

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

**PULPA KUAFAJ MATERYALLERİNİN DİŞ  
PULPASI KÖKENLİ MEZENKİMAL KÖK  
HÜCRELER ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN  
İNCELENMESİ**

**DOKTORA TEZİ**

**İbrahim UMAR**

**İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ ve SELÇUK ÜNİVERSİTESİ  
DİŞ HASTALIKLARI ve TEDAVİSİ ANABİLİM DALI  
ORTAK DOKTORA PROGRAMI**

**DANIŞMAN**

**Doç. Dr. Muhammet YALÇIN**

**MALATYA-2014**

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

**PULPA KUAFAJ MATERYALLERİNİN DİŞ  
PULPASI KÖKENLİ MEZENKİMAL KÖK  
HÜCRELER ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN  
İNCELENMESİ**

**İbrahim UMAR**

**Danışman Öğretim Üyesi: Doç.Dr. Muhammet YALÇIN**

**Ortak Tez Danışmanı: Prof.Dr. Bora ÖZTÜRK**

**Bu araştırma İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından**

**2013/81 Proje numarası ile desteklenmiştir**

**MALATYA-2014**

**ONAY SAYFASI**

iii

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

Bu çalışma jürimiz tarafından Dış Hastalıkları ve Tedavisi Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

İmza

Jüri Başkanı,  
Ortak Tez Danışmanı

Prof. Dr. Bora ÖZTÜRK  
Selçuk Üniversitesi



Danışman

Doç. Dr. Muhammet YALÇIN  
İnönü Üniversitesi



Üye

Doç. Dr. Mustafa ÜLKER  
Selçuk Üniversitesi



Üye

Doç. Dr. Cemal YEŞİLYURT  
Karadeniz Teknik Üniversitesi



Üye:

Yrd. Doç. Dr. Hacer TURGUT  
İnönü Üniversitesi



ONAY :

Bu tez, İnönü Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu ...../...../ 20.... tarih ve 20.../.....sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Yusuf TÜRKÖZ  
Enstitü Müdürü

## TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim ve tez çalışmam sırasında bilgi, deneyim ve desteğini esirgemeyen tez danışman hocam Sayın Doç. Dr. Muhammet YALÇIN'a,

Çalışma zemininin hazırlanması ve gerekli şartların sağlanması için her türlü desteği sağlayan ve tez çalışmamın her aşamasında bilgi ve deneyimi ile katkıda bulunan Sayın Prof. Dr. Erdal KARAÖZ ve Dr. Ayça AKSOY'a,

Bu uzun süreçte desteklerini ve sabırlarını esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Hacer TURGUT' a ve Yrd. Doç. Dr. Burak DAYI' ya ve çalışma arkadaşlarım Arş. Gör. Dt. Reyhan ŞİŞMAN' a ve Arş. Gör. Dt. Hakan KAMALAK' a;

Bu projeye maddi destek sağlayan İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeler Birimi Başkanlığı'na

Eğitim dönemim boyunca her konuda beni destekleyen eşime ve kızıma,  
Hayatım boyunca bana destek olup bugünlere gelmemi sağlayan anne ve babama,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım...

## ÖZET

**Amaç:** Bu çalışmanın amacı, pulpa kuafajında kullanılan kuafaj materyallerinin diş pulpası mezenkimal kök hücreleri (DP-MKH) üzerindeki etkilerinin, sitotoksik ve odontojenik farklılaştırma yönünden incelenmesidir.

**Gereç ve yöntem:** Çalışmada güncel kuafaj materyalleri olan Biodentine, MM-MTA, BioAggregate ve TheraCal'in sitotoksik etkilerini belirlemek amacıyla DP-MKH üzerinde WST-1 testi gerçekleştirilmiştir. Odontojenik farklılaştırma deneyi için ise, DP-MKH' ler ve kuafaj materyallerinden oluşturulan diskler (5x2 mm) odontojenik indüksiyon besisi yerinde ortak kültüre edilerek, odontojenik farklılaştırmanın bir belirteci olan Alkalen fosfataz (ALP) aktivite testi yapılmıştır.

**Bulgular:** WST-1 testi sonuçlarına göre, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında kuafaj materyallerinin tümünde sitotoksik etki gözlemlenmiştir. TheraCal diğer kuafaj materyallerinden daha fazla sitotoksik etki göstermiştir. Materyaller arasında en yüksek odontojenik farklılaştırma potansiyeli TheraCal grubunda gözlemlenmiştir. Biodentine ve MM-MTA ise kontrol grubu ile karşılaştırıldığında düşük ALP aktivitesi göstermiştir.

**Sonuç:** Yeni geliştirilen pulpa kuafaj materyalleri, yeni doku oluşumunu uyarmada üstün özelliklere sahip olsalar bile sitotoksikite yönünden dikkatli olunmalı ve ilave çalışmalar yapılmalıdır.

**Anahtar Kelimeler:** Diş Pulpası Kök Hücreleri, Sitotoksikite, ALP aktivitesi, Pulpa kuafajı.

## ABSTRACT

### **Investigation of the Effect of Pulp Capping Materials on Mesenchymal Dental Pulp Stem Cells**

**Purpose:** The aim of this study is to examine the effects of the capping materials used in pulp capping on dental pulp mesenchymal stem cells (DP-MSC) in terms of cytotoxic and odontogenic differentiation.

**Method and Materials:** In this study, in order to determine the cytotoxic effects of the current capping materials like Biodentine, MM-MTA, BioAggregate and TheraCal, a WST-1 test was applied upon DP-MSC. Furthermore, to assay the odontogenic differentiation, disc-shaped (5x2 mm) specimens of capping materials and DP-MSCs were common cultered in odontogenic induction medium and Alkaline Phosphatase (ALP) activity which is a marker of odontogenic differentiation, was tested.

**Results:** According to the WST-1 test, cytotoxic effect compared with the control group was observed in all of the capping materials. TheraCal was observed to be more cytotoxic than the other capping materials. The highest potential of odontogenic differentiation between materials was observed in TheraCal group. Biodentine and MM-MTA had low ALP activity when compared with control group.

**Conclusion:** Even though the newly developed pulp capping materials have superior properties to stimulate new tissue formation, it is needed to be careful in terms of cytotoxicity and further studies should be performed.

**Key Words:** Dental Pulp Stem Cells, Cytotoxicity, ALP activity, Pulp capping.

## İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI .....	iii
TEŞEKKÜR .....	iv
ÖZET .....	v
ABSTRACT .....	vi
İÇİNDEKİLER .....	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
TABLolar DİZİNİ .....	xi
1.GİRİŞ .....	1
2.GENEL BİLGİLER .....	4
2.1.Kök Hücre Kavramı .....	4
2.1.1.Kök Hücrelerin Genel Özellikleri .....	4
2.2.Diş Pulpası Kaynaklı Kök Hücreler (DP-KH).....	6
2.3.Pulpa Kuafajı .....	9
2.3.1.İndirekt Pulpa Kuafajı .....	10
2.3.2.Direkt Pulpa Kuafajı.....	10
2.4.Dentin Köprüsü Oluşumu .....	12
2.5.Kuafaj Materyallerinin Dentin Pulpa Kompleksi Üzerine Etkileri .....	13
2.6.Biyouyumluluk.....	16
2.6.1.Pulpa Kuafaj Materyallerinde Biyouyumluluk .....	17
2.6.2.Sitotoksosite.....	18
2.6.3.Hücre Kültürü .....	19
3.GEREÇ ve YÖNTEM .....	21
3.1.Kök Hücrelerin Çözdürülmesi ve Proliferasyonları .....	21
3.1.1.Hücrelerin Dondurularak Saklanması ve Çözdürülmesi.....	22
3.2.Test Materyal Örneklerinin Hazırlanması .....	23
3.3.Sitotoksosite ve Odontojenik Farklılaştırma Testlerinin Yapılması .....	25
3.3.1.Test Materyallerinin Sitotoksitesinin WST-1 Canlılık Testi İle Belirlenmesi.....	25
3.3.2.Odontojenik Farklılaşmanın Değerlendirilmesi .....	27

3.4.Verilerin değerlendirilmesi .....	29
4. BULGULAR.....	30
4.1.WST-1 Testi Bulguları .....	30
4.2.ALP Aktivitesi Bulguları.....	32
4.3.Morfolojik Bulgular .....	34
5.TARTIŞMA.....	36
5.1.Odontojenik Farklılaştırma Bulgularının Tartışılması.....	38
5.2.Sitotoksisite Bulgularının Tartışılması .....	43
6. SONUÇ ve ÖNERİLER .....	47
KAYNAKLAR .....	48
EKLER.....	63
EK. 1: Etik Kurul Onayına Gerek Olmadığına Dair Belge .....	63
ÖZGEÇMİŞ.....	64



**SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ**

<b>ALP aktivitesi</b>	:Alkale fosfataz aktivitesi
<b>Ca(OH)<sub>2</sub></b>	:Kalsiyum Hidroksit
<b>DMEM</b>	:Dulbecco'nun modifiye Eagle esansiyel vasatı
<b>DP-KH</b>	:Dis pulpası kaynaklı kök hücre
<b>EKH</b>	:Embriyonik kök hücre
<b>FBS</b>	:Fetal sığır serumu
<b>iDP-MKH</b>	:İnsan Diş Pulpası Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre
<b>MEM</b>	:Minimal esansiyel medium
<b>MKH</b>	:Mezenkimal kök hücre
<b>MTA</b>	:Mineral trioksit aggregate
<b>PBS</b>	:Fosfat tampon solüsyonu
<b>SKH</b>	:Somatik kök hücre
<b>µg</b>	:Mikrogram
<b>µl</b>	:Mikrolitre

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3. 1. KÖGEM’ de bulunan laminar akışlı steril kabin. ....	22
Şekil 3. 2. A)Faz kontrast mikroskobu, B) Kültür ortamında iğ şekilli diş pulpası kök hücrelerinin faz kontrast mikroskop görüntüsü.....	23
Şekil 3. 3. Çalışmada kullanılan kuafaj materyalleri ve 5x2 boyutunda hazırlanmış diskler.....	24
Şekil 3. 4. Monokromatik sistemli mikropilaka okuyucu .....	25
Şekil 3. 5. CO <sub>2</sub> inkübatör .....	26
Şekil 3. 6. Çalkalamalı su banyosu .....	28
Şekil 3. 7. Soğutmalı santrifüj .....	29
Şekil 4. 1. DP-MKH’ lerinin test materyalleri ile 1, 4, 7 ve 14 gün süresince ortak kültürü sonrasında gerçekleştirilen WST-1 testi sonuçlarının grafiksel gösterimi.....	31
Şekil 4. 2. DP-MKH’ lerinin odontojenik indüksiyon ortamında test materyalleri ile ortak kültürünün 1., 7. ve 14. günlerindeki ALP aktivite değerlerinin grafiksel gösterimi.....	323
Şekil 4. 3. DP-MKH’lerinin odontojenik indüksiyon ortamında test materyalleri ile ortak kültürünün faz kontrast mikroskopik görüntüleri .....	34

**TABLULAR DİZİNİ**

Tablo 3. 1. Tez çalışmasında kullanılan kuafaj materyalleri.....	24
Tablo 4. 1. DP-MKH üzerinde sitotoksik etkisi incelenen materyallerin 1,4,7 ve 14. günün sonunda elde edilen hücre canlılık değerleri.....	30
Tablo 4. 2. DP-MKH' lerinin 1,7 ve 14. günün sonunda test materyalleri etkisiyle gösterdikleri ALP aktivite değerleri. ....	32

## 1.GİRİŞ

Tüm dünyada koruyucu ve restoratif diş hekimliği uygulamaları giderek yaygınlaşmasına rağmen, çürük nedeniyle erken dönemde diş kayıpları oluşmaktadır. Dişlerin erken kaybı, malokluzyonlara, çiğneme fonksiyonlarındaki kayıplar nedeniyle beslenme bozukluklarına, psikolojik problemlere ve konuşma bozukluklarına yol açabilmektedir. Bu nedenlerle, oral dokuların bütünlüğünün korunması amacıyla koruyucu diş hekimliği uygulamaları ile çeşitli restoratif tedavilere gereksinim vardır (1).

Pulpa tedavilerinin temel amacı çürük dışındaki nedenlerle açığa çıkan minimal orandaki pulpa dokusunun canlılığının korunmaya çalışılması ve devam ettirilmesidir. Direkt pulpa kuafajı, mekanik olarak veya travma nedeniyle açığa çıkan pulpa dokusunun çeşitli biomateryallerle örtülmesi esasına dayanır (2). İşlem, bu yönüyle konservatif ve rejeneratif bir tedavi yöntemidir.

Dentin-pulpa kompleksi tersiyer dentinin oluşumuna yol açan doğal rejeneratif bir potansiyele sahiptir. Odontoblastlar, atrizyon ya da erken çürük lezyonları gibi hafif hasarlarda, canlılığını sürdürebilir ve reaksiyoner bir dentin matris salgılar (3). Ancak, ilerlemiş çürük veya restoratif prosedürler gibi daha büyük şiddette bir travma, önceden var olan odontoblastların ölümüne yol açabilir (4). Dentin-pulpa ara yüzünde, uyaranlara yanıt olarak, atubuler reperatif dentin sentezi için, yaralanma yerinde yeni odontoblastlar farklılaşır ve görevlendirilir. Bu reperatif dentin pulpa canlılığını korumak amacıyla, hemen yoğun hasarlı doku altında mineralize bir doku 'köprü' temin eder (5). Bu konudaki çalışmalar göstermiştir ki post natal pulpa, reperatif dentin oluşumuna aracılık etmede önemli bir yere sahip olan kök hücrelerin çeşitli nişlerini içeriyor. Gerçekten de, kök hücre nişleri yara iyileşmesi sürecinde temel bir rol oynayan, vücudun tüm bağ dokusunda, sürekli olarak üretiliyor (6). Bu farklılaşmamış hücrelerin alt kümesi toplam hücre popülasyonunun % 1' i kadar azını temsil edebilir. Bununla birlikte, spesifik hücre dışı sinyallere yanıt olarak birçok son derece farklı hücre tiplerine dönüşür. Nadiren görülen, ancak neredeyse

sınırsız şekilde kendi kendini yenileyen ‘asıl’ yetişkin veya ‘ana’ kök hücreler nişin merkezine doğru bulunurlar (5).

Canlı dokular, doku gelişimi ve tamirinden sorumlu kök hücre veya öncü hücreleri barındırmaktadır. Kök hücreler, uzun zaman dilimleri boyunca bölünebilme, kendilerini yenileyebilme, özelleşmiş hücrelere kaynaklık etme ve hasar sinyallerini algılama özellikleriyle vücuttaki diğer hücrelerden farklı, özelleşmemiş hücrelerdir. Bu hücreler, embriyonik gelişimde ve organların oluşmasında ve hasarlı dokuların tamir edilmesinde önemli rol oynamaktadır (7).

Öncü hücreler, insanların postnatal dokularında görülmüştür. Bu hücreler sınırlı yaşam sürelerine sahip olmaları ile organizmanın hayatı boyunca var olan kök hücrelerden ayrılırlar ve sadece belirli doku tiplerini oluşturmak için farklılaşabilirler (8).

Kök hücre terimi 1909 yılında, bilimsel olarak kullanılmak üzere rus histolog Alexander Maksimov tarafından önerilmiştir. Alexander Maksimov, çoğalmasına ve ileri hücrelere farklılaşmasına izin veren mikro ekolojik çevreye (niş) kan boyunca köç etme yeteneğine sahip morfolojik olarak lenfosit görünümünde hematopoetik kök hücrelerin varlığı bildiren ilk kişidir (9).

Günümüzde kök hücre biyolojisi; hastalıklar, travma, kanser ve doğumsal bozukluklar sonucu hasar gören doku ve organların işlevselliğinin onarılması, iyileştirilmesi ve rejeneratif tıp uygulamaları bakımından önemli bir yere sahiptir (10).

Kök hücreler, embriyonik kök hücreler (EKH) ve erişkin kök hücreleri (Somatik kök hücre SKH) olarak iki temel kategoriye ayrılırlar (11). Embriyonik kök hücreler, yüksek telomeraz aktivitesine sahip, her üç germ yaprağına ait (ektoderm, endoderm ve mezoderm) doku ve organların hücrelerine dönüşebilme yeteneğindedirler ve 200’ den fazla hücre tipini geliştirme yeteneğine sahiptir (12). Embriyonik kök hücreleri, embriyolardan elde edilir, erken morula aşamasındaki embriyonun blastosit iç hücre kitlesinden (4-5 günlük erken aşamasındaki embriyo, 50-150 hücreden oluşur) türetilmiş hücrelerdir. Embriyonik kök hücreler sahip oldukları farklılaşma

potansiyelleri açısından çok üstün olmalarına karşın, araştırmalardaki en önemli sorun bu hücrelerin bir canlıya nakilleri sonrası “teratom” gelişim riskidir (13).

Somatik kök hücreler ise kemik iliği, kordon kanı, periferik kan başta olmak üzere vücuttaki çeşitli doku ve organlardan (kemik iliği, periferik kan, diş pulpası, iç kulak, göbek kordon kanı, nazal mukoza, amniyotik sıvı ve plasenta membranı) izole edilebilmektedir (14-19).

Ancak, somatik kök hücrelerin, EKH’ lere oranla çoğalma ve farklılaşma potansiyellerinde kısıtlamalar bulunmaktadır. Bunun yanında, EKH’ lerin gelecekte insanlar için tedavide kullanılabilmesinin önünde bulunan etik ve teratom oluşturma riski gibi nedenlerle somatik ya da erişkin kök hücreler önemli alternatif kaynaktırlar (20).

Diş pulpasının perivasküler nişinde (yatağında) yer alan ve “diş pulpası mezenkimal kök hücreleri (DP-MKH)” olarak adlandırılan hücre popülasyonunun izolasyonu, ilk olarak 2000 yılında Gronthos ve ekibi tarafından gerçekleştirilmiş ve aynı ekip tarafından, bu hücrelerin odontoblastik, adipojenik ve nöral hücre tiplerine farklılaşması gösterilmiştir (14, 21). Sonraki çalışmalarda, benzer olarak diş pulpası kaynaklı mezenkimal kök hücrelerinin in-vitro koşullarda düz kas (22), kıkırdak (23) ve sinir hücrelerine (24) farklılaşma potansiyeline sahip oldukları rapor edilmiştir.

Tez kapsamındaki bu çalışmanın amacı diş hekimliği pratiğinde direkt veya indirekt kuafaj tedavisi uygulanması gereken durumlarda kullanılan dört farklı güncel kuafaj materyalinin, disk haline getirilmiş formlarının laboratuvar ortamında izolasyonları ve karakterizasyonları yapılmış diş pulpası kökenli mezenkimal kök hücreler üzerindeki odontojenik farklılaştırma ve sitotoksosite yönünden etkilerinin incelenmesidir.

## 2.GENEL BİLGİLER

Diş hekimliği pratiğinde uygulanan kuafaj tedavisi sırasında ve sonrasında uygulanan materyalleri ve iyileşme sürecinin anlaşılabilmesi için kuafaj materyallerinin, pulpa yapısının ve hücrelerinin iyi bilinmesi gerekmektedir. Bu bölümde kök hücrelerin genel özelliklerinin yanında çalışmada kullanılan insan diş pulpası mezenkimal kök hücreleri ve kuafaj materyallerine ilişkin literatür bilgisine yer verilmiştir. Ayrıca kuafaj, pulpa yapısı, odontojenik farklılaşma ve iyileşme süreçlerine ilişkin bilgilerle birlikte, gerçekleştirdiğimiz çalışmanın hedeflerinin daha anlaşılır hale gelmesi amaçlanmıştır.

### 2.1.Kök Hücre Kavramı

Kök hücreler insan vücudunda bütün dokuları ve organları oluşturan ana hücrelerdir. Kök hücreler uzun zaman dilimleri boyunca bölünebilme ve kendilerini yenileyebilme yeteneğine sahip, özelleşmemiş hücreler olup, kök hücreden elde edilen bir hücre özelleşmiş hücrelere kaynaklık edebilir (25).

#### 2.1.1.Kök Hücrelerin Genel Özellikleri

Bir hücreyi, kök hücre olarak tanımlamak için beş gerekli ölçüt vardır (26).

- Kök hücreler, uzun zaman boyunca bölünebilme ve kendilerini yenileyebilme kabiliyetine sahiptirler. Kök hücre, yaşadığı sürece kendi kopyasını alacak şekilde, özelleşme olmadan çoğalmakta ve gerektiğinde organ ve dokuya özgü öncü hücrelere dönüşmektedir. Kök hücreler bölünmeler esnasında bir yandan öncü hücreye farklılaşarak hücreyi üretirken bir yandan da kendi yedeğini oluşturmaktadır. Bu bir *asimetrik hücre bölünmesidir* (Kök hücre + Öncü hücre) ve kök hücre havuzunun yaşam boyu sabit kalmasını sağlar (27).
- Kök hücreler, özelleşmemiş hücrelerdir. Bir kök hücrenin temel özelliklerinden biri de, bu hücrenin özelleşmiş işlevleri yerine getirebilecek herhangi bir dokuya özgün yapıya sahip olmayışıdır (28).

- Kök hücrelerin özelleşmiş hücrelere kaynaklık etme yetenekleri “plastisite (farklılaşma)” olarak adlandırılmaktadır. Kök hücreler, buldukları evrelere göre, farklı potansiyel özellikler gösterirler (29).
- Totipotent hücreler, zigot evresindeki, 8 hücrelik blastomer evresindeki sınırsız farklılaşma yeteneğine sahip hücrelerdir. Totipotent özelliği bilinen tek kök hücre tipi, embriyonun gelişim sürecinde organizmayı oluşturan tüm doku ve hücre çeşitlerine farklılaşma kapasitesine sahip, fertilize yumurta hücresidir. Bu hücreler, embriyon ve embriyon dışı membran ve organların kaynağını oluşturmaktadır (30).
- Pluripotent hücreler, mezodermal (kemik, kas, kan, kıkırdak vb), ektodermal (nöron, deri, saç vb) ve endodermal (hepatositler, pankreatik beta hücreleri, sindirim sistemi hücreleri) hücrelere farklılaşma göstermekte, buna karşılık multipotent kök hücreler tek bir germ yaprağına ait hücrelere farklılaşabilmektedir (31). Pluripotent kök hücrelerin vücuttaki farklılaşmış bütün hücre tiplerini oluşturabilme potansiyeline sahip “gerçek kök hücreler” olduğu belirtilmektedir (32).
- Oligopotent kök hücreler lenfoid ve myeloid kök hücreleri gibi az sayıda hücre grubuna dönüşebilirler.
- Unipotent kök hücreler sadece tek hücre tipini yani kendilerini oluşturabilirler. Ancak kendilerini yenilerken kök hücre özelliklerini korurlar.

Erişkin bireylerin dokularında var olan multipotent kök hücreler ise, kültür koşullarında çok miktarda çoğaltılabilmekte ve organizmada, gerçekleşen doku ve organ hasarlarında, ilgili dokuların hücrelerine farklılaşarak tamirin gerçekleşmesini sağlamaktadır. Multipotent kök hücreler, EKH’ lerle karşılaştırıldığında sınırlı bir farklılaşma yeteneğine sahiptirler (33).

- Kök hücreler, hasarlı organların tedavisi amacıyla gerçekleştirilen nakillerde, kaynak dokunun işlevsel olarak tekrar çoğaltabilmesine olanak sağlamaktadır (34).
- Kök hücreler, *in vivo* koşullarda doku hasarının gerçekleşmediği durumlarda bile farklılaşmış diğer hücrelere katkı sağlamaktadır (35).



Kök hücrelerin, buldukları doku hücrelerinin dışında kalan diğer tip hücrelere de farklılaşabileceği belirlenmiştir. Somatik dokulardan elde edilen bu kök hücre kaynaklarından özellikle de mezenkimal kök hücreler (MKH) önem kazanmıştır. Oral ve maksillofasiyal bölgede de alternatif mezenkimal kök hücre kaynakları bulunmaktadır. Erişkin diş pulpası, apikal papilla, dental folikül, eksfoliyeye süt dişi ve periodontal ligamentten mezenkimal kök hücreler elde edilebilmektedir (36, 37).

## **2.2.Diş Pulpası Kaynaklı Kök Hücreler (DP-KH)**

Diş tabakasının gelişimi ektodermden kaynak almaktadır. Ektodermal yapı diş germelerini oluştururken, nöral kabartı hücrelerinden de diş organı, diş papillası ve diş folikülü farklılaşmaktadır. Bu nedenle, diş pulpası ektodermal kaynaklı nöral kabartı hücrelerini de kapsayan mezenkimal bileşenler içermektedir.

Diş pulpasının damarları çevresinde yer alan ve “diş pulpası kök hücreleri (DP-KH)” olarak adlandırılan hücre popülasyonunun MKH oldukları düşünülmektedir. Bu nedenle dental pulpa kök hücreleri, dental pulpa mezenkimal kök hücreleri olarak da adlandırılmaktadır. Bu hücreler, yüksek proliferasyon gösterebilen, klonlanabilen ve yüksek plastisite yeteneğine sahip multipotent hücrelerdir (14).

1990’ lı yılların ortalarında, diş pulpasından öncül hücrelerin elde edildiği bildirilmiştir. Daha sonra, MKH’ lerinin, gömük yirmi yaş diş pulpasından da elde edildiği belirtilmiştir. DP-KH’ lerin izolasyonu ve tanımlanması, ilk olarak 2000 yılında Gronthos ve ekibi tarafından gerçekleştirilmiş ve aynı ekip tarafından, bu hücrelerin odontoblastik, adipojenik ve nöral hücre tiplerine farklılaşması gösterilmiştir. Pulpa dokusundan kök hücrelerin izolasyonu oldukça etkili şekilde gerçekleştirilebilmektedir. DP-KH’ lerin kemik iliği kökenli kök hücrelerden, hücre döngüsü ile ilişkili genleri eksprese etmeleri nedeni ile ayırt edilebildiği belirtilmektedir. Bu sonuçlar, DP-KH’ lerin MKH’ ler ile karşılaştırıldığında yüksek proliferasyon hızına sahip olduğuna ilişkin bulgular ile uyumluluk göstermektedir. DP-KH’lerin kolay izole edilebilmesi ve daha yüksek bir proliferasyon hızı göstermeleri, bu hücreleri kemik iliği mezenkimal kök hücreleri (Kİ-MKH)’lerden

üstün kılmaktadır. Diş kök hücreleri, damarların çevresinde lokalize olmaktadır ve kök hücre belirteci olan Stro-1(hücre yüzey proteini)' i eksprese etmektedir (20, 38).

Bundan dolayı DP-KH' lerinin hücresel özellikleri, kemik iliği kök hücrelerine benzetilmektedir. Hem diş pulpası hemde kemik iliği kök hücre popülasyonları CD44, CD106, CD146, 3G5 ve Stro-1 gibi kabul edilmiş benzer kök hücre yüzey belirteçleri sergilerler. Bunlar her ikisinde de, alkalen fosfataz, osteokalsin ve osteopontin gibi mineral dokusu oluşumu ile ilişkili matriks proteinlerini ifade eder (39).

DP-KH' lerin başlıca farklılaşma potansiyeli dentin ya da diş kökünü saran bağ doku ile ilişkili hücrelerin oluşumunda etkili olmaktadır. Bu kök hücreler pulpa, diş çevreleyen bağ dokusu ya da diş folikülünden köken almaktadır. Diş dokularındaki kök hücrelerin farklı kaynaklardan elde edilebilmesi mümkündür;

- Diş çevreleyen bağ dokudan alınan kök hücreler, ( *PDLSC* )
- Süt dişlerinden alınan kök hücreler, ( *SHED* )
- Gelişimini tamamlamış daimi dişlerden alınan kök hücreler, ( *DPSCs* )
- Gelişimi devam etmekte olan daimi dişlerden alınan kök hücreler;
  - Apikal papilladan elde edilen kök hücreler ( *SCAP* )
  - Diş folikülünden alınan kök hücreler ( *DFCs* )
  - Diş jerminden alınan kök hücreler ( *TGSCs* )

Diş epitelinden elde edilen kök hücreler (ektodermal kök hücreler) dışındaki, diş kök hücrelerinin tümü, nöral-kabartı kaynaklı ektomezenkimal hücrelerdir. Bu kök hücreler, dentin ve diş dokularının gelişiminde gelişim ve hücresel farklılaşma süreçlerine katılmaktadır (20).

DP-KH' lerin gen ekspresyonlarının belirlenmesi ve bu genlerin fonksiyonel sınıflandırılmasının gerçekleştirilmesi ile bu hücrelerin alkalen fosfataz, dentinmatriks protein-1, dentin siyalofosfoprotein ekspresyonları gösterilmiştir. Gen ekspresyon analizleri, eksprese edilen genlerin çoğunun ekstraselluler matriks bileşenleri, büyüme faktörleri ve hücre adezyon moleküllerini kodladığını ortaya

koymuştur. Gen ekspresyon düzeyleri, hücre sinyalleri, hücrel etkileşimler ve hücre metabolizmasını düzenleyici etki göstermektedir (38).

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

- Bu hücrelerin elde edilmesi oldukça kolaydır,
- Pulpa dokusundan elde edilen kök hücre ekstraksiyonu daha yüksek etkinlik göstermektedir,
- Yüksek farklılaşma yeteneğine sahiptirler,
- Biyomateryallerle birlikte gerçekleştirilen uygulamalarda dokuların yeniden yapılandırılması için etkin olarak kullanımları mümkündür,
- Yaşam süreleri uzundur, Güvenli olarak kriyoprezervasyonları mümkündür (40).

DP-KH güvenli bir şekilde dondurulabilen, immunsupresif özelliklere sahip ve mezenkimal markırları eksprese edebilen, yaygın olarak çoğalan (en az 25 pasaj süren) multipotent hücrelerdir (9). Buna ek olarak, dişlerden elde edilen kök hücreler, kültür ortamında bol miktarda sitoplazmaya ve sitoplazmik uzantılara sahip, geniş bir merkezi çekirdeği olan büyük iğ şeklindeki hücrelerdir. Bu yapışan hücreler kemik iliğinden elde edilen mezenkimal kök hücrelerle morfolojik olarak aynıdır (14).

Sağlıklı insan dişinden elde edilen DP-KH' lerin dondurularak saklandıktan sonra çözdürülmesiyle elde edilen yüksek hücre canlılık oranları bu hücrelerin gerektiğinde kullanılmak üzere, numune saklama bankalarında da saklanabileceğini ortaya koymuştur (22).

Zhang ve ark, (41) olgun diş pulpasından aldıkları hücrelerin, dondurulmuş olsalar dahi nöron, odontoblast, yağ, kas ve kıkırdak hücresi gibi beş farklı hücre tipine dönüşebildiğini göstermişlerdir. Bu çalışmanın devamında, diş pulpası kök hücrelerinin in vivo olarak, odontojenik, miyojenik (kas hücresi) ve adipojenik (yağ hücresi) farklılaşmaları da bildirilmiştir (42).

Diş pulpası mezenkimal kök hücre (DP-MKH)' ler, anti-inflamatuar ve immün-düzenleyici özelliktedir. Bu hücreler, pulpa kaynaklı ve diş destek dokularının enfeksiyonlarında, bağışıklık yanıtının oluşumunda rol oynamaktadırlar. Allojenik dokulara transplante edildiklerinde ise immunolojik tolerans gelişimini uyarılmaktadırlar. DP-MKH' ler, bağışıklık sistemini baskılayıcı etkilerini T-lenfositlerin proliferasyonunu inhibe ederek göstermektedirler (43).

Üçüncü molar dişlerden elde edilen insan diş pulpa mezenkimal kök hücreleri (iDP-MKH)' lerin dentin-yapıcı odontoblastlar (21), osteoblastlar (44), yağ hücreleri (21, 45), iskelet/düz kas hücreleri(22), endotel hücreleri (22), kıkırdak hücreleri (41) ve sinir hücrelerine (22, 41) farklılaşabildiği gösterilmiştir. Aynı zamanda bu hücreler, osteoblastlara özgü karakteristik özellikler de göstermiştir. Bu çalışmalar, diş pulpası kök hücrelerinin mezenkimal ve mezenkimal olmayan dokuların hücrelerine farklılaşabildiğini göstermektedir. DP-MKH' ler, bu özellikleriyle dentin, periodontal doku ve kemiksi kıkırdak dokuların onarılmasında, bağışıklık sistemi, kas hastalıkları ve bağ doku hasarlarının tedavisine yönelik klinik uygulamalarda önemli bir kullanım potansiyeline sahiptir (22).

### **2.3.Pulpa Kuafajı**

Vital pulpa tedavisi, çürük, travma, restoratif prosedürler nedeniyle bozulmamış fakat tehlike altında olan sağlıklı pulpanın doku bütünlüğünü ve sağlığını sürdürmek amacıyla tanımlanan tedavilerdir. Bu tedavilerde öncelik dişlerin vitalitesinin korunmasıdır.

Pulpa kuafajı olarak kullanılması düşünülen bir materyalin enfeksiyonu kontrol edebilmesi, dentine çok iyi bağlanabilmesi, mikrosızıntıyı önleyebilmesi, biyouyumlu olması, klinik olarak kolay yerleştirilebilmesi ve dentin köprüsü oluşumunu uyarabilmesi gibi birçok özelliğe sahip olması gerekmektedir (46). Bu materyaller aynı zamanda antiseptik olmalı, alkalın reaksiyon göstermeli, çürük nedeniyle oluşan asitleri nötralize edebilmeli ve genişleme göstermemelidir. Isısal izolasyon ve sedasyon da direkt pulpa kuafajı ajanlarından beklenen özellikler

arasında yer almaktadır (47). Yıllardır birçok direkt pulpa kuafaj materyali deneysel olarak uygulanmıştır (48). Bunlar arasında, hidroksi apatit kristalleri, mine matriks türevleri, rekombinant insan osteojenik proteinleri, kemik sialoproteinleri, demineralize dentin matriksi, kalsiyum hidroksit içerikli rezinler, tetrakalsiyumfosfat simanlar, hiyaluronik asit, büyüme faktörleri, dental adeziv sistemler ve mineral trioksit agregat sayılabilir (49-51).

### **2.3.1.İndirekt Pulpa Kuafajı**

Pulpa dejenerasyonunun belirti ve semptomlarının bulunmadığı, pulpaya yakın derin çürük lezyonlu dişlerde indirekt pulpa kuafajı önerilmektedir. Bu tedavi yöntemi ile çürüğün ilerleme hızının azaltılması, dentin sklerozu ve tersiyer dentin oluşumunun stimüle edilmesi ve etkilenmiş dentinin remineralizasyonunun sağlanarak pulpanın canlılığının korunması amaçlanır (52, 53).

### **2.3.2.Direkt Pulpa Kuafajı**

Sağlıklı pulpa dokusunun restoratif tedaviler sırasında açığa çıktığı durumlarda dişlerin canlılığını koruyabilmek amacıyla uygulanan diğer bir tedavi yöntemi de direkt pulpa kuafajıdır (54). McDonald ve Stanley, bilinen ilk vital pulpa tedavisinin 1756 yılında Philip Pfaff tarafından perfore olmuş vital pulpanın üzerine çok küçük bir altın parçası uygulanarak yapıldığını bildirmişlerdir (55).

Asemptomatik bir dişte açığa çıkan pulpa dokusunun 1 mm'lik bir çapı geçmeyecek büyüklükte olması ve oral sıvılarla kontamine olmaması direkt pulpa kuafajı için endikasyon oluşturmaktadır. Çürük nedeniyle pulpanın açığa çıktığı veya kanamanın kontrol edilemediği, spontan ağrı, perküsyon ve palpasyon hassasiyeti varlığı ise direkt pulpa kuafajı işlemi için kontrendike durumlardır (56).

Pulpa ekspozlarında tedavi amacıyla kullanılan materyal ve yöntemlerin yanı sıra bakteriyel invazyonun da tedavi başarısı üzerindeki etkisini araştıran Kakehashi

(57), ratlarda yaptığı çalışmada deneysel pulpa ekspozunu takip eden 8. günde pulpa dokusunda parsiyel, 14. günde ise total nekroz gelişimini tespit etmiştir. Araştırmacı aynı çalışmada bakterisiz ortamda ekspoz edilen dişlerde 32. günde tüm pulpa dokusunun normal ve sağlıklı olduğunu saptamış ve ekspoz bölgesinde dentin köprüsü oluşumu gözlemlemiştir. Kakehashi ile aynı görüşü paylaşan birçok araştırmacı, herhangi bir inflamasyon veya enfeksiyon belirtisi göstermeyen dişlerde oral sıvılarla kontaminasyon nedeniyle, bakteriler ve bakteri ürünlerinin pulpa üzerinde olumsuz etkiler oluşturduğunu ve direkt pulpa kuafajının başarı oranını azalttığını bildirmektedirler (58).

Direkt pulpa kuafajlarının başarısını etkileyen diğer bir faktör de pulpa ekspozunun büyüklüğüdür. Araştırmalar, direkt pulpa kuafajı uygulanabilmesi için ekspoz pulpa çapının 1 mm 'den küçük olması gerektiğini ortaya koymaktadır (52, 59). Geniş perforasyonlarda, pulpa dokusundaki yaralanmanın ve kanamanın, dolayısıyla hasarın daha büyük olacağı ve buna bağlı olarak şiddetli inflamatuvar reaksiyonların gelişeceği düşünülmektedir. Öte yandan aşırı küçük ekspozlarda tedavi amacıyla kullanılan materyalin pulpaya temas edememesinin de başarıyı olumsuz yönde etkilediği belirtilmektedir (58, 59).

Dikkat edilmesi gereken diğer bir durum ise, pulpal perforasyonun hangi yolla meydana geldiğidir. Yapılan retrospektif bir çalışmada mekanik nedenlerle ekspoz olan dişlere uygulanan direkt pulpa kuafajlarının başarısının % 92.2 olduğu belirtilirken, bu oranın çürükle ekspoz olan dişlerde % 33.3'te kaldığı bildirilmiştir (60). Travma ve çürük nedeniyle oluşan perforasyon sonrasındaki pulpa reaksiyonlarını histolojik olarak karşılaştırdıklarında, travma ile ekspoz olan grupta çürük grubuna göre pulpada daha az inflamatuvar hücre bulunduğunu tespit etmişlerdir(61).

Araştırmacılar bu sonuçların ışığı altında direkt pulpa kuafajının sadece travma ile veya mekanik nedenlerle ekspoz olan pulpaya uygulanabileceğini söylemektedirler. Çürük nedeniyle ekspoz olan dişlerde direkt pulpa kuafajı, pulpa

içine sızan bakteriyel toksinlerin inflamasyon sürecini başlatabilmesi ve bu süreci hızlandırabilmesi nedeniyle önerilmemektedir (52, 53, 55, 59).

#### **2.4.Dentin Köprüsü Oluşumu**

Uygun koşullarda ve doğru bir kanama kontrolü sonrası yapılan direkt pulpa kuafajı neticesinde dentin köprüsü yapımı başlar. Bu oluşum iki safhada incelenebilmektedir: Dentin köprüsü oluşumunun erken safhalarında pulpa kuafaj materyaline komşu olarak oluşan sınır hattının (demarkasyon hattı) altında mezenkimal hücre sayısında artış meydana gelir. İki-üç gün içerisinde arjinofilik lif sayısında yoğunlaşma ile birlikte organize olmamış, kalın ve sağlam konnektif doku lifleri, pulpa kuafaj materyalinin altında, ona paralel bir şekilde uzanırlar(62).

Kollajen formasyonundaki artış 3-7. günler arası devam eder. Zamanla arjirofilik lifler organize olur, kollajen şekillenir; mevcut olan hücreden zengin tabakanın altındaki mezenkimal hücreler ve fibroblastların sayısı yüksek seviyelere ulaşır. Bu tabakadaki hücreler preodontoblastlara ve prizmatik şekilli odontoblastlara farklılaşırlar. Daha alttaki arjinofilik lifler üstün gelirler ve sınır hattına dik bir şekilde organize olurlar (63). Sonrasında Korff lifleri adını alan bu lifler, yayılmaya ve kollajenin özelliklerini almaya başlarlar. Korff liflerinin yayılımı kollajen matriks içindeki düzensiz kollajen formasyonu ile birlikte devam eder. Yedi gün sonra yüzeyel ve fonksiyon görmeyen kapillerlerin parsiyel veya total olarak oblitere olmaya başlamasıyla birlikte matriks daha da kalınlaşmıştır (64).

İkinci safhada preentin oluşumunu takiben dentin köprüsünün kalsifikasyonu meydana gelmektedir. Bazı dişlerde tübüler matriks formasyonunun aksadığı yerlerde, primitif matriks düzensiz dentin şeklinde kalsifiye olur. Fakat daha sonra tübüler dentin şekillenir. Sağlam dişlerde, özellikle de açık apeksli dişlerde tübüler preentin oluşumu 2 haftaya kadar uzayabilmektedir. Bir ay sonra köprü, koronal tarafta hücresel içerikle beraber düzensiz osteodentin benzeri bir yapıdan, pulpal tarafta odontoblastlarla birlikte preentin hattından oluşmuştur. Üç ay sonrasında ise dentin köprüsü iki tabakadan oluşmaya başlar. Bu tabakalardan biri koronaldeki

düzensiz tübül ve hücreli içerikli dentin benzeri doku, diğeri ise canlı pulpaya en yakın konumdaki pre-dentin, yoğun kollajen fibrilleri ve hücreli uzantılardır (Tomes fibrilleri) (64). Dentin köprüsü oluşumunda meydana gelebilecek bir komplikasyon, tünel defektleri (65) ve tamamlanmamış dentin köprüsü oluşumu (66-69) ile sonuçlanabilmektedir. Bu istenmeyen durumlar bakteriyel mikro sızıntıya ve pulpal nekroza ortam hazırlamaktadırlar (70). Araştırmacılar bu tür komplikasyonların gelişmemesi ve tamamlanmış dentin köprüsü oluşumu için pulpa kuafaj materyalinin doğru seçilmesinin yanı sıra sadece küçük pulpa ekspozlarında bu tedavinin seçilmesini (71) ve kavite içindeki debrisin mutlaka uzaklaştırılması gerektiğini belirtmişlerdir (72).

## **2.5.Kuafaj Materyallerinin Dentin Pulpa Kompleksi Üzerine Etkileri**

Bugüne kadar, kalsiyum hidroksit (10, 73), çinko oksit öjenol, cam ionomer siman, rezin adezivler (74), hidroksiapatit kristalleri (75, 76), trikalsiyum fosfat ve mineral trioxide agregat (MTA) (77) gibi materyallerle dentin dokusu onarılmaya çalışılmıştır. Ancak dentin benzeri sert doku oluşum mekanizması hala bilinmemektedir. Son zamanlarda bu mekanizmanın anlaşılması amacıyla, osteojenik ve odontojenik proteinler gibi biyolojik aktif moleküller incelenmektedir (78, 79). Böylece diş pulpasındaki hücreli yanıtla beraber, diş oluşum evresinin başlangıcındaki dentin yapımı, laboratuvar ortamında gözlemlenerek çözülmeye uğraşmaktadır. Artık dentin oluşumu sırasında ortamda bulunan indükleyici faktörler ve maddeler de önem kazanmıştır.

Bir dişin canlılığını sürdürmesi, fonksiyon görebilmesi açısından oldukça önemlidir. Pulpanın yaralanması, istenmeyen doku kayıplarına sebep olmaktadır. Araştırmacılar yıllardır pulpanın korunması için zarar gören dentin dokusunun tamirini sağlamaya uğraşmaktadır (80).

Direkt pulpa kuafajlarında pulpa dokusu üzerine sıklıkla kalsiyum hidroksit ( $\text{Ca(OH)}_2$ ) içeren ve hızlı sertleşme özelliği olan patlar yerleştirilmektedir. Ancak bu



materyallerin dentin yüzeyine zayıf bağlandıkları, mikrosızıntıyı önleyemedikleri ve bir süre sonra restorasyon altında çözüldükleri görülmüştür (81, 82). Ayrıca kalsiyum hidroksit altında oluşan dentin köprülerinde tünel defektleri olabileceği bilinmektedir (56).

Bu nedenlerle kalsiyum hidroksite alternatif olabilecek materyaller konusundaki arayışlar son yıllar içinde hız kazanmıştır. Araştırmacılar ideal bir pulpa kuafaj materyalinin yaralanmış pulpanın bakteriyel kontaminasyonunu önleyebilmesi ve aynı zamanda da reperatif dentin oluşumunu teşvik edici dentinojenik özelliğinin bulunması gerektiğini belirtmektedirler (83).

Mineral Trioksit Agregat (MTA) kalsiyum hidroksite alternatif olarak geliştirilmiş; yüksek fiziksel dayanıma sahip oldukça popüler bir biyomateryaldir. Mineral trioksit agregat bakteriyel sızıntıyı engelleyebilmesi, oldukça biyouyumlu bir materyal olması ve rezorbe olmaması nedeniyle süt ve daimi dişlerdeki vital pulpa tedavilerinde de başarıyla kullanılmaktadır (84). MTA'nın kalsiyum hidroksite benzer şekilde alkali özelliğinin olması nedeniyle, pulpa hücrelerindeki dentinojenik potansiyeli açığa çıkardığı düşünülmektedir (85). Bu bilgilerin ışığında MTA'nın dentinojenik olayları düzenleyebilen, biyolojik olarak aktif bir substrat olduğu görülmektedir.

MTA son yirmi yıl içinde doğrudan pulpa kuafaj malzemesi olarak tercih edilir hale gelmiştir(86). In-vivo ve in-vitro çalışmalar MTA ile örtülmüş ekspoze alanlar altında, dentin-köprüsü oluşumunu göstermiştir. Ancak MTA'nın da uzun sertleşme zamanı, diş dokusunda renklenme yapması, kullanım zorluğu gibi sakıncaları vardır. Bu sınırlamalardan bazılarının üstesinden gelmek için son zamanlarda diğer biyoaktif trikalsiyum silikat simanlar da piyasada tanıtılmıştır (87).

Bu materyallerden biride Septodont, (St. Maur des Fosses, Fransa) tarafından üretilen Biodentine' dir. Aktif biosilikat teknolojisi ile biyoaktif bir dentin ikamesi olarak pazarlanmaktadır. Malzeme, içinde tozu ve likiti olan kapsül şeklindedir. Toz çoğunlukla dikalsiyum silikat ( $\text{Ca}_2\text{SiO}_4$ ) kalsiyum karbonat ( $\text{CaCO}_3$ ), zirkonyum

oksit ( $ZrO_2$ ) ve trikalsiyum silikat ( $Ca_3SiO_5$ )' tan oluşmaktadır. Likitinde su, kalsiyum klorid ( $CaCl_2$ ) ve modifiye edilmiş polikarboksilat içerir (88). MTA gibi, Biodentine de aslında trikalsiyum silikat siman gibi biyoseramikler denilen biyoaktif maddelerin olduğu büyük gruba aittir. Trikalsiyum silikat simanları, dentin-mineralleştirici özellikleri ile direk pulpa kuafajı için dolgu materyalleri olarak kullanılabilir (89). Bu yeni trikalsiyum silikat siman restoratif diş hekimliği için yüksek mekanik özelliklere sahiptir ve erken pulpa mineralizasyonunu uyardığı görülmüştür (90). Ayrıca bu simanın dental pulpa kök hücrelerinin çoğalmasını ve farklılaşmasını teşvik ettiği de rapor edilmiştir (91).

Son nanoteknolojik gelişmeler sayesinde biyoseramikler, sağladığı tüm faydalarla birlikte kök kanal tamirinde, apikal retrograd dolgularda, apeksifikasyon ve vital pulpa tedavilerinde de kullanımları mümkün olmuştur. Bu faydalardan ilki biyoseramiklerin fiziksel özellikleri ile ilgilidir. Biyoseramikler biyolojik olarak son derece uyumludurlar, toksik değildirler, kullanımları sonrasında büzülme göstermezler ve kimyasal olarak stabildirler (92). Bir biyoseramik olan BioAggregate (Innovative BioCeramix Inc, Vancouver, BC, Kanada), su bazlı bir simandır. Biyouyumlu seramik nano partiküllerden oluşan bir materyaldir (93). BioAggregate'in içeriği çok sayıda sentetik bileşenlerin karışımından oluşur (kalsiyum silikat hidrat, kalsiyum hidroksit, hidroksiapatit, tantal oksit ve amorf silikon oksit). Üretici firma dokular için toksik etkilerini azaltmak amacıyla alüminyum içermediğini iddia etmektedir (94).

BioAggregate piyasaya sürülen ilk nanopartiküllü tamir simanıdır. Kullanım endikasyonları beyaz MTA ile aynıdır. MTA'da kullanılan bizmut oksitten ziyade BioAggregate'e radyopaklık sağlamak için, tantal pentoksit kullanılmıştır (95).

BioAggregate tek kullanımlık toz (1g'lık paket) ve likitlerden (0,38ml'lik kapsül) oluşur. Likit deiyonize sudur. Çalışma süresi 5 dakikadır. Materyal karışımdan 5 dakika sonra dehidrate olup kurumaya başlar. Sertleşme süresi ise 4-72 saattir

Mineral trioksit agregat Portland simanından modifiye edilmiştir. MTA® (MM MTA) (Micro Mega, Besanc\_on, Fransa) yine bir alternatif perforasyon tamir materyali olarak piyasaya çıkmıştır. Yeni bir materyal olduğu için yayınlanmış pek az çalışma vardır. MM MTA içeriğine CaCO<sub>3</sub> eklenmesi nedeniyle çalışma süresi kısadır kendi ekipmanları ile kullanımı pratiktir.

Trikalsiyum silikat esaslı olarak bilinen BioAggregate iyi biyouyumluluk gösterdiği ve mineralize doku oluşumu uyaran potansiyele sahip olduğu bildirilmektedir. MM MTA ve BioAggregate, perforasyon onarımı ve pulpa kuafaj gibi aynı endikasyonlara sahiptir. Her iki malzeme de toz ve likit formundadır (96-98).

TheraCal (Bisco Inc, Schamburg, IL, ABD) direk ve indirek kuafaj kullanımı için tasarlanmış ışıkla sertleşen yeni bir rezinle modifiye kalsiyum silikat doldurucu kaide / astar materyalidir. İçeriği yaklaşık % 45 mineral madde (tip III Portland simanı), % 10 radyopak bileşen, % 5 hidrofilik bir yoğunlaştırma maddesi, ve yaklaşık % 45 rezin ihtiva eder (99). Materyalin rezin içeriği üretan dimetakrilat (UDMA), bisfenol A-glisidil metakrilat (BisGMA), trietilen glikol dimetakrilat (TEGDMA veya TriEDMA ) gibi hidrofobik bileşenden ve hidroksietil metakrilat (HEMA) ve polietilen glikol dimetakrilat (PEGDMA) gibi hidrofilik bir bileşenden oluşur (99). TheraCal iyi sızdırmazlık özelliklerine sahiptir ve immortalize edilmiş odontoblast hücreleri tarafından iyi tolere edilmiştir (100).

## **2.6.Biyouyumluluk**

Biyolojik uyum; canlı doku içerisine yerleştirilen bir restorasyon veya implantın çevresindeki yumuşak ya da sert dokuda herhangi bir etkiye ve farklılığa yol açmadan tepkisiz kalabilmesidir (101). Bu durum bir biyomateryalin herhangi bir olumsuz konak cevabını oluşturmamasını, materyalden herhangi bir ürünün salınmamasını, yeni bir ürünün oluşmamasını veya materyalin lokal veya sistemik olarak karsinogenik olmamasını gerektirmektedir (101). Biyolojik uyum bir materyalin durağan değil sürekli olarak doku içerisinde kaldığı müddetçe devam etmesi gereken

bir özelliğidir ve biyolojik olarak uyumlu olabilmesi için konağın, materyalin ve materyalden beklenen fonksiyonun uyum içerisinde olması gerekmektedir (102, 103). Tam tersi durumda biyolojik uyumu olmayan malzemeler dokuda değişik reaksiyonlara neden olurlar(104). Doku ile temas halinde, normal metabolizmayı ve fizyolojik işleyişi değiştirebilirler. Dokularda fiziksel veya kimyasal etkilere, hücrelerde dejenerasyon, ölüm ve nekroza neden olabilirler (101). Tüm bu bilgiler ışığında bir materyalin ağız ortamında kullanılması için biyoyumlu olması kaçınılmazdır (105).

### **2.6.1.Pulpa Kuafaj Materyallerinde Biyoyumluluk**

Bir materyalin biyoyumluluğu materyalin; tipine, uygulandığı bölgeye ve fonksiyonuna bağlıdır. Biyoyumluluk bir materyalin canlı dokular ile temas halinde iken sistemik ve lokal toksisite, alerjik, mutajenik ve karsinojenik etkiler gibi doku reaksiyonları oluşturmamasıdır (103). Bir materyalin biyolojik uyumluluğu bu maddeden çözünme ya da aşınma sonucu açığa çıkan bileşenlerle belirlenir. Bu bileşenler hücrelere zarar verebilir ya da belirli hücrede sentezlenmesini uyarabilir ve iltihapsal reaksiyon oluşmasına neden olabilirler. Benzer şekilde proteinlerin yüzeyde birikmesi ya da absorbe edilmesi veya materyalle ekstraselüler matriksin etkileşimi bir materyalin biyolojik davranışlarını belirlemede çok önemli bir rol oynar (104).

Diş hekimliğinde kullanılan malzemelerin biyoyumluluk kriterleri şu şekilde sıralandırılmıştır:(106)

- Pulpa ve yumuşak dokulara zararlı olmamalıdır.
- Dolaşım sistemine salınarak ve difüzyon yolu ile absorbe edilerek sistemik toksik cevaba yol açan toksik maddeler içermemelidir.
- Potansiyel olarak alerjik bir cevap oluşturma olasılığı olan ajanlar bulundurmamalıdır.
- Karsinojenik potansiyeli olmamalıdır.

Dental materyallerin biyolojik olarak incelenmesinde çok sayıda yöntem kullanılmaktadır. Bunlar 1982 yılında FDI (Uluslararası Dişhekimliği Birliği), ISO (Uluslararası Standardizasyon Organizasyonu) ve ADA tarafından üç grupta sınıflandırılmıştır.

- İn vitro deneyler (birincil ya da eleme testleri),
- İn vivo hayvan deneyleri (ikincil testler),
- İnsanlarda klinik çalışmalar

### **İn Vitro Testler (Birincil ya da Eleme Testleri)**

Ağız içi test, karın içi test, soluma testi, hemolizis testi, ames testi, styles testi, dominant letal testi ve sitotoksitate testleridir.

#### **2.6.2.Sitotoksitate**

Diş hekimliğinde kullanılan materyallerden salınan maddeler, ağız mukozası, diş eti, pulpa, alveol kemiği gibi uygulandıkları bölgeye komşu dokularda lokal toksisite reaksiyonuna neden olabilirler (107).

Toksitate bir materyalin kimyasal olarak biyolojik sisteme zarar vermesi şeklinde tanımlanmaktadır. Biyolojik sistemde meydana gelen zararlar lokal ve sistemik olarak iki şekilde oluşmaktadır. Lokal toksisitede reaksiyonlar materyalin uygulandığı alanda oluşurken sistemik toksisitede reaksiyonlar uygulanan alandan farklı bölgelerde meydana gelmektedir (103).

Günümüzde yeni bir materyalin insanlarda uygulanmadan önce geniş kapsamlı testler ile biyoyumluluğunun değerlendirilmesi gerekmektedir. Yeni bir materyalin biyolojik olarak kabul edilebilirliğini saptamak için günümüzde çeşitli testler kullanılmaktadır (108). Tek bir test metodu, materyale bağlı olarak gelişen çeşitli reaksiyonlar içerisinde yalnız bir tip reaksiyonun saptanması için uygulanır. Test

metotlarının her biri meydana gelen reaksiyonların tek bir açıdan değerlendirilmesini sağlar. Örneğin hücre kültür testlerinde materyalin etkisi izole edilen hücrelerde saptanmaktadır. Materyallerin biyolojik özelliklerinin test edilmesine genellikle hücre kültürlerinin kullanıldığı basit *in vitro* test yöntemleri ile başlanır. Değerlendirmelere daha pahalı ve uzun zaman gerektiren hayvan testleri ile devam edilir (107).

*In vitro* sitotoksosite testlerinde; doku kültürleri, organ kültürleri, hücre kültürleri ve hücre organelleri kullanılabilir. Dental materyallerin sitotoksosite testleri için en fazla kullanılmakta olan biyolojik sistemler, kültür hücreleridir. Kültür hücreleri ya ticari olarak kültürlerden elde edilen hücrelerden oluşabilir ya da organizmalardan elde edilen doku parçalarından derive edilebilirler (109).

*In vitro* testlerin diğer biyoyumluluk testlerine göre çeşitli avantaj ve dezavantajları vardır. Hızlı bir şekilde uygulanması, hayvan ve insan deneylerine göre daha ucuz olmaları, standardize edilebilmeleri avantaj olarak sayılabilir. Dezavantaj olarak bu testlerin ağız ortamı gibi karmaşık biyolojik ortamların ve dokular üzerinde materyallerin meydana getireceği etkinin bu testler ile saptanan sonuçlarla tamamen uyuşmaması olarak açıklanabilir (108).

### **2.6.3.Hücre Kültürü**

Hücre kültürleri, hücre yapısının, fizyolojik özelliklerinin, hücrelerdeki patolojik değişikliklerin, çoğalma ve tamir mekanizmalarının değerlendirilmesinde kullanılmaktadır (108).

Materyallerin sitotoksik etkilerini araştıran deneylerde insan ve hayvanlardan derive edilmiş hücre kültürleri kullanılmaktadır. Hücre kültürleri sayesinde canlı dokuların vücut dışında yaşatılabilmesi, sürekli üretilmesi ve gelişimi taklit edilmiş olur. Bireysel faktörlerden etkilenmez, tekrar uygulanabilir, ara aşamalarda kolay kontrol edilebilir ve hayvan deneylerinde olduğu gibi canlı varlıklar öldürülmez. Bu

nedenlerle kullanımları oldukça yaygındır. Fakat hücre kültür testleri yalnızca başlangıç aşamadaki sitotoksisiteyi göstermekte, malzemenin uzun süre doku ile temasta olduğu durumlarda toksisitenin ne düzeyde olacağı hakkında bilgi verememektedir (110).

Hücre kültürü yönteminin temel ilkesi, canlı dokulardan alınan parçaların *in vitro* koşullarda yaşama ve üremelerini sağlamaktır. Tüp, şişe gibi laboratuvar gereçlerinde uygun besleyici sıvıların içinde üretilerek kullanılan canlı dokulardır. Bu amaçla canlıların çeşitli dokuları önce parçalanarak tek tek hücrelere ayrılırlar. Bu hücreler çeşitli tuzlar, tampon maddeleri, aminoasitler, vitaminler, dana veya keçi serumu içeren besleyici sıvılarda süspansiyon ederek steril tüp veya şişelere koyulur. Bu hücre süspansiyonu 36 °C'de bekletildiğinde hücreler kabın çeperine yapışarak ürerler. Üreme sonucunda oluşan yapıya *hücre kültürü* denir (110).

Dental malzemelerin biyolojik uyumunun saptanmasında kullanılan hücre kültürü teknikleri organ veya doku bağlantısını temsil etmez. Dental dokulara ait kültürler, bağımsız üniteler olarak morfolojileri, DNA ve protein sentezleri gibi tek tek hücresel düzeyde değerlendirme için kullanılırlar(111).

### 3.GEREÇ ve YÖNTEM

Bu tez çalışmasında diş hekimliğinde kullanılan pulpa kuafaj materyallerinin, odontojenik besiyerinde insan diş pulpası mezenkimal kök hücreleri üzerinde odontojenik farklılaşma ve sitotoksosite yönünden etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Bu çalışma üç aşamada gerçekleştirildi.

- Kök hücrelerin çözdürülmesi ve proliferasyonları.
- Test materyal örneklerinin hazırlanması.
- Sitotoksosite ve odontojenik farklılaştırma testlerinin yapılması.

Sitotoksosite testi için Water Soluble Tetrazolium-1(WST-1) testi, odontojenik farklılaşmayı incelemek için de Alkalen Fosfataz (ALP) aktivitesi testi yapıldı. Kök hücre kültürü çalışmalarında, hücre kültürü çalışmaları için uygunluğu test edilmiş steril ve tek kullanımlık hücre kültürü malzemeleri kullanıldı ve işlemler laminar akışlı steril kabinde, steril koşullar altında gerçekleştirildi. Kontaminasyonun önlenmesi amacıyla; yapılan çalışmalar, bone, maske ve pudrasız cerrahi eldivenler kullanılarak, asepsi koşullarına uygun şekilde gerçekleştirildi.

#### 3.1.Kök Hücrelerin Çözdürülmesi ve Proliferasyonları

Dental kök hücreleri ile çalışmaların gerçekleştirilebilmesi için öncelikle bu hücrelerin izolasyonu ve tanımlanması gerekmektedir.

Ülkemizde çok az sayıda merkezde kök hücrelerin izolasyonu yapılmaktadır. Bu projede kullanılacak diş pulpası kaynaklı kök hücreler, kök hücre izolasyonu konusunda deneyimli olan Prof Dr. Erdal KARAÖZ danışmanlığında Kocaeli Üniversitesi, Kök Hücre ve Gen Tedavileri Uygulama Merkezi (KÖGEM )'nde izole edilip karakterizasyonu yapılmış ve uygun saklama koşullarında depolanmıştır.





**Şekil 3. 1.** KÖGEM’ de bulunan laminar akışlı steril kabin.

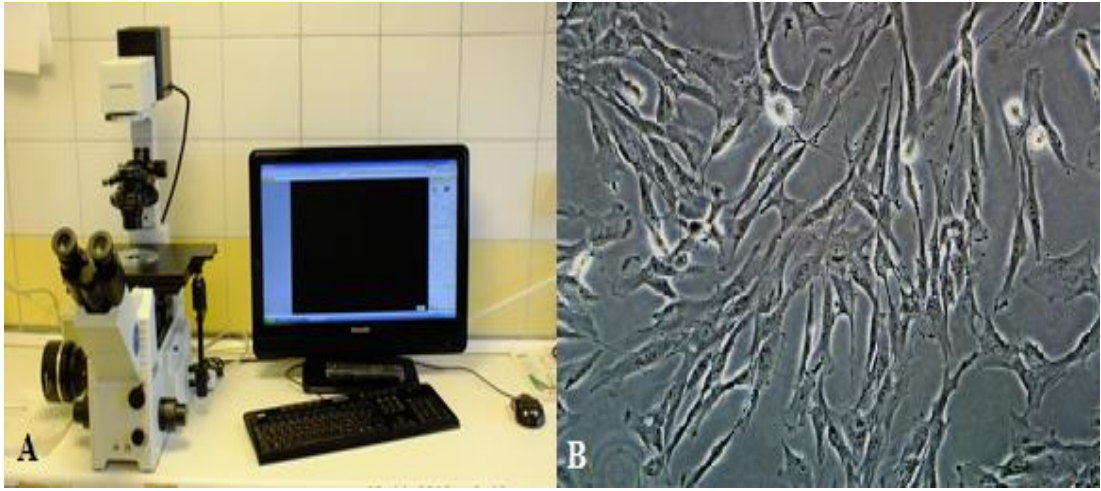
### **3.1.1.Hücrelerin Dondurularak Saklanması ve Çözdürülmesi**

Diş pulpasından elde edilen MKH’ler, her pasaj sonrası donduruldu,  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ ’ de sıvı nitrojen tankına alınarak saklandı. Dondurma işlemi öncesinde, hücre kültür flasklarının yüzeyini % 70-80 oranında kaplayan hücrelere, tripsinizasyon işlemi uygulandı yapışan hücrelerin kaldırılması sağlandı ve ardından santrifüj edildi. Önceden hazırlanmış olan % 60 DMEM-LG, % 35 FBS ve % 5 dimetilsülfoksit (DMSO) içeren solüsyon, tüplere damlalar halinde eklendi, hücre peleti ile karıştırıldı, pipetle homojenize olması sağlandı. Her kriyotüpe bu süspansiyondan 1 ml konuldu. Kriyotüpler  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ’ de 24 saat bekletilip ardından sıvı nitrojen tankına alındı.

Diş pulpası kökenli mezenkimal kök hücrelerin çözdürülmesi ve proliferasyonları KÖGEM tarafından yapıldı.

Bu tez çalışmasında 3. pasajdaki hücreler kullanıldı. P0, P1 ve P2’ de hücreler kültür kabı tabanını % 70-80 oranında doldurulduğunda pasajlama işlemine geçildi. Laminar akışlı steril kabinde,  $75\text{ cm}^2$  lik hücre kültür flaskları, (T-25 kültür kaplarına) besi ortamı ve yapışmayan hücreler uzaklaştırıldıktan sonra,  $\text{Ca}^{+2}$  ve  $\text{Mg}^{+2}$  içermeyen 5 ml PBS (fosfat ile tamponlanmış solüsyon) ile flask yüzeyleri yıkandı. 3 ml % 0,25 tripsin-EDTA (Gibco Invitrogen, Grand Island, ABD) solüsyonu ilave

edilerek, 2-3 dk CO<sub>2</sub> inkübatöre alındı. Yapışan bütün hücrelerin yüzeyden ayrıldığı mikroskopta gözledikten sonra, tripsinin inaktivasyonu için, 5 ml besi ortamı flasklara eklendi. Daha sonra hücreler 15 ml'lik konik tabanlı tüplere alındı ve 1300 rpm' de 5 dakika santrifüj edildi. Işık mikroskobunda hücre sayımı gerçekleştirildi. Uygun oranda besi ortamıyla seyreltilerek,  $0,5 \times 10^6$  hücre yoğunluğunda 75 cm<sup>2</sup> lik hücre kültür flasklarına (T-75 kültür kaplarına) ekildi.



**Şekil 3. 2.** A)Faz kontrast mikroskobu, B) Kültür ortamında iğ şekilli diş pulpası kök hücrelerinin faz kontrast mikroskop görüntüsü.

### 3.2.Test Materyal Örneklerinin Hazırlanması

Bu çalışmada Tablo 3. 1.' de markaları ve üretici firmaları verilen farklı tipteki pulpa kuafaj materyalleri kullanılarak, bu materyallerden ALP enzim aktivitesi testi ve WST-1 testi için, hücre kültürü testlerinde kullanılmak üzere 5 x 2 mm boyutlarındaki özel olarak hazırlanmış teflon kalıplardan her materyalden en az 18 adet olmak üzere standart diskler hazırlandı. Diskler 24 saat nemli ortamda oda sıcaklığında bekletildi. Diskler kültür ortamına konulmadan önce UV ışık altında sterilize edildi.

Diskler üretici firmanın tavsiyelerine göre hazırlandı.



**Şekil 3. 3.** Çalışmada kullanılan kuafaj materyalleri ve 5x2 boyutunda hazırlanmış diskler.

**Tablo 3. 1.** Tez çalışmasında kullanılan kuafaj materyalleri.

<u>Test Materyalleri</u>	<u>İçerik</u>	<u>Üretici Firma</u>
<b>Biodentine</b>	Dikalsiyum silikat, Kalsiyum karbonat, Zirkonyum oksit ve Trikalsiyum silikat Likiti (su, kalsiyum klorid ve modifiye edilmiş polikarboksilat )	Septodont, Saint Maur des Faussés, Fransa
<b>TheraCal</b>	Portland simanı Tip III. Polietilen glikol dimetakrilat., Baryum zirkonat	Bisco Inc, Schamburg, IL, ABD
<b>BioAggregate</b>	Monobazik kalsiyum fosfat, Tantal pentoksit, Amorf silikon oksit, Trikalsiyum silikat, Dikalsiyum silikat, likit(iyonize su)	Innovative BioCeramix Inc. Vancouver, Kanada
<b>MM MTA</b>	Modifiye Portland Siman, Kalsiyum Karbonat ( CaCO <sub>3</sub> )	MicroMega, Besançon, Fransa

### 3.3.Sitotoksisite ve Odontojenik Farklılaştırma Testlerinin Yapılması

#### 3.3.1.Test Materyallerinin Sitotoksisitesinin WST-1 Canlılık Testi İle Belirlenmesi

Bu yöntem hücre çoğalmasının tayini için yapılır. Bu yöntem ile hücrelerin mitokondrial aktiviteleri ölçülür. Hücreler bir kolorimetrik substratla birlikte inkübe edilir. Kolorimetrik yöntem için kullanılan temel parametre canlı hücrelerin metabolik aktiviteleridir. Tetrazolium tuzu (WST-1) hücre proliferasyonu ve canlılığını belirlemede kullanılır. Tetrazolium tuzunun sadece metabolik aktivitesi olan hücreler tarafından renkli formazanlara indirgenmesinden dolayı bu yöntemle sadece canlı hücreler saptanır. Canlı hücreler içerisinde WST-1 renkli formazan tuzuna indirgenir. Formazan'ın miktarı mikropilaka okuyucu (Microplate Reader, VersaMax, Molecular Device, ABD)' da besiyerinin 480 nm deki absorbanası ile belirlenir.



Şekil 3. 4. Monokromatik sistemli mikropilaka okuyucu.

İnsan diş pulpası kökenli mezenkimal kök hücreleri (iDP-MKH) 3.pasajda (P3) 12 kuyucuklu kültür kaplarına (BD Biosciences Discovery Labware, CT,ABD)  $3 \times 10^4$  hücre/cm<sup>2</sup> olacak şekilde ekildi ve 1 gece yüzeye yapışmaları için 37 °C' de ve % 5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde (Sanyo, Etten Leur, Hollanda) beklendi. Steril ortamda

kuafaj materyallerinden hazırlanmış olan diskler (Biodentine, MM MTA, BioAgregate ve TheraCal), iki tarafıda UV'de (Laminar akışlı steril kabin (Class II, Heraeus, Hanau, Almanya)) 20' şer dakika sterilize edilmiştir. Kuafaj materyalleri iDP-MKH üzerine yerleştirilmiş ve %10 fetal sığır serumu (FBS; Gibco Invitrogen, Grand Island, ABD), %0,2 primosin (Invivogen, San Diego, ABD) içeren düşük glikozlu DMEM (DMEM-LG [Dulbecco's Modified Eagle's Medium- Low Glucose]) hücre kültürü vasatı (Gibco Invitrogen, Grand Island, ABD) besiyerinde inkübatörde kültüre edildi. Kontrol grubu olarak materyallerle muamele edilmeyen iDP-MKH kullanıldı. Disklerin hücreler üzerine yerleştirilmesini takiben 1., 4., 7. ve 14. günlerin sonundaki hücre canlılığını ve toksisiteyi belirlemek amacıyla WST-1 testi yapıldı. Kuafaj materyalleri hücrelerin üzerinden alındıktan sonra 1:10 (100µl besiyerine 10µl WST-1 boyası) oranında WST-1 Cell Proliferation Assay Reagent (Roche) eklendi. Uygun koşullarda (37 °C' de, % 5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde; Sanyo, Etten Leur, Hollanda) 2,5 saatlik inkübasyonun ardından, absorbanlar 480 nm dalga boyunda Monokromatik sistemli mikropilaka okuyucu kullanılarak okutuldu.



**Şekil 3. 5.** CO<sub>2</sub> inkübatör.

### 3.3.2.Odontojenik Farklılaşmanın Değerlendirilmesi

Odontojenik farklılaştırma için kültür kabının  $\text{cm}^2$ ' sinde  $3 \times 10^4$  hücre olacak şekilde ekilen iDP-MKH kullanıldı. Pasaj 3' de iDP-MKH' ler 12 kuyucuklu (BD Biosciences Discovery Labware, CT, ABD) kültür kaplarına ekildi ve % 70-80 oranında yüzeyi kapladığında odontojenik indüksiyon besiyeri olarak 100 nM deksametazon (Fluka, Sigma Aldrich, Buchs, İsviçre), 0.05  $\mu\text{M}$  askorbat-2-fosfat (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ABD), 10 mM  $\beta$ -gliserofosfat (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ABD), %0,2 primosin (Invivogen, San Diego, ABD) ve %10 FBS (Gibco Invitrogen, Grand Island, ABD) içeren LG-DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium- Low Glucose) kullanıldı. Kültür ortamında hücreler 2 hafta boyunca inkübe edildi ve haftada üç defa besiyerleri değiştirildi. Kontrol grubu olarak aynı besiyerinde ancak materyallerle muamele edilmemiş iDP-MKH kullanıldı. Odontojenik farklılaşmanın 1., 7. ve 14. günlerinde ALP enzim aktivitesi belirlendi. BCA yöntemi kullanılarak toplam protein konsantrasyonu hesaplandı ve ALP aktivitesi mg protein miktarına oranlandı.

#### ALP Aktivitesi Tayini

Alkalin fosfataz enzimi osteoblastlar tarafından kemik oluşumunun erken evrelerinde salgılanan ve kalsiyum fosfat minerallerinin hücre dışı ortamda birikmesi için gerekli olan bir enzimdir. Bu çalışmada İDP-MKH' leri diskler üzerine ekildikten sonra odontoblastlara farklılaşma besiyeri içinde büyütüldü ve 1., 7. ve 14. gün sonrasında hücreler tarafından salgılanan ALP enzim aktivitesi belirlendi. Bu değerler örneklerin karşılaştırılması için kullanıldı.

Bu amaçla hücreli diskler önce fosfat tampon solüsyonu (PBS) ile yıkandı daha sonra da total protein Mammalian Protein Extract Reagent (M-PER) (Thermo Scientific) ile ayrıştırıldı.



**Şekil 3. 6.** Çalkalamalı su banyosu.

Odontojenik indüksiyonun 1., 7. ve 14. günlerinde ALP aktivitesi tayini gerçekleştirildi. Bu amaçla hücrelerin üzerindeki besi ortamı uzaklaştırılarak iki kere PBS (DPBC; Ca<sup>2</sup> Mg<sup>2</sup> free, Gibco Invitrogen, Grand Island, ABD) ile yıkandıktan sonra hücre kazıyıcısı kullanılarak hücreler kaldırıldı. Hücre peletinin üzerine Mammalian Protein Extract Reagent (M-PER) (Thermo Scientific, Rockford, ABD) eklendikten sonra 5 dakika çalkalamalı su banyosunda (Nüve ST 402) bekletildi ve 14000 rpm' de 5 dakika soğutmalı santrifüj (Universal 320 R, Hettich, Almanya) yapıldıktan sonra total protein içeren süpernatant başka bir tüpe alınarak -80 °C' de dondurularak(Sanyo, Etten Leur, Hollanda; MDF-U5386S Model) saklandı. Tüm grupların toplam protein izolasyonları gerçekleştirildikten sonra ALP aktivitesi tayini için 96 kuyucuklu kültür kaplarına (BD Biosciences Discovery Labware, CT, ABD) protein solüsyonları 25 µl eklendi ve üzerine p-Nitrophenyl Phosphate Liquid Substrate (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ABD) 200 µl eklenerek oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonunda absorbanlar 405 nm dalga boyunda mikropilaka okuyucu (VersaMax Microplate Reader Molecular Devices) kullanılarak okutuldu. Absorbanlar toplam protein miktarına (mg) oranlandı.



**Şekil 3. 7.** Soğutmalı santrifüj.

### **Protein Miktarı Tayini**

Toplam protein miktarı Bicinchoninic Acid (BCA) Protein Assay Kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ABD) kullanılarak tayin edildi. Daha önce -80 °C' de saklanan toplam protein solüsyonları ve hazırlanan BSA (Bovine Serum Albumin, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ABD) standartları 96 kuyucuklu kültür kaplarına 25 µl eklendi. Kitin talimatlarına göre hazırlanmış çalışma solüsyonundan 200 µl eklenerek inkübatörde 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonunda VersaMax Microplate Reader protein quantification BCA Assay analiz sistemi kullanılarak µg protein miktarları belirlenmiştir.

### **3.4.Verilerin değerlendirilmesi**

Verilerin değerlendirilmesi IBM SPSS Statistics 13.0 (SPSS, Chicago, IL, ABD) paket programı kullanılarak yapıldı. Veriler, tanımlayıcı istatistikler (ortalama, standart sapma) ile özetlendi.



## 4. BULGULAR

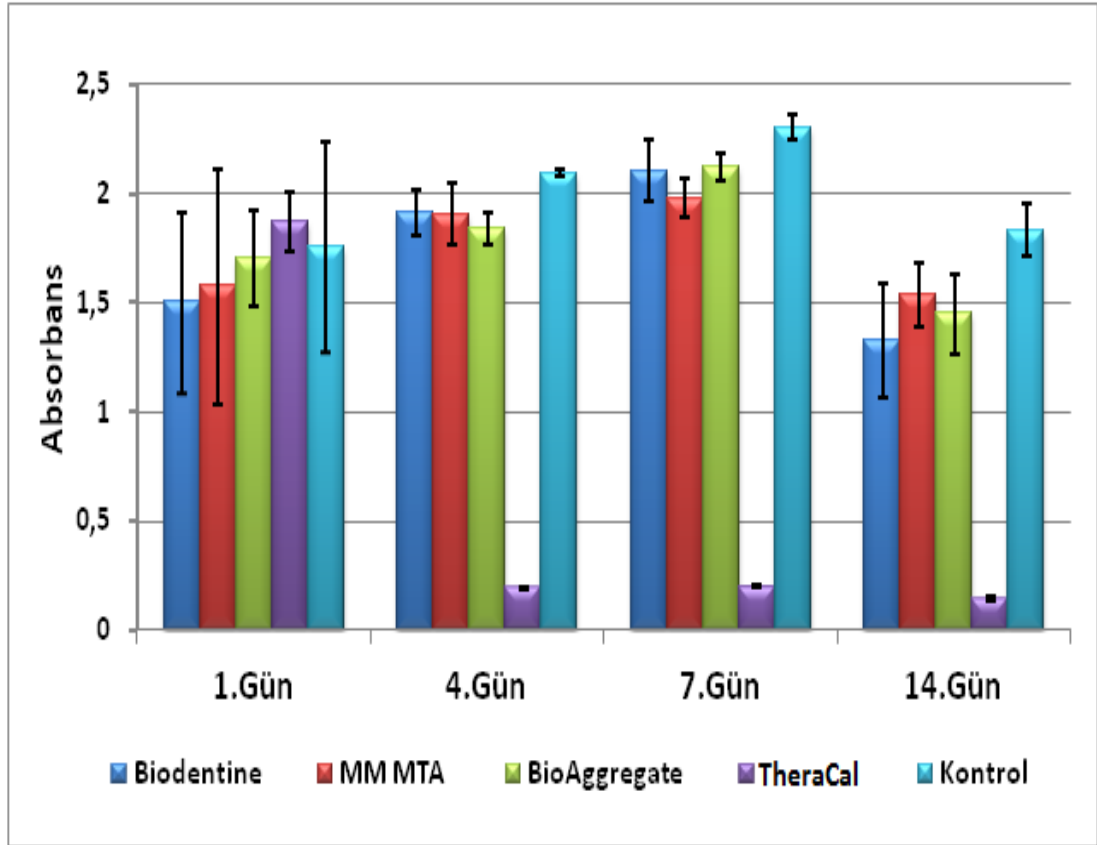
### 4.1.WST-1 Testi Bulguları

Kullanılan kuafaj materyalleri ile ortak kültüre edilen insan diş pulpası mezenkimal kök hücrelerinin (İDP-MKH), WST-1 canlılık testi sonucundaki hücre canlılık değerleri Tablo 4.1’ de gösterilmektedir.

**Tablo 4. 1.** DP-MKH üzerinde sitotoksik etkisi incelenen materyallerin 1,4,7 ve 14. günün sonunda elde edilen hücre canlılık değerleri.

<u>Test materyalleri</u>	<u>Ort±SS</u>			
	<i>1.Gün</i>	<i>4.Gün</i>	<i>7.Gün</i>	<i>14.Gün</i>
<i>Kontrol</i>	1,75±0,48	2,09±0,01	2,29±0,05	1,83±0,12
<i>Biodentine</i>	1,50±0,41	1,90±0,10	2,10±0,14	1,33±0,26
<i>MM MTA</i>	1,57±0,54	1,91±0,14	1,97±0,08	1,53±0,14
<i>BioAggregate</i>	1,70±0,22	1,83±0,07	2,12±0,05	1,44±0,18
<i>TheraCal</i>	1,87±0,13	0,19±0	0,20±0	0,14±0

Tablo 4. 1. incelendiğinde 1. günde kuafaj materyalleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında en fazla canlı hücrenin TheraCal gurubunda, en az canlı hücrenin ise Biodentine gurubunda olduğu görülmüştür. 4. gün yapılan ölçümlerde kontrol gurubuna göre en fazla canlı hücre MM MTA gurubunda en az canlı hücre ise TheraCal gurubunda ölçülmüştür. 7. güne gelindiğinde kontrol gurubuna göre sayıca en fazla canlı hücre BioAggregate gurubunda en az canlı hücre ise yine TheraCal gurubunda görülmüştür. 14. gün yapılan ölçümlerde ise tüm gruplarda hücre ölümlerinde artış görülmüştür. Bununla birlikte kontrol grubu ile karşılaştırıldığında en fazla canlı hücre MM MTA gurubunda en az canlı hücre ise TheraCal gurubunda gözlenmiştir.



**Şekil 4. 1.** DP-MKH' lerinin test materyalleri ile 1, 4, 7 ve 14 gün süresince ortak kültürü sonrasında gerçekleştirilen WST-1 testi sonuçlarının grafiksel gösterimi.

Şekik 4.1' e bakıldığında 4. gün tüm materyallerin çoğalan hücre sayılarının kontrol grubuna göre daha az olduğu görülmektedir. 7. günde yapılan ölçümlerde tüm materyallerin kontrol gurubu ile karşılaştırıldığında hücre sayıları daha azdır. Ancak Biodentine ve BioAggregate gruplarında ölçülen hücre canlılık değerleri birbirlerine yakındır. 14. günde hücre ölüm oranı en fazla olan Biodentine olarak gözlenmektedir. TheraCal grubunda deneyin 4. gününden itibaren hücre sayıları diğer materyallerden daha az bulunmuştur . Bu sonuçlara göre TheraCal hücre çoğalmasını daha fazla engellemiş ve aynı zamanda hücre sayısında düşüşe neden olmuştur.

WST-1 testi sonuçlarına göre test materyalleri arasında hücre sayılarında en fazla azalmaya neden olan 4. günden itibaren TheraCal olarak gözlemlenmiştir. Diğer kuafaj materyalleri birbirlerine yakın değerlerde hücre canlılığı göstermişlerdir. TheraCal haricindeki diğer kuafaj materyalleri gruplarında hücre

çoğalmasi gözlenmiştir. Fakat hiç bir kuafaj materyali kontrol gurubundan fazla oranda hücre çoğalmasina neden olmamıştır.

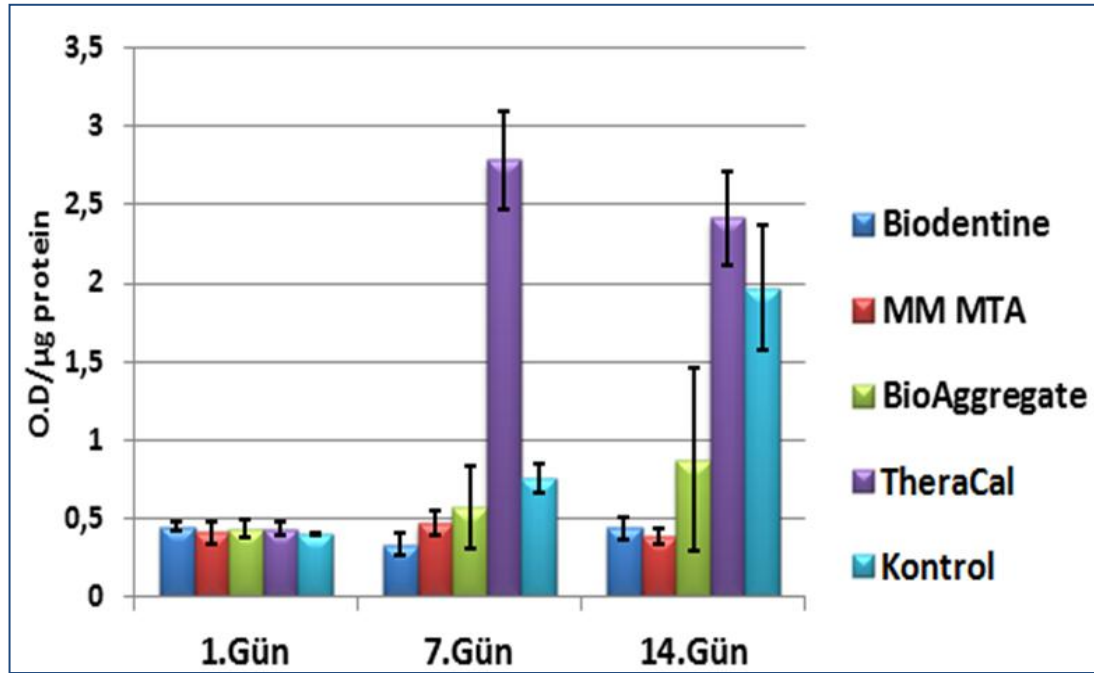
#### 4.2.ALP Aktivitesi Bulguları

DP-MKH' lerinin kuafaj materyalleri ile odontojenik besiyeride 14 gün boyunca ortak kültürünü takiben sert doku oluşturabilme özelliklerinin incelenmesi için ALP enzim aktivitesi testi uygulandı.

**Tablo 4. 2.** DP-MKH' lerinin 1,7 ve 14. günün sonunda test materyalleri etkisiyle gösterdikleri ALP aktivite değerleri.

<u>Test materyalleri</u>	<u>Ort.± SS</u>		
	<i>1.Gün</i>	<i>7.Gün</i>	<i>14.Gün</i>
<i>Kontrol</i>	0,40±0,01	0,75±0,09	1,96±0,4
<i>Biodentine</i>	0,44±0,03	0,33±0,07	0,43±0,07
<i>MM MTA</i>	0,40±0,07	0,47±0,08	0,38±0,05
<i>BioAggregate</i>	0,43±0,06	0,56±0,26	0,87±0,58
<i>TheraCal</i>	0,43±0,04	2,78±0,31	2,41±0,3

Tablo 4.2. incelendiğinde 1. gün yapılan ölçümlerde kontrol gurubuna göre ALP aktivite değeri en fazla olan Biodentine en az olan ise MM MTA olarak ölçülmüştür. 7. gün yapılan ölçümlerde kontrol gurubu ile karşılaştırıldığında en fazla ALP enzim aktivite değerinin TheraCal gurubunda, en az ALP enzim aktivite değerinin ise Biodentine gurubunda olduğu gözlemlenmiştir. 14. güne gelindiğinde ALP enzim aktivitesinin TheraCal' ın olduğu grupta en yüksek, MM MTA' nın olduğu grupta ise en düşük seviyede olduğu görülmüştür.



**Şekil 4. 2.** DP-MKH' lerinin odontojenik indüksiyon ortamında test materyalleri ile ortak kültürünün 1., 7. ve 14. günlerindeki ALP aktivite değerlerinin grafiksel gösterimi.

Şekil 4. 2 incelendiğinde TheraCal'ın odontojenik farklılaşma potansiyeli kontrol gurubu ve diğer gruplardan daha yüksek olduğu gözlenmektedir. MM MTA ve Biodentine' nin diğer gruplara göre diş pulpası kök hücrelerini odontojenik farklılaştırma yönünden daha az uyardığı görülmektedir. BioAggregate'in ise odontojenik farklılaştırma açısından kontrol gurubu ile uyumlu bir şekilde ALP enzim aktivitesini zamanla arttırdığı görülmektedir.

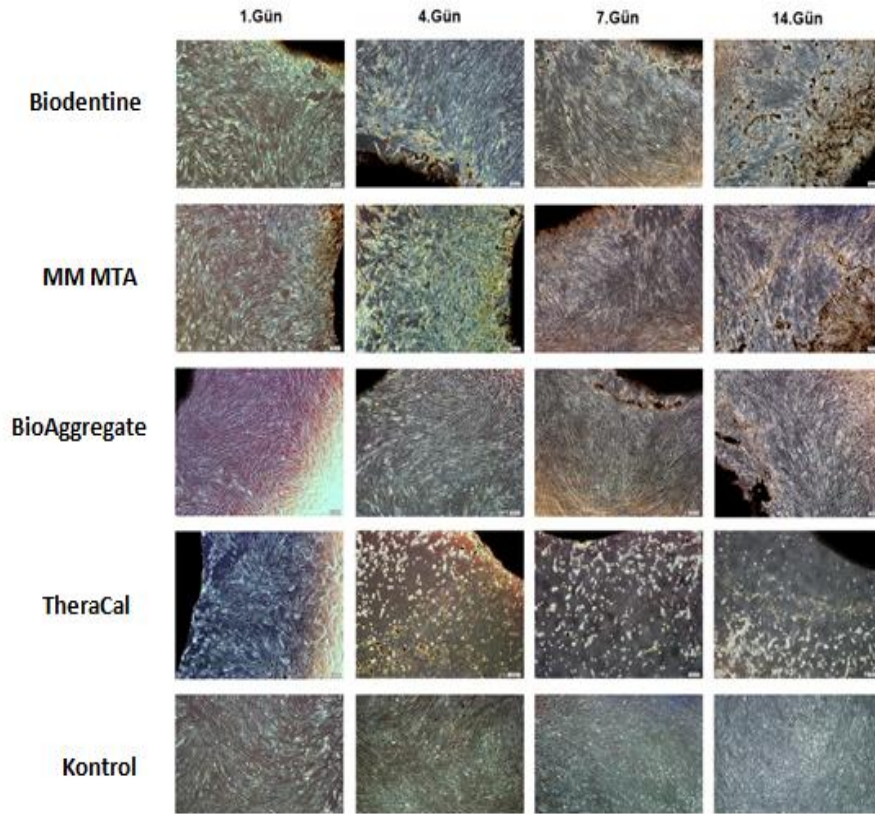
BioAggregate, TheraCal ve kontrol gurubunda ALP aktivitelerinin odontojenik indüksiyon besi ortamında zamana bağlı olarak arttığı gözlenmektedir. Diş pulpası mezenkimal kök hücrelerinin odontojenik farklılaşmasının 7. ve 14. günlerinde yapılan ALP ölçümlerinde TheraCal gurubunda odontojenik farklılaşma ortalama değerlerinin diğer gruplardan daha yüksek olduğu gözlenmiştir. En az ortalama ALP aktivite değerleri Biodentine ve MM MTA gruplarında gözlenmiştir. Kontrol

gurubuyla karşılaştırıldığında TheraCal'ın 7. ve 14. günlerde ALP aktivitesini daha fazla arttırdığı görülmektedir.

### 4.3.Morfolojik Bulgular

#### Faz Kontrast Mikroskobu

Bu tür mikroskop sadece hücrelerin, kültür ortamında “flask (cam kap)” veya “plakalarda” büyütüldüğü çalışmalarda, hücreyi veya hücre topluluğunu incelemek amacıyla kullanılır. Ölen hücreler yapıştıkları alt tabakadan ayrılacakları için besiyeri içinde yüzmeye başlarlar. Bu hücreler faz kontrast mikroskobu ile gözlenebilirler.



Şekil 4. 3. DP-MKH' lerinin odontojenik induksiyon ortamında test materyalleri ile ortak kültürünün faz kontrast mikroskopik görüntüleri

Diş pulpası mezenkimal kök hücrelerinin, materyaller ile ortak kültürleri süresince morfolojik özellikleri faz kontrast mikroskobu ile incelenmiştir. Kültürün ilk günlerinde fibroblast benzeri, iğsi hücrelerden oluşan populasyon gözlenmiştir. Bu morfolojinin sonraki günlerde materyallerin etkileri sonucunda değişmediği veya bozulmaya başladığı gözlenmiştir. Diş pulpası mezenkimal kök hücrelerinin Biodentin, MM-MTA ve Bioagregate ile ortak kültürü sonucunda faz kontrast mikroskobisinde hücrelerin 7. güne kadar morfolojilerini koruduğu, ancak 7. günden sonra hücrelerin kültür kabı tabanından ayrıldığı ve yuvarlak bir morfoloji sergilediği gözlenmiştir (Şekil 4.1). Bu bulgu WST-1 sonuçları ile uyumluluk göstermektedir. TheraCal grubunda ise toksik etkinin 1. günden sonra başladığı ve 14. güne kadar hücrelerin çoğunun kültür kabından ayrıldığı gözlenmektedir. Hücrelerin toksik etkiden dolayı sayıca azaldığını gösteren faz kontrast mikroskobik bulguları Theracal grubunda da WST-1 analizi sonuçlarıyla da uyumludur.

## 5.TARTIŞMA

Çürük ve travma nedeni ile oluşan diş kayıpları ciddi bir sağlık sorunu oluşturmaktadır. Hastalanmış ya da zarar görmüş dişlerin rejenerasyonunun sağlanması en önemli ve konservatif tedavi seçeneklerinden birini oluşturmaktadır. Diş pulpasında da bulunan post natal kök hücrelerin esas görevleri buldukları dokuyu tamir etmek ve dokunun devamlılığını sağlamaktır (112, 113).

Kök hücreler, özelleşmemiş hücreler olup, uzun süreli kendini yenileme ve çoklu hücre tipine yönelme yeteneğine sahiptir. Bu özellikleriyle dokuların rejenerasyonuna katkıda bulunmaktadırlar. Bu hücrelerin yaşam boyunca sınırsızca bölünerek diğer hücrelerin yerini aldıkları düşünülmektedir (114). Kök hücreler aynı zamanda, diğer dokulara ait özelleşmiş hücreleri oluşturma potansiyeline de sahiptir ve bu durum “transdiferansiyasyon” ya da “plastisite” olarak adlandırılır. Post natal kök hücreler kemik iliği sinir dokusu, deri, retina ve sıklıkla dental epitel gibi çeşitli dokularda bulunmaktadır (112).

Çeşitli dokulardan elde edilen kök hücreler birçok hücre tipine dönüştürülerek doku onarımında kullanılmaktadır (115). Diş pulpası, son zamanlarda üzerinde önemle durulan ve çeşitli kök hücre araştırmalarında kullanılan bir kök hücre kaynağıdır (113). Kolayca elde edilebilmesi, zorlu ve karmaşık prosedürlere ihtiyaç göstermemesi çok önemli bir avantaj oluşturmaktadır. Bu tez çalışmasında test materyallerinin odontojenik ve sitotoksik etkilerinin incelenmesi için, bu avantajlarından dolayı diş pulpası mezenkimal kök hücreleri kullanılmıştır.

Odontojenik farklılaşma ile ilişkili genetik değişiklikleri incelemek, (116) immunohistokimyasal analizler (117) ve diğer kuafaj materyallerinin odontoblastik farklılaşmasının incelenmesi (118) gibi birçok araştırmada diş pulpası kök hücreleri kullanılmaktadır.

Dental kök hücreler, diş çürüğü oluşumu sonrası büyüme faktörlerinin salınımı ile aktifleşerek tamir dokusu oluşumunda, dentin-pulpa kompleksinin rejenerasyonunda görev yapmaktadır (114). Yapılan çalışmalarda dentin/pulpa dokusu ve sement/periodontal dokusunun, insan dental pulpa kök hücreleri ve periodontal ligament kök hücreleriyle rejenere olabileceği bildirilmektedir (119).

Diş hekimliği alanında, diş kök hücreleriyle ilgili yapılan çalışmaların, daha çok dişlerin rejenerasyonuna yönelik araştırmalarda yoğunlaştığı görülmektedir. Kemirgenlerde hücre temelli çalışmaların gelecek vaad etmesi insanlar için umut kaynağı olmuştur (120, 121). İnsanın kendi dokusundan diş dokusuna benzer bir yapı oluşturulmaya çalışılmaktadır. Uzun dönem de hedeflenen ise canlı diş dokusunun oluşturulmasıdır (122).

Yıllardır araştırmacılar, kaybolan veya zarar gören diş dokularının tamirini anlamak için çalışma yapmaktadır. Dr.B.W. Hermann tarafından, 1952 yılında kalsiyum hidroksitin pulpa amputasyonu tedavisinde kullanılması, rejeneratif tedaviye ait ilk girişim olarak kabul edilmektedir (10). Pulpanın açığa çıktığı durumlarda, kalsiyum hidroksit esaslı patların etkisiyle fibröz doku uyarılarak, odontoblast hücreleri tarafından dentin oluşumu sağlanmaktaydı. Kuafaj tedavileri sırasında pulpa dokusu üzerine sıklıkla kalsiyum hidroksit ( $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ) içeren patlar yerleştirilmektedir. Ancak bu materyallerin dentin yüzeyine zayıf bağlandıkları, mikrosızıntıyı önleyemedikleri ve bir süre sonra restorasyon altında çözünmeleri gibi dezavantajları görülmüştür (81, 82). Ayrıca, oluşan dentin köprülerinde tünel defektleri olabileceği de bildirilmiştir (56).

Bu nedenlerle  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  'te alternatif olabilecek materyaller araştırılmaya başlanmıştır. Araştırmacılar ideal bir pulpa kuafaj materyalinin yaralanmış pulpanın bakteriyel kontaminasyonunu önleyebilmesi ve aynı zamanda da reperatif dentin oluşumunu teşvik edici dentinojenik özelliğinin bulunması gerektiğini belirtmektedirler (83).

Bu çalışmada kullanılan test materyalleri,  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  e ait dezavantajları ortadan kaldırmaya yönelik ve  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  ' e alternatif olarak son yıllarda üretilen materyallerden oluşmaktadır.

Değişik hücre gruplarının kıyaslandığı bir çalışmada, odontoblast farklılaşması, sadece mezenkim kökenli olan hücreler tarafından gerçekleştirildiği gözlenmiştir (123). Apikal papilla dokusu mezenkimal yapıda kök hücreleri içermektedir. Bu hücrelerin primer odontoblastların kaynağını oluşturarak kök dentininin yapımında görev aldığı bilinmektedir (124). Araştırmacılar, meydana gelen dokuların farklı



olmasını; dentin, sement ve kemik oluşumu için gereken moleküler düzenleyicilerin aynı olmasına rağmen hücre gruplarına özel proteinlerin (genlerin) ve büyüme faktörlerini harekete geçiren transkriptör faktörlerinin (moleküler sinyallerin) farklı olmasına bağlamaktadırlar (125). Bu çalışmada test materyallerinin sert doku oluşturma potansiyellerinin karşılaştırılması amacıyla, diş pulpası mezenkimal kök hücreleri ile test materyalleri odontojenik farklılaşma besiyerinde ortak kültüre edilmiştir. Bu şekilde diş pulpası mezenkimal kök hücrelerinin odontoblastik hücrelere farklılaşması kültür ortamı kullanılarak indüklenmiştir.

Restoratif materyallerin biyouyumluluğunu ve dokular üzerindeki etkilerini değerlendiren araştırmalarda çeşitli test metotları kullanılmaktadır. Bu metotlardan en yaygın olarak kullanılanları hayvan deneyleri ve hücre kültür testleridir. Dental materyallerin sitotoksitesini değerlendirmek için hayvan deneyleri yapılması uzun zaman almakta, pahalı ve etik problemlere yol açmaktadır. Hayvan deneyleri ile karşılaştırıldığında hücre kültür metotları önemli teknik avantajlara sahip olmaktadır. Hücre kültür metotları daha iyi standardize edilebilir ve bu metot ile deneylerin tekrar edilebilirliği kolay hale gelebilir. Aynı zamanda hücre kültür testleri uygulaması kolay, daha az zaman alan ve daha düşük maliyete sahip testlerdir (126). Pulpa dokusundan elde edilen hücrelerden kültür ortamında belirli özelliklere sahip hücre kolonileri ortaya çıkartılabilmektedir (127).

Dental materyallerin sitotoksitesinin değerlendirildiği *in vitro* testlerde materyallerin *in vivo* ortamda oluşturduğu temas şekilleri taklit edilmeye çalışılmıştır. *In vitro* direkt hücre materyal temas testlerinde deney materyalleri doğrudan hücre ile temas etmektedir (105). Kuafaj tedavisinde kullanılan materyaller ile açığa çıkan pulpa dokusu örtüldüğünden ve materyaller hücrelere direkt temas ettiğinden dolayı çalışmamızda sitotoksitesite ve ALP aktivitesi testlerinde hücre kültür test yöntemleri tercih edilmiştir.

### **5.1.Odontojenik Farklılaştırma Bulgularının Tartışılması**

Yara iyileşme süreci; inflamatuvar ve fibrojenik faz, rejeneratif aşama, ve yenilenme aşaması olarak üç ayrı evreye ayrılır (128). Bu fazlar arasında, hücre çoğalması, hücre göçü, hücre adezyonu, doku rejenerasyonu için gerekli süreçlerdir.

Progenitör hücrelerin, pulpa-dentin sınırı sürekliliğini kaybettiğinde odontoblast benzeri hücelere farklılaştığı bilinmektedir (63, 129).

Direkt pulpa kuafajı yaralı pulpa perforasyon alanının bir dental materyal ile örtülmesi esasına dayanan, onarıcı dentinojenik cevabı uyaran ve dental pulpanın canlılığını sürdürebilmesi için gerekli olan çok önemli bir tedavidir (130). Direkt kuafajda kullanılan materyaller dentin pulpa kompleksini korumak için bariyer oluşturmalı ve pulpa ve restoratif materyal arasında yeni bir dentin köprüsü veya dentin benzeri köprü oluşumunu uyarmalıdır (56).

İnsan diş pulpası kök hücrelerinin odontoblastik farklılaşması için standart bir indüksiyon besiyeri olmamasına rağmen, yapılan çalışmalarda Gronthos ve ekibi tarafından bildirilen protokol yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu protokole göre 3. ,4. veya 5. pasajdaki hücreler, fetal sığır serumu, L-glutamin, L-askorbik asit 2-fosfat, penisilin ve streptomisin, monopotasyum fosfat ve deksametazon ile takviye edilmiş MEM $\alpha$  (Minimum Essential Medium Alpha) içeren odontojenik indüksiyon ortamı ile birlikte inkübe edilir (131).

Günümüze kadar, mezenkimal pulpa dokusundan odontoblast benzeri hücre oluşumunu sağlamak amacıyla çeşitli hücre kültürü çalışmaları yapılmıştır. Hücre farklılaşması için, hücrelerin alındığı dişin bulunduğu gelişim evresi kadar, kullanılan maddelerin miktarı da önemli olmaktadır. Odontojenik farklılaşmada mineralizasyon beta-gliserolfosfat varlığında sağlanabilirken serum miktarı bu farklılaşmada etkilidir (132).

Diş pulpası kaynaklı kök hücreler besi yerinde sadece organik fosfat kaynağı olan  $\beta$ -gliserofosfat bulunması durumunda bile mineralizasyon yapabildiği bildirilmiştir (132). Diğer bir deyişle DP-MKH' ler odontojenik farklılaşma için deksametazon ve askorbik asit gibi osteojenik farklılaşma faktörlerine gereksinim duymamaktadır, fakat bunların yokluğunda ortamda organik fosfat kaynağı bulunması durumunda da kalsiyum fosfat minerali oluşturabilmektedir (133).

Morsecek ve ark. steroid hormonunun glikokortikoid sınıfının bir üyesi olan deksametazonun, diş folikülü kök hücrelerinin kemik hücresine farklılaşmasını

başlattığını hatta, insülinin de deksametazon kadar olmasa bile bu değişimi sağladığını ortaya koymuşlardır (125).

Moazzami ve arkadaşları deksametazon,  $\beta$ -gliserofosfat ve vitamin-D kombinyonu ile rat pulpası üzerinde yaptıkları çalışmada dentin köprüsü oluşumunu uyardığını göstermişlerdir(134). Çalışmamızda da odontojenik induksiyon besi yeri hücre kültürlerinde odontoblast farklılaşması için  $\beta$ -gliserofosfat, askorbik asit ve deksametazon kullanılmıştır.

Alliot-Licht (135) perisit içeren insan dental pulpa kültüründe in vitro olarak deksametazonun osteojenik farklılaşma üzerindeki etkisinin incelediği, Zhang ve arkadaşlarının (136) ratlardan aldıkları post natal dental kök hücrelerin beta-gliserofosfat, deksametazon, ve L-askorbik asit ile destekli kültür ortamında ALP aktivitesini analiz etikleri çalışmalarda ALP aktivitesinin giderek arttığı fakat farklılaşma sırasında bu aktivitelerinin zamanla azaldığını gözlemlemişlerdir. Bizim çalışmamızda da TheraCal ve BioAggregate grubunda ALP enzim aktivitesinin deney süresi boyunca yükseldiği gözlemlenmiştir.

Alkalin fosfatazlar yüksek pH' da (pH 8-10) monofosfat esterlerini hidrolize eden hücre membranında bulunan ektoenzimlerdir. Adından da anlaşılacağı gibi alkali ortamda etkinlik gösterirler (137). İnsan ALP' si dokuya özgü olmayan, intestinal, plasental ve germ hücrelerden olmak üzere 4 çeşittir. Dokuya özgü olmayan alkalin fosfatazlar hipertrofik kondrositler, osteoblastlar ve odontoblastların hücre zarları üzerinden eksprese edilirler ve ayrıca bu hücrelerden tomurcuklanan matris veziküllerin zarları üzerinden de konsantre edilmektedirler (138, 139). ALP aktivitesinin induksiyonu, osteo/odontoblastik farklılaşmanın erken bir belirteçidir ve nihai mineralizasyon sürecinde önemli bir rol oynadığı bilinmektedir (140). Çalışmamızda da test materyallerinin diş pulpası mezenkimal kök hücreleri üzerindeki odontoblastik farklılaştırma etkilerini gözlemek amacıyla ALP enzim aktivitesi testi yapılmıştır.

Kalsiyum ( $Ca^{+}$ ) iyonlarının, mineralize sert dokuların oluşumunda çeşitli biyokimyasal reaksiyonlarda görev aldığı bilinmektedir.  $Ca^{+}$  iyonları kalsiyum kanalları tarafından, kemik ile ilişkili proteinlerin ekspresyonunu uyarabilmekte ve

mineralizasyon sürecinde önemli bir rol oynayan adenozin trifosfat (ATP)' yi aktive edebilmektedir (141).  $Ca^{+}$  iyonlarının, pulpa hücrelerinin farklılaşması ve mineralizasyonu için gerekli olduğu ve  $Ca^{+}$  ' dan zengin besi ortamının odontoblast-benzeri hücrelerin farklılaşmasını ve çoğalmasını uyardığı bilinmektedir (142). Buna ek olarak,  $Ca^{+}$  iyonları, özellikle pulpa kalsifikasyonu sırasında osteopontin ve kemik morfojenik protein-2 (KMP-2) düzeylerini modüle ettiği ve  $Ca^{+}$  salınımının dentin mineralizasyonu ve dentin köprüsü oluşumunu korumaya yardımcı olan pirofosfataz aktivitesini artırdığı bildirilmiştir (143, 144).

Pulpa kuafaj materyallerinin  $Ca^{+}$  ve  $OH^{-}$  iyonlarını serbestlemesi ortam pH' sını arttırabilmektedir. Pulpa kuafaj materyallerinin alkalizan gücü bununla ilişkili biyolojik özellikleri için önemlidir. Alkalin pH' ın onarıcı dentinin oluşması ile ilişkili enflamatuar reaksiyonlara neden olduğu bilinmektedir ve aynı zamanda hidroksiapatit oluşumunu destekleyebilmektedir (99, 145).

Gandolfi ve arkadaşlarının ProRoot MTA ve Dycal'ı kontrol grubu olarak kullandığı ve TheraCal'ın kimyasal ve fiziksel özelliklerini incelediği çalışmalarında, TheraCal'ın istatistiksel olarak diğerlerinden daha fazla  $Ca^{+}$  serbestleştirdiğini rapor etmişlerdir. Aynı çalışmada TheraCal'ın ilk günler pH' ının alkaline seviyede olduğu, fakat daha sonra takip eden iki hafta içinde bu alkaline seviyenin gerilediğini gözlemlenmiştir (99).

Torabinejad ve Parirokh, yaptıkları çalışmalarda MTA' nın pulpa ekspozu sonrası dentin köprüsü oluşumu üzerindeki olumlu etkileri olduğunu ancak rezin esaslı kuafaj materyallerinin dentin köprüsü oluşumu üzerinde zayıf etkilere sahip olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca MTA ile örtülmüş in-vivo ve in-vitro çalışmalar, ekspoz alanlar altında dentin köprüsü oluşumunu göstermişlerdir (86, 87).

Fakat odontojenik farklılaştırmanın değerlendirildiği bu tez çalışmasında kuafaj materyallerinden TheraCal, rezin içerikli olmasına rağmen, diğer materyallerden daha yüksek ALP enzim aktivitesi sergilemiştir. TheraCal'ın  $Ca^{+}$  iyonu serbestleştirme özelliğinin bulunması ve önceki çalışmalara uyumlu olarak alkaline fosfatazın alkaline ortamda etkili olduğu göz önüne alındığında,  $Ca^{+}$  iyonları TheraCal grubunda kültür ortamının pH' ını yükseltmiş olabilir. TheraCal grubunun

odontojenik potansiyelinin diğer kuafaj materyallerinden yüksek olması, kök hücreler üzerindeki matris veziküllerinde bulunan ALP 'nin alkali ortamda reaksiyona girmesi ve ALP enziminin aktivitesini diğerlerinden daha fazla artması ile açıklanabilir. Biodentine ve MM MTA ise kontrol grubu ile karşılaştırıldığında düşük düzeyde ALP aktivitesi sergilediği gözlemlenmiştir.

Nowicka ve arkadaşları Biodentine ile direkt kuafaj tedavisi yapılan pulpada tam dentin köprüsü oluşumu ve enflamasyon olmayan pulpa cevabı gözlemlemişlerdir. Buna ek olarak, Biodentine ile direkt kuafaj sonrasında, osteodentin altında tubuler dentine doğru iyi düzenlenmiş odontoblast ve odontoblast benzeri hücre tabakaları görülmüştür (146).

Tran ve arkadaşlarının ratlarda yaptığı bir hayvan çalışmasında Biodentine, MTA ve Ca(OH)<sub>2</sub>'nin yaralı pulpa dokusu üzerinde etkilerini incelemiş 7. gün sonunda tüm materyallerin hücre proliferasyonunu arttırdığı mineralizasyon oluşumunu tetiklediğini gözlemlemişlerdir. Ayrıca odontoblast benzeri hücreler tarafından 30 gün sonrasında dentin köprüsü oluştuğu ve Biodentine grubundaki dentin köprüsünün daha homojen ve primer dentin ile sürekliliği olduğunu belirtmişlerdir (147). ALP enzim aktivitesinin değerlendirildiği bu tez çalışmasında kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, en az ALP aktivite değerleri Biodentine ve MM MTA gruplarında gözlenmiştir.

Chang ve arkadaşları, BioAggregate ve MM MTA'yı ProRoot MTA ile karşılaştırdığı çalışmalarında BioAggregate ve MM MTA'nın ALP aktivitesini benzer şekilde arttırdığı ve biyouyumluluklarının da birbirlerine yakın olduğunu rapor etmişlerdir (148). Bu tez çalışmasında BioAggregate ve MM MTA'nın ALP aktivitesi değerleri farklılık göstermektedir. Bioaggregate ALP aktivitesi yönünden kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 1.,4. ve 7. günlerdeki ALP aktivite değerleri birbirlerine yakındır. MM MTA ise 4. ve 7. günlerde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında daha düşük ALP aktivitesi göstermiştir.

BioAggregate'in osteoblast hücreleri üzerinde etkilerinin incelendiği bir çalışmada, fare osteoblast hücrelerinde mineralizasyon süreciyle ilişkili olan genlerin ekspresyonunu uyardığı gösterilmiştir. BioAggregate'in bu özelliğinin yapısında

bulunan hidroksiapatit molekülüne bağlı olabileceği öne sürülmüştür (98). Bu tez çalışmasında biyoseramik sınıfında olan BioAggregate' in, materyallerle temas etmemiş odontojenik besi yeri olan kontrol grubu ile uyumlu bir şekilde ALP enzim aktivitesini zamanla arttırdığı görülmüştür. Fakat bu kuafaj materyalinin yapısında bulunan kalsiyum silikat, kalsiyum hidroksit ve hidroksiapatit gibi moleküllerin mineralizasyon süreçleri ile ilişkili genlerin ekspresyonu üzerindeki etkilerinin araştırılması için yeni çalışmalara ihtiyaç vardır.

## 5.2.Sitotoksisite Bulgularının Tartışılması

Yapay dokuların üretilmesi için kullanılan hücrelerin, kalite kontrol sürecinin en önemli aşamalarından biri de hücre canlılığının değerlendirilmesidir. Sıralı hücre kültüründe oluşabilecek spesifik hücre ölümü mekanizmalarının anlaşılması, en uygun hücre kaynaklarının belirlenmesine katkıda bulunacaktır (149).

Hücre canlılığını ölçmek için, trypan blue exclusion test, Water-Soluble Tetrazolium 1 (WST-1), LIVE/ DEAD Viability/Cytotoxicity Kit ve electron probe x-ray microanalysis (EPXMA) gibi çeşitli yöntemler kullanılmıştır (150). WST-1 testi hücre proliferasyonunu ve sitotoksisitenin belirlenmesi esasına dayanmaktadır. Tetrazolium tuzu toksik olmayan, suda çözünebilen membran-geçirgen ürünlere metabolize edilirler, böylelikle kültürde kolayca diffüze olurlar. Bu nedenle WST-1 testinde, hücre kültürlerinin canlılığı riske atılmamakta ve arada çözünme gibi başka bir aşama içermemektedir (151). Yapışık veya süspansiyon halindeki hücreler bir mikro levhada kültüre edilmektedir. Daha sonra WST-1 ile inkübe edilmekte ve spektrofotometre ile değerlendirilmektedir. Bu analiz hücresel dehidrogenaz sonucu tetrazolium tuzunun WST-1'in redüksiyonla formazana dönüşmesi ve boya absorbansının görüntülenmesi esasına dayanmaktadır (152). Yani daha fazla boya absorbansı daha fazla canlılığa işaret etmektedir.

WST-1 mitokondrial metabolik aktiviteyi ve insan DP-KH' lerinin hücre proliferasyonunu belirlemek için kullanılan bir yöntemdir. Ayrıca WST-1 mitokondriyal işlevi hakkında ayrıntılı bilgi veren, diğer hücre canlılığı deneylerini tamamlayacak bir metabolik tekniktir (153, 154). Bu nedenle çalışmamızda

kullanılan test materyallerinin pulpa kök hücreleri üzerindeki sitotoksitelerini ölçmek amacıyla WST-1 testi tercih edilmiştir.

İnsanlar üzerinde kullanılan materyallerin, klinik açıdan güvenli olması gerekmektedir. Çalışmamızda kullandığımız materyallerin, pulpa kuafajı, retrograd dolgu malzemesi, kök kanal dolgusu ve perforasyon tamir dolgusu olarak kullanım endikasyonları vardır. Bu materyallerin içerikleri kan ve doku sıvıları ile vucuda geçebilmekte ve içeriğindeki metaller vucutta veya lokal olarak kullanıldığı bölgelerde toksik etki gösterebilmektedir (96). Çeşitli ticari MTA içerikli materyallerde arsenik ve diğer metalleri araştıran çalışmalar çelişkili sonuçlar göstermiştir (155-157). Kum ve arkadaşları MM MTA ve BioAggregate materyallerini de içeren çalışmalarında MM MTA' nın ISO standartlarında kabul edilebilir düşük seviyelerde birçok metal içerdiğini Bioagregate'ın ise sadece alüminyum içerdiğini bildirmişlerdir (96). Bu tez çalışmasında kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 4. gün yapılan ölçümlerde tüm materyallerin çoğalan hücre sayılarının kontrol grubuna göre daha az olduğu görülmektedir. MM MTA diğer materyallere göre 4. gün yapılan ölçümlerde daha fazla hücre canlılığı göstermiştir. Bu sonuçlara göre MM MTA' nın 4. günde diğer materyallere göre daha az sitotoksik etki gösterdiği söylenebilir. Test materyalleri arasında hücre sayılarında en fazla azalmaya neden olan 4. günden itibaren TheraCal olarak gözlemlenmiştir.. TheraCal'ın rezin içerikli olması, ışıkla sertleşmesi ve buna bağlı artık monomerin oluşma riski sitotoksik olmasına neden olabilir.

Işıklı sertleşen TheraCal rezin içermektedir. Polimerizasyon reaksiyonunun başlatılabilmesi için rezin içeriğinde 400-450 nm dalga boyuna duyarlı fotoinitiatör olarak ışık emici diketon absorber (kamforokinon), hızlandırıcı olarak da alifatik amin bulunmaktadır. Işık kaynakları rezin içeriğindeki fotoinitiatör molekülleri aktive ederek oluşan serbest radikallerle polimerizasyonu başlatır (158). Resin matrisinde ayrıca; TEGDMA, UDMA, HEMA gibi monomerler bulunmaktadır. Monomer içerikli materyallerden artık monomerlerin salındığı ve salınan bu maddelerin pulpa üzerinde olumsuz etkilere neden olduğu vurgulanmaktadır (159). Yapılarında zamanla meydana gelen bozulmayla ve tamamlanmamış veya yetersiz polimerizasyonu nedeniyle, monomer içerikli materyallerden ağız ortamına sızan

içeriklerin sitotoksik olduğu bir çok çalışmada belirtilmiştir (160). Monomer içeriğinden dolayı TheraCal'den serbest monomerlerin salınma potansiyeli sitotoksiteyi etkileyebilmektedir.

HEMA ile karşılaştırıldığında TEGDMA'nın yüksek toksisitesi; TEGDMA'nın yüzey aktif madde gibi davranarak hücre membranındaki lipit tabakası ile etkileşime girme potansiyeli veya TEGDMA'nın lipit peroksidasyonuna neden olma potansiyeli ile açıklanmıştır (161). Ayrıca TEGDMA'nın HEMA'ya oranla yağ dokusunda yüksek çözünülebilirliğe sahip olduğu belirtilmiştir (162).

Kuafaj materyallerinin WST-1 canlılık testi ile sitotoksitesinin incelendiği bu tez çalışmasında TheraCal test numunelerinin bulunduğu kültür ortamında hücre sayısında ciddi bir düşüş olmuş ve materyaller içerisinde TheraCal'ın sitotoksik etkisi yüksek olarak gözlenmiştir. Diş pulpası kök hücrelerinin zarları da diğer hücrelerde olduğu gibi % 40-50 lipit tabakası ile çevrili olduğu göz önüne alındığında ve TheraCal içeriğindeki monomerlerden biri olan TEGDMA'nın bu yağ dokusunu peroksidasyona uğratarak hücre zar yapısını bozduğu dolayısı ile hücre ölümüne yol açtığı söylenebilir.

Biodentine ile farklı konsantrasyonlarda yapılan bir çalışmada düşük konsantrasyonlardaki Biodentin' in kök hücre proliferasyonunu arttırdığı yüksek oranların istatistiksel olarak azalttığı, ayrıca düşük konsantrasyonların migrasyon ve adezyon yeteneğini arttırdığı görülmüştür (163). Çalışmamızda üretici firma tavsiyelerine göre hazırlanan Biodentine grubunda 4. ve 7. günlere kadar canlı hücre sayısında artma, 7. günden sonra ise canlı hücre sayısında azalma olduğu görülmüştür.

BioAggregate' in biyouyumluluğunun in vitro olarak araştırıldığı hücre toksisite çalışmasında insan mezenkim hücreleri kullanılmış ve sonuç olarak beyaz MTA ile arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı bildirilmiştir (93). Bir diğer hücre toksisitesi çalışmasında insan periodontal ligament fibroblastları kullanılmış ve BioAggregate'in bu tip hücreler üzerinde toksik etki göstermediği sonucuna varılmıştır. (92). Pulpa kuafaj materyallerinin, WST-1 testi ile pulpa kök hücreleri



üzerinde sitotoksik etkilerin araştırıldığı bu tez çalışmasında BioAggregate grubunda kontrol grubuna göre daha az hücre artışı gözlemlenmiştir.

Bu tez çalışmasında farklı yapıdaki pulpa kuafaj materyallerinin diş pulpası mezenkimal kök hücreleri ile ortak kültürleri sonrası kuafaj materyallerinin sitotoksik potansiyelleri incelenmiş ve odontoblastik farklılaştırma açısından bu farklı pulpa kuafaj materyalleri kıyaslanmıştır. Sonuç olarak ticari olarak piyasada bulunan bu kuafaj materyallerinin, odontoblastik farklılaştırma potansiyellerinin değerlendirilmesi amacıyla ALP enzim aktivitesi deneyi yapılmış, kuafaj materyallerinin ALP enzim aktivitesini farklı oranlarda arttırdığı bulunmuştur. İkinci olarak bu güncel kuafaj materyallerinin sitotoksik etkilerinin incelenmesi amacıyla WST-1 testi yapılmış ve test materyallerinin kontrol grubu ile karşılaştırıldığında pulpa kök hücreleri üzerinde daha az hücre artışına neden olduğu sonucuna varılmıştır.

## 6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında erişkin insan diş pulpası dokusundan izole edilen mezenkimal kök hücrelerin karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirildikten sonra in vitro olarak kültür ortamında, güncel kuafaj materyalleri olan Biodentine, BioAggregate, TheraCal ve MM MTA' nın kök hücreler üzerinde odontojenik farklılaştırma ve sitotoksikite testleri sonuçlarına göre;

Materyaller sitotoksikite yönünden WST-1 testi ile değerlendirildiğinde test materyallerinin hepsinde sitotoksik etki gözlenmiştir. 1,4,7 ve 14. günlerdeki sitotoksik etki incelendiğinde, TheraCal deneyin 4. gününden itibaren sitotoksik etki göstermiş. Diğer kuafaj materyalleri ise birbirlerine yakın değerlerde sitotoksik etki göstermişlerdir.

Odontojenik farklılaştırma yönünden değerlendirildiğinde, sitotoksik etkisi diğerlerinden daha fazla olmasına rağmen TheraCal' in odontojenik potansiyeli diğerlerinden daha fazla gözlenmiştir. MM MTA ve Biodentine' nin diğer gruplara göre diş pulpası kök hücrelerini odontojenik farklılaştırma yönünden daha az uyardığı bulunmuştur. BioAggregate'in ise odontojenik farklılaştırma açısından kontrol grubu ile uyumlu bir şekilde ALP enzim aktivitesini zamanla arttırdığı görülmüştür.

Ancak materyallerin ALP aktivitesi ve odontojenik potansiyellerinin daha iyi anlaşılabilmesi için diğer kuafaj materyalleri ile karşılaştırıldığı başka çalışmalara da ihtiyaç duyulmaktadır. Hücre kültürü çalışmaları tek yönlü olduğundan materyallerin sitotoksikitesi ve odontojenik potansiyellerinin ortaya çıkarılması açısından in vivo çalışmalara da ihtiyaç vardır.

İnsan diş pulpası kök hücrelerini odontojenik yönden uyaran ve toksik etkisi minimal olan yeni materyallerin geliştirilmesi için odontoblast hücrelerinin ve pulpa kaynaklı kök hücrelerinin karakterleri üzerine özellikle kök hücreleri harekete geçiren sinyallerin ve moleküllerin anlaşılması adına yeni çalışmalar da yapılabilir.

Bu şekilde kuafaj tedavisinden beklenen ağrısız ve çabuk iyileşen, dentin köprüsü oluşumu ile sonuçlanan tedavilerin başarı yüzdesi artırılabilir.

## KAYNAKLAR

1. Kranz, A. M., Rozier, R. G., Preisser, J. S., Stearns, S. C., Weinberger, M.Lee, J. Y. (2014). Preventive Services by Medical and Dental Providers and Treatment Outcomes. *J Dent Res.* 93(7):633-638.
2. Kidd, E. A. (1997). A caries control programme for adult patients. *Dent Update.* 24 (7). 296-301.
3. Arana-Chavez, V. E., Massa, L. F. (2004). Odontoblasts: the cells forming and maintaining dentine. *Int J Biochem Cell Biol.* 36 (8). 1367-1373.
4. Smith, A. J., Cassidy, N., Perry, H., Begue-Kirn, C., Ruch, J. V.Lesot, H. (1995). Reactionary dentinogenesis. *Int J Dev Biol.* 39 (1). 273-280.
5. Sloan, A. J., Waddington, R. J. (2009). Dental pulp stem cells: what, where, how? *Int J Paediatr Dent.* 19 (1). 61-70.
6. Stocum, D. L. (2001). Stem cells in regenerative biology and medicine. *Wound Repair Regen.* 9 (6). 429-442.
7. Petersen, B. E., Bowen, W. C., Patrene, K. D., Mars, W. M., Sullivan, A. K., Murase, N. (1999). Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science.* 284 (5417). 1168-1170.
8. Duailibi, M. T., Duailibi, S. E., Duailibi Neto, E. F., Negreiros, R. M., Jorge, W. A., Ferreira, L. M. (2011). Tooth tissue engineering: optimal dental stem cell harvest based on tooth development. *Artif Organs.* 35 (7). e129-135.
9. Rodriguez-Lozano, F. J., Insausti, C. L., Iniesta, F., Blanquer, M., Ramirez, M. D., Meseguer, L. (2012). Mesenchymal dental stem cells in regenerative dentistry. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 17 (6). e1062-1067.
10. Murray, P. E., Garcia-Godoy, F.Hargreaves, K. M. (2007). Regenerative endodontics: a review of current status and a call for action. *J Endod.* 33 (4). 377-390.
11. European Molecular Biology Organization. (2006). *Stem Cell Research-Status Prospects Prerequisites.* s: 11-13.
12. The National Academy of Sciences. (2002) *Stem Cells and the Future of Regenerative Medicine.* National Academy Press, Washington, DC, s:9-12.

13. Stewart, R., Stojkovic, M., Lako, M. (2006). Mechanisms of self-renewal in human embryonic stem cells. *Eur J Cancer*. 42 (9). 1257-1272.
14. Gronthos, S., Mankani, M., Brahimi, J., Robey, P. G., Shi, S. (2000). Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97 (25). 13625-13630.
15. Jiang, Y., Jahagirdar, B. N., Reinhardt, R. L., Schwartz, R. E., Keene, C. D., Ortiz-Gonzalez, X. R. (2002). Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*. 418 (6893). 41-49.
16. Li, H., Liu, H., Heller, S. (2003). Pluripotent stem cells from the adult mouse inner ear. *Nat Med*. 9 (10). 1293-1299.
17. Zhao, Y., Glesne, D., Huberman, E. (2003). A human peripheral blood monocyte-derived subset acts as pluripotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100 (5). 2426-2431.
18. Kogler, G., Sensken, S., Airey, J. A., Trapp, T., Muschen, M., Feldhahn, N. (2004). A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential. *J Exp Med*. 200 (2). 123-135.
19. Murrell, W., Feron, F., Wetzig, A., Cameron, N., Splatt, K., Bellette, B. (2005). Multipotent stem cells from adult olfactory mucosa. *Dev Dyn*. 233 (2). 496-515.
20. Morszeck, C., Reichert, T. E., Vollner, F., Gerlach, T., Driemel, O. (2007). [The state of the art in human dental stem cell research]. *Mund Kiefer Gesichtschir*. 11 (5). 259-266.
21. Gronthos, S., Brahimi, J., Li, W., Fisher, L. W., Cherman, N., Boyde, A. (2002). Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res*. 81 (8). 531-535.
22. d'Aquino, R., Graziano, A., Sampaolesi, M., Laino, G., Pirozzi, G., De Rosa, A. (2007). Human postnatal dental pulp cells co-differentiate into osteoblasts and endotheliocytes: a pivotal synergy leading to adult bone tissue formation. *Cell Death Differ*. 14 (6). 1162-1171.
23. Huang, A. H., Chen, Y. K., Chan, A. W., Shieh, T. Y., Lin, L. M. (2009). Isolation and characterization of human dental pulp stem/stromal cells from

- nonextracted crown-fractured teeth requiring root canal therapy. *J Endod.* 35 (5). 673-681.
24. Stevens, A., Zuliani, T., Olejnik, C., LeRoy, H., Obriot, H., Kerr-Conte, J. (2008). Human dental pulp stem cells differentiate into neural crest-derived melanocytes and have label-retaining and sphere-forming abilities. *Stem Cells Dev.* 17 (6). 1175-1184.
  25. Bishop, A. E., Buttery, L. D., Polak, J. M. (2002). Embryonic stem cells. *J Pathol.* 197 (4). 424-429.
  26. Bayık, M. (2004). *Kök Hücre: Yasamın Kaynağı*. I.Ulusal Klinik Pratikte Kök Hücre ve Gen Tedavisi Kongre Kitabı, s:13-23.
  27. Hiyama, E., Hiyama, K. (2007). Telomere and telomerase in stem cells. *Br J Cancer.* 96 (7). 1020-1024.
  28. Morst (Ministry of Research Science and Tecnology). ( 2006). *Stem Cell Research in New Zealand; Challenges and Opportunities for the Research Sector*. New Zealand p:13-16..
  29. Özel, H.B., Ozan, E., Dabak, Ö. (2008). Embriyonik kök hücreler. *Türkiye Klinikleri J Med Sci.* 28: 333-341.
  30. Blau, H. M., Brazelton, T. R., Weimann, J. M. (2001). The evolving concept of a stem cell: entity or function? *Cell.* 105 (7). 829-841.
  31. Matur İ. (Solmaz S. Current Approaches in Stem Cell Production. *Archives Medical Review Journal.* 2011; 20(3): 168-186. Turkish. ).
  32. Karaöz, E., Ovalı, E. ( 2004 ). Kök Hücreler, Atı Teknoloji Yayınları (1), Trabzon.
  33. Freshney, I. A., Stacey, G.I., Auerbach, J. M. , Culture of Human Stem Cells, Wiley-Liss, 2007). 5-18.
  34. Türkiye bilimler akademisi. (2009). *Kök Hücre Biyolojisi ve Klinik Uygulamalar 1*. Ankra : Türkiye Bilimler Akademisi Yayınları
  35. Loeffler, M., Roeder, I. (2002). Tissue stem cells: definition, plasticity, heterogeneity, self-organization and models--a conceptual approach. *Cells Tissues Organs.* 171 (1). 8-26.

36. Estrela, C., Alencar, A. H., Kitten, G. T., Vencio, E. F., Gava, E. (2011). Mesenchymal stem cells in the dental tissues: perspectives for tissue regeneration. *Braz Dent J.* 22 (2). 91-98.
37. Aydın, A. K , Berbercan, P. ( 2010). Biyomühendislik esasları ile diş oluşturulmasına yönelik yaklaşımlar. *SÜ Dişhek Fak Derg.* 19. 99-114.
38. Krebsbach, P. H., Robey, P. G. (2002). Dental and skeletal stem cells: potential cellular therapeutics for craniofacial regeneration. *J Dent Educ.* 66 (6). 766-773.
39. Shi, S., Bartold, P. M., Miura, M., Seo, B. M., Robey, P. G., Gronthos, S. (2005). The efficacy of mesenchymal stem cells to regenerate and repair dental structures. *Orthod Craniofac Res.* 8 (3). 191-199.
40. Todorović, V., Marković, D., Milošević-Jovčić, N., Petakov, M., Balint, B., Čolić, M. (2008). Dental pulp stem cells - potential significance in regenerative medicine. *Stom Glas,*( 55). 170-8.
41. Zhang, W., Walboomers, X. F., Shi, S., Fan, M.Jansen, J. A. (2006). Multilineage differentiation potential of stem cells derived from human dental pulp after cryopreservation.. *Tissue Eng,* 12 (10). 2813-2823.
42. Zhang, W., Walboomers, X. F., Van Kuppevelt, T. H., Daamen, W. F., Van Damme, P. A., Bian, Z. (2008). In vivo evaluation of human dental pulp stem cells differentiated towards multiple lineages. *J Tissue Eng Regen Med.* 2 (2-3). 117-125.
43. Graziano, A., d'Aquino, R., Laino, G.Papaccio, G. (2008). Dental pulp stem cells: a promising tool for bone regeneration. *Stem Cell Rev.* 4 (1). 21-26.
44. Laino, G., d'Aquino, R., Graziano, A., Lanza, V., Carinci, F., Naro, F. (2005). A new population of human adult dental pulp stem cells: a useful source of living autologous fibrous bone tissue (LAB). *J Bone Miner Res.* 20 (8). 1394-1402.
45. Jo, Y. Y., Lee, H. J., Kook, S. Y., Choung, H. W., Park, J. Y., Chung, J. H. (2007). Isolation and characterization of postnatal stem cells from human dental tissues. *Tissue Eng.* 13 (4). 767-773.
46. Tziafas, D., Smith, A. J., Lesot, H. (2000). Designing new treatment strategies in vital pulp therapy. *J Dent.* 28 (2). 77-92.

47. Ford, T. R., Torabinejad, M., Abedi, H. R., Bakland, L. K., Kariyawasam, S. P. (1996). Using mineral trioxide aggregate as a pulp-capping material. *J Am Dent Assoc.* 127 (10). 1491-1494.
48. Stanley, H. R., Clark, A. E., Pameijer, C. H., Louw, N. P. (2001). Pulp capping with a modified bioglass formula (#A68-modified). *Am J Dent.* 14 (4). 227-232.
49. Gwinnett, A. J., Tay, F. (1998). Early and intermediate time response of the dental pulp to an acid etch technique in vivo. *Am J Dent.* (11). 35-44.
50. Fernandes, A. M., Silva, G. A., Lopes, N., Jr., Napimoga, M. H., Benatti, B. B., Alves, J. B. (2008). Direct capping of human pulps with a dentin bonding system and calcium hydroxide: an immunohistochemical analysis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 105 (3). 385-390.
51. Kitasako, Y., Shibata, S., Tagami, J. (2006). Migration and particle clearance from hard-setting Ca(OH)<sub>2</sub> and self-etching adhesive resin following direct pulp capping. *Am J Dent.* 19 (6). 370-375.
52. Fuks, A. B. (2000). Pulp therapy for the primary and young permanent dentitions. *Dent Clin North Am.* 44 (3). 571-596, vii.
53. Rodd, H. D., Waterhouse, P. J., Fuks, A. B., Fayle, S. A., Moffat, M. A. (2006). Pulp therapy for primary molars. *Int J Paediatr Dent.* (16). 15-23.
54. McDonald, R.E., Avery, D.R., Dean, J.A.,. ((2004). ). *Treatment of deep caries, vital pulp exposure and pulpless teeth..* St. Louis: Mosby Inc.
55. Stanley, H. R. (1989). Pulp capping: conserving the dental pulp--can it be done? Is it worth it? *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 68 (5). 628-639.
56. Modena, K. C., Casas-Apayco, L. C., Atta, M. T., Costa, C. A., Hebling, J., Sipert, C. R. (2009). Cytotoxicity and biocompatibility of direct and indirect pulp capping materials. *J Appl Oral Sci.* 17 (6). 544-554.
57. Kakehashi, S., Stanley, H. R., Fitzgerald, R. J. (1965). The Effects of Surgical Exposures of Dental Pulp in Germ-Free and Conventional Laboratory Rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* (20). 340-349.
58. Cox, C. F., Bergenholtz, G., Fitzgerald, M., Heys, D. R., Heys, R. J., Avery, J. K.. (1982). Capping of the dental pulp mechanically exposed to the oral

- microflora -- a 5 week observation of wound healing in the monkey. *J Oral Pathol.* 11 (4). 327-339.
59. Kopel, H. M. (1992). Considerations for the direct pulp capping procedure in primary teeth: a review of the literature. *ASDC J Dent Child.* 59 (2). 141-149.
  60. Al-Hiyasat, A. S., Barrieshi-Nusair, K. M., Al-Omari, M. A. (2006). The radiographic outcomes of direct pulp-capping procedures performed by dental students: a retrospective study. *J Am Dent Assoc.* 137 (12). 1699-1705.
  61. Raslan, N., Wetzel, W. E. (2006). Exposed human pulp caused by trauma and/or caries in primary dentition: a histological evaluation. *Dent Traumatol.* 22 (3). 145-153.
  62. Mjor, I. A. (2002). Pulp-dentin biology in restorative dentistry. Part 7: The exposed pulp. *Quintessence Int.* 33 (2). 113-135.
  63. Fitzgerald, M. (1979). Cellular mechanics of dentinal bridge repair using 3H-thymidine. *J Dent Res.* (58). 2198-2206.
  64. Stanley, H. R. (1965). *Diseases of dental pulp.* R. W. Tietze (Ed.). Oral Pathology (s. 95-103). New York: McGraw-Hill Book Co Inc.
  65. Cox, C. F., Subay, R. K., Ostro, E., Suzuki, S., Suzuki, S. H. (1996). Tunnel defects in dentin bridges: their formation following direct pulp capping. *Oper Dent.* 21 (1). 4-11.
  66. Kitasako, Y., Arakawa, M., Sonoda, H., Tagami, J. (1999). Light and scanning electron microscopy of the inner surfaces of resins used in direct pulp capping. *Am J Dent.* 12 (5). 217-221.
  67. Kitasako, Y., Inokoshi, S., Tagami, J. (1999). Effects of direct resin pulp capping techniques on short-term response of mechanically exposed pulps. *J Dent.* 27 (4). 257-263.
  68. Kitasako, Y., Shibata, S., Arakawa, M., Cox, C. F., Tagami, J. (2000). A light and transmission microscopic study of mechanically exposed monkey pulps: dynamics of fiber elements during early dentin bridge formation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 89 (2). 224-230.
  69. Kitasako, Y., Shibata, S., Pereira, P. N., Tagami, J. (2000). Short-term dentin bridging of mechanically-exposed pulps capped with adhesive resin systems. *Oper Dent.* 25 (3). 155-162.



70. Santini, A. (1986). Long-term clinical assessment of pulpotomies with calcium hydroxide containing Ledermix in human permanent premolars and molars. *Acta Odontol Pediatr.* 7 (2). 45-50.
71. Kitasako, Y., Murray, P. E., Tagami, J., Smith, A. J. (2002). Histomorphometric analysis of dentinal bridge formation and pulpal inflammation. *Quintessence Int.* 33 (8). 600-608.
72. Stanley, H. R. (1998). Criteria for standardizing and increasing credibility of direct pulp capping studies. *Am J Dent.* (11) 17-34.
73. Cvek, M. (1978). A clinical report on partial pulpotomy and capping with calcium hydroxide in permanent incisors with complicated crown fracture. *J Endod.* 4 (8). 232-237.
74. Tsuneda, Y., Hayakawa, T., Yamamoto, H., Ikemi, T., Nemoto, K. (1995). A histopathological study of direct pulp capping with adhesive resins. *Oper Dent.* 20 (6). 223-229.
75. Jaber, L., Mascres, C., Donohue, W. B. (1991). Electron microscope characteristics of dentin repair after hydroxylapatite direct pulp capping in rats. *J Oral Pathol Med.* 20 (10). 502-508.
76. Jaber, L., Mascres, C., Donohue, W. B. (1992). Reaction of the dental pulp to hydroxyapatite. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 73 (1). 92-98.
77. Barrieshi-Nusair, K. M., Qudeimat, M. A. (2006). A prospective clinical study of mineral trioxide aggregate for partial pulpotomy in cariously exposed permanent teeth. *J Endod.* 32 (8). 731-735.
78. Jepsen, S., Albers, H. K., Fleiner, B., Tucker, M., Rueger, D. (1997). Recombinant human osteogenic protein-1 induces dentin formation: an experimental study in miniature swine. *J Endod.* 23 (6). 378-382.
79. Nakashima, M., Akamine, A. (2005). The application of tissue engineering to regeneration of pulp and dentin in endodontics. *J Endod.* 31 (10). 711-718.
80. Goldberg, M., Six, N., Decup, F., Lasfargues, J. J., Salih, E., Tompkins, K. (2003). Bioactive molecules and the future of pulp therapy. *Am J Dent.* 16 (1). 66-76.

81. Cox, C. F., Suzuki, S. (1994). Re-evaluating pulp protection: calcium hydroxide liners vs. cohesive hybridization. *J Am Dent Assoc.* 125 (7). 823-831.
82. Hwas, M., Sandrik, J. L. (1984). Acid and water solubility and strength of calcium hydroxide bases. *J Am Dent Assoc.* 108 (1). 46-48.
83. Yoshimine, Y., Maeda, K. (1995). Histologic evaluation of tetracalcium phosphate-based cement as a direct pulp-capping agent. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 79 (3). 351-358.
84. Schmitt, D., Lee, J., Bogen, G. (2001). Multifaceted use of ProRoot MTA root canal repair material. *Pediatr Dent.* 23 (4). 326-330.
85. 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 (3). 245-254.
86. Parirokh, M., Torabinejad, M. (2010). Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review--Part III: Clinical applications, drawbacks, and mechanism of action. *J Endod.* 36 (3). 400-413.
87. Torabinejad, M., Parirokh, M. (2010). Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review--part II: leakage and biocompatibility investigations. *J Endod.* 36 (2). 190-202.
88. Laurent, P., Camps, J., About, I. (2012). Biodentine(TM) induces TGF-beta1 release from human pulp cells and early dental pulp mineralization. *Int Endod J.* 45 (5). 439-448.
89. Koubi, G., Colon, P., Franquin, J. C., Hartmann, A., Richard, G., Faure, M. O. (2013). Clinical evaluation of the performance and safety of a new dentine substitute, Biodentine, in the restoration of posterior teeth - a prospective study. *Clin Oral Investig.* 17 (1). 243-249.
90. Eghbal, M. J., Asgary, S., Baglue, R. A., Parirokh, M., Ghodduji, J. (2009). MTA pulpotomy of human permanent molars with irreversible pulpitis. *Aust Endod J.* 35 (1). 4-8.
91. Peng, W., Liu, W., Zhai, W., Jiang, L., Li, L., Chang, J. (2011). Effect of tricalcium silicate on the proliferation and odontogenic differentiation of human dental pulp cells. *J Endod.* 37 (9). 1240-1246.

92. Mukhtar-Fayyad, D. (2011). Cytocompatibility of new bioceramic-based materials on human fibroblast cells (MRC-5). *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 112 (6). e137-142.
93. De-Deus, G., Canabarro, A., Alves, G., Linhares, A., Senne, M. I., Granjeiro, J. M. (2009). Optimal cytocompatibility of a bioceramic nanoparticulate cement in primary human mesenchymal cells. *J Endod.* 35 (10). 1387-1390.
94. Park, J. W., Hong, S. H., Kim, J. H., Lee, S. J., Shin, S. J. (2010). X-Ray diffraction analysis of white ProRoot MTA and Diadent BioAggregate. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 109 (1). 155-158.
95. Leal, F., De-Deus, G., Brandao, C., Luna, A. S., Fidel, S. R.Souza, E. M. (2011). Comparison of the root-end seal provided by bioceramic repair cements and White MTA. *Int Endod J.* 44 (7). 662-668.
96. Kum, K. Y., Kim, E. C., Yoo, Y. J., Zhu, Q., Safavi, K., Bae, K. S. (2014). Trace metal contents of three tricalcium silicate materials: MTA Angelus, Micro Mega MTA and Bioaggregate. *Int Endod J.* 47 (7). 704-710.
97. Yan, P., Yuan, Z., Jiang, H., Peng, B., Bian, Z. (2010). Effect of bioaggregate on differentiation of human periodontal ligament fibroblasts. *Int Endod J.* 43 (12). 1116-1121.
98. Yuan, Z., Peng, B., Jiang, H., Bian, Z., Yan, P. (2010). Effect of bioaggregate on mineral-associated gene expression in osteoblast cells. *J Endod.* 36 (7). 1145-1148.
99. Gandolfi, M. G., Siboni, F., Prati, C. (2012). Chemical-physical properties of TheraCal, a novel light-curable MTA-like material for pulp capping. *Int Endod J.* 45 (6). 571-579.
100. Hebling, J., Lessa, F. C., Nogueira, I., Carvalho, R. , M.Costa, C. A. (2009). Cytotoxicity of resin-based light-cured liners. *Am J Dent.* 22 (3). 137-142.
101. Edgerton, M., Levine, M. J. (1993). Biocompatibility: its future in prosthodontic research. *J Prosthet Dent.* 69 (4). 406-415.
102. Campbell, S. D. (2003). Biological compatibility of prosthodontic materials. *Int J Prosthodont.* 16 Suppl. 52-54.
103. Wataha, J. C. (2001). Principles of biocompatibility for dental practitioners. *J Prosthet Dent.* 86 (2). 203-209.

104. Hanks, C. T., Wataha, J. C., Sun, Z. (1996). In vitro models of biocompatibility: a review. *Dent Mater.* 12 (3). 186-193.
105. Schmalz, G. (1997). Concepts in biocompatibility testing of dental restorative materials. *Clin Oral Investig.* 1 (4). 154-162.
106. Anusavice, K. (1996). *Philips' Science of Dental Materials*. 10th ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company;
107. Schmalz, G., Arenholt-Bindslev, D. ( 2009 ). Biocompatibility of Dental Materials. *Springer-Verlag Berlin Heidelberg*,. s:1-11
108. Powers, J.M., Sakaguchi, R.L. ( 2006). *Craig's restorative dental materials*. Mosby . s:97-125.
109. Schmalz, G. (1994). Use of cell cultures for toxicity testing of dental materials--advantages and limitations. *J Dent.* 22 Suppl 2. s: 6-11.
110. Freshney, R. I. (2005). *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*. Fifth Edition, John Wiley & Sons, Inc.
111. Cortes, O., Garcia, C., Perez, L., Boj, J.Alcaina, A. (2006). Pulp cell cultures obtained with two different methods for in vitro cytotoxicity tests. *Eur Arch Paediatr Dent.* 7 (2). 96-99.
112. Morsczeck, C., Schmalz, G., Reichert, T. E., Vollner, F., Galler, K., Driemel, O. (2008). Somatic stem cells for regenerative dentistry. *Clin Oral Investig.* 12 (2). 113-118.
113. Sloan, A. J., Smith, A. J. (2007). Stem cells and the dental pulp: potential roles in dentine regeneration and repair. *Oral Dis.* 13 (2). 151-157.
114. Casagrande, L., Mattuella, L. G., de Araujo, F. B, .Eduardo, J. (2006). Stem cells in dental practice: perspectives in conservative pulp therapies. *J Clin Pediatr Dent.* 31 (1). 25-27.
115. Bickenbach, J. R., Stern, M. M. (2005). Plasticity of epidermal stem cells: survival in various environments. *Stem Cell Rev.* 1 (1). 71-77.
116. Seo, M. S., Hwang, K. G., Lee, J., Kim, H., Baek, S. H. (2013). The effect of mineral trioxide aggregate on odontogenic differentiation in dental pulp stem cells. *J Endod.* 39 (2). 242-248.

117. Yoshiba, N., Yoshiba, K., Ohkura, N., Shigetani, Y., Takei, E., Hosoya, A. (2012). Immunohistochemical analysis of two stem cell markers of alpha-smooth muscle actin and STRO-1 during wound healing of human dental pulp. *Histochem Cell Biol.* 138 (4). 583-592.
118. Zhao, X., He, W., Song, Z., Tong, Z., Li, S., Ni, L. (2012). Mineral trioxide aggregate promotes odontoblastic differentiation via mitogen-activated protein kinase pathway in human dental pulp stem cells. *Mol Biol Rep.* 39 (1). 215-220.
119. Sonoyama, W., Liu, Y., Fang, D., Yamaza, T., Seo, B. M., Zhang, C. (2006). Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in swine. *PLoS One.* 1. e79.
120. Ohazama, A., Modino, S. A., Miletich, I., Sharpe, P. T. (2004). Stem-cell-based tissue engineering of murine teeth. *J Dent Res.* 83 (7). 518-522.
121. Yen, A. H., Sharpe, P. T. (2006). Regeneration of teeth using stem cell-based tissue engineering. *Expert Opin Biol Ther.* 6 (1). 9-16.
122. Duailibi, M. T., Duailibi, S. E., Young, C. S., Bartlett, J. D., Vacanti, J. P., Yelick, P. C. (2004). Bioengineered teeth from cultured rat tooth bud cells. *J Dent Res.* 83 (7). 523-528.
123. Narayanan, K., Srinivas, R., Ramachandran, A., Hao, J., Quinn, B., George, A. (2001). Differentiation of embryonic mesenchymal cells to odontoblast-like cells by overexpression of dentin matrix protein 1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98 (8). 4516-4521.
124. Sonoyama, W., Liu, Y., Yamaza, T., Tuan, R. S., Wang, S., Shi, S. (2008). Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: a pilot study. *J Endod.* 34 (2). 166-171.
125. Morsczeck, C., Schmalz, G., Reichert, T. E., Vollner, F., Saugspier, M., Viale-Bouroncle, S. (2009). Gene expression profiles of dental follicle cells before and after osteogenic differentiation in vitro. *Clin Oral Investig.* 13 (4). 383-391.
126. Schmalz, G., Schuster, U., Thonemann, B., Barth, M., Esterbauer, S. (2001). Dentin barrier test with transfected bovine pulp-derived cells. *J Endod.* 27 (2). 96-102.

127. Ueno, A., Kitase, Y., Moriyama, K., Inoue, H. (2001). MC3T3-E1-conditioned medium-induced mineralization by clonal rat dental pulp cells. *Matrix Biol.* 20 (5-6). 347-355.
128. Gurtner, G. C., Werner, S., Barrandon, Y., Longaker, M. T. (2008). Wound repair and regeneration. *Nature.* 453 (7193). 314-321.
129. Bjorndal, L., Mjor, I. A. (2001). Pulp-dentin biology in restorative dentistry. Part 4: Dental caries--characteristics of lesions and pulpal reactions. *Quintessence Int.* 32 (9). 717-736.
130. Desai, S., Chandler, N. (2009). Calcium hydroxide-based root canal sealers: a review. *J Endod.* 35 (4). 475-480.
131. Jones, T. D., Naimipour, H., Sun, S., Cho, M., Alapati, S. B. (2014). Mechanical Changes in Human Dental Pulp Stem Cells during Early Odontogenic Differentiation. *J Endod.* (14). 00715-8.
132. Couble, M. L., Farges, J. C., Bleicher, F., Perrat-Mabillon, B., Boudeulle, M., Magloire, H. (2000). Odontoblast differentiation of human dental pulp cells in explant cultures. *Calcif Tissue Int.* 66 (2). 129-138.
133. About, I., Bottero, M. J., de Denato, P., Camps, J., Franquin, J. C., Mitsiadis, T. A. (2000). Human dentin production in vitro. *Exp Cell Res.* 258 (1). 33-41.
134. Moazzami, F., Ghahramani, Y., Tamaddon, A. M., Dehghani Nazhavani, A., Adl, A. (2014). A histological comparison of a new pulp capping material and mineral trioxide aggregate in rat molars. *Iran Endod J.* 9 (1). 50-55.
135. Alliot-Licht, B., Bluteau, G., Magne, D., Lopez-Cazaux, S., Lieubeau, B., Daculsi, G. (2005). Dexamethasone stimulates differentiation of odontoblast-like cells in human dental pulp cultures. *Cell Tissue Res.* 321 (3). 391-400.
136. Zhang, W., Walboomers, X. F., Wolke, J. G., Bian, Z., Fan, M. W. Jansen, J. A. (2005). Differentiation ability of rat postnatal dental pulp cells in vitro. *Tissue Eng.* 11 (3-4). 357-368.
137. Orimo, H. (2010). The mechanism of mineralization and the role of alkaline phosphatase in health and disease. *J Nippon Med Sch.* 77 (1). 4-12.
138. Hoshi, K., Amizuka, N., Oda, K., Ikehara, Y. Ozawa, H. (1997). Immunolocalization of tissue non-specific alkaline phosphatase in mice. *Histochem Cell Biol.* 107 (3). 183-191.

139. Miao, D., Scutt, A. (2002). Histochemical localization of alkaline phosphatase activity in decalcified bone and cartilage. *J Histochem Cytochem.* 50 (3). 333-340.
140. Cormier, C. (1995). Markers of bone metabolism. *Curr Opin Rheumatol.* 7 (3). 243-248.
141. Jung, G. Y., Park, Y. J., Han, J. S. (2010). Effects of HA released calcium ion on osteoblast differentiation. *J Mater Sci Mater Med.* 21 (5). 1649-1654.
142. Lopez-Cazaux, S., Bluteau, G., Magne, D., Lieubeau, B., Guicheux, J., Alliot-Licht, B. (2006). Culture medium modulates the behaviour of human dental pulp-derived cells: technical note. *Eur Cell Mater.* 11. 35-42.
143. Rashid, F., Shiba, H., Mizuno, N., Mouri, Y., Fujita, T., Shinohara, H. (2003). The effect of extracellular calcium ion on gene expression of bone-related proteins in human pulp cells. *J Endod.* 29 (2). 104-107.
144. Estrela, C., Holland, R. (2003). Calcium hydroxide: study based on scientific evidences. *J Appl Oral Sci.* 11 (4). 269-282.
145. Okiji, T., Yoshida, K. (2009). Reparative dentinogenesis induced by mineral trioxide aggregate: a review from the biological and physicochemical points of view. *Int J Dent.* 2009. 464280.
146. 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 (6). 743-747.
147. Tran, X. V., Gorin, C., Willig, C., Baroukh, B., Pellat, B., Decup, F. (2012). Effect of a calcium-silicate-based restorative cement on pulp repair. *J Dent Res.* 91 (12). 1166-1171.
148. Chang, S. W., Lee, S. Y., Kum, K. Y., Kim, E. C. (2014). Effects of ProRoot MTA, Bioaggregate, and Micromega MTA on odontoblastic differentiation in human dental pulp cells. *J Endod.* 40 (1). 113-118.
149. Martin-Piedra, M. A., Garzon, I., Oliveira, A. C., Alfonso-Rodriguez, C. A., Carriel, V., Scionti, G. (2014). Cell viability and proliferation capability of long-term human dental pulp stem cell cultures. *Cytotherapy.* 16 (2). 266-277.

150. Berridge, M. V., Herst, P. M., Tan, A. S. (2005). Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnol Annu Rev.* 11. 127-152.
151. Galluzzi, L., Aaronson, S. A., Abrams, J., Alnemri, E. S., Andrews, D. W., Baehrecke, E. H. (2009). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes. *Cell Death and Differentiation.* 16 (8). 1093-1107.
152. Ngamwongsatit, P., Banada, P. P., Panbangred, W., Bhunia, A. K. (2008). WST-1-based cell cytotoxicity assay as a substitute for MTT-based assay for rapid detection of toxigenic *Bacillus* species using CHO cell line. *J Microbiol Methods.* 73 (3). 211-215.
153. Garzon, I., Perez-Kohler, B., Garrido-Gomez, J., Carriel, V., Nieto-Aguilar, R., Martin-Piedra, M. A. (2012). Evaluation of the cell viability of human Wharton's jelly stem cells for use in cell therapy. *Tissue Eng Part C Methods.* 18 (6). 408-419.
154. Martin-Piedra, M. A., Garzon, I., Oliveira, A. C., Alfonso-Rodriguez, C. A., Sanchez-Quevedo, M. C., Campos, A. (2013). Average cell viability levels of human dental pulp stem cells: an accurate combinatorial index for quality control in tissue engineering. *Cytotherapy.* 15 (4). 507-518.
155. Monteiro Bramante, C., Demarchi, A. C., de Moraes, I. G., Bernadineli, N., Garcia, R. B., Spangberg, L. S. (2008). Presence of arsenic in different types of MTA and white and gray Portland cement. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 106 (6). 909-913.
156. Chang, S. W., Baek, S. H., Yang, H. C., Seo, D. G., Hong, S. T., Han, S. H. (2011). Heavy metal analysis of ortho MTA and ProRoot MTA. *J Endod.* 37 (12). 1673-1676.
157. Matsunaga, T., Tsujimoto, M., Kawashima, T., Tsujimoto, Y., Fujiwara, M., Ookubo, A. (2010). Analysis of arsenic in gray and white mineral trioxide aggregates by using atomic absorption spectrometry. *J Endod.* 36 (12). 1988-1990.
158. Salgado, V. E., Albuquerque, P. P., Cavalcante, L. M., Pfeifer, C. S., Moraes, R. R. Schneider, L. F. (2014). Influence of photoinitiator system and



- nanofiller size on the optical properties and cure efficiency of model composites. *Dent Mater.* (10). 264-71.
159. Paschalidis, T., Bakopoulou, A., Papa, P., Leyhausen, G., Geurtsen, W., Koidis, P. (2014). Dental pulp stem cells' secretome enhances pulp repair processes and compensates TEGDMA-induced cytotoxicity. *Dent Mater.* (14). 00586-7
  160. Yalcin, M., Ahmetoglu, F., Sisman, R., Bozkurt, B., Hakki, S. (2014). Cytotoxicity of low-shrink composites with new monomer technology on bovine dental pulp-derived cells. *Hum Exp Toxicol.*
  161. Kehe, K., Reichl, F. X., Durner, J., Walther, U., Hickel, R., Forth, W. (2001). Cytotoxicity of dental composite components and mercury compounds in pulmonary cells. *Biomaterials.* 22 (4). 317-322.
  162. Yoshii, E. (1997). Cytotoxic effects of acrylates and methacrylates: relationships of monomer structures and cytotoxicity. *J Biomed Mater Res.* 37 (4). 517-524.
  163. Luo, Z., Li, D., Kohli, M. R., Yu, Q., Kim, S., He, W. X. (2014). Effect of Biodentine on the proliferation, migration and adhesion of human dental pulp stem cells. *J Dent.* 42 (4). 490-497.

**EKLER****EK. 1: Etik Kurul Onayına Gerek Olmadığına Dair Belge**

13 nisan 2013 tarih ve 28617 sayı ile T.C. Resmi Gazetede yayınlanan ‘Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik’ in Birinci Bölümünün 2. Maddesinin 1.Fıkrası (Bu Yönetmelik, biyoyararlanım ve biyoşdeğerlik çalışmaları dâhil, ruhsat veya izin alınmış olsa dahi insanlar üzerinde yapılacak olan ilaç, tıbbi ve biyolojik ürünler ile bitkisel ürünlerin klinik araştırmaları, klinik araştırma yerlerini ve bu araştırmaları gerçekleştirecek gerçek veya tüzel kişileri kapsar.) gereğince tezimin bir klinik araştırma değil sadece laboratuvar çalışması olması sebebiyle Etik Kurul kararı alınmamıştır.

## ÖZGEÇMİŞ

1982 yılında Tarsus' ta doğdum. Orta okul ve liseyi Tarsus Anadolu Lisesinde tamamladım. 2005 yılında 19 Mayıs Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesinden mezun oldum. 2007 yılında askerlik görevini tamamladım. 2010 yılında İnönü Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Diş Hastalıkları ve Tedavisi Anabilim Dalında doktora eğitimine başladım. Halen Mersin kamu hastaneleri kurumunda çalışmaktadayım. Evli ve bir kız çocuğu babasıyım.

## YAYINLAR

### Yurt dışı SCI, SCI-Expanded kapsamındaki dergilerde yayınlanan makaleler

1.Yalcin M, Barutçigil C, Umar I, Bozkurt BS, Hakki SS. Cytotoxicity of hemostatic agents on the human gingival fibroblast. Eur Rev Med Pharmacol Sci 2013;17(7):984-8.

### Yurt İçi Dergilerde Yayınlanan Makaleler

1.Yalçın M, Şimşek N, Keleş A, Ahmetoğlu F, Kocabaşoğlu A, Umar İ. Effect of salivary contamination on micro-tensile bond strength of self-etch adhesives systems after bonding procedure. J Res Dent 2013;1:55-9

2.Muhammet Yalçın, Emine Şirin Karaarslan, İbrahim Umar, M. Ata Cebe, DDS, PhD,b “Kanama durdurucu ajanların dental dokuların renk değişikliği üzerindeki etkileri” Cumhuriyet Dent J 2012;15(2):101-108

### Poster Sunumları

1.İbrahim UMAR, Muhammet YALÇIN, Ayça AKSOY, Erdal KARAÖZ ‘Pulpa Kuafaj Materyallerinin Diş Pulpası Kökenli Mezenkimal Kök Hücreler Üzerindeki

Etkisinin İncelenmesi’ 1.Uluslararası Katılımlı Kök Hücre ve Hücresel Tedaviler Kongresi 20-23 Mart 2014, Kocaeli/Türkiye

2.Nimet ÜNLÜ, Ali İhsan ERKAN, İbrahim UMAR, Muhammet YALÇIN. ‘Hassasiyet giderici ajanların iki self-etch bonding ajanın dentine bağlanma dayanımına etkisi’ İnönü Üniversitesi 1. Uluslararası Diş Hekimliği Kongresi, 26-28 Nisan 2012, Malatya

3.Muhammet YALÇIN, Burak DAYI, İbrahim UMAR, Reyhan GOZLEK, Nimet UNLU “The Investigation of Surface Roughness and Ion Exchange of Teeth After Bleaching Agents Were Applied” 5th ConsEuro Meeting in 2011, *13-15 Ekim 2011, İstanbul-TÜRKİYE*

4.Muhammet YALÇIN, Neslihan ŞİMŞEK, Ali KELEŞ, Fuat AHMETOĞLU, Ayşe KOCABAŞOĞLU, İbrahim UMAR. “Micro-Tensile Bond Strength of Two Different Adhesives to Dentin Contaminated” 5th ConsEuro Meeting in 2011, *13-15 Ekim 2011, İstanbul-TÜRKİYE*

5.Muhammet Yalçın, Emine Şirin Karaarslan, İbrahim Umar, M. Ata Cebe. “Kanama durdurucu ajanların dental dokuların renk değişikliği üzerindeki etkileri” XV. Dis Hastalıkları ve Tedavisi Anabilim Dalları Toplantısı 25-27 Ekim 2010 Trabzon.