J Endod*, 36, 190–202.

Torabinejad M, Chivian N. (1999). Clinical applications of mineral trioxide aggregate. *J Endod*, 25(3), 197–205.

Torabinejad M, Hong C, McDonald F, Pitt Ford TR. (1995). Physical and chemical properties of a new root-end filling material. *J Endod*, 21, 349–353.

Torabinejad M, Hong CU, Lee SJ, Monsef M, Pitt Ford TR. (1995). Investigation of mineral trioxide aggregate for root-end filling in dogs. *J Endod*, 21 (12), 603–608.

Torabinejad M, Hong CU, Pitt Ford TR, Kettering JD. (1995a). Antibacterial effects of some root end filling materials. *J Endod*, 21, 403–406.

Torabinejad M, Hong CU, Pitt Ford TR, Kettering JD. (1995b). Cytotoxicity of four root end filling materials. *J Endod*, 21(10), 489–492.

Torabinejad M, Pitt Ford TR, McKendry DJ, Abedi HR, Miller DA, Kariyawasam SP. (1997). Histologic assessment of mineral trioxide aggregate as a root-end filling in monkeys. *J Endod*, 23 (4), 225–228.

Torabinejad M, Watson TF, Pitt Ford TR. (1993). Sealing ability of a mineral trioxide aggregate when used as a root end filling material. *J Endod*, 19(12), 591–595.

Tsukamoto Y, Fukutani S, Shin-Ike T, Kubota T, Sato S, Suzuki Y, Mori M. (1992). Mineralized nodule formation by cultures of human dental pulp - derived fibroblasts. *Arch. Oral Biol*, 12, 1045–1055.

Tziafas D, Pantelidou O, Alvanou A, Belibasakis G, Papadimitriou S. (2002). The dentinogenic effect of mineral trioxide aggregate (MTA) in short-term capping experiments. *Int Endod J*, 35, 245–254.

Viana Viola N, Maria Guerreiro-Tanomaru J, Ferreira da Silva G, Sasso-Cerri E, Tanomaru-Filho M, Cerri PS. (2012). Biocompatibility of an experimental MTA sealer implanted in the rat subcutaneous: Quantitative and immunohistochemical evaluation. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 100B(7), 1773–1781.

Viljoen GJ, Nel LH, Crowther JR. (2005). *Molecular Diagnostic PCR Handbook*. Springer, Dordrecht, Chapter 1.

Wang X, Sha X-J, Li G-H, Yang F-S, Ji K, Wen L-Y, Liu S-Y, Chen L-D, Yin Xuan K. (2012). Comparative characterization of stem cells from human exfoliated deciduous teeth and dental pulp stem cells. *Arch. Oral Biol*, 57, 1231–40.

Wang Y, Preston B, Guan G. (2012). Tooth bioengineering leads the next generation of dentistry. *Int J Ped Dent*, 22, 406–18.

Wang Y, Yan M, Fan Z, Ma L, Yu Y, Yu J. (2014). Mineral trioxide aggregate enhances the odonto/osteogenic capacity of stem cells from inflammatory dental pulps via NF- κ B pathway. *Oral Diseases*, 20, 650–8.

Wang YH, Liu Y, Maye P, Rowe DW. (2006). Examination of mineralized nodule formation in living osteoblastic cultures using fluorescent dyes. *Biotechnol Prog*, 22, 1697–1701.

Wataha JC. (2001). Principles of biocompatibility for dental practitioners. *J. Prosthet. Dent*, 86, 203–209.

Watts JD, Holt DM, Beeson TJ, Kirkpatrick TC, Rutledge RE. (2007). Effects of pH and mixing agents on the temporal setting of tooth-colored and gray mineral trioxide aggregate. *J Endod*, 33, 970–3.

Weinreb M, Shinar D, Rodan GA. (1990). Different pattern of alkaline phosphatase, osteopontin and osteocalcin expression in developing rat bone visualized by in situ hybridization. *J Bone Miner Res*, 5(8), 831–842.

Wiltbank K, Schwartz S, Schindler WG. (2007). Effect of selected accelerants on the physical properties of mineral trioxide aggregate and Portland cement. *J Endod*, 33, 1235–8.

Woo SM, Hwang YC, Lim HS, Choi N, Kim SH. (2013). Effect of nifedipine on the differentiation of human dental pulp cells cultured with mineral trioxide aggregate. *J Endod*, 39, 801–5.

Xu C, Police S, Hassanipour M, Li Y, Chen Y, Priest C, O’Sullivan C, Laflamme MA, Zhu WZ, Van Biber B, Hegerova L, Yang J, Delavan-Boorsma K, Davies A, Lebkowski J, Gold JD. (2011). Efficient generation and cryopreservation of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. *Regen Med*, 6, 53–66.

Xu J, Wang W, Kapila Y, Lotz J, Kapila S. (2009). Multiple Differentiation Capacity of STRO-1+/CD146+ PDL Mesenchymal Progenitor Cells. *Stem Cells Dev*, 18(3), 487–496.

Yaltırık M, Özbaş H, Bilgiç B, İşsever H. (2004). Reactions of connective tissue to mineral trioxide aggregate and amalgam. *J Endod*, 30(2), 95–99.

Yalvac ME, Ramazanoglu M, Rizvanov AA, Sahin F, Bayrak OF, Salli U, Palotás A, Kose GT. (2010). Isolation and characterization of stem cells derived from human third molar tooth germs of young adults: implications in neo-vascularization, osteo-, adipo- and neurogenesis. *The Pharmacogenomics J*, 10, 105–13.

Yamaza T, Kentaro A, Chen C, Liu Y, Shi Y, Gronthos S, Wang S. (2010). Immunomodulatory properties of stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *BioMed Central*, 1, 1–10.

Yan X, Qin H, Qu C, Tuan RS, Shi S, Huang GT. (2010). iPS cells reprogrammed from human mesenchymal-like stem/progenitor cells of dental tissue origin. *Stem Cells Dev*, 19, 469–480.

Yang QL, Xu CY, Zhao J-J, Zhang X-B, Zhao Y, Kong Y. (2011). Evaluation on mutagenicity of mineral trioxide aggregate mixed with disodium hydrogen phosphate by micronuclei test. *Stomatology*, 9, 1–6.

Yao S, Pan F, Prpic V, Wise GE. (2008). Differentiation of Stem Cells in the Dental Follicle. *J Dent*, 87, 767–771.

Yıldırım S. (2013). *Dental pulp stem cells* (pp. 25–56). Springer New York.

Yıldırım S, Alaçam A. (2007). Vital Pulpa Tedavilerinde Protein ve Gen Terapileri. *Hacettepe Dişhek. Fak. Derg*, 54–63.

Ylmén R, Jäglid U, Steenari B-M, Panas I. (2009). Early hydration and setting of Portland cement monitored by IR, SEM and Vicat techniques. *Cement and Concrete Res*, 39, 433–439.

Yokose S, Kadokura H, Tajima Y, Fujieda K, Katayama I, Matsuoka T, Katayama T. (2000). Establishment and Characterization of a Culture System for Enzymatically Released Rat Dental Pulp Cells. *Calcif Tissue Int*, 66, 139–144.

Yoon J H, Roh EY, Shin S, Jung NH, Song EY, Chang JY, Kim BJ, Jeon HW. (2013). The, Comparison of Explant-Derived and Enzymatic Digestion-Derived MSCs and Jelly, Growth Factors from Wharton's. *BioMed Res Int*, 2013, 1–8.

Yoshida K, Yoshida N, Nakamura H, Iwaku M, Ozawa H. (1996). Immunolocalization of fibronectin during reparative dentinogenesis in human teeth after pulp capping with calcium hydroxide. *J Dent Res*, 75, 1590 – 1597.

Young CS, Terada S, Vacanti JP, Honda M, Bartlett JD, Yelick PC. (2002). Tissue Engineering of Complex Tooth Structures on Biodegradable Polymer Scaffolds. *J Dent Res*, 81, 695–700.

Yu J, Deng Z, Shi J, Zhai H, Nie X, Zhuang H. (2006). Differentiation of Dental Pulp Stem Cells into Regular-Shaped Dentin-Pulp Complex Induced by Tooth Germ Cell Conditioned Medium. *Tissue Eng*, 12(11), 3097–3105.

Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, Nie J, Jonsdottir GA, Ruotti V, Stewart R, Slukvin II, Thomson JA. (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*, 318, 1917–1920.

Zabierowski SE, Herlyn M. (2010). Embryonic stem cells as a model for studying melanocyte development. *Methods Mol Biol*, 584, 301–316.

Zapf AM, Chedella SC V, Berzins DW. (2015). Effect of additives on mineral trioxide aggregate setting reaction product formation. *J Endod*, 41, 88–91.

Zhang W, Walboomers XF, Shi S, Fan M, Jansen JA. (2006). Multilineage differentiation potential of stem cells derived human dental pulp after cryopreservation. *Tissue Eng*, 12, 2813–2823.

Zhou HM, Shen Y, Wang ZJ, Li L, Zheng YF, Häkkinen L, Haapasalo M. (2013). In vitro cytotoxicity evaluation of a novel root repair material. *J Endod*, 39, 478–483.

Zhu Q, Haglund R, Safavi KE. (2000). Adhesion of human osteoblasts on root-end filling materials. *J Endod*, 26, 404–406.

Zhu Y, Shang L, Chen X, Kong X, Liu N, Bai Y, Fang J, Dang J, Wang X, Jin Y. (2013). Deciduous dental pulp stem cells are involved in osteoclastogenesis during physiologic root resorption. *J Cell Bio*, 228, 207–15.

Zubaidah N. (2007). The citotoxicity of calcium hydroxide intracanal dressing by MTT assay. *Dent J*, 40(4), 157–160.

Zulewski J, Abraham EJ, Gerlach MJ, Daniel FB, Moritz W, Muller B, Vallejo M, Thomas MK, Habener JF. (2001). Multipotential nestin-positive stem cells isolated from adult pancreatic islets differentiate ex vivo into pancreatic endocrine, exocrine, and hepatic phenotypes. *Diabetes*, 50, 521–533.

9. EKLER

Ek 1. Bilgilendirilmiş Onam Formu

Araştırma projesinin adı:

Sertleşme Süresi Farklı Hızlandırıcılar ile Kısaltılan Mineral Trioksit Agregatın Daimi Diş Pulpa Kaynaklı Kök Hücreler Üzerindeki Sitotoksitesinin ve Rejeneratif Kapasitesinin İncelenmesi

Araştırmanın yürütüleceği kuruluş:

Marmara Üniversitesi Diş hekimliği Fakültesi, Pedodonti Anabilim Dalı

Yeditepe Üniversitesi Mühendislik ve Mimarlık Fakültesi Genetik ve Biyomühendislik Bölümü

Sorumlu Araştırmacılar:

Prof. Dr. Betül KARGÜL

Dt. Pınar KULAN

Araştırmayı hazırlayan kuruluş:

Bu araştırma Marmara Üniversitesi Diş hekimliği Fakültesi, Pedodonti Anabilim Dalı'nda görevli olan Prof. Dr. Betül KARGÜL ve Dt. Pınar KULAN tarafından hazırlanmıştır.

Amaç:

Mineral Trioksit Agregat (MTA) son yıllarda rejeneratif tedavilerde tercih edilen bir materyal haline gelmiştir. Çalışmamızda sertleşme süresi kısaltmış MTA'nın rejeneratif

özelliklerinin ve biyolojik ve histokimyasal toksisitelerin incelenmesi ortodontik tedavi amacıyla çekilmiş daimi diş pulpasından elde edilecek olan mezenkimal kök hücreler kullanılarak yapılacaktır. Bu araştırma, insan üzerindeki araştırmalarda, insan haklarını ve sağlığını korumak amacı ile Dünya Tıp Birliğince ilan edilmiş olan Helsinki Deklarasyonunun son şekline uygun hazırlanmış ve Marmara Üniversitesi Etik Komitesinin onayına sunulmuştur

Bu araştırmaya katılmak için niçin seçildiniz?

Herhangi bir sistemik hastalığı bulunmayan ortodontik tedavi amaçlı çekim endikasyonu bulunan dişlerinizin olması sebebiyle bu çalışmaya katılmanız uygun görülmüştür.

Araştırmada kullanılacak yöntem:

Araştırmada aşağıdaki basamaklar sırasıyla izlenecektir.

- 1) Ağız içi durumunuzu belirlemek amacıyla klinik muayeneniz yapılacaktır.
- 2) Ortodontik tedavi amaçlı çekim endikasyonu bulunan dişleriniz belirlenecektir.
- 3) Sonuçlar değerlendirilerek bu çalışmaya katılıp katılmayacağınıza karar verilecektir. Sistemik herhangi bir hastalığa sahip iseniz çalışmaya dahil edilmeyeceksiniz.
- 4) Çalışmanın 2. bölümünde, çalışmaya katılan gönüllülerin dişleri çekilecektir.
- 5) Dişler saklama solüsyonları içerisine koyularak laboratuvara transfer edilecektir.
- 6) Laboratuvar da kök hücre izolasyon ve farklılaşma işlemleri yapılacaktır.
- 7) Elde edilen bulgular istatistiksel olarak değerlendirilecektir.

Araştırmaya katılmakla meydana gelebilecek yan etkiler ve olumsuzluklar:

Çalışmadan bağımsız olarak çekim kararı verilmiş dişler seçildiğinden kullanılmaması durumunda atılacak bir kaynak söz konusu olduğundan hastaya çekim işlemi sırasında ve sonrasındaki temel yan etkiler ve komplikasyon dışında herhangi bir yan etki ve komplikasyon söz konusu değildir.

Araştırmadan beklenen faydalar:

Diş çürüğü, genel sağlığı yakından ilgilendiren ve günümüzde oldukça sık görülen bir diş sağlığı problemidir. Günümüzde koruyucu diş hekimliği çalışmaları oldukça ilerlemiş olmasına rağmen, ağız-diş sağlığı problemleri devam etmekte ve çoğu zaman ilerlemiş çürüklerle karşılaşmaktadır. Bu gibi durumlarda da çoğunlukla pulpa tedavi gereği ortaya çıkmaktadır. Pulpa tedavilerinde, dişin yapısal bütünlüğünün korunmasında alternatif ve rejeneratif tedavi metotları olarak düşünülmektedir. Çalışmamız rejeneratif tedavilerde kullanılan materyalin etkinliğini gösterecek, tedavilerin daha etkili ve daha güvenilir olarak yapılmasına olanak sağlayacaktır.

Gizlilik

Araştırmaya katılan bireylerin isimleri gizli tutulacak ve kendi rızası olmadan açıklanmayacaktır.

Ek 2. Onam Formu

Proje adı: Sertleşme Süresi Farklı Hızlandırıcılar ile Kısaltılan Mineral Trioksit Agregatın Daimi Diş Pulpa Kaynaklı Kök Hücreler Üzerindeki Sitotoksitesinin ve Rejeneratif Kapasitesinin İncelenmesi

Araştırmaya ait hasta / kişi numarası: _____

Üniversite hastanesi protokol numarası: _____

Araştırmacı adı: Pınar KULAN

Marmara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi, Pedodonti Anabilim Dalı Araştırma Projesi Bilgilendirme yazısını okudum ve anladım. Sorularıma Dt. Pınar Kulan tarafından beni tatmin eden cevaplar verildi. Adı geçen projeye kendi rızam ile hiçbir baskı altında kalmadan katılmayı kabul ediyorum. İstedğim anda çalışmadan çıkabileceğim ve bunun normal tedavi sürecini etkilemeyeceğini, çalışmadan kendi isteğimle çıkmam halinde tıbbi ve hukuki haklarımın saklı olduğunu biliyorum.

Hasta kişi

Tarih

İmza

Velayet yada vesayet altında
Bulunanlar için veli veya vasi

Tarih

İmza

Onam ve Açıklama yapan

Tarih

İmza

Tanık

Tarih

İmza

Ek 3. Etik Kurul Onayı



Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

BAŞVURU BİLGİLERİ	PROTOKOL KODU	09.2014.0091	10757436-050106.04-14 0000 2822
	PROJE ADI	Serileşme süresi farklı hazırlanmışlar ile kısaltılan mineral trioksit agregatın daimi diş pulpa kaynaklı kök hücreler üzerindeki sitotoksitesinin ve rejeneratif kapasitesinin incelenmesi	
	SORUMLU ARASTIRICI ÜNVAN/ADI	Prof.Dr. Betül KARGÜL	

KARAR BİLGİLERİ	Tarih: 07.11.2014 Yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma başvurusu doyan ve ilgili belgeler araştırmanın gereke, ammi, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak (acelenin ve gerçekleştirilmesinde sakınca bulunmadığı için Kurulumuza onaylanmasına oy birliği ile karar verilmiştir. Onay sonrasında yapılacak her türlü proje değişiklikleri (kaldırılma, başlık vb.) veya protokol değişikliklerinde Etik Kurulu bildirilerek proje onayına yenilerinin gerekmektedir.
-----------------	--

Unvanı / Adı / Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu / EK Üyeliği	Onaylanan Proje ile İlgili		Talepten Kaçınım		İmza
Prof.Dr. Hacer DİREKÇİ	Romatoloji	M.Ü. Tıp Fakültesi Başkan	Var	Yok	Evet	Hayır	
Prof.Dr. Tülin ERGUN	Dermatoloji	M.Ü. Tıp Fakültesi Başkan Yard.	Var	Yok	Evet	Hayır	
Prof.Dr. Handan KAYA	Patoloji	M.Ü. Tıp Fakültesi Üye	Var	Yok	Evet	Hayır	
Prof.Dr. M.Bahadır GÜLLÜOĞLU	Genel Cerrahi	M.Ü. Tıp Fakültesi Üye	Var	Yok	Evet	Hayır	
Prof.Dr. Atila KARASLIF	Farmakoloji	M.Ü. Tıp Fakültesi Üye	Var	Yok	Evet	Hayır	
Prof.Dr. Semra SARIKAS	Genel	M.Ü. Erişim/Tıp Fak. Üye	Var	Yok	Evet	Hayır	
Prof.Dr. Başak DOĞAN	Diş Hekimi	M.Ü. Diş Hekimliği Fak. Üye	Var	Yok	Evet	Hayır	
Doç.Dr. ERFAYDINER KARAKOÇ	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	M.Ü. Tıp Fakültesi Üye	Var	Yok	Evet	Hayır	
Doç.Dr. Beste Metek ATASOY	Radyasyon Onkolojisi	M.Ü. Tıp Fakültesi Üye	Var	Yok	Evet	Hayır	
Doç.Dr. Meltem KÖRAY	Diş Hekimi	İstanbul Üni. Diş Hekimliği Fak. Üye	Var	Yok	Evet	Hayır	
Doç.Dr. Telga GÜVEN	Tıp Tarihi ve Etik	M.Ü. Tıp Fakültesi Üye	Var	Yok	Evet	Hayır	
Doç. Dr. Gürkan SERT	İç Hastalıkları	M.Ü. Tıp Fakültesi Üye	Var	Yok	Evet	Hayır	
Yrd.Doç.Dr. Figen DEMİR	Halk Sağlığı	Akademi Üyesi, Tıp Fak.	Var	Yok	Evet	Hayır	
Yrd.Doç.Dr. Pınar Maya TİBER	Biyoetik	M.Ü. Tıp Fakültesi Üye	Var	Yok	Evet	Hayır	
Av. Ümit ERDEM	Sağlık Memuru (özgeçmiş kişi)	Serbest	Var	Yok	Evet	Hayır	

Ek 4. Tez Çalışması İzin Yazısı

16/12/2013

Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar

Etik Kurulu Başkanlığı'na;

“Sertleşme Süresi Farklı Hızlandırıcılar İle Kısaltılan Mineral Trioksit Agregatın Daimi Diş Pulpa Kaynaklı Kök Hücreler Üzerindeki Sitotoksitesinin ve Rejeneratif Kapasitesinin İncelenmesi” başlıklı tez çalışmasının laboratuvar aşamaları Yeditepe Üniversitesi Mühendislik ve Mimarlık Fakültesi Genetik ve Biyomühendislik Bölümü’nde yürütülecektir.

Gereğini bilgilerinize arz ederim.



Prof. Dr. Gamze TORUN KÖSE

Yeditepe Üniversitesi Mühendislik ve

Mimarlık Fakültesi Genetik ve Biyomühendislik Bölümü

10. ÖZGEÇMİŞ

Adı	PINAR	Soyadı	KULAN
Doğum Yeri	KİLİS	Doğum Tarihi	08.06.1986
Uyruğu	T.C.	Tel	05057508548
E-mail	pnarkulan@gmail.com		

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora/Uzmanlık	Marmara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Pedodonti Anabilim Dalı	2015
Yüksek Lisans		
Lisans	Gazi Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi	2009
Lise	Hacı Mehmet Koçarslan Anadolu Lisesi	2004

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*
İngilizce	İyi	İyi	İyi

Yabancı Dil Sınav Notu #								
YDS	ÜDS	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE
	68,75							

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	87,977	86,658	84,633
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
MICROSOFT OFFICE	İyi

10.1. Uluslararası ve ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler

1. Kulan P, Pekiner F, Akyüz S. Oral Manifestations and Dental Management of CATCH 22 Syndrome: A Case Report. Marmara Üniversitesi Uluslararası Diş Hekimliği Bilimsel Kongresi, 30 Ağustos- 1 Eylül, İstanbul, 2012.
2. Kulan P, Durhan A, Tanboğa İ. Ön çapraz kapanış-18 ay takip: Olgu sunumları. . 19. Türk Pedodonti Derneği Kongresi, 4-7 Ekim, Antalya-Belek, 2012.
3. Peker S, Durhan A, Kulan P, Pisiriciler R, Kargul B. A Quantitative Analysis of Low Level Diode Laser on PDL cell survival. 12th Congress of the European Academy of Paediatric Dentistry, Sopot, Poland, 5–8 June 2014
4. Caglar E, Peker S, Durhan A, Kulan P, Kargul B. A quantitative analysis of a new storage medium for avulsed teeth. 12th Congress of the European Academy of Paediatric Dentistry, Sopot, Poland, 5–8 June 2014
5. Kulan P, Kargul B. The effect of several accelerants on setting time of mineral trioxide aggregate. 8th International Congress of Mediterranean Societies of Pediatric Dentistry, Istanbul, November 13-15, 2014.

10.2. Ulusal ve uluslararası yayınlar

1. Kulan P, Pekiner F, Akyüz S. Oral Manifestation and Dental Management of CATCH 22 Syndrome. Marmara Dent J, 1:46-48;2013.
2. Kargül B, Kulan P. Minimal İnvaziv Dişhekimliği: Klinik Dişhekimliğinde Bir Öncü. İstanbul Diş Hek Odası Dergi, 57:48-52;2014.
3. Caglar E, Peker S, Durhan A, Kulan P, Kuscu O, Pisiriciler R, Ak E, Kargul B, Sandalli N. A Quantitative Analysis of a Probiotic Storage Media for Avulsed Teeth. Acta stomatol Croat, 49(1):21-26;2015.