

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

**KOLLAJEN VE BİOAGGREGATE' DEN
OLUŞAN YAPI İSKELESİNİN PERFORE DİŞ
PULPASI ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN
İNCELENMESİ**

DOKTORA TEZİ

Burak DAYI

**İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ ve SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
DİŞ HASTALIKLARI ve TEDAVİSİ ANABİLİM DALI**

ORTAK DOKTORA PROGRAMI

DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. Muhammet YALÇIN

MALATYA-2014

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

**KOLLAJEN VE BİOAGGREGATE' DEN
OLUŞAN YAPI İSKELESİNİN PERFORE DİŞ
PULPASI ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN
İNCELENMESİ**

Burak DAYI

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

Ortak Tez Danışmanı: Prof. Dr. Nimet ÜNLÜ

**Bu araştırma İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
2013/80 proje numarası ile desteklenmiştir.**

MALATYA-2014

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

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

İmza

Jüri Başkanı

Prof. Dr. Abdulkadir ŞENGÜN
Turgut Özal Üniversitesi



Üye

Doç. Dr. Ertuğrul ERCAN
Kırıkkale Üniversitesi



Danışmanı

Yrd. Doç. Dr. Muhammet YALÇIN
İnönü Üniversitesi



Üye

Yrd. Doç. Dr. Hacer TURGUT
İnönü Üniversitesi



Üye

Yrd. Doç. Dr. Mustafa ERSÖZ
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. Yaşar BAYINDIR
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca bütün akademik faaliyetlerimde ve bu tezin hazırlanmasından sonlandırılmasına kadar, çalışmanın her aşamasında yardım, öneri ve desteğini hep hissettiğim danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Muhammet YALÇIN' a;

Kısa dönemde bana hem akademik hem de manevi olarak çok şeyler kazandıran ikinci danışmanım Prof. Dr. Nimet ÜNLÜ' ye ve Selçuk Üniversitesi Dış Hekimliği Fakültesi Dış Hastalıkları ve Tedavisi Anabilim Dalı öğretim üyeleri ve asistanlarına;

Doktora eğitimim boyunca desteklerini hep hissettiğim Yrd. Doç. Dr. Hacer TURGUT' a ve çalışma arkadaşlarım Arş. Gör. Dt. İbrahim UMAR' a ve Arş. Gör. Dt. Reyhan GÖZLEK' e;

Materyallerin deney hayvanlarına uygulanması aşamasında sabırla bana yardımcı olan çalışma arkadaşım Arş. Gör. Dt. Hakan KAMALAK' a ve Fırat Üniversitesi TAHAM çalışanlarına;

Histolojik kesitlerin hazırlanması ve değerlendirilmesinde emeğini esirgemeyen Prof. Dr. Hatice ERÖKSÜZ' e ve asistanı Burak KARABULUT' a;

Yapı iskelelerinin hazırlanmasında emeği geçen Prof. Dr. Vasıf HASIRCI' ya ve Deniz SEZLEV' e;

İstatistiksel değerlendirmelerindeki katkılarından dolayı Arş. Gör. Bahadır YÜZBAŞI' ya;

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

Tez çalışmalarım süresince sonsuz bir sabırla beni her zaman destekleyen sevgili eşim ve canım oğluma;

Sonsuz teşekkür ederim.

ÖZET

Giriş ve Amaç: Diş pulpasının çeşitli nedenlerle açıldığı durumlarda pulpanın korunarak dişin canlılığının devam ettirilebilmesi için biyouyumlu materyallerle pulpadaki açıklığın örtülmesi gerekmektedir. Diş hekimliğinde doku mühendisliği, kaybedilmiş diş dokularının ve hatta kaybedilmiş bir dişin tekrar oluşturabilmesini sağlayacak materyaller ve teknikler üzerine yoğunlaşmıştır.

Bizde bu çalışmada, Kollajen ve BioAggregate materyallerinden oluşturulmuş süngerimsi yapı iskelesinin perfore edilen koyun dişlerinde direkt kuafaj materyali olarak kullanılmasının dördüncü ve sekizinci haftalar arasındaki doğal diş dokusu oluşumuna etkisini histolojik incelemelerle değerlendirmeyi amaçladık.

Gereç ve Yöntem: Çalışmamızda deney hayvanı olarak 4 adet koyun kullanıldı. Kollajen ve BioAggregate materyallerinin karıştırılarak liyofilizasyon işlemi ile gözenekli hale getirildiği yapı iskeleleri laboratuvar ortamında oluşturuldu. Yapı iskeleleri oluşturulduktan sonra por büyüklüğü ve yoğunluğunu belirleyebilmek için civa porozimetresi testi ve SEM görüntülemesi ile karakterizasyonları yapıldı. Daha sonra koyunların mandibular kesici dişlerinden ikisinde oluşturulan perforasyon alanlarına bu yapı iskeleleri yerleştirildi. 4 ve 8 hafta sonra koyunlar dekapite edilerek dişler çenelerden çıkarılıp histolojik kesitler hazırlandı ve ışık mikroskobu altında perforasyon alanındaki doku oluşumu gözlemlendi. CellSens Standard Software programı vasıtasıyla kesitlerin görüntülemesi ve oluşan dentin miktarının ölçümü yapıldı. Oluşan dentin köprüsü miktarının haftalar arasında istatistiksel olarak karşılaştırılmasında Mann-Whitney U testi kullanılmıştır.

Bulgular: Yapılan civa porozimetresi testi ve SEM görüntülemelerinde, oluşturulan yapı iskelelerinin hücrelerin yerleşerek doku oluşturabilmesi için yeterli yoğunlukta ve büyüklükte gözeneklere sahip olduğu saptanmıştır. Diş kesitlerinin histolojik incelemelerinde de 4. hafta sonunda gözenekli yapıda, perforasyon alanını tamamen örten osteodentin karakterinde tamir doku oluşumu gözlenmiştir. 8. hafta sonundaki örneklerde de 4. haftaya göre daha kompakt yapıda, doku ile bütünlük sağlamış, tübüler bir yapı kazanmış osteodentin karakterinde tamir dokusu gözlenmiştir. 8. haftadaki bazı örneklerde tamir dokunun perforasyon alanının dışına yapı iskelesi

içine doğru geliştiği de gözlenmiştir. Oluşan tamir dentin kalınlığının miktarında 4. hafta ve 8. hafta arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir. ($p>0.05$).

Sonuç: Diş pulpasının açığa çıktığı durumlarda pulpa dokusu ile uyumlu materyallerden oluşturulmuş gözenekli yapı iskeleleri ile diş pulpasının örtülmesi, doğal diş dokusu oluşturarak diş pulpasının canlılığını sağlıklı bir şekilde devam ettirebilmesi için kullanılabilir.

Anahtar Kelimeler: Yapı İskelesi, Kollajen, BioAggregate, Direkt Pulpa Kuafajı

ABSTRACT

THE EFFECT OF COLLAGEN AND BIOAGGREGATE SCAFFOLD ON PERFORATED DENTAL PULP

Background: In cases of dental pulp exposures, dental pulp tissue must be covered with biocompatible materials to maintain viability of tooth. Dental tissue engineering has concentrated on materials and techniques which will reconstitute lost tooth structures.

In this study we used sponge scaffold, which was made from collagen and BioAggregate materials on perforated sheep teeth and we investigated its effect on the reconstituted dental tissue between four and eight weeks with histological examination.

Materials and Methods: In our study, four sheep were used as experimental animals. Collagen and BioAggregate mixed and created a porous scaffold with lyophilization process in the laboratory. After creating the sponge scaffold, we characterized the scaffold through the mercury porosimetry test and SEM imaging in order to determine pore size and density. Afterwards, the scaffolds were placed on expose mandibular incisor teeth pulp of sheeps. 4 and 8 weeks later, sheeps were decapitated and teeth were extracted. The formation of new tissue at pulp exposure area was observed on histological sections of teeth through light microscope. The histological sections were monitorized and the amount of dentin formation was measured by using CellSens Standard Software program. The dentin bridge formed was compared statistically by Mann-Whitney U test week by week.

Results: Mercury porosimetry test and SEM imaging showed that scaffolds were suitable for cell attachment and cell organization to reconstitute new dental tissue. At the end of the 4th week, it was observed that formation of the repaired tissue in the character of osteodentin was completely covered the area of perforation. Moreover, at the end of the 8th week, the repaired tissue formation was more compact and in tubular formation compared to the repaired tissue in the 4th week. In some histological sections in the 8th week, it was observed that the repaired tissue

formation developed towards outside of perforation site into the scaffold. The repaired tissue was not greater in the 8th week than the 4th week ($p > 0.05$).

Conclusions: Biocompatible sponge scaffolds may be used at dental pulp exposures to maintain viability of dental pulp tissue and reconstitute lost tooth structures.

Key Words: Scaffold, Collagen, BioAggregate, Direct pulp capping

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ONAY SAYFASI.....	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vii
İÇİNDEKİLER.....	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	xii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
TABLolar DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Diş Pulpa Dokusunun Yapısı	4
2.2. Diş Pulpasının Hücreleri	4
2.2.1. Odontoblastlar	4
2.2.2. Fibroblastlar	5
2.2.3. Makrofajlar.....	5
2.2.4. Dentritik Hücreler	6
2.2.5. Lenfositler	6
2.2.6. Mast Hücreleri.....	6
2.3. Dentin.....	6
2.3.1. Reaksiyoner (Tersiyer) Dentin.....	7
2.3.2. Tamir Dentini	8
2.4. Dentin Tamirinin Mekanizması	8
2.5. Doku Mühendisliği	9
2.5.1. Hücreler.....	9
2.5.1.1. Mezenkimal diş kök hücreleri (MDSC).....	10
2.5.1.2. Diş pulpası kök hücreleri (DPSC).....	10
2.5.1.3. Çekilmiş süt dişi kök hücreleri (SHED).....	11
2.5.1.4. Periodontal ligament kök hücreleri (PDLSC).....	11
2.5.1.5. Dental folikül progenitör kök hücreler (DFPC).....	11

2.5.1.6. Apikal papilla kök hücreleri (SCAP)	11
2.5.2. Yapı İskeleleri	12
2.5.3. Hücre sinyalleri ve biyolojik çevre	12
2.6. Dentin ve Pulpa Tedavileri.....	13
2.6.1. Direkt Pulpa Tedavisi.....	13
2.6.1.1. Direkt Pulpa Tedavisinin Endikasyonları	13
2.6.1.2. Direkt Pulpa Tedavisinde Başarıyı Etkileyen Faktörler.....	14
2.6.1.2.1. Perforasyon Alanının Büyüklüğü.....	14
2.6.1.2.3. Bakteriyel Kontaminasyon Ve Mikrosızıntı	14
2.6.1.2.4. Kanama Kontrolü ve Pıhtı Oluşumu.....	14
2.6.1.2.5. Dentinin Aşırı Kurutulması.....	15
2.6.1.2.6. Basınç	15
2.6.1.2.7. Perforasyon Alanının Konumu	15
2.6.1.2.8. Bireyin Yaşı ve Pulpanın Patolojik Durumu.....	15
2.6.1.2.9. Direkt Pulpa Tedavisinde Kullanılan Materyalin Seçimi	16
2.7. BioAggregate	16
2.8. Kollajen	18
2.8.1. Tip I Kollajen	18
2.9. Diş Hekimliğinde Doku Mühendisliği Yaklaşımları	19
2.10. Kollajenin Dişhekimliğinde Kullanımı	20
3. GEREÇ VE YÖNTEM	22
3.1. Kollajen ve BioAggregate' den süngerimsi yapı iskelesinin oluşturulması ve karakterizasyonu	22
3.1.1. Kollajen-BioAggregate Süngerimsi Yapı İskelesinin Karakterizasyonu.....	23
3.2. Oluşturulan süngerimsi yapı iskelesinin deney hayvanlarına uygulanması ve takibi.....	24
3.3. Dişlerin Histopatolojik Açısından Değerlendirilmesi	30
3.3.1. Dişlerin Fiksasyonu.....	30
3.3.2. Dişlerin Demineralizasyonu.....	30
3.3.3. Dişlerin Histolojik Kesit Alımına Hazırlanması	31
3.4. İstatistiksel Değerlendirme.....	35
4. BULGULAR	36

4.1. Kollajen-BioAggregate Yapı İskelesinin Karakterizasyonu.....	36
4.1.1. SEM ve Civa Porozimetresi Bulguları.....	36
4.2. Diş Örneklerinin Histopatolojik Bulguları.....	38
4.2.1. Kontrol Grubu Dişlerinin Histopatolojik Bulguları.....	38
4.2.2. Dördüncü Haftaya Ait Dişlerin Histopatolojik Bulguları.....	38
4.2.3. Sekizinci Haftaya Ait Dişlerin Histopatolojik Bulguları.....	41
4.3. Dentin Köprüsü Ölçüm Değerleri.....	44
5. TARTIŞMA.....	46
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	58
7. KAYNAKLAR.....	59
EK-1: Etik Kurul Onayı.....	74
ÖZGEÇMİŞ.....	75

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

MTA: Mineral Trioksit Aggregate

MDSC: Mezenkimal Diş Kök Hücreleri

DPSC: Diş Pulpası Kök Hücreleri

SHED: Çekilmiş Süt Dişi Kök Hücreleri

PDLSC: Periodontal Ligament Kök Hücreleri

DFPC: Dental Folikül Progenitör Kök Hücreler

SCAP: Apikal Papilla Kök Hücreleri

FDA: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi

SEM: Taramalı Elektron Mikroskop

µm: Mikrometre

mm: Milimetre

µl: Mikrolitre

mg: Miligram

ml: Mililitre

ŞEKİLLER DİZİNİ**Sayfa No**

Şekil 3.1. Çalışmada kullanılan Kollajen ve BioAggregate materyalleri.	22
Şekil 3.2. Çalışmada kullanılan Liyofilizatör.	23
Şekil 3.3. Çalışmada kullanılan Steromikroskop.	23
Şekil 3.4. Çalışmada kullanılan koyunlar.	24
Şekil 3.5. Sprey boya ile numaralandırılmış koyun.	25
Şekil 3.6. Çalışmada kullanılan anestezi maddeleri.	25
Şekil 3.7. Hayvanlara uygulanan lokal anestezi.	26
Şekil 3.8. Çalışmada kullanılan aletlerin bir kısmı.	26
Şekil 3.9. Taşınabilir diş unit sistemi.	27
Şekil 3.10. Süngerimsi yapıdaki yapı iskelesinin 1 mm' lik.	28
Şekil 3.11. Perforasyon alanına yerleştirilmiş yapı iskelesi.	28
Şekil 3.12. Kompozit restorasyon yapılmış dişler.	29
Şekil 3.13. Dişlerin formaldehit solüsyonu içindeki görüntüsü.	30
Şekil 3.14. Dişlerin demineralizasyonu için kullanılan solüsyon.	31
Şekil 3.15. Otomatik doku takip cihazı (Leica TP 1020).	31
Şekil 3.16. Bloklama cihazı (Leica EG 1150 H).	32
Şekil 3.17. Kesiti alınmış dişlerin bloklanması.	32
Şekil 3.18. Kesitlerin kullanıldığı rotary mikrotom cihazı.	33
Şekil 3.19. Histolojik incelemeye hazırlanmış preparatlar.	34
Şekil 3.20. Olympus BX 43 Trinoküler Florasan Ataçmanlı ve Görüntüleme Sistemli Işık Mikroskobu.	34
Şekil 3.21. Oluşan dentin miktarının ölçüldüğü bir kesit.	35
Şekil 4.1. Sadece kollajen ve BioAggregate/Kollajen kullanılarak elde edilmiş süngerimsi yapı iskelesinin SEM görüntüsü.	36
Şekil 4.2. Kontrol grubuna ait bir dişin hematoksilen eozin boyaması yapılmış x4 büyütmedeki görüntüsü.	38
Şekil 4.3. Dördüncü haftaya ait 1. hayvanın süngerimsi yapı iskelesi uygulanmış 1. dişinin hematoksilen eozin boyaması yapılmış x4 büyütmedeki görüntüsü.	39

- Şekil 4.4.** Dördüncü haftaya ait 1. hayvanın süngerimsi yapı iskelesi uygulanmış
2. dişinin hematoksilen eozin boyaması yapılmış x4 büyütmedeki görüntüsü..... 39
- Şekil 4.5.** Dördüncü haftaya ait 2. hayvanın süngerimsi yapı iskelesi uygulanmış
1. dişinin hematoksilen eozin boyaması yapılmış x10 büyütmedeki görüntüsü..... 40
- Şekil 4.6.** Dördüncü haftaya ait 2. hayvanın süngerimsi yapı iskelesi uygulanmış
2. dişinin hematoksilen eozin boyaması yapılmış x10 büyütmedeki görüntüsü..... 40
- Şekil 4.7.** Sekizinci haftaya ait 1. hayvanın süngerimsi yapı iskelesi uygulanmış
1. dişinin hematoksilen eozin boyaması yapılmış A) x4 ve B) x10 büyütmedeki
görüntüsü..... 41
- Şekil 4.8.** Sekizinci haftaya ait 1. hayvanın süngerimsi yapı iskelesi uygulanmış
2. dişinden alınmış kesitin hematoksilen eozin boyaması yapılmış x4 büyütmedeki
görüntüsü..... 42
- Şekil 4.9.** Sekizinci haftaya ait 1. hayvanın süngerimsi yapı iskelesi uygulanmış
2. dişinden alınmış kesitin hematoksilen eozin boyaması yapılmış x10 büyütmedeki
görüntüsü..... 42
- Şekil 4.10.** Sekizinci haftaya ait 2. hayvanın süngerimsi yapı uygulanmış 1. dişinden
alınmış kesitin hematoksilen eozin boyaması yapılmış x4 büyütmedeki görüntüsü. 43
- Şekil 4.11.** Sekizinci haftaya ait 2. hayvanın süngerimsi yapı iskelesi uygulanmış bir
dişten alınmış kesitin hematoksilen eozin boyaması yapılmış A) x20, B) x40
büyütmedeki görüntüsü; Rejenere dentin ve odontoblast benzeri hücreler (siyah
okların gösterdiği hücreler), genç dentin dokusu (siyah yıldızlı alan) ve hipermik
pulpa (beyaz oklar)..... 43
- Şekil 4.12.** Sekizinci haftaya ait 2. hayvanın süngerimsi yapı uygulanmış 2. dişinden
alınmış kesitin hematoksilen eozin boyaması yapılmış x4 büyütmedeki görüntüsü. 44

TABLolar DİZİNİ**Sayfa No**

Tablo 4.1. Civa porozimetresi ve SEM yöntemleri ile hesaplanan gözeneklilik yüzdeleri.....	37
Tablo 4.2. Haftalara ait dentin ölçüm miktarlarının ortalama ve standart sapma değerleri.....	45
Grafik 4.1. Saf kollajen ve Kollajen/BioAggregate yapı iskelesinin gözenek boyutları ve sayısı .	37
Grafik 4.2. Dördüncü ve sekizinci haftaların dentin ölçüm miktarları.	45

1. GİRİŞ

Restoratif dişhekimliğinin esas amacı uygun restoratif tedavi ile pulpanın fonksiyonunun tekrar sağlanması ve korunmasıyla birlikte diş sağlığını devam ettirmek ve restore etmektir. Bu amaçla gerçekleştirilen vital pulpa terapileri; travma, iatrojenik nedenler veya çürük nedeniyle pulpanın açıldığı ve geri döndürülebilir bir enflamasyonun olduğu durumlarda uygulanan tedavilerdir.

Vital pulpa terapileri; derin çürüklü dişlerde uygulanan indirekt pulpa uygulaması ve diş pulpasının ekspozite olduğu vakalarda uygulanan direkt pulpa kuafajı veya pulpotomi olmak üzere iki terapötik yaklaşım içermektedir (1).

Direkt pulpa kuafajı; pulpa koruyucu ajanın ekspozite pulpa dokusu üzerine direkt uygulanarak altta kalan pulpa dokusunu sonraki zararlardan korumak ve dentin-pulpa kompleksinin rejenerasyonuna izin vermek için uygulanan bir tedavi şeklidir (2).

Diş pulpası, dişlerin korunması ve inervasyonunda olduğu gibi dentinin oluşumu ve beslenmesinde de önemli rol oynar. Birincil pulpa fonksiyonu olan dentinin oluşumu; periferik mezenkimal hücrelerin odontoblastlara farklılaştığı ve kollajen matriksin depozisyonunun başladığı anda başlar ve depozisyon-mineralizasyon sıralaması dişin oluşumu ile biter. İlk formasyondan hemen sonra pulpa fizyolojik olarak dişin olgunlaşmasında görevi olan dentin üretimine devam eder (3).

Pulpa farklı uyarılara tepki vermekten sorumludur, bunu savunma hareketiyle ve kan damarlarının dilatasyonu ve geçirgenliği ile ve enflamasyon hücrelerinin varlığı ile yapar. Eğer uyarı pulpanın iyileşme kapasitesini aşmazsa dentin-pulpa kompleksinde tamir yapıcı bir modifikasyon meydana gelir. Tamir dentini fiziksel ve/veya kimyasal yaralanmalara cevap verildiği durumlarda üretilmektedir. Odontoblastlar süreçlerini yeni oluşmuş dokunun içinde devam ettirir, buda dentinin beslenmesinden sorumlu gerçek kanallar oluşturur. Bu pulpanın biyolojik olarak aktif olduğu zamanlarda devam eden bir süreçtir (3, 4).

Dentin-pulpa kompleksinin korunması, diş dokusu ve restoratif materyal arasındaki bir veya çok katlı uygulanan özel materyalin pulpa dokusuna operatif prosedürlerle, restoratif materyalin toksisitesi ile ve mikrosızıntı nedeniyle olan bakteri penetrasyonu ile oluşan fazladan hasarı önlemeyi içermektedir. Dentin-pulpa kompleksinin korunması pulpanın canlılığının geri kazanılmasıyla olmaktadır (5).

Dental materyallerin biyolojik uyumluluğunda en önemlisi pulpa dokusunun irritasyon veya dejenerasyonunu önlemek veya sınırlamaktır. Dişhekimliğinde kullanılan materyallerin sitotoksitesisi ve biyoyumluluğu, pulpa ekspozlu yada ekspozsuz derin kavitelerde veya farklı hücre kültürlerinde sıklıkla test edilmiştir.

BioAggregate; biyoyumluluğu ve pulpa kuafajında güvenle kullanılabilirliği kanıtlanmış olan Mineral Trioksit Aggregate (MTA)' e benzer içeriğe sahip, seramik parçacıklardan oluşan, perforasyon tamirinde ve vital pulpa tedavilerinde kullanılabilen bir materyaldir (6).

Doku mühendisliği interdisipliner bir çalışma alanıdır ve mühendisliğin prensiplerini; normal fonksiyonu restore etmek, devam ettirmek ve geliştirmek yönünde biyolojiye ve tedaviye uygular (7). Doku mühendisliği yaklaşımında canlı hücreler, yapı iskeleleri ve hücre sinyalleri olmak üzere üç temel bileşen vardır (8).

Çeşitli diş dokularından kaynak alan mezenkimal kök hücreler; izole edilmiş tarif edilmiş ve özelleşmiş hücre çeşitlerinden biridir. Mezenkimal diş kök hücreleri; nöral hücreler, miyositler, osteoblastlar, kondrositler, adipozitler, kardiyomiyositler ve hepatik hücrelere invitro şartlarda farklılaşabilmektedirler (9). Gronthos ve ark. yetişkin insan diş pulpası kök hücrelerinin odontoblastlara/osteoblastlara, adipozitlere ve nöral hücrelere farklılaşabilme kabiliyetini ortaya çıkarmışlardır (10).

Yapı iskeleleri hücrelere belirli bir zaman dilimi için ekstrasellüler matriks olarak hizmet eden üç boyutlu çerçevelerdir. Yapı iskeleleri hücrelere hem göç etmeleri hem de çoğalmaları için ortam sağlar ve önceden tasarlanmış şekil ve birleşimlerde oluşturulur. Sentetik ve doğal polimerler, yapı iskelelerinin oluşturulmasında yaygın olarak kullanılmaktadır. Doğal polimerler çok iyi biyoyumluluk sağlarken sentetik polimerler de çözünme oranı, mikroyapı ve mekanik güç gibi fiziko-kimyasal özelliklerin kontrol edilebilmesine izin verir (11).

Birçok sentetik bileşenin doku mühendisliği yapı iskelelerinde bekleneni karşılmasına rağmen daha iyi taşıyıcı oluşturma amacıyla hayvan kaynaklı doğal polimerler olan kollajen ve elastinden faydalanılmıştır (12).

Yeniden yapılandırılmış tip I kollajen jel, doku mühendisliği doğal yapı iskelelerinde sık kullanılmaktadır (13). Güncel olarak kollajen sünger yapı iskeleleri ve kollajen jellerin diş rejenerasyonu için faydalı olduğu kanıtlanmıştır (14). Sumita ve ark. yaptıkları bir çalışmada kullandıkları kollajen süngerlerin diş rejenerasyonunu ve sert doku oluşumunu sağladıklarını göstermişlerdir (15).

Diş hekimliğinde doku mühendisliği alanında diş sert dokularının ve yumuşak dokularının kök hücre tabanlı rejenerasyon yardımıyla restore edilmesine büyük bir ilgi vardır. Kök hücreler kullanılarak diş benzer yapıların oluşturulduğu çalışmalar bulunmaktadır (16-18). Bu çalışmaların çoğunda taşıyıcı materyaller olan yapı iskeleleri hücrelerle kolonize edilerek deney hayvanlarına implante edilmiştir. Aynı zamanda yapı iskeleleri yerleştirilerek canlının kendi kök hücreleri uyarılıp yapı iskelesine göçü ve bu şekilde doku oluşturulması çalışmaları da yeni bir yaklaşım olarak doku mühendisliğinde yer almıştır (19). Hayvan çalışmalarında gerçekleştirilen diş rejenerasyonu çalışmaları umut verici olmuş ancak insanlara uygulanması için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

Bu çalışmanın amacı; Kollajen ve BioAggregate materyallerinin belirli oranlardaki karışımı ile oluşturulmuş ve liyofilizasyon işlemi ile gözenekli hale getirilmiş yapı iskelesinin perfore hayvan dişlerinde direkt kuafaj materyali olarak kullanılmasının dördüncü ve sekizinci haftalar arasındaki doğal diş dokusu rejenerasyonuna etkisinin histolojik incelemelerle değerlendirilmesidir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Diş Pulpa Dokusunun Yapısı

Pulpa dokusu; sinirler, kan damarları, interstisyel sıvı, özelleşmiş hücreler olan odontoblastlar, fibroblastlar ve diğer hücresel bileşenleri içeren mezenkimal orjinli benzersiz bir bağ dokusudur (20, 21). Radyografide dişin ortasında, koronelden apikale uzanan koyu ve ince bir çizgi halinde gözükür (21). Etrafını saran mineralize dentin matriksi ile direkt temas halinde ve mükemmel bir uyum içinde olması nedeniyle bu iki doku beraber ele alınıp pulpo-dentinal kompleks olarak adlandırılmıştır (20, 22).

2.2. Diş Pulpasının Hücreleri

2.2.1. Odontoblastlar

Odontoblastlar, diş oluşumu ve gelişimini içeren dentinogenezis için gerekli, pulpo dentinal kompleksin oldukça karakteristik ve özelleşmiş hücreleridir. Dentinogenezis boyunca odontoblastlar dentin ve dentin tübüllerini oluştururlar ve dentin tübüllerindeki varlıkları ile dentinin duyarlı bir doku olmasını sağlarlar (20). Dentin dokusundaki kollajenin sentezinden ve kontrolünden de odontoblastlar sorumludur (23).

Odontoblastlar pulpa boşluğunun koronal kısmında dişin servikal ve kök orta bölümüne göre oldukça fazla sayıdadırlar. Bu alanda mm^2 de 45.000-65.000 adet odontoblast bulunur (24). Boyut ve şekilleri de buldukları yerlere göre değişiklik gösterir. Dişin kuron kısmında bulunanları uzun, silindirik ve göreceli olarak pulpa boşluğunun diğer bölgelerine göre daha büyük iken kök ortasında kısa silindirik formdadırlar (24, 25). Dişin apeksine doğru gittikçe yassılaşılarak fibroblastlara benzer bir form alırlar (25). Hücrelerin biçimi hücre aktivitesini de etkilemektedir; daha büyük hücrelerin daha fazla matriks sentezleme kapasitesi vardır (24).

Odontoblast hücreleri; primer, sekonder ve tersiyer dentini oluşturabilme yeteneğindedir. Dentinin ömür boyu üretilebilmesi, birincil odontoblast hücrelerinin

varlığının devamı ile mümkündür. Bu hücrelerin çeşitli nedenlerle zarar gördüğü durumlarda pulpanın mezenkimal öncü hücreleri, yeni odontoblast benzeri hücelere farklılaşmaktadır ve tamir dentini bu sekonder odontoblastlar ile meydana gelmektedir (26).

2.2.2. Fibroblastlar

Fibroblastlar, ektomezenkimal dokudan köken alan bağ dokunun baskın hücreleridir (21). Diş pulpa dokusunda da en fazla gözlenen hücrelerdir ve en fazla sayıda kuron pulpa dokusunda bulunurlar (24).

Fibroblastlar, ekstrasellüler matriksin kollajen, elastin, proteoglikan, glikoprotein, sitokin, büyüme faktörleri ve proteinazlar gibi fibröz unsurlarını içeren geniş çeşitlilikte ekstrasellüler molekülleri salgılar ve sentezleyebilirler (21). Pulpa dokusunda Tip I kollajen ve Tip III kollajen sentezi yaparlar. Kuron pulpasında çoğunlukla bant tipinde kollajen bulunur (25). Fibroblastlar kollajeni fagosite etme ve sindirme yeteneğine de sahiptirler, yani kollajen döngüsünden sorumlu hücrelerdir (20).

Fibroblast hücreleri, geniş çekirdekli ve gelişmiş granüllü endoplazmik retikuluma sahip hücrelerdir. Golgi aygıtı ve kesecikler çekirdeğe yakın yerdedir, bu durum hücrelerin sentezleme kapasitelerinin bir göstergesidir (27). Hücreler arası bir temas kurulmuştur ve bu temaslar hücreden hücreye kimyasal sinyalizasyonu veya elektronik bağlantıyı sağlayan “*Gap junction*” (haberleşme kanalları) formunu almışlardır (20).

Pulpadaki fibroblastların çoğu farklılaşmamış olmaları ile karakterize edilmiştir. Bu farklılaşmamış hücelere günümüzde terim olarak “kök hücre” denmiştir (20).

2.2.3. Makrofajlar

Makrofajlar, kan dolaşımından ayrılarak dokular içine giren ve çeşitli altpopülasyonlara farklılaşan monositlerdir. Bu farklı altpopülasyonlar immunohistokimyasal çalışmalarla antijenik özelliklerine bakılarak gözlenebilmektedir. Fibroblastlara benzer şekilde makrofajlar da pulpadaki sinyalizasyonda aktif bir görev almaktadır. Uygun iltihabi uyarımlarla aktive

olduklarında interlökin 1, tümör nekrozis faktör, büyüme faktörleri ve diğer sitokinleri içeren geniş çeşitlilikte çözünebilir faktörler üretebilme kapasitesindedirler (20).

2.2.4. Dentritik Hücreler

Antijen sunucu bu hücreler pulpa içerisinde en fazla görülen immun sistem hücreleridir (24). Epidermis ve müköz membranda yer alan Langerhans hücrelerine benzer göreve sahiptirler; yabancı antijenleri tutarak T hücrelerine taşırlar (20, 25). Normal pulpada genelde koronal pulpanın periferinde predentine yakın yerdedirler, fakat antijenik durumlar sonrası pulpanın merkezine göç ederler (20). Pulpada yer alan makrofaj ve dentritik hücre sayısı pulpanın toplam hücrelerinin % 8 ini oluştururken dentritik hücre sayısı makrofajlardan 4 kat daha fazla sayıdadır (25).

2.2.5. Lenfositler

Sağlıklı bir pulpada T lenfositleri görülürken, B lenfositlerinin normal diş pulpasındaki varlığı henüz görülmemiştir (21).

2.2.6. Mast Hücreleri

Kan damarları ile ilişkili küçük gruplar halinde bağ dokusu içinde yaygınca dağılmış hücrelerdir. Normal pulpa dokusunda nadiren gözükürken genelde kronik iltihaplı pulpalarda bulunurlar (20).

2.3. Dentin

Dentin, diş yapısının neredeyse tamamı boyunca uzanan dişin en geniş kısmını oluşturan yapıdır. Dış kısmı anatomik krona mine, kök kısmında ise sement ile kaplı iken iç kısımda dentin pulpa odası ve kanallarını çevreler (28). Ağırlık temelli olarak dentin mineden daha az mineralize bir doku iken (ağırlıkça % 96), kemik ve sementten daha fazla mineralize bir dokudur (ağırlıkça % 65)(23).

Gelişimi tamamlanmış bir dentinin ağırlık olarak % 70' i inorganik madde, % 20' si organik madde ve % 10' u sudan oluşur. Dentinin ana inorganik bileşeni kalsiyum hidroksiapatittir, $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$. Organik matriks ise protein içerir ve içerdiği proteinin büyük kısmını tip I kollajen oluştururken az bir kısmını da tip V

kollajen oluşturur. Kollajenöz olmayan proteinler ise dentin fosfoprotein (DPP), dentin matriks protein 1 (DMP1), dentin sialoprotein (DSP), osteopontin (OPN), osteokalsin (OCN) ve kemik sialoprotein (BSP)' dir (20).

Dentin, her mm²' sinde 40.000 den 70.000 tübüle değişen yoğunlukta milyonlarca tübül içeren bir yapıdır (21). Pulpaya yaklaştıkça dentin tübüllerinin boyu kısılırken tübüllerin birim alandaki sayısı artar ve çaplarında genişleme görülür (28). Tübüllerinin çapı mine-dentin sınırında 1µm iken pulpaya yakın yüzeyde 3µm' dir (21). Tübül çaplarının pulpa yakın kısımda mine-dentin ve sement-dentin sınırına göre daha geniş olması bu bölgede dentinin geçirgenliğini arttırmakta ve daha başarısız bir pulpa bariyeri olmasına neden olmaktadır (28).

Odontogenezis boyunca diş fonksiyonel hale gelinceye kadar odontoblastlar primer dentin oluşumu için önemlidir. Diş sürerek antagonist kuspları ile temasta olmaya başladığında ise hemen sekonder dentin oluşumu başlar ve ömür boyu devam eder. Primer ve sekonder dentin arasındaki en büyük fark morfolojileridir ve sekonder dentinin tübüllerinin S-eğriliği daha belirgindir (23).

2.3.1. Reaksiyoner (Tersiyer) Dentin

Reaksiyoner veya tersiyer dentin, diş ağız içine sürdükten sonra operatif işlemler, yavaş ilerleyen diş çürüğü, abrazyon, atrizyon, erozyon gibi hafif iritanlar nedeniyle odontoblastlar tarafından sentezlenen bir tepkisel dokudur. Çoğu kez iritanın etki ettiği alanı karşılayan pulpa odasının duvarında oluşan bir dentin tabakası şeklinde görülmektedir (28). Reaksiyoner dentin; çürük atağının hızına ve şiddetine, reaksiyonun ilerlemesine ve hastanın yaşına bağlı olarak osteodentin tipte bir tabaka olarak veya tubuler veya atubuler ortodentin olarak meydana gelir. Bu dentin tabakası dental dolgu materyallerinin salınan bazı bileşenlerine karşı, rezinlerin veya civa içeren gümüş amalgamın serbest monomerlerine karşı fizyopatolojik cevap olarak da bulunabilir (23). Uyarının şiddetinin hafif olduğu ve odontoblastların canlılığını devam ettirdiği durumlarda etkilenen odontoblastlar tarafından sentezlenen matriks salgı hızında artış meydana gelir (25). Uyarının şiddeti eğer fazla ise ve odontoblastlar bozulmuş ise reaksiyoner dentin Höehl' s tabakasının altındaki hücreler tarafından üretilir (23).

2.3.2. Tamir Dentini

Tamir dentin; bu dentin yapısı reaksiyoner dentin yapısı gibi odontoblastlar veya onlarla ilişkili hücrelerin aktivitesi sonucu oluşan bir doku değil, pulpanın progenitör hücreleri ile meydana gelen kemik benzeri yapıların veya daha az mineralize yapıların karıştığı, dentinden ziyade daha çok kemiğe yakın bir yapıdır (23). Bu iki yapıyı hem klinik olarak hem de histolojik olarak ayırt etmek zordur fakat dişlerin tamir ve rejenerasyonunun hücrel ve moleküler mekanizması hakkında bilinmeyenleri açıklayabilmek için bu iki yapının ayırt edilebilmesi önemlidir (29).

Kalsiyum hidroksit ile direkt pulpa kuafajı sonrası dentinin tamiri için hücrelerin göçü ve çoğalmasını inceleyen maymunlar üzerinde yapılan bir çalışmada; kalsiyum hidroksit ile pulpa dokusu arasında yeni farklılaşan odontoblast tipi hücreler ile ilk matriks oluşumunun en erken 8. günde meydana geldiği gözlemlenmiştir (30).

2.4. Dentin Tamirinin Mekanizması

Dentin köprüsünün oluşumu uygulanan materyele göre değişiklik gösterebilmektedir (25). MTA' nın kalsiyum hidroksit serbestleyen bir materyal olması sebebiyle tamir dentinogenezisi başlatma özelliğinin kalsiyum hidroksit ile ortak olduğu öne sürülmüştür (31). Yüksek pH değerine sahip materyaller pulpa ile direkt temas ettiğinde temas yüzeyinde nekrotik bir tabaka meydana gelir. Bu durum pulpa hücrelerinin savunma ve tamir reaksiyonlarını indükler. Nekrotik alan dejenere olup yok olur ve diş pulpa dokusu ile kuafaj materyali arasında bir boşluk kalır. Nekrotik alan altındaki pulpanın rezerv mezenkimal hücreleri ve endotelyal pulpa hücreleri göç ederek prolifer olurlar. Mezenkimal hücreler önce fibroblastlara sonra da matriksi hazırlayacak odontoblast benzeri hücrelere farklılaşırlar (25). Tamir dentinogenezisi genelde kübik hücrelerle beraber atübüler veya düzensiz fibrodentin matriks oluşumu ile başlar. Tübüler dentin benzeri matriks, uzun ve polarize odontoblast benzeri hücrelerin yer almasıyla oluşur (31). Matriksin mineralizasyonu sistemik kan dolaşımından gelen Ca iyonları ile gerçekleşir (25).

2.5. Doku Mühendisliği

Doku mühendisliği, hasara uğramış veya kaybolmuş dokuların yenilenmesini kimya, fizik, mühendislik ve biyoloji bilimleri, metodları ve prensiplerinin birleşimi ile sağlama odaklı multi disiplinler bir alandır. Son birkaç yıl içerisinde doku mühendisliğinin, yanık tedavileri için deri üretimi, geniş kemik defektlerinin yeniden oluşturulması için kemik greftleri, aterosklerotik damar hastalıklarının tedavisinde kullanılmak üzere oluşturulmuş küçük çapa sahip arterler ve plastik ve rekonstrüktif cerrahi için kıkırdak oluşturulması gibi yeni terapilerdeki başarıları sonuçlanmıştır. Dişhekimliği alanında ise temporomandibular eklem, periodontal ligament, dentin, mine, pulpa ve bağlantılı diş dokularının rejenerasyonun hedeflendiği gelişmeler raporlanmıştır (8).

Doku mühendisliği temel konsepti ilk olarak 1980 lerin ortalarında A.B.D. de organ nakli için donör yetersizliği sorununu azaltmak için öne sürülmüştür (32). Hücre kaynaklı doku mühendisliği yaklaşımı çözünebilir yapı iskelelerine hücrelerin ve/veya büyüme faktörlerinin ekilerek doku gelişiminin uyarılması ve kontrol edilmesi için nakledilmesini kapsamaktadır (33).

Doku mühendisliği için üç temel unsur gerekmektedir (34);

1- Uygun bir hücre kaynağı.

2- Geçici hücre dışı matris olarak görev yapacak doğal yada sentetik orjinli çözünebilir bir yapı iskelesi.

3. Hücre çalışması için en uygun sinyaller.

Doku mühendisliğinde başarının yakalanması; hücreler, yapı iskeleleri ve hücre sinyallerinin mükemmel uyumu ile sağlanabilir.

2.5.1. Hücreler

Hücre kaynaklı tedaviler rejeneratif tıpta ortak bir yaklaşımdır. Kök hücreler çoğalarak istenilen organları oluşturabilecek birçok farklı tipte hücreye gelişebilme potansiyeline sahiptirler ve bu hücreler rejeneratif tıp için büyük umut kaynağıdır. Kök hücre soyları özelleşmemiş progenitörler olarak istenen dokunun oluşumu ve gerektiğinde tamiri için özelleşmiş hücrelere farklılaşabilen internal bir kaynaktırlar (35).

Diş dokusundan, odontoblast benzeri hücelere farklılaşabilen 5 tip mezenkimal diş kök hücresi tespit edilmiştir. Bunlar;

2.5.1.1. Mezenkimal Diş Kök Hücreleri (MDSC)

MDSC' ler genişleyerek çoğalan multipotent hücrelerdir (en az 25 pasaj devam eder). Dondurularak güvenle saklanabilirler, immunosupresif özelliklere sahiptirler ve mezenkimal belirleyiciler taşırlar. Bu hücreler geniş çekirdekli, bol sitoplazmalı, geniş eksenli hücrelerdir ve kültürde sitoplazmik uzantılıdır. Bu bağlı hücreler morfolojik olarak kemik iliğinden (BMMSC) elde edilmiş mezenkimal kök hücrelerle özdeştir (36). MDSC' ler invitro olarak germinal layerların bütün hücrelerine farklılaşabilirler. Bunlar; ektoderm (nöral hücreler), mezoderm (miyositler, osteoblastlar, kondrositler, adipositler ve kardiyomyositler) ve endoderm (hepatik hücreler)'dir (9). MDSC' ler enzimatik sindirim veya explant kültür kullanılarak izole edilebilirler.

Mezenkimal diş kök hücreleri bugüne kadar; diş pulpası kök hücrelerini (DPCS), çekilmiş insan geçici diş kök hücrelerini (SHED), periodontal ligament kök hücrelerini (PDLSC), dental folikül progenitör kök hücrelerini (DFPC) ve apikal papilla kök hücrelerini (SCAP) içeren birçok tip yetişkin kök hücreleri dişlerden izole edilmiştir (35).

2.5.1.2. Diş Pulpası Kök Hücreleri (DPSC)

Gronthos ve ark. 2000' li yıllarda yetişkin insan diş pulpası hücrelerinden yeni tip kök hücreler keşfettiler, bunlar nöral hücreler, adipositler ve odontoblast/osteoblastlara farklılaşabilme kabiliyetine sahiptirler. Bu hücreleri diş pulpası kök hücreleri olarak adlandırılırlar (DPSC). Ex-vivo olarak gelişmiş DPSC ile hidroksiopotat/trikalsiyumfosfat formu ektopik dentin/pulpa benzeri bileşime immun-baskılı farede tansplante edilmiştir. Heterojen DPSC ler vaskülerize pulpa benzeri doku oluşturmuş ve doğal dentindeki gibi tübüller içeren dentin üreten odontoblast benzeri hücre tabakası tarafından sarılmıştır (10). DPSC' ler CD73, CD9D, CD105 gibi mezenkimal belirleyicileri taşırlar (9).

2.5.1.3. Çekilmiş Süt Dişi Kök Hücreleri (SHED)

Çekilmiş insan süt dişinden (SHED) elde edilen kök hücreler olgunlaşmamış olarak da isimlendirilir ve osteojenik ve odontojenik hücrelere, adipozitelere ve nöral hücrelere farklılaşabilme kapasitesine sahip insan süt dişlerinin pulpalarından elde edilen MDSC lerdir (10). Postnatal kök hücrelerle ilişkili nörolojik hücreleri gibi SHED lerde; nestin, beta III tubulin, glutamik asit dekarboksilaz (GAD), nöral nüklei (NeuN), glial fibriler asidik protein (GFAP), nörofilament M (NFM) ve 2',3'-siklik nükleotid 3'-fosfodiesteraz (CNPase) gibi çeşitli nöral hücre merkezlerini içerirler. Ayrıca SHED ler *invivo* transplantla kemik oluşturabilirler ve immunomodülatör özelliklerinin geliştirilmesiyle immun hastalıkların iyileştirilmesi için uygun kök hücre kaynağı olabilirler (37).

2.5.1.4. Periodontal Ligament Kök Hücreleri (PDLSC)

İnsan periodontal ligamentinden izole edilen periodontal ligament kök hücreleri (PDLSC) mezenkimal belirleyicileri içerirler. *In vitro* olarak, PDLSC' ler adipojenik, osteojenik ve kondrojenik hücrelere farklılaşma kabiliyetine sahiptir. PDLSC' ler, prelinik çalışmalarla olumlu bir şekilde kanıtlandığı gibi sementoblast ve hallojen formu hücrelere benzer hücrelere farklılaşma kapasitesine sahip yeni kök hücre popülasyonları sunar (38).

2.5.1.5. Dental Folikül Progenitör Kök Hücreler (DFPC)

Gelişen diş germini saran mezenkimal dokudan elde edilen dental folikül progenitör kök hücreler (DFPC); immunomodülatör özelliklere, yüksek proliferasyon potansiyeline ve odontoblastlar, sementoblastlar, osteoblastlar ve dişteki diğer hücrelere farklılaşma kapasitesine sahip multipotent kök hücrelerdir (39). Ayrıca *invivo* implantasyon sonrası yeni periodontal ligament oluşumunu da sağlayabilirler (9).

2.5.1.6. Apikal Papilla Kök Hücreleri (SCAP)

Apikal papilla kök hücreleri (SCAP) kök pulpası öncüllerinden elde edilir, mezenkimal işaretler gösterir ve *invitro* ve *invivo* çalışma sistemlerinin her ikisinde de dentin benzeri doku üretirler (40).

Domuz çenesine implante edilmiş hidroksiapatit bazlı yapı iskelesine ekilmiş SCAP-PDLSC karışımının kök benzeri yapı oluşturduğu görülmüştür (9).

2.5.2. Yapı İskeleleri

Yapı iskelesi; hücrelere yapışması için, çoğalması için, göç etmesi için ve farklılaşması için uygun 3 boyutlu çevre sağlar (34).

Doku mühendisliği yapı iskeleleri için kullanılan materyallerin yüksek poroziteli ve uygun por büyüklüğüne sahip hücre infiltrasyonuna izin veren ve hücrelerin yapışması, çoğalması ve göç etmesi için uygun kimyasal ve fiziksel yüzey özelliklerine sahip biyouyumlu materyaller olmaları gerekmektedir (41, 42).

Boyutlu yapılar ve yapı iskelelerinin poroziteleri kök hücreler üzerinde büyük bir rol oynar (43). İki boyutlu yapı iskeleleri ile karşılaştırıldığında üç boyutlu yapı iskelelerinin kök hücrelerin osteoblastik gen ekspresyonunu arttırdığını göstermiştir (44, 45).

Yapı iskelesi kökenli doku mühendisliği için ideal hücre popülasyonları yetişkin kaynaklardan izole edilebilen otolog farklılaşmamış kök hücrelerdir (43). Çünkü enflamasyon riski düşük ve immun yanıt oluşma riski yoktur (46).

Doku mühendisliği uygulamalarında sentetik ve doğal olmak üzere iki grup yapı iskelesi materyali kullanılmaktadır. Kullanılan sentetik materyallerden çözünebilir olanları; poli(ϵ -kaprolakton), poliglolik asit (PGA), polilaktikasit (PLA) ve bunların kopolimerleri olan poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA)' dir. Çözünemeyen sentetik yapı iskelesi materyalleri ise; polimetil metakrilat (PMMA), politetrafloroetilen (PTFE), polidimetilsiloksan (PDMS)' dir (35).

Yapı iskelelerinde kullanılan doğal materyaller; aljinat, agaroz, chitosan, kollajen, fibrin, jelatin, hiyaluronik asit ve pektin' dir (35). Yapı iskelelerinde kullanılan doğal poliesterler; polihidroksibutirat (PHB) ve polihidroksibutirat-co-hidroksivalerat (PHBV)' dir. Polianhidratlar; poli N-izopropil Akrilamid (pNIPAM) ve poliüretanlar da doku mühendisliği uygulamaları için uygun materyallerdir (46).

2.5.3. Hücre Sinyalleri ve Biyolojik Çevre

Hücre sinyalleri, hücrelerin aktivitelerini yöneten karmaşık iletişim sisteminin bir parçasıdır ve hücreler arası etkileşimi organize eder. Hücre sinyalizasyonunda

birçok ekstrasellüler molekül yer almaktadır ve bu ekstrasellüler molekül havuzunun içinde tek bir proteinin dahi hücrelerin fonksiyonel bir dokuya farklılaşmasında büyük öneminin olduğu görülmüştür (8).

2.6. Dentin ve Pulpa Tedavileri

Vital pulpalı bir dişte çürük, travma, operatif veya çeşitli nedenlerle oluşan pulpa-dentin hasarlarında uygulanan, derin dentin çürüğünün tedavisi, ekspoze dentinin tedavisi ve amputasyonlar şeklinde açılmış pulpalarda uygulanabilen tedavilerin tümünü içermektedir (25).

2.6.1. Direkt Pulpa Tedavisi

Travma veya iatrojenik nedenlerle perfore olmuş sağlıklı bir diş pulpa dokusunda tamir dentin yapımını uyaracak ve pulpanın canlılığının devamını sağlayacak doku dostu bir materyal ile direkt örtülmesi işlemidir (47).

2.6.1.1. Direkt Pulpa Tedavisinin Endikasyonları

Direkt pulpa kuafajının endike olduğu durumlar şunlardır (25, 47);

- Travma nedeniyle pulpası açılmış dişler.
- Dişin protetik amaçlı kesimi veya çürüğün temizlenmesi esnasında pulpanın istenmeden oluşan pulpa perforasyonlarında.
- Doku kaybının restore edilebilir düzeyde olduğu durumlarda.
- Kök gelişimini tamamlamış veya tamamlamamış dişlerde.
- Diş pulpası, geri dönüşümlü bir evre olan pulpitis evresinden daha ileri bir patolojik durumda değilse.
- Pulpada meydana gelen kanamanın normal bir sürede durdurulabildiği ve cerahatli eksuda içermediği durumlarda.
- Termal ve elektrik pulpa testine pozitif yanıt alınmıyorsa.
- Dişte spontan ağrı yoksa.
- Perküsyon ve palpasyonda dişte ağrı yoksa.
- Pulpada kalsifikasyon yoksa.
- İlerlemiş bir periodontal hastalığın olmadığı durumlarda.

-Radyografik incelemede intraradiküler ve periradiküler dokuların normal gözlendiği durumlarda

2.6.1.2. Direkt Pulpa Tedavisinde Başarıyı Etkileyen Faktörler

2.6.1.2.1. Perforasyon Alanının Büyüklüğü

Pulpa odasının tavanının bütünüyle kaldırıldığı durumlarda dahi dentinde tamir meydana gelebildiği bilinmektedir. Bu nedenle ideal koşullarda perforasyon alanının büyüklüğünün pek önemli olmadığı öne sürülmektedir (25).

2.6.1.2.3. Bakteriyel Kontaminasyon ve Mikrosızıntı

Direkt pulpa kuafajı tedavisinde prognozu etkileyen en önemli faktörlerden birinin çürük yoluyla, tükürük kontaminasyonu ile ve dolgu ve diş dokusu arasında çeşitli nedenlerle meydana gelen mikrosızıntı nedeniyle oluşan pulpanın bakteriyel kontaminasyonu olduğu gösterilmiştir (47).

Mikroorganizmasız ortamda yetiştirilmiş deney hayvanlarında oluşturulan pulpa perforasyonlarında herhangi bir ilaç kullanılmadan ve perforasyon alanı kapatılmadan da dentin tamiri oluştuğu gözlenmiştir (25).

2.6.1.2.4. Kanama Kontrolü ve Pıhtı Oluşumu

Pulpa açılımı sonucu pulpa dokusu altındaki kapillerlerde kanama meydana gelir. Kanamanın miktarı hasara uğramış damar sayısı ve açılan yara yüzeyinin büyüklüğü ile orantılıdır (25, 47).

Kanama kontrolü, serum fizyolojik veya %3' lük oksijenli su ile nemlendirilmiş önceden steril edilmiş pamuk peletlerin 3-5 dk süre ile perfore alan üzerine yapılan baskı ile sağlanmaya çalışılır. Kanama durdurulduktan sonra kuafaj materyali ile perfore alan kapatılır. Kuafaj materyali altında kanamanın devam etmesiyle oluşan kan pıhtısı kuafaj materyali ile pulpa dokusu arasında bir engel oluşturarak kuafaj materyalinin işlevini engeller ve bakteriyel kontaminasyona zemin oluşturur (47).

Stanley (48) kalsiyum hidroksitin direkt kuafajda etki edebilmesinde pulpa dokusu ile temasının önemini vurgulamıştır. Paranjpe ve arkadaşları (49) ise

yaptıkları bir invitro çalışmada direkt pulpa kuafajında son yıllarda kalsiyum hidrokside göre birçok açıdan üstünlüğü kanıtlanmış MTA' nın da insan diş pulpası hücreleri ile direkt temasta olduğunda hızlı ve etkin bir tamir dentin formasyonuna diş pulpası hücrelerini aktive ettiğini göstermişlerdir.

2.6.1.2.5. Dentinin Aşırı Kurutulması

Açığa çıkmış dentinin fazla kurutulmasıyla dentin tübüllerindeki sıvı hızla dışarıya doğru hareket eder. Bu sıvının devamlılığı pulpa tarafından sağlanmaktadır. Dentin tübüllerindeki sıvının dışarıya doğru hızlı hareketi odontoblastlarında yerinden ayrılarak dentin tübülü içine yer değiştirmesine sebep olur ve odontoblast hücreleri burada otolize uğrar. Aynı zamanda sıvı hareketi mekanoreseptörleri uyararak ağrıya neden olur (25).

2.6.1.2.6. Basınç

Pulpanın perfore olduğu durumlarda frez veya el aletinin basıncı direkt pulpaya iletilir ve pulpa da hasara neden olabilir (47).

2.6.1.2.7. Perforasyon Alanının Konumu

Özellikle tek ve dar kanallı ön ve yan grup dişlerde kök çürükleri ve kole bölgesindeki pulpa perforasyonlarında pulpa kuafaj maddesinin ve tamir dentininin pulpanın iki bölümünü ayırdığı durumlar meydana gelebilmekte ve pulpa ile bağlantısı kopan kısımda iltihabi reaksiyonlar ve nekrozlar meydana gelebilmektedir (25).

2.6.1.2.8. Bireyin Yaşı ve Pulpanın Patolojik Durumu

Bir diş pulpasında fizyolojik ve patolojik olmak üzere iki tip yaşlanma meydana gelir. Bireyin kronolojik yaşının artması ile diş pulpasının fizyolojisinde de değişiklikler meydana gelmektedir. Ayrıca travma, çürük, periodontal hastalıklar gibi etkenlerle de dişte bireyin kronolojik yaşına bağlı olmaksızın erken bir patolojik yaşlanma olabilmektedir (47).

Yaşlanma ile hücrelerin metabolik aktivitesi azalmakta, antikor ve bağışıklık reaksiyonları da bozulmaya uğramaktadır. Hücrelerin boyutları küçülmekte, atrofiye

olmakta ve farklılaşma ve mitoz hızının azalması doku yenilenmesini de olumsuz etkilemektedir (25). Auschill ve ark.(50) direkt pulpa kuafajının oldukça başarılı olduğu bireylerin 10-19 yaş aralığındaki genç hastalar olduğunu vurgulamışlardır.

2.6.1.2.9. Direkt Pulpa Tedavisinde Kullanılan Materyalin Seçimi

Direkt pulpa kuafajında kullanılacak materyalin, tedavinin başarısı açısından bazı özelliklere sahip olması gerekir. Bu özellikler; (25, 47, 51)

1. Materyal biyouyumlu olmalıdır.
2. Tamir dentini yapımını uyarabilecek yapıda olmalıdır.
3. Antiseptik etkiye sahip olmalıdır.
4. Alkalin reaksiyon göstermelidir.
5. Çürük nedeniyle meydana gelen asitleri nötralize edebilmelidir.
6. pH sı pulpanın pH sına eşit olmalıdır.
7. Bakteriyel sızıntıya engel olabilmelidir.
8. Isıyı iletmemelidir.
9. Boyutsal stabilitesi iyi olmalıdır.
- 10.Sedatif olmalıdır.
- 11.Dentine ve restoratif materyale yapışabilmelidir.
- 12.Sekonder çürükleri önleyebilmesi için flor serbestleyebilmelidir.
- 13.Radyopak olmalıdır.
- 14.Uygulanabilirliği kolay olmalıdır.

Direkt pulpa kuafajı sonrası tamir dentin oluşumunu ve pulpanın canlılığının devamını sağlayabilmek için birçok materyal kullanılmıştır. Bu amaçla; kalsiyum hidroksit, mineral trioksit aggregate, çinko oksit öjenol, doku adezivleri, dentin adezivleri, bazı simanlar, enzimler, hormonlar, antibiyotikler gibi birçok materyalin yanında kollajen, kondroidin sülfat ve sodyum hyalüranat gibi osteojenik ajanlar da kullanılmıştır (47).

2.7. BioAggregate

DiaRoot BioAggregate (DiaDent, Burnaby, BC, Kanada), önceki materyallerin bazı olumsuz özelliklerini ortadan kaldırmak amacı ile laboratuvarlarda yeni geliştirilmiş su bazlı bir simandır. Bu materyal kontrol altındaki koşullarda toz

gibi saf ve ince hidrolik simanın kontaminasyonsuz biyouyumlu seramik nanopartiküller ile birleştirilmesiyle üretilmiştir (52).

Nanoteknolojik gelişmelerle biyoseramikler; perforasyonların tamirinde, apikal retrograd kök dolgusu olarak, gelişimi tamamlanmamış dişlerin apikalini kapatmada ve vital pulpa tedavilerinde kullanılabilir hale getirilmiştir (53).

BioAggregate, ilk nanopartiküllü tamir simanı olarak dişhekimliği materyalleri içinde yerini almış ve henüz az sayıda çalışma bu materyelin etkinliğini göstermesine rağmen sementogenezisi sağladığı ve kök kanal sistemi içinde hermetik kapamayı sağladığı iddia edilmiştir (52).

Biyoseramikler; biyolojik olarak oldukça uyumlu, toksik özellikte olmayan, kullanımı sonrasında büzülme göstermeyen ve kimyasal olarak stabil materyallerdir. Aynı zamanda kök kanal dolgusunda, kök kanal tamiri gibi endodontik uygulamalarda ve hatta kanal dışına taşıkları durumlarda dahi dokularda önemli bir iltihabi reaksiyona neden olmadıkları görülmüştür (54). Kolay manupilasyonu, ideal çalışma süresi ve iyi kullanım özelliklerinin yanında antifungal aktiviteye de sahip bir materyeldir (55).

Yapılan bir çalışmada, BioAggregate' in biyomineralizasyon kabiliyetinin yüksek olduğu ve BioAggregate ve ProRoot MTA' nın benzer biyomineralizasyon karakterine ve Ca serbestleme konsantrasyonuna sahip olduğu belirtilmiştir. Materyallerin çökeltilerindeki Ca, P, O ve karbonatlaşmış hidroksiapatitin de benzer olduğu görülmüştür (53).

İçeriğinde; trikalsiyum silikat, dikalsiyum silikat, kalsiyum fosfat monobasic, amorf silikon dioksit ve radyopaklığı için geleneksel MTA da yer alan bizmut oksidin yerine tantalum pentoksit vardır. Aynı zamanda geleneksel MTA dan farklı olarak dokular için toksik etkilerini azaltmak amacıyla alüminyum içermemektedir (56).

BioAggregate' in dental marketlerdeki sunumu; toz olarak tek kullanımlık 1 gr' lık paketler ve tozun karıştırılacağı 0,38 ml' lik kapsüllerdeki deiyonize su şeklindedir. BioAggregate tozu deiyonize su ile ince krem kıvamına gelinceye kadar yaklaşık 2 dakika karıştırılır ve uygulanacak yere beklenmeden yerleştirilir. Çalışma süresi ortalama 5 dakika kadardır. Materyal deiyonize su ile karıştırıldıktan 5 dakika

kadar sonra dehidratasyona uğrayarak kurumaya başlar. Sertleşme süresi ise min. 4 saattir (57).

2.8. Kollajen

“Kollajen” teriminin ingilizcede benimsenmesi yaklaşık 150 yıl önce olmuştur (58). Kollajen isimlendirmesi karakteristik üç polipeptit zincirin üçlü heliks formundaki proteinler için kullanılan genel bir terimdir ve kollajen ailesinin bütün üyeleri büyüklük, yapı ve doku dağılımındaki önemli farklılıklarına rağmen ekstrasellüler matriksde bu supramoleküler yapıdadırlar (59).

Kollajen insan vücudunda en çok bulunan protein olup bütün proteinin yaklaşık %30'unu içerir (60). Günümüze kadar 28 tip kollajen tespit edilmiştir (58). Tip I, II, III, V ve XI kollajenler çizgili fibril oluşturan kollajenlerdir. Tip XXIV ve XXVII kollajenler de yeni tanımlanmış çizgili fibril oluşturan kollajenler olarak kollajen ailesinde yer almıştır. Tip I-II-III kollajenler konnektif doku matriksinin ana kollajenleridir (60). Fibriler kollajenler oldukça yüksek gerilme gücüne sahiptirler ve iskelet, deri, kan damarları, bağırsaklar veya organların fibröz kapsülleri gibi vücut yapıları için yapısal çerçeve sağlayarak anahtar bir rol oynarlar (58).

Tip I kollajen tendonlar, ligamanlar, kemik, kornea ve derinin ana kollajenlerindedir. Tip III kollajen, tip I kollajenden daha az oranda bulunur ancak hiç bulunmadığı kemik dokusu ve tendonlar hariç dağılımı tip I kollajenle paraleldir. Tip III kollajen en çok kan damarları gibi gerilebilir dokularda bulunur. Tip V kollajen, tip I kollajenin var olduğu dokularda bulunur. Tip II kollajen ise kıkırdağın önemli bir bileşenidir (58).

2.8.1. Tip I Kollajen

Tip I kollajen, en çok bulunan ve en iyi çalışılmış kollajen çeşididir. Kemikğin organik kütlelerinin %90'ından fazlasını oluşturduğu gibi tendonların, ligamanların, korneanın, derinin ve hiyalin kıkırdağın, beyin ve vitröz vücut hariç birçok interstisyel dokunun ana kollajenidir (59). İntertübüler dentinin de %90 gibi bir oranla ana proteini iken peritübüler dentinde kollajen fibrillere rastlanmamıştır (23).

Her tip I kollajen molekülünde tipik olarak iki $\alpha 1$ zinciri ve bir $\alpha 2$ zinciri [$\alpha 1(I)_2 - \alpha 2(I)$] karakteristik üçlü heliks formunda birbiri etrafında sarmal yaparlar.

Her $\alpha 1$ zinciri ve $\alpha 2$ zinciri kısa N-terminal peptidinden önce uzun sarmal alan ve ardından kısa C-terminal peptidi içerir (58).

Tendon gibi dokularda tip I kollajen fibrilleri birbirlerine paraleldirler ve demetler ya da lifler halindedirler. Deri gibi dokularda ise rastgele yönlendirilmiş ve birbirine geçmiş fibrillerin karmaşık ağları şeklindedirler. Kemik dokusunda ise hidroksiapatit kristalleri, kollajen molekülleri arasındaki boşluklara uzanmış gibi gözükmetedirler (58).

2.9. Diş Hekimliğinde Doku Mühendisliği Yaklaşımları

Dişhekimliğinde rejeneratif biyoloji alanındaki birçok çalışmada yapı iskeleleri, önceden izole edilmiş ve ekilmiş hücrelerle kültüre edilmiş ve daha sonra deney hayvanlarına uygulanmıştır (19). Huang ve ark. (61), kök kanalını boşaltarak poli-laktid/glikolid (PLG) sentetik yapı iskelesi üzerine diş pulpası kök hücreleri ve apikal papilladan elde ettikleri kök progenitör hücreleri izole ederek ettikleri ve kök kanalı içine yerleştirdikleri bir çalışmada mevcut dentin duvarı üzerinde dentin benzeri doku ve pulpa benzeri yapı oluştuğunu gözlemlemişlerdir. Daha sonra Sakai ve ark.(62) tarafından diş dilimi/yapı iskelesi modelinin geliştirildiği çalışma, yapay pulpada poli-L-laktik asit (PLLA) yapı iskelesi ve diş pulpası kök hücreleri (DPSC) ile rejenere olan dentinogenezisi göstermiştir.

Bir başka yaklaşım da; hücrelerin adezyonu için herhangi bir dış taşıyıcı materyal kullanmadan hücrelerin birleşimi yönündedir (19). Birçok organda olduğu gibi dişlerin gelişiminde de epitelyal-mezenkimal etkileşimler anahtar bir mekanizmadır (63-65). Birçok yapı iskelesiz çalışmada bu iki tip hücre karıştırılmıştır ve hücre birleşimi gözlenmiştir(66, 67). Hu ve ark. morfolojik olarak tanımlanmış tam bir diş oluşumu için oldukça fazla sayıda mezenkimal hücre gerekmesinin bu yaklaşımın tek zorluğu olduğunu belirtmişlerdir (68).

Üçüncü bir yaklaşım ise diğer yaklaşımlar gibi invitro hücre kültürlerinin izole edilerek invivo kullanılması değilde “stem cell homing” olarak adlandırılan canlının kendi kök hücrelerinin istenilen alana yerleşmesinin sağlandığı yaklaşımdır. Kan dolaşımındaki mezenkimal kök hücreler hedef dokuya bağlanır ve ilgili dokuya farklılaşırlar (19). Bu yaklaşımla periodontal ve diş yapılarının rejenerasyonu ilk olarak 2010 yılında Kim ve ark. tarafından ifade edilmiştir (69).

“Stem cell homing” tekniğinin hücre transplantasyonuna göre avantajları vardır. Bunlar;

Hücre transplantasyonunun immun yanıt oluşturma, patojen bulaştırma ve tümör oluşturma riskleri vardır. Hücrelerin saklanması, kullanıma hazır hale getirilmesi ve nakledilmesi de ayrıca bir iş yükü ve maliyete neden olmaktadır. Ayrıca uygulayıcıların hücreleri kullanabilme konusundaki bilgi eksikliği ve Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA)’ nin onayı için mevzuata uygunluğu da ayrıca bir uğraştırıcı yönüdür. Cell homing ürünlerinde ise klinisyenlerin özel eğitim almalarına gerek yoktur. Sadece nasıl hazırlanıp kullanmaları gerektiğini bilmeleri yeterlidir. Ayrıca FDA onaylı “cell homing” ürünleri zaten piyasada mevcuttur ve yeni “cell homing” ürünleri içinde kök hücre ürünlerine göre FDA onayının daha rahat alınabileceği düşünülmektedir (70).

2.10. Kollajenin Dişhekimliğinde Kullanımı

Kollajen, dişhekimliği alanında; yönlendirilmiş doku rejenerasyonunda ve hemostatik ve pansuman ajanı olarak başarısı kanıtlanmış bir materyaldir. Kollajen, düşük immun yanıt ve toksisite gibi doğal özelliklere sahip olduğu gibi hücresel büyüme ve bağlanmayı ve homeostazisi teşvik etme yeteneğine de sahiptir (71).

Bimstein and Shoshan, kollajen solüsyonunu köpeklerde yaptıkları çalışmada direkt pulpa kuafaj ajanı olarak kullanmışlar ve 1 aylık periyot sonunda test edilen dişlerin canlılığını devam ettirdiğini ve ince, yeni oluşmuş dentin köprüsü oluşumunu raporlamışlardır (72).

Marsan ve arkadaşları köpeklerde yaptıkları bir direkt pulpa kuafajı tedavisi çalışmasında kollajen membranı pulpa kuafaj materyali olarak kullanmışlardır. 6 hafta sonraki gözlemlerinde pulpanın iyi bir kan desteği ile canlılığını koruduğunu ve kan damarları sayısını arttırdığını göstermişlerdir (73).

Ortodontik amaçlı çekim endikasyonu konmuş dişlerde yapılan bir klinik pulpotomi çalışmasında; üstün yara iyileştirme özelliği bilinen kolajen partikülleri, kullanılan diğer siman materyaline göre vaskülarizasyonu ve pulpanın iyileşme kapasitesini arttırmış ve daha biyouyumlu bulunmuştur (71).

Akkouch ve arkadaşları yaptıkları bir invitro çalışmada; kollajen-hidroksiapatit-poli(L-laktid-ko-ε-kaprolakton) materyallerinden oluşturdukları üçlü

yapı iskelesini insan diş pulpası kök hücreleri üzerinde denemişler ve yapı iskelesinin insan osteoblast benzeri hücrelerin çoğalmasını ve yapışmasını desteklediğini ve kemik formasyonu fenotipine farklılaşmasını uyardığını raporlamışlardır (74).

Kikuchi ve arkadaşları, hidroksiapatit ve kollajenden oluşan nanokompozit yapının kemik dokusu ve osteokondral defektler gibi birçok klinik uygulamalarda başarısı kanıtlanmış oldukça faydalı bir kemik benzeri materyal olduğunu göstermişlerdir (75).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma üç aşamada gerçekleştirilmiştir.

1. Kollajen ve BioAggregate' den süngerimsi yapı iskelesinin laboratuvar ortamında oluşturulması ve karakterizasyonu.
2. Oluşturulan süngerimsi yapı iskelesinin deney hayvanlarının dişlerine uygulanması.
3. Uygulama yapılmış deney hayvanı dişlerinin gözlem süresi sonunda histopatolojik açıdan incelenmesi.

3.1. Kollajen ve BioAggregate' den süngerimsi yapı iskelesinin oluşturulması ve karakterizasyonu

Hassas terazi ile ölçümü yapılan 1.5 mg BioAggregate, (DiaDent, Burnaby, BC, Kanada) ve 15 mg sığır derisinden elde edilmiş Tip I kollajen (Sigma Aldrich, Almanya) karışımı, 0.5 % asetik asit içerisinde çözüldü (Şekil 3.1). Bu çözeltiden 51 µL, 96 kuyucuklu plakalar içerisine alındı ve -20⁰C'de dondurularak liyofilizatör (Labconco, ABD) ile liyofilize edildi (Şekil 3.2). Elde edilen süngerler kullanılana kadar nemsiz ortamda ve oda sıcaklığında saklandı.



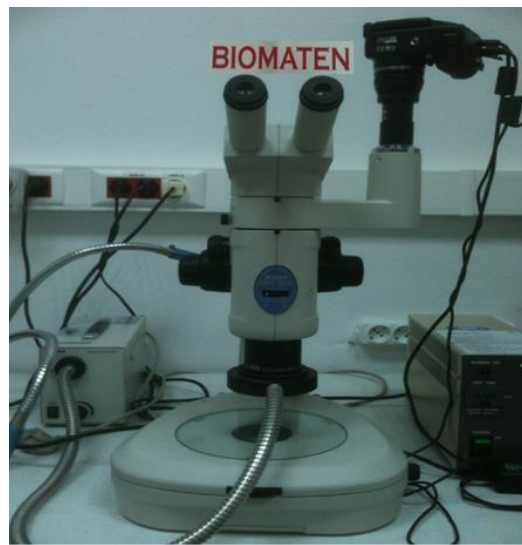
Şekil 3.1. Çalışmada kullanılan Kollajen ve BioAggregate materyalleri.



Şekil 3.2. Çalışmada kullanılan Liyofilizatör.

3.1.1. Kollajen-BioAggregate Süngerimsi Yapı İskelesinin Karakterizasyonu

Oluşturulan yapı iskelelerinin; hücrelerin göçü, yapışması ve çoğalarak doğal diş dokusu oluşturması için uygun yapıda, büyüklükte ve yoğunlukta gözeneklere sahip olup olmadığının belirlenebilmesinde steromikroskop (Nikon, ABD) ve yüksek çözünürlüklü Taramalı Elektron Mikroskop (SEM) (Quanta, ABD) cihazları ile görüntüleme yapıldı (Şekil 3.3). Yapı iskelelerinin gözeneklilik yüzdesinin belirlenmesinde Civa Porozimetresi (Quantachrome, ABD) yöntemi kullanıldı. Ayrıca saf kollajenden aynı yöntemlerle elde edilmiş yapı iskelesi ile karşılaştırıldı.



Şekil 3.3. Çalışmada kullanılan Steromikroskop.

3.2. Oluşturulan süngerimsi yapı iskelesinin deney hayvanlarına uygulanması ve takibi

Bu çalışmada deneysel süreçte 4 adet Akkaraman cinsi koyun kullanıldı. Koyunlar, deneysel çalışmanın yapılacağı günün bir gün öncesinde anestezi maddeye bağlı gelişebilecek bulantı ve hipersalivasyonu önlemek amacıyla, 18 saat aç ve 6 saat susuz bırakıldı. Çalışma günü koyunlar anestezi altına alınmadan önce tartılarak ağırlık ortalamaları 42 kg olarak belirlendi ve tüm anestezi maddelerin dozları bu kg değeri baz alınarak ayarlandı (şekil 3.4).



şekil 3.4. Çalışmada kullanılan koyunlar.

Deneysel uygulamanın yapılacağı koyun rastgele seçilerek kalıcı sprey boya ile numaralandırıldı ve anestezi yapılarak deneysel işleme geçildi (şekil 3.5). Bir koyunun deneysel işlemini tamandıktan sonra sıradaki diğer koyuna anestezi uygulandı.



Şekil 3.5. Sprey boya ile numaralandırılmış koyun.

Anestezi için, önce 0,1 mg/kg Xylazine HCl içeren Alfazyne %2 (Alfasan International B.V., Woerden, Hollanda) ve daha sonra 5 mg/kg Ketamine HCl içeren Ketasol %10 (Richter Pharma AG, Wels, Avusturya) semimembranosus-semiendanosus bölgesine intramüsküler olarak uygulandı.(Şekil 3.6) Bu dozdaki anestezi solunum depresyonuna neden olmadığından entübasyon uygulanmasına gerek kalmadı. İlgili dişlere işlem sonrası ağrıyı önlemek amacıyla Jetokain (Adeka, Samsun) ile infiltratif lokal anestezi yapılmıştır (Şekil 3.7).



Şekil 3.6. Çalışmada kullanılan anestezik maddeler.



Şekil 3.7. Hayvanlara uygulanan lokal anestezi.

Çalışmada kullanılacak bütün aletler çalışmadan bir gün önce, otoklavda steril edildi ve her bir koyunda yeni steril çalışma aletleri kullanıldı.(Şekil 3.8)



Şekil 3.8. Çalışmada kullanılan aletlerin bir kısmı.

Çalışmanın rahat gerçekleştirilebilmesi amacı ile deney hayvanının ağzını açık tutmaya yarayacak bir tahta parçasına steril gazlı bez sarılarak hayvanın çeneleri arasına yerleştirildi ve her işlem sonrası diğer deney hayvanına geçilirken gazlı bez değiştirildi. Çalışmada taşınabilir diş unit sistemi (Dynamic, Çin) kullanıldı (Şekil

3.9). Mine tabakasında 10 numaralı aeratör elmas frezler (Diatech, ABD), dentin tabakasında ise 10 numaralı tungsten karbid rond frez (Diatech, ABD) kullanılarak koyunların diş pulpalarında steril şartlar altında 1 mm büyüklüğünde perforasyonlar oluşturuldu.



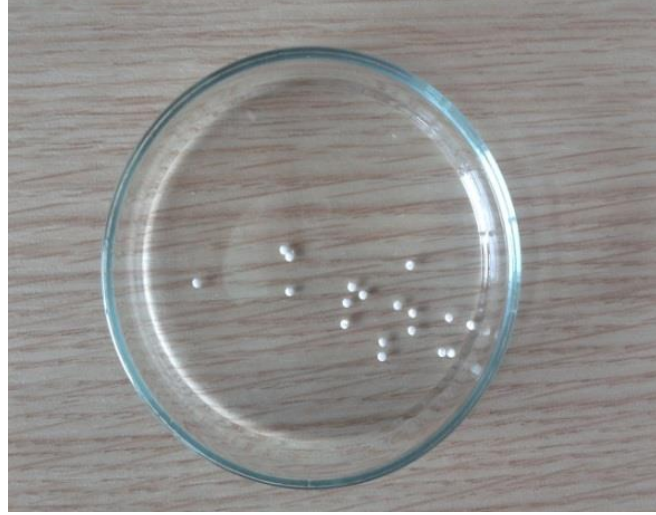
Şekil 3.9. Taşınabilir diş unit sistemi.

Açılan pulpa yüzeyinde meydana gelen kanama, serum fizyolojik'e batırılmış steril pamuk peletlerle kontrol altına alınarak kavite serum fizyolojik ile yıkayıp hafifçe hava ile kurutuldu.

Koyunların alt sağ santral ve lateral dişleri ve sağ ve sol kanin dişleri olmak üzere toplam dört dişi, iki ayrı çalışma grubu oluşturdu. A grubunu oluşturan sağ ve sol kanin dişlerine herhangi bir uygulama yapılmadı. Bu grup kontrol grubu olarak değerlendirildi.

B grubunu oluşturan sağ santral ve lateral dişlere ise; Kollajen (Sigma-Aldrich, Almanya) ve BioAggregate' den (DiaDent, Burnaby, BC, Kanada) oluşan perforasyon alanının büyüklüğünde kesilmiş süngerimsi yapıdaki yapı iskelesi materyali yerleştirildi (Şekil 3.10 ve Şekil 3.11). Daha sonra cam iyonomer siman (Fuji IX GC, ABD) yerleştirilerek iki aşamalı self etch bonding ajan (Clearfill SE

Bond, Kuraray, ABD) kullanılarak kompozit dolgu materyali (Arabesk, Voco, Almanya) ile restore edildi.(Şekil 3.12)



Şekil 3.10. Süngerimsi yapıdaki yapı iskelesinin 1 mm' lik boyutta kesilmiş görüntüsü.



Şekil 3.11. Perforasyon alanına yerleştiriliş yapı iskelesi.

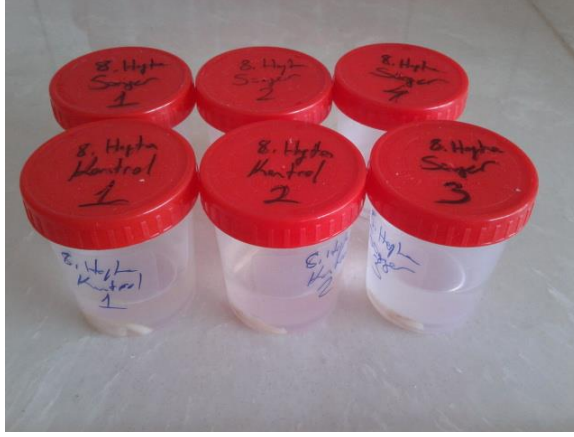


Şekil 3.12. Kompozit restorasyon yapılmış dişler.

Tedavileri tamamlanan koyunlar, daha sonra Fırat Üniversitesi Tarım ve Hayvancılık Uygulama ve Araştırma Merkezi Müdürlüğü (TAHAM) bünyesindeki bakım alanında kendileri için özel hazırlanmış bakım alanına alınarak gözlem sürelerinin sonuna kadar orada tutuldu.

Çalışmaya dahil edilen dört koyun ikişer adet olmak üzere, dişlerin gözlem zamanlarına göre rastgele iki eşit gruba ayrıldı. Dişlerin gözlem zamanları olan dördüncü hafta ve sekizinci haftada hayvanlar dekapite edildi ve diş örnekleri %10' luk formaldehit (Sigma-Aldrich, Almanya) solüsyonuna alınarak histolojik açıdan incelenmek üzere Fırat Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı' na teslim edildi.(Şekil 3.13)

Dişler numaralandırılırken, formaldehit içeren kabın dış kısmına ve kapağına hangi haftada dekapitasyonun yapıldığı belirtilerek deney hayvanının sağ alt çenesinden başlanarak sırası ile uygulama yapılan dişler numaralandırıldı. İkinci hayvana geçildiğinde numaralandırılma işlemine önceki hayvanda kalınan numaradan devam edildi. Kontrol grupları Kontrol-1 ve Kontrol-2 olarak belirtildi.



Şekil 3.13. Dişlerin formaldehit solüsyonu içindeki görüntüsü.

3.3. Dişlerin Histopatolojik Açıdan Değerlendirilmesi

3.3.1. Dişlerin Fiksasyonu

%10' luk formaldehit (Sigma-Aldrich, Almanya) solüsyonuna alınarak histolojik açıdan incelenmek üzere Fırat Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı' na teslim edilen kaplar 10 gün boyunca günde 2 kez olmak üzere, formalin solüsyonun dişlere daha iyi nüfuz etmesi için el vasıtasıyla dairesel olarak 1-2 dakika çalkalandı. 10 günün sonunda tesbiti gerçekleşen dişler formalin içeren kaplardan alınıp distile su ile 1-2 dakika yıkandıktan sonra yine 100 ml'lik kapaklı plastik özdeş numune kaplarına konuldu.

3.3.2. Dişlerin Demineralizasyonu

Fiksasyonu tamamlanan dişlerin konulduğu kaplara demineralizasyon amacıyla 30 ml demineralizasyon solüsyonu (Osteosoft, Merck, Almanya) ilave edildi (Şekil 3.14). Dişler 5 hafta süreyle oda sıcaklığında, ışık alamayan dolaplar içerisinde bu solüsyonda tutuldu ve solüsyonlar haftada 1 kez olmak üzere 4 kez yenilendi. Kaplar günde iki kez olmak üzere dairesel hareketlerle 1-2 dakika el vasıtasıyla çalkalandı. 5 hafta sonunda dişlerin, el yardımıyla, son derece esnek ve bükülebilir özellikte oldukları görüldü ve demineralizasyon işlemi sonlandırıldı.



Şekil 3.14. Dişlerin demineralizasyonu için kullanılan solüsyon.

3.3.3. Dişlerin Histolojik Kesit Alımına Hazırlanması

Dişler histolojik doku takip kasetlerine (İsolab Embedding Cassettes, Almanya) alındı ve birkaç saat süreyle çeşme suyunda yıkandı. Daha sonra dişler doku takip kasetleri içerisinde sırasıyla %70-%80-%96 ve %99' luk konsantrasyon oranlarındaki alkolden (Sigma-Aldrich, Almanya) geçirilerek, 4 saat ksilol' de (Tekkim Kimya Sanayi) bekletildi ve parafin (Leica Yaprak Parafin, Almanya) içeren otomatik doku takip cihazında (Leica TP 1020) otomatik program ile işlendi (Şekil 3.15).



Şekil 3.15. Otomatik doku takip cihazı (Leica TP 1020).

Doku takibi bitiminde kasetler parafin bloklama cihazına (Leica EG 1150 H) alındı(Şekil 3.16). Bloklama işleminden önce dişler, pulpadan ve işlem uygulanmış olan kaviteden kesitler alınabilmesi için uzun eksenleri boyunca bistüri yardımıyla ikiye bölündü ve kesit yüzleri istikametinde bloklandı (Şekil 3.17). Bloklanan dokular soğutma ünitesinde (Leica EG 1150 C) 30 dakika bekletildikten sonra kesit kalitesini arttırmak için -18 derecede 3 saat daha bekletildi. Daha sonra buz aküleri üzerinde parafin bloklar teker teker alınmak suretiyle kesim işlemine geçildi.



Şekil 3.16. Bloklama cihazı (Leica EG 1150 H).



Şekil 3.17. Kesiti alınmış dişlerin bloklanması.

Seri kesitler rotary mikrotom (Leica RM 2125) ile 3 mikron kalınlığında, her dişten 10 kesit olacak şekilde alınıp 42 derece sıcaklıktaki distile su ihtiva eden yüzdürme havuzuna (Leica HI 1210, Almanya) bırakılıp 5-10 saniye doku kırışıklıklarının düzelmesi beklendikten sonra çift tarafı rodajlı standart lamlara (Micro-Tech, Almanya) alındı (Şekil 3.18).



Şekil 3.18. Kesitlerin kullanıldığı rotary mikrotom cihazı.

Lamların üzerine kurşun kalem vasıtasıyla dişle ilgili bilgiler yazıldı (örnek: 4. haftaya ait söz konusu materyalin sünger formu uygulanmış dişten alınan kesitine 4HS yazıldı). Kesitlerin lama daha iyi yapışmasını sağlamak için lamlar 15 dakika 60 derece sıcaklıktaki preparat ıstıcısının (Sakura Slide Warmer, Japonya) üzerinde bekletildi. Daha sonra bu lamlar metal lam taşıma sepetlerine dizilerek 68 derece sıcaklıktaki etüvde (Elektro-Mag M 3025 BP, Türkiye) parafinin erimesi için 45 dakika bekletildi. 45 dakika sonunda sepetler teker teker etüvden çıkarılarak erimiş vaziyette olan parafinin tekrardan donmaması için vakit kaybedilmeden sırasıyla 2 ayrı ksilolde 5'er dakika 10'ar kez dip yaptırılarak deparafinize edildi. Ardından ksilolün kuruması için 5 dakika daha 68 derecedeki etüvde bekletilen sepetlere Standart Hematoksilen-Eosin boyama yöntemi uygulandı (Merck, Almanya). Boyama işleminden sonra değişen derecelerde (%96-%96-%99-%99) alkol serisinden geçirilen sepetler kuruması için 10 dakika daha 68 derece sıcaklıktaki

etüvde tutuldu. Etüvden çıkarılan sepetler 2 ayrı ksilolde 5'er dakika tutulduktan sonra lamlar entellan kullanılarak (Merck, Almanya) lamellerle (Micro-Tech, Almanya) kapatıldı. Kuruması için 20 dakika 60 derece sıcaklıktaki preparat ısıtıcısının üzerinde bekletildi (Şekil 3.19). Mikroskopik görüntüleme, ölçümler ve fotoğraf çekimleri Olympus BX 43 Trinoküler Florasan Ataçmanlı ve Görüntüleme Sistemli Işık Mikroskobu kullanılarak CellSens Standard Software programı vasıtasıyla yapıldı (Şekil 3.20).

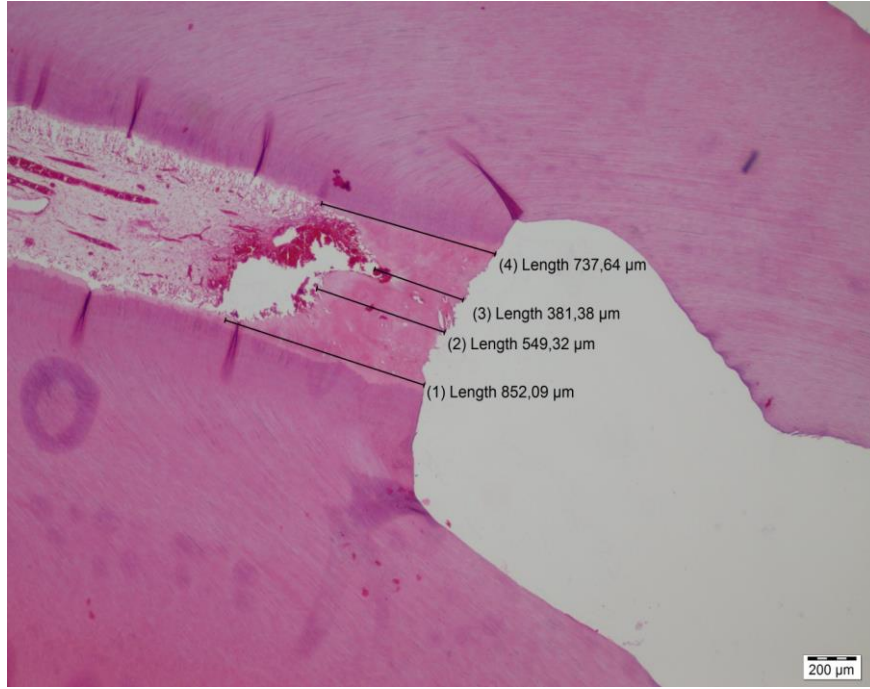


Şekil 3.19. Histolojik incelemeye hazırlanmış preparatlar.



Şekil 3.20. Olympus BX 43 Trinoküler Florasan Ataçmanlı ve Görüntüleme Sistemli Işık Mikroskobu.

Dentin köprüsü ölçümlerinde her diştten alınan iki kesit üzerinde dört farklı noktadan perforasyon alanında oluşan dentin miktarı ölçüldü (Şekil 3.21). Her diş için toplamda 8 adet ölçüm değeri elde edilmiş oldu.



Şekil 3.21. Oluşan dentin miktarının ölçüldüğü bir kesit

3.4. İstatistiksel Değerlendirme

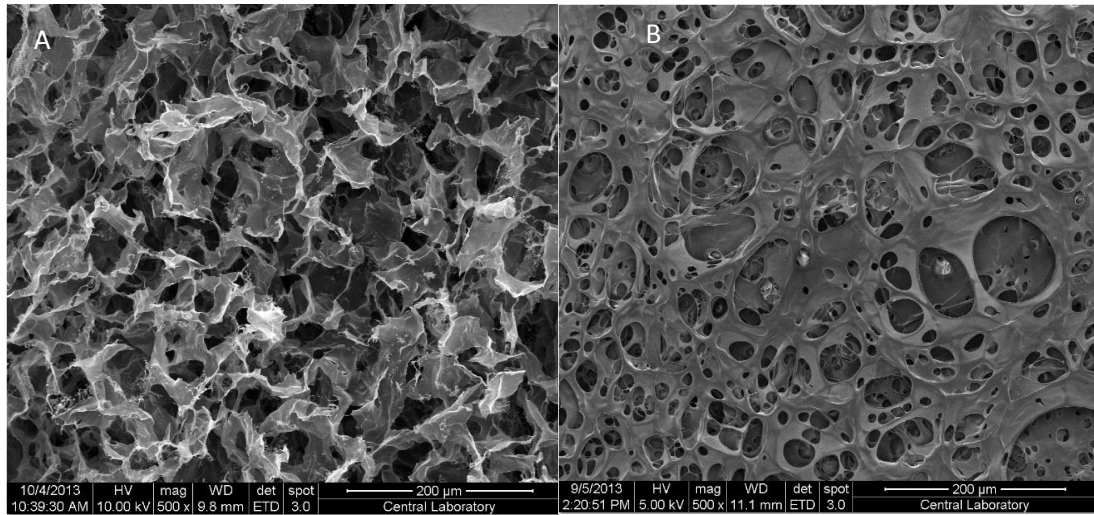
Bu çalışmada oluşan dentin köprülerinin ölçüm değeri skaler bir değer olduğu için 4. ve 8. haftalar arasında oluşmuş dentin köprüsü miktarının istatistiksel olarak karşılaştırılmasında non-parametrik Mann-Whitney U testi kullanılmıştır. Testin non-parametrik olarak seçilmesinin sebebi ise Kolmogorov-Smirnov normallik testine göre dentin köprülerinin ölçüm değerlerinin normal dağılım göstermemesidir. İstatistiksel analizler SPSS Windows 13.0 paket programı ile gerçekleştirildi.

4. BULGULAR

4.1. Kollajen-BioAggregate Yapı İskelesinin Karakterizasyonu

4.1.1. SEM ve Civa Porozimetresi Bulguları

Alınan SEM görüntüleri ve civa porozimetresi sonuçları oluşturulan yapı iskelelerinin gözenekliliğini göstermiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. (A) Sadece kollajen kullanılarak elde edilmiş süngerimsi yapı iskelesinin SEM görüntüsü.

(B) BioAggregate ve Kollajen karışımı kullanılarak elde edilmiş süngerimsi yapı iskelesinin SEM görüntüsü

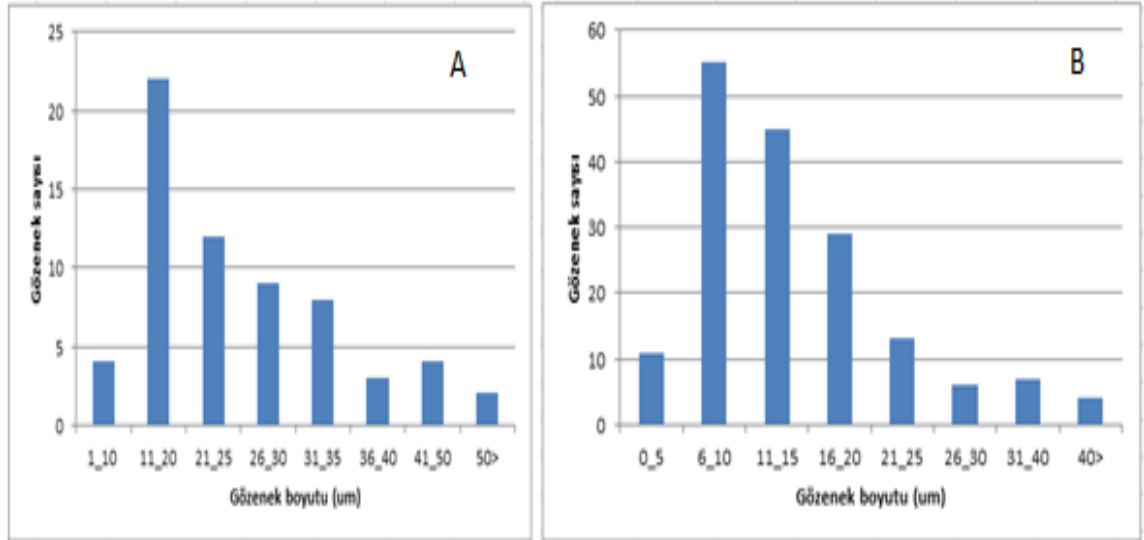
Gözeneklilik yüzdesi hesaplanması için yapılan civa porozimetresi ve SEM yöntemlerinin sonuçları Tablo 4.1’ de gösterilmiştir. Yapılan her iki yöntemle de, saf kollajen ile oluşturulmuş yapı iskelesi ile karşılaştırıldığında BioAggregate materyalinin yapıya katılmasıyla oluşan yapı iskelesinin gözeneklilik kaybına uğradığı gözlenmektedir.

Tablo 4.1. Civa porozimetresi ve SEM yöntemleri ile hesaplanan gözeneklilik yüzdeleri

Örnek	Gözeneklilik (%)	
	Civa Porozimetrisi	SEM
Saf kollajen yapı iskelesi	86	62
Kollajen-BioAggregate yapı iskelesi	57	36

SEM sonuçları porozimetreden elde edilen değerlerden düşüktür. Her iki yöntemle de BioAggregate materyali içeren yapı iskelesi, saf kollajen içeren örneğe oranla daha düşük gözeneklilikte bulunmuştur. İki ölçüm yöntemi sonuçları arasındaki bu farklılığın gözeneklilik ölçümünde izlenen yöntemin farklılığından olduğu düşünülmektedir. Sonuçta civa porozimetresi değerinin kullanılması daha uygun olacaktır.

SEM görüntülerinden yapılan hesaplamalara göre gözenek boyutu gözenek sayısı ilişkisi Grafik 4.1’ de gösterilmiştir. Saf kollajen yapı iskelesinde, Kollajen-BioAggregate yapı iskelesine göre daha büyük olan daha fazla gözenek saptanmıştır.



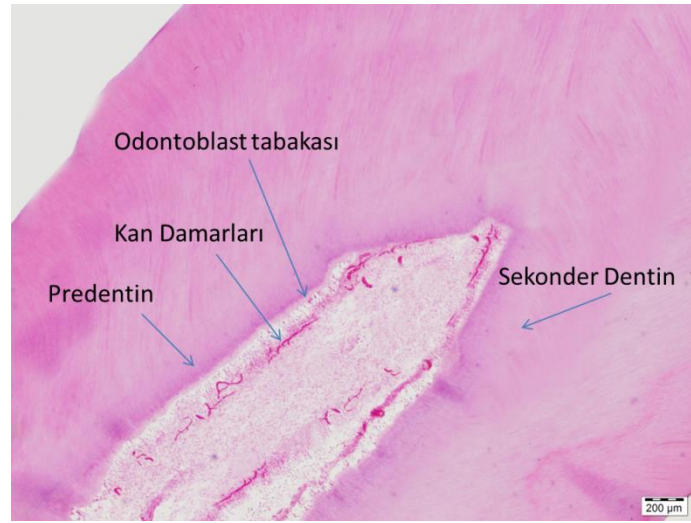
Grafik 4.1. (A) Saf kollajen yapı iskelesinin gözenek boyutları ve sayısı.

(B) Kollajen- BioAggregate yapı iskelesinin gözenek boyutları ve sayısı.

4.2. Diş Örneklerinin Histopatolojik Bulguları

4.2.1. Kontrol Grubu Dişlerinin Histopatolojik Bulguları

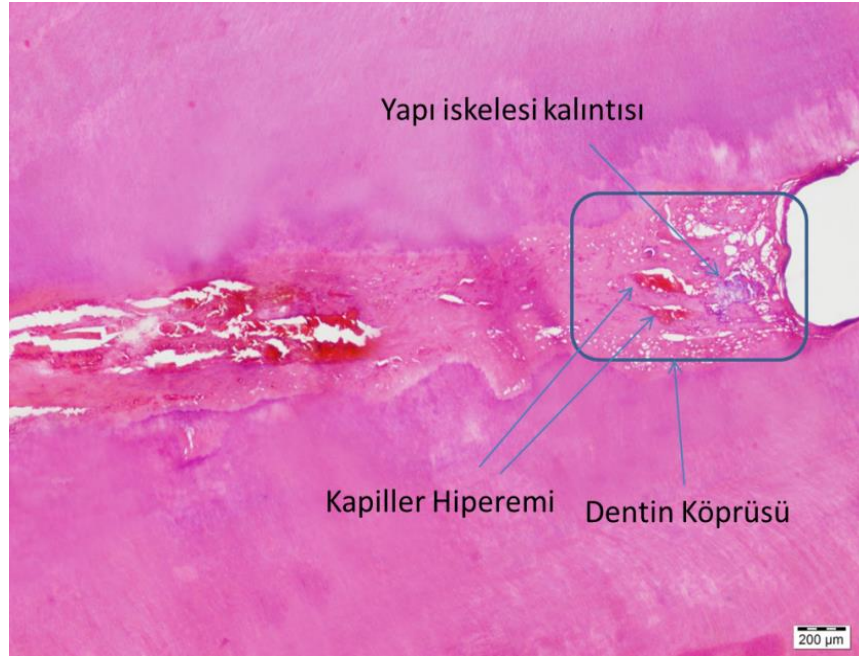
Kontrol grubu olarak alınmış dişlerin histopatolojik değerlendirmelerinde herhangi bir patolojik duruma rastlanmamış, pulpa dokusu ve periapikal dokuların sağlıklı olduğu görülmüştür (Şekil 4.2).



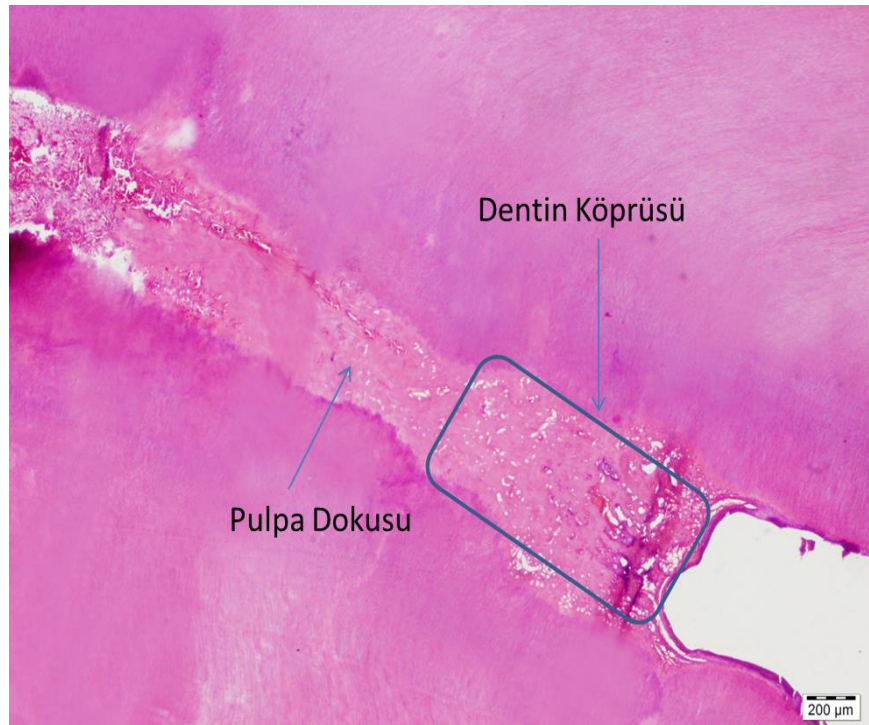
Şekil 4.2. Kontrol grubuna ait bir dişin hematoksilen eozin boyaması yapılmış x4 büyütmedeki görüntüsü.

4.2.2. Dördüncü Haftaya Ait Dişlerin Histopatolojik Bulguları

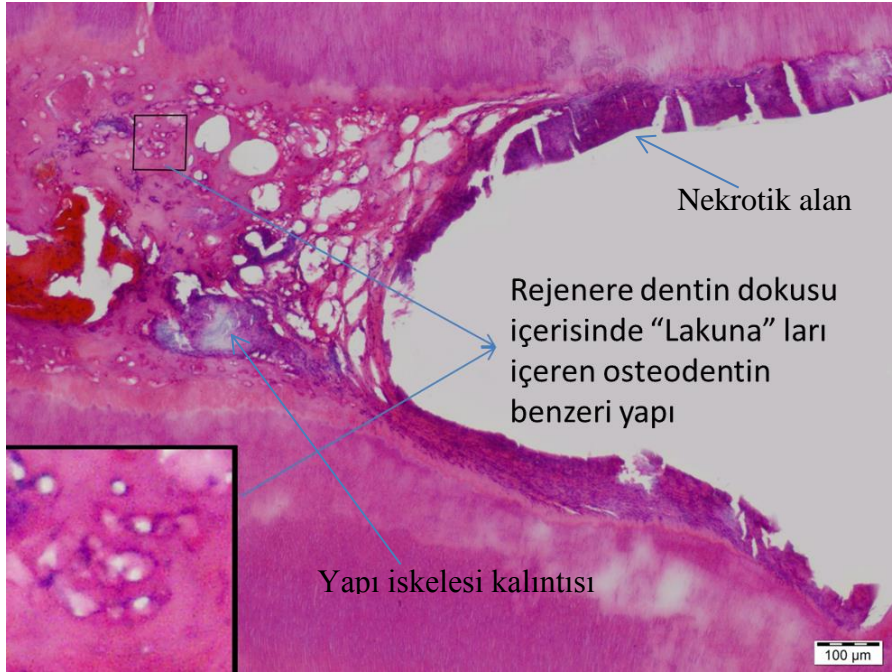
Dördüncü hafta sonunda, süngerimsi yapı iskelesi uygulanmış dişlerde osteodentin yapıda gözenekli tamir dentin yapısının tam olarak şekillendiği gözlenmektedir. Tamir dentini içinde süngerimsi yapı iskelesi artıklarına da rastlanmıştır. Pulpada yangısal dönemi düşündüren bulgulara rastlanmamıştır. Dentin tabakası ile şekillenen yeni doku arasında iyi bir uyumun olduğu görülmüştür (Şekil 4.3, Şekil 4.4, Şekil 4.5, Şekil 4.6).



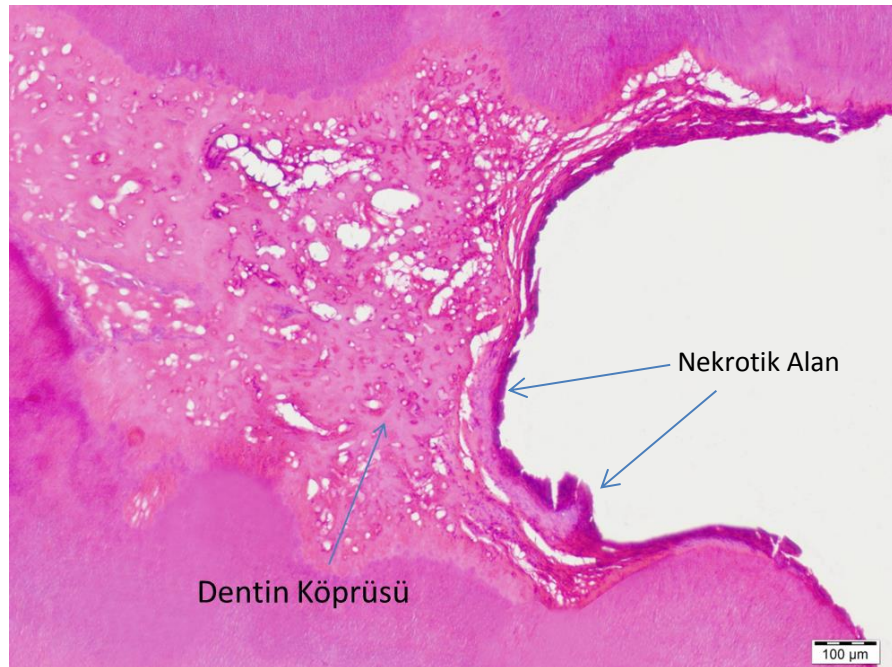
Şekil 4.3. Dördüncü haftaya ait 1. hayvanın süngerimsi yapı iskelesi uygulanmış 1. dişinin hematoksilen eozin boyaması yapılmış x4 büyütmedeki görüntüsü.



Şekil 4.4. Dördüncü haftaya ait 1. hayvanın süngerimsi yapı iskelesi uygulanmış 2. dişinin hematoksilen eozin boyaması yapılmış x4 büyütmedeki görüntüsü.



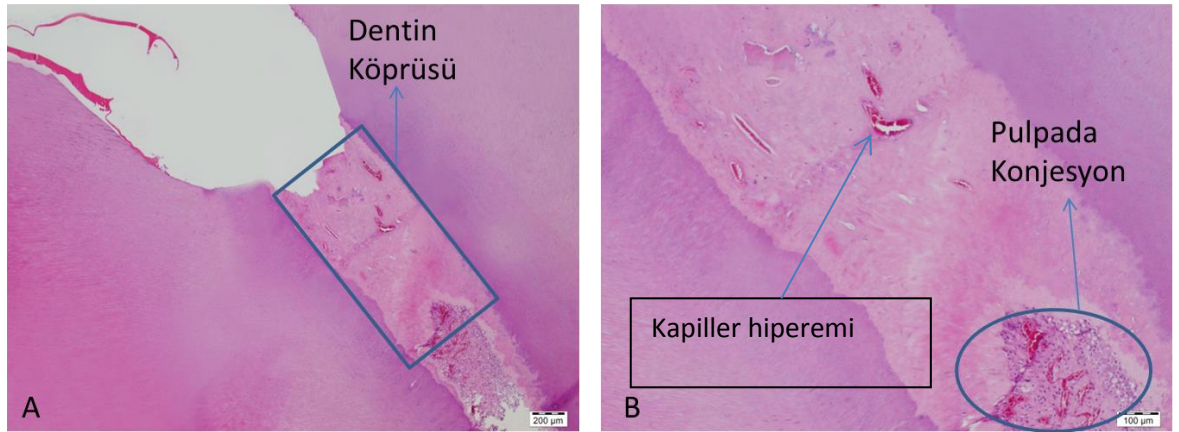
Şekil 4.5. Dördüncü haftaya ait 2. hayvanın süngerimsi yapı iskelesi uygulanmış 1. dişinin hematoksilen eozin boyaması yapılmış x10 büyütmedeki görüntüsü.



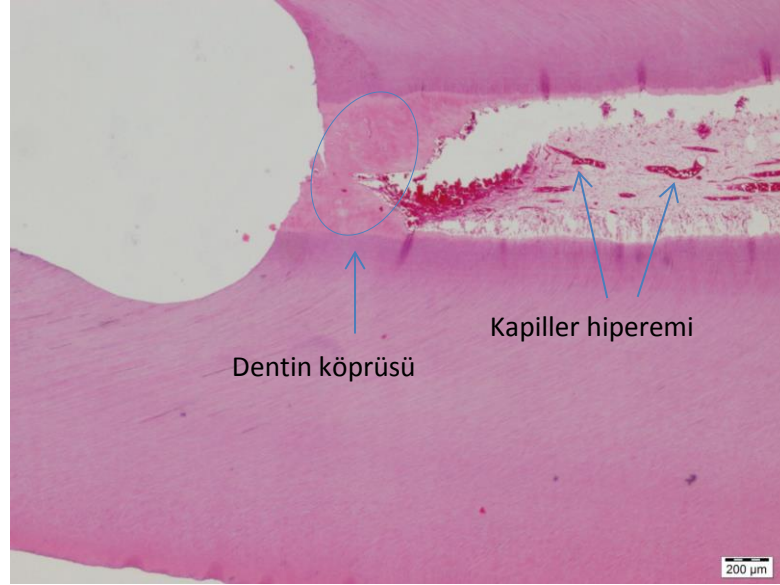
Şekil 4.6. Dördüncü haftaya ait 2. hayvanın süngerimsi yapı iskelesi uygulanmış 2. dişinin hematoksilen eozin boyaması yapılmış x10 büyütmedeki görüntüsü.

4.2.3. Sekizinci Haftaya Ait Dişlerin Histopatolojik Bulguları

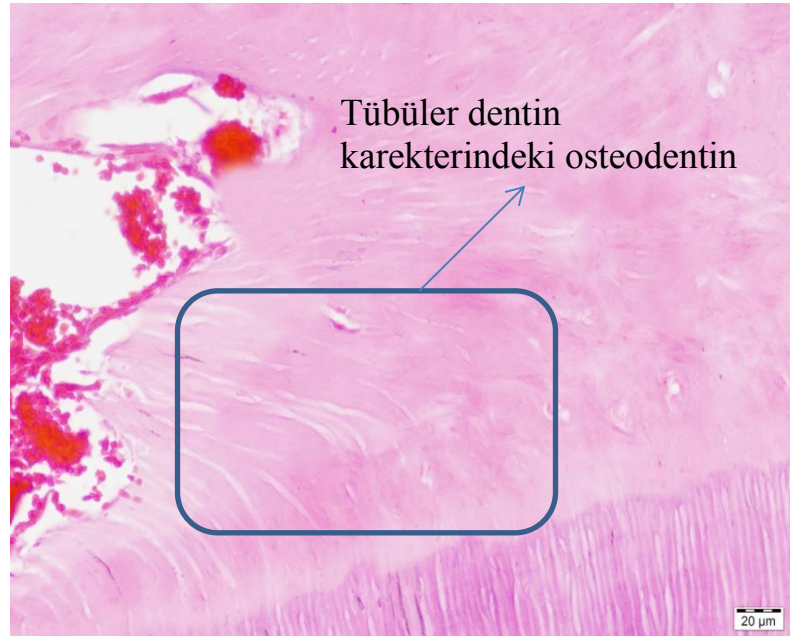
Sekizinci hafta sonunda, süngerimsi yapı iskelesi uygulanmış dişlerde osteodentin yapıda homojen kompakt tamir dentin yapısının tam olarak şekillendiği gözlenmektedir. Perforasyon alanına doğru ilerleme gösteren osteodentin yapısı dentin köprüsü ile aynı özelliği taşımaktadır. Pulpa içerisine doğru ilerleyen osteodentin karakterindeki yapı da yine benzer özellik taşımaktadır. Dentin köpsünü oluşturan osteodentin dokunun dentin yapısındaki tübüllere benzer yapı gösterdiği izlenmiştir. Osteodentin dokusu içerisinde yangısal reaksiyonu düşündürecek hücre (nötrofil, makrofaj, lenfosit gibi..) infiltrasyonlar ve kapiller hiperemi dışında yangısal bir reaksiyon gözlenmemiştir. Tamir dentini içinde süngerimsi yapı iskelesi artıklarınada rastlanmıştır. Dentin tabakası ile şekillenen yeni doku arasında iyi bir uyumun olduğu görülmüştür (Şekil 4.7, Şekil 4.8, Şekil 4.9, Şekil 4.10, Şekil 4.11, Şekil 4.12).



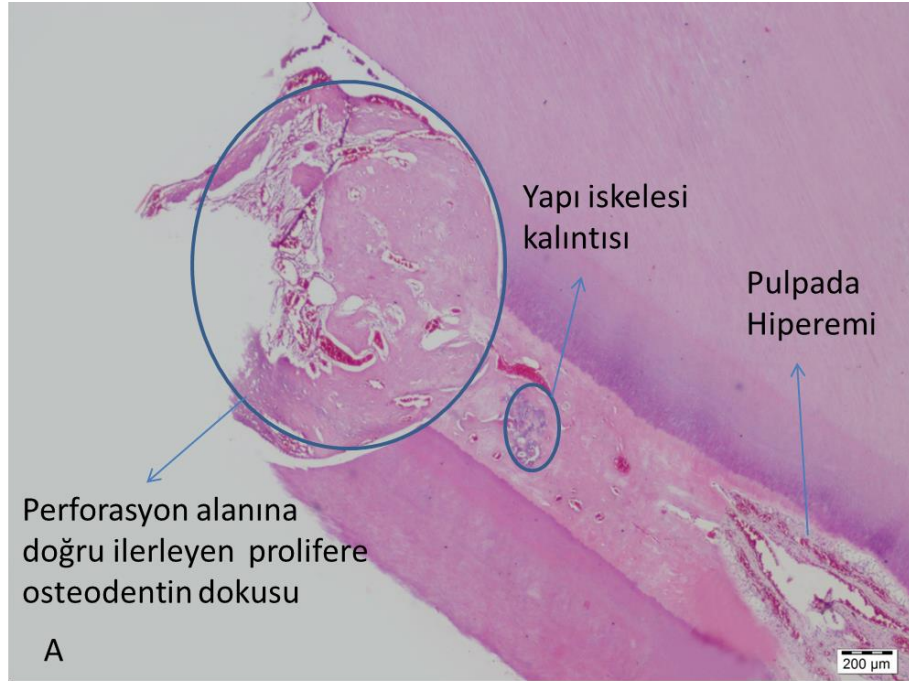
Şekil 4.7. Sekizinci haftaya ait 1. hayvanın süngerimsi yapı iskelesi uygulanmış 1. dişinin hematoksilin eozin boyaması yapılmış A) x4 ve B) x10 büyütmedeki görüntüsü.



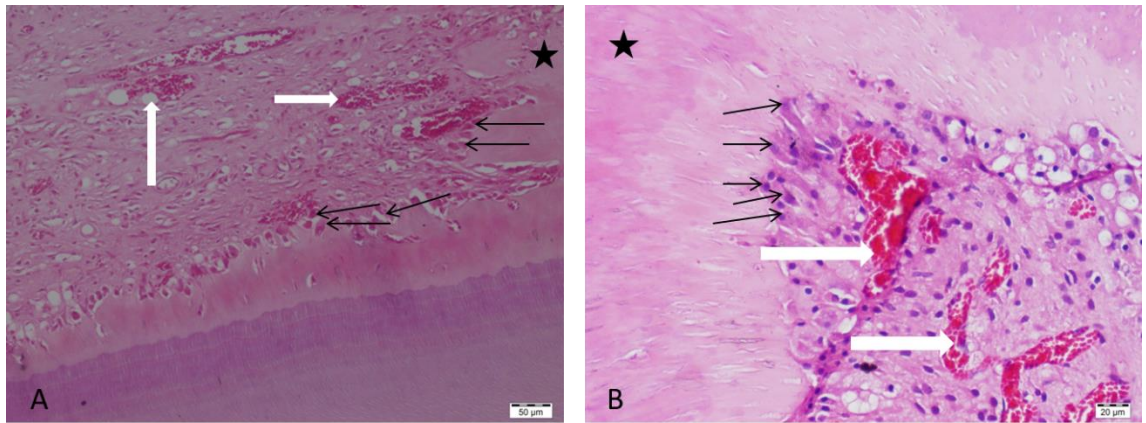
Şekil 4.8. Sekizinci haftaya ait 1. hayvanın süngerimsi yapı iskelesi uygulanmış 2. dişinden alınmış kesitin hematoksilin eozin boyaması yapılmış x4 büyütmedeki görüntüsü.



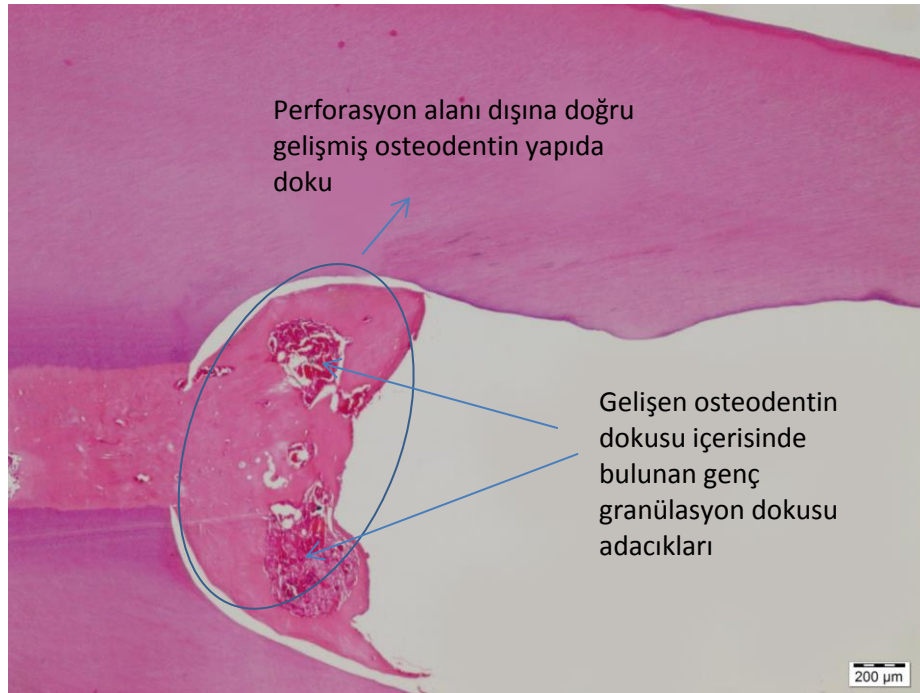
Şekil 4.9. Sekizinci haftaya ait 1. hayvanın süngerimsi yapı iskelesi uygulanmış 2. dişinden alınmış kesitin hematoksilin eozin boyaması yapılmış x10 büyütmedeki görüntüsü.



Şekil 4.10. Sekizinci haftaya ait 2. hayvanın süngerimsi yapı uygulanmış 1. dişinden alınmış kesitin hematoksilin eozin boyaması yapılmış x4 büyütmedeki görüntüsü.



Şekil 4.11. Sekizinci haftaya ait 2. hayvanın süngerimsi yapı iskelesi uygulanmış bir dişten alınmış kesitin hematoksilin eozin boyaması yapılmış A) x20, B) x40 büyütmedeki görüntüsü; Rejenere dentin ve odontoblast benzeri hücreler (siyah okların gösterdiği hücreler), genç dentin dokusu (siyah yıldızlı alan) ve hipermik pulpa (beyaz oklar).



Şekil 4.12. Sekizinci haftaya ait 2. hayvanın süngerimsi yapı uygulanmış 2. dişinden alınmış kesitin hematoksilen eozin boyaması yapılmış x4 büyütmedeki görüntüsü.

4.3. Dentin Köprüsü Ölçüm Değerleri

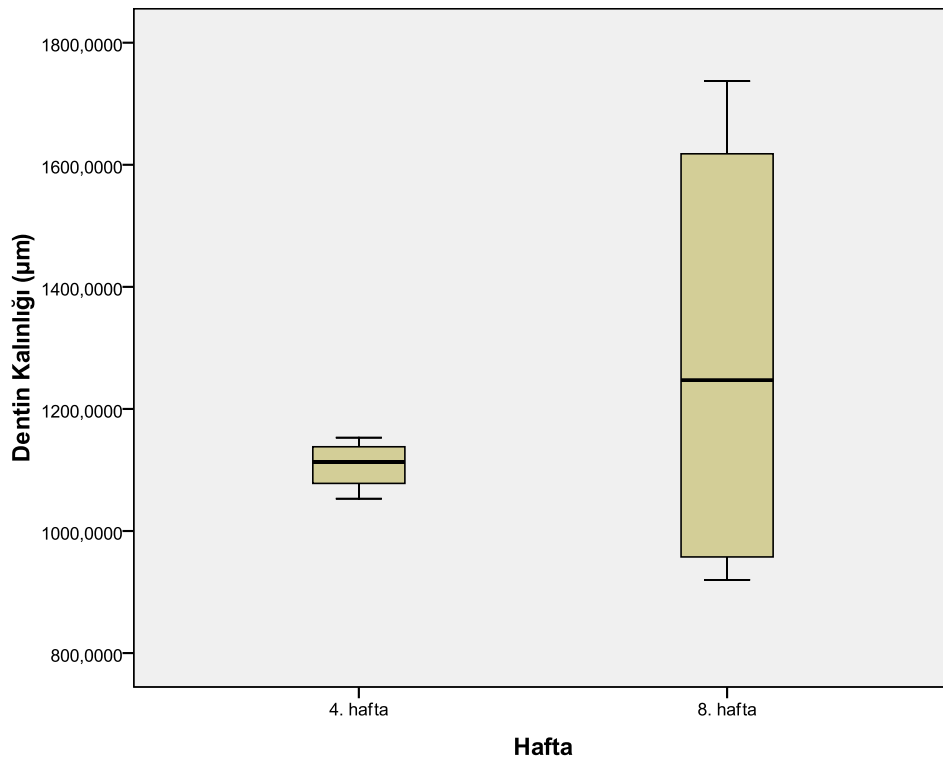
Kollajen - BioAggregate yapı iskelesi uygulanmış dişlerde dördüncü hafta sonunda pulpa perforasyon alanında oluşmuş dentin miktarı $1108,00 \pm 42,031 \mu\text{m}$ olarak bulunmuştur (Tablo 4.2, Grafik 4.2).

Sekizinci hafta sonunda yapılan ölçümlerde ise pulpa perforasyon alanında oluşmuş dentin miktarı $1287,75 \pm 394,71 \mu\text{m}$ olarak bulunmuştur (Tablo 4.2, Grafik 4.2).

Dördüncü ve sekizinci haftaya ait ortalama ve standart sapma değerleri karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olmadığı görülmüştür ($P > 0.05$)

Tablo 4.2. Haftalara ait dentin ölçüm miktarları.

Ölçüm Haftası	Örnek sayısı	Ortalama Değer (μm)
4	4	1108,00 \pm 42,031
8	4	1287,75 \pm 394,71

**Grafik 4.2.** 4. ve 8. haftaların dentin ölçüm miktarları.

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada, Kollajen ve BioAggregate materyallerinin belirli oranlardaki karışımı ile oluşturulmuş ve liyofilizasyon işlemi ile gözenekli hale getirilmiş yapı iskelesinin perfore edilen koyun dişlerinde direkt kuafaj materyali olarak kullanılmasının dentin dokusunda dört ve sekizinci haftalar arasındaki dentin köprüsünün oluşumuna katkısı ve gelişen doku altında kalan pulpa dokusunun devamlılığına etkisi histolojik incelemelerle değerlendirilmiştir.

İnsan dişleri sınırlı derecede kendini yenileyebilme kapasitesine sahip yapılardır. Farklı mineralize diş dokuları (mine, dentin, sement ve alveol kemiği) farklı oluşum süreçlerine (amelogenez, dentinogenez, sementogenez ve osteogenez) ve kendini yenileyebilme kabiliyetine sahiptir (76). Mine dokusunun progenitör hücresi olan ameloblastların mine matriksinin oluşum sürecinde apoptozise uğraması nedeniyle sürmüş bir dişteki mine dokusunun kendini yenileyebilmesi mümkün değildir (77). Fakat sürmüş bir dişin tersiyer dentin, önceden var olan odontoblastlar ile reaksiyoner dentin ve farklılaşmış odontoblast benzeri hücreler ile tamir dentin oluşturabilme kapasitesi vardır. Reaksiyoner dentin mevcut odontoblastlar tarafından üretilirken, tamir dentini farklılaşmış odontoblast benzeri hücrelerle oluşmaktadır (76).

Direkt pulpa kuafajında amaç diş pulpa dokusunun canlılığını devam etmesini sağlamaktır. Bu da açığa çıkmış canlı pulpa dokusunda; tamir dentin yapımını uyaracak, bakterilerin pulpayı enfekte etmesini önleyecek, tamir dentin yapımını sağlayacak biyoyumlu dental materyallerin kullanımı ile mümkündür (78). Bu amaçla çalışmamızda biyoyumlu materyaller olan BioAggregate ve kollajenden oluşturulmuş yapı iskelesi kullanılmıştır.

BioAggregate biyoyumluluğu kanıtlanmış yeni bir endodontik dolun ve tamir simanıdır (79). Literatürde BioAggregate materyali kullanılarak yapılmış sınırlı sayıda *invivo* ve *invitro* çalışma mevcut iken bu materyal kullanılarak gerçekleştirilen direkt pulpa kuafajı çalışmasına rastlanmamıştır. Fakat yapı ve kullanım endikasyonları açısından benzer olan MTA materyali ile ilgili direkt pulpa

kuafajı çalışmaları mevcuttur (80-82). Yalçın ve ark. (83) tarafından gerçekleştirilen ve TÜBİTAK tarafından desteklenen bir projede (110S483-SBAG) diş hekimliği kliniklerinde yaygın olarak kullanılan 4 farklı kuafaj materyalinin diş pulpası kök hücreleri üzerindeki odontojenik farklılaşmaya etkisi incelenmiştir. Bu projenin sonuçlarına göre diğer kuafaj materyallerine oranla hücrelerin odontojenik farklılaşmasına etkisi açısından en olumlu sonuçlar DiaRoot BioAggregate materyalinde görülmüştür. Bizim projemizde de bu çalışmadan yola çıkılarak DiaRoot BioAggregate materyali kullanılmıştır.

MTA' nın BioAggregate' e göre farklarından biri içeriğinde, materyalin radyoopaklığını sağlayıcı bizmutoksit maddesinin bulunmamasıdır. Bu maddenin sitotoksitesisi ile ilgili bazı çalışmalar yapılmıştır. İnsan ilik stromal hücreleri üzerinde yapılan bir çalışmada hem bizmutoksit eklenen siman hem de yapısında bizmutoksit içeren MTA, hücrelerin büyümesini azaltmıştır (84). İnsan diş pulpası hücreleri üzerinde yapılan bir başka çalışmada, bizmutoksit içeren portland simanı ve MTA' nın hücre canlılığını etkileyerek sitotoksitesite gösterdiği raporlanmıştır (85). Bizmut oksit içeren portland simanlarının radyoopaklığının ve sitotoksitesinin incelendiği bir başka çalışma ise bizmutoksitin materyallere eklenmesinin materyallerin biyouyumluluğunu etkilemediğini göstermiştir (86). Bizim çalışmamızda MTA yerine bizmutoksit içermeyen BioAggregate materyalinin kullanılması bu kaygılardan uzak kalmamızı sağlamıştır.

BioAggregate' in insan fibroblast hücreleri üzerindeki etkisinin incelendiği bir invitro çalışmada materyalin kabul edilebilir bir biyouyumluluğa sahip olduğu raporlanmıştır (54). BioAggregate ve MTA' nın osteoblast hücrelerindeki etkilerinin incelendiği bir çalışmada da; BioAggregate' in nispeten daha iyi bir etkisi olmakla beraber MTA ile birlikte osteoblast hücrelerinde mineralizasyonu sağlayıcı genlerin ekspresyonunu uyardığı gözlemlenmiştir (87). Çalışmamızda kullandığımız Kollajen/BioAggregate yapı iskelesinin diş pulpasındaki kök hücrelerin odontoblast benzeri hücrelere farklılaşmasını sağlayarak mineralize tamir dokusu oluşturması bu çalışma ile benzerlik göstermektedir.

BioAggregate' in insan diş pulpası hücrelerinin odontojenik farklılaşmasına etkisinin incelendiği bir çalışmada ProRoot MTA' nın da aralarında bulunduğu 4 farklı materyal kullanılmıştır (88). Erken osteoblastik farklılaşma belirleyicisi olan

ve mineralizasyon sürecinde önemli rol oynayan ALP aktivitesi seviyesi ProRoot MTA ve BioAggregate için benzer bulunmuş fakat 14. gün sonunda BioAggregate' in ProRoot MTA' ya göre daha mineralize nodüller oluşturduğu görülmüştür (88, 89). Bizim çalışmamızda da BioAggregate materyali içeren yapı iskelesinin hem 4. hafta hem de 8. hafta sonunda perforasyon alanında dişin doğal dentin dokusuna benzer mineralizasyonda osteodentin yapı oluşturması bu çalışma ile uyum göstermektedir.

ProRoot MTA ile DiaRoot BioAggregate' in sistemik biyouyumluluğunun değerlendirildiği bir çalışmada; materyaller üretici firmanın talimatları doğrultusunda hazırlanıp teflon kalıplara yerleştirilerek ratların sırtında açılan ceplere implante edilmiş ve ratlar 7. ve 30. günde sakrifiye edilerek böbrek ve karaciğerinde histolojik ve morfometrik incelemeler yapılmıştır. Çalışmanın sonuçları ProRoot MTA ile DiaRoot BioAggregate' in ratların böbrek ve karaciğeri üzerinde iltihabi etkilere yol açtığını ve MTA' nın etkisinin BioAggregate' e göre çok daha şiddetli olduğunu göstermiştir (55). Morais ve ark. (90) ile Parirokh ve ark. (91) yaptıkları benzer çalışmalarda subkütan dokunun MTA' ya verdiği iltihabi cevabın 60 gün sonra düştüğünü belirtmiş fakat kontrol grubuyla karşılaştırıldığında tamamen bir iyileşmenin gerçekleşip gerçekleşmediği konusunda herhangi bir bilgi vermemişlerdir. Bizim çalışmamızda ise hem 4. haftadaki örneklerde hem de 8. haftadaki örneklerde kapiller hiperemi dışında yangısal bir yanıt görülmemiştir.

ProRoot MTA ve diğer portland bazlı simanların mekanik, fiziksel ve biyolojik özellikleri ile ilgili son yıllarda birçok çalışma yapılmıştır (92-94). MTA, pulpa kuafaj materyali olarak birçok çalışmada kullanılmış, etkinliği gösterilmiş ve tavsiye edilmiştir (95-97). MTA' nın osteoblastlar üzerindeki gen ekspresyonu cevabının incelendiği invitro bir deneyde, materyalin 24 saat sonra osteoblastlarda osteokalsin ve tip I kollajen ekspresyonunu arttırdığı görülmüştür (98). Diğer araştırma çalışmaları MTA' nın sementoblast, fibroblast, ve osteoblastların proliferasyonunu uyardığını göstermiştir (99). Ayrıca yapılan bir çalışmada MTA' nın mineralize matriks gen üretimi ve protein ekspresyonu yanında sementoblastların bağlanma ve büyümesine izin verdiği de görülmüştür (100). Bizim çalışmamızda da BioAggregate materyali, diş pulpası kök hücrelerinin farklılaşarak osteodentin yapıda tamir dokusu oluşturmasını indüklemiş olabilir.

ProRoot MTA ve DiaRoot BioAggregate' in de aralarında bulunduğu 4 farklı kök dolum materyallerinin süt dişlerinde kırılma direncine etkilerinin incelendiği bir çalışmada 1 yıllık zaman dilimi içinde DiaRoot BioAggregate en yüksek kırılma direnci gösteren materyal olmuştur. ProRoot MTA ise üçüncü en yüksek kırılma direncine sahip materyal olarak belirtilmiştir. Bu çalışma ile (53) BioAggregate' in klinik kullanımı için tavsiye edilebilecek bir materyal olduğu anlaşılmış ve çalışmamızda tercih edilmesindeki etkenlerden biri olmuştur.

MTA ile yapılmış bir insan çalışmasında; MTA ve bir kalsiyum hidroksit preparatı olan Dycal ile üçüncü molar dişlere direkt pulpa kuafajı tedavisi uygulanmıştır. Bir hafta sonra yapılan gözlemden MTA uygulanmış dişlerde enflamasyonun olmadığı ve üç ay sonraki gözlemden de kalınlığı artan bir sert doku bariyeri olduğu gözlenmiştir. Dycal uygulanan dişlerde ise enflamasyon ve tünel defektlerinin olduğu, sürekliliği az doku bariyeri görülmüştür (101). Bizim çalışmamızda da 8. hafta örneklerinde 4. hafta örneklerine göre daha yoğun ve bazı örneklerde de kalınlığı artmış osteodentin yapıda sert doku oluşumu gözlenmiştir. Ayrıca hem 4. haftadaki örneklerde hem de 8. haftadaki örneklerde yangısal bir cevaba ve tünel defektlerine rastlanmamıştır.

Rat dişlerinde MTA ve kalsiyum hidroksitin direkt pulpa kuafajında kullanımı sonrasında tamir boyunca fibronektin molekülünün immunlokalizasyonuna bakılmıştır. MTA uygulanan dişlerde daha yoğun fibronektin varlığına, daha az enflamasyona ve daha erken fibrin matriks oluşumuna rastlanmıştır (102). Çalışmamızda kullanılan BioAggregate materyalinin MTA' ya benzer yapıda olması nedeniyle hücre farklılaşmasını uyararak daha hızlı ve sağlıklı bir tamir dentin oluşumunu sağladığı düşünülmektedir.

Tip I kollajen hücrelerin yapışması ve yayılımında etkili bir proteindir (103). Çalışmamızda kullandığımız yapı iskelesi tasarlanırken tip I kollajenin kullanılmasına karar verilmesinde materyalin böyle bir özelliğe sahip olması en önemli etkenlerden biri olmuştur.

Kakarla ve ark. (71) yaptıkları klinik bir çalışmada kollajen partiküllerini ve yeni bir simanı süt dişlerinde kuafaj materyali olarak kullanmışlardır. Her iki gruptaki dişlerin 7., 15. ve 30. günlerdeki histolojik incelemelerinde her iki grupta da gittikçe azalan bir enflamasyon gözlenmiş ve 30. günün sonunda enflamasyonun

tamamen ortadan kalktığı ve dentin köprüsünün oluştuğu raporlanmıştır. Ayrıca kollajen grubunun yeni siman materyaline göre daha iyi bir kuafaj materyali olduğu belirtilmiştir. Bizim çalışmamızda da 8. haftadaki örneklerin histolojik incelemelerinde 4. haftadaki örneklere göre daha kompakt osteodentin yapı gözlemlenmiştir. Aynı zamanda 8. haftadaki örneklerde osteodentin yapı içinde doğal dentin dokusuna benzer tübülömsü yapıların da oluşmaya başladığı gözlemlenmiştir.

Postlewaithe ve Kang topikal olarak yerleştirilen kollajenin enflamatuvar hücreleri aktive ederek yara iyileşmesini başlattığını ve iyileşen dokuda artan bir vaskülarizasyon sağladığını belirtmişlerdir (104). Bizim çalışmamızda da yara yüzeyinin iyileşerek vaskülarizasyonun sağlanmasının kollajenin etkisiyle gerçekleştiği düşünülebilir.

Hidroksiapatit ve kollajenden (HA/Kol) oluşturulan, iki farklı partikül büyüklüğüne sahip kompozit süngerlerin ve sadece kollajenden (Kol) oluşturulan kompozit süngerin osteoblast hücrelerinin osteoblastik farklılaşması üzerindeki etkilerinin incelendiği bir çalışmada, nano partiküllü HA/Kol yapının üzerine ekilen osteoblast hücrelerinin osteoblastik farklılaşma hızının büyük partiküllü HA/Kol süngeri ve Kol süngeri üzerine ekilen hücelere göre daha yüksek olduğu görülmüştür (105). Çalışmamızda kullanılan BioAggregate materyalinin hidroksiapatit içermesi (106), pulpa hücrelerinin odontoblast benzeri hücelere farklılaşmasını hızlandırmış olabilir.

Bir hücre kültürü çalışmasında, Doğan ve ark. (107) doğrudan kültür ortamına bıraktıkları kollajen sünger parçalarının hem fibroblastlar hem de osteoblastlar tarafından kabul gördüğünü ve yaptıkları elektron mikroskopik değerlendirmede hücrelerin kollajen süngere bağlanarak süngerin gözenekleri arasına girdiklerini gözlemlemişlerdir. Çalışmamızdaki 8. hafta örneklerinin bazılarında süngerimsi yapı iskelesi içine doğru gelişen dokuların görülmesi bu çalışmayı destekler niteliktedir.

Dick ve ark. (108)' da kollajen süngeri pulpa kuafaj materyeli olarak değerlendirdikleri çalışmalarında materyalin kalın dentin köprüsü oluşturmadığı fakat mineralizasyonu sağladığını bildirmişlerdir. Çalışmamızdan yola çıkarak tamir dentini oluşumuna kollajenin de katkısı olduğu söylenebilir.

Hasar görmüş diş yapılarının yeniden oluşturulması ve biyolojik fonksiyonlarının restore edilmesinde yapı iskelesi kökenli doku mühendisliği umut verici bir strateji sunmaktadır, fakat yapı iskeleleri diş kök/progenitör hücrelerin adezyonu, çoğalması, farklılaşması ve sonuç olarak doğal diş dokusu oluşumunun meydana gelmesi için uygun bir ortam sağlamalıdır. Üç boyutlu yapı iskeleleri, doku tamiri ve rejenerasyonunda hedeflenen fonksiyonlar için kök hücrelerin gizli potansiyelinin yönlendirilmesinde ideal bir sistemdir. Bizim çalışmamızda da iatrojenik nedenlerle meydana gelen perforasyonları taklit edecek şekilde koyun dişlerinde perforasyonlar oluşturuldu ve hücrelerin adezyonu, çoğalması, farklılaşması ve sonuç olarak doğal diş dokusu oluşturularak hasarlı bölgeyi tamir edilebilmeleri için hücrelere uygun bir ortam sunan biyouyumlu materyallerden meydana gelmiş bir yapı iskelesi tasarlanarak perforasyon alanına uygulandı.

Diş pulpası kök hücreleri ve kollajen sünger yapı iskelesinin insan mandibulasındaki iyileşmeye etkisinin incelendiği oldukça az sayıdaki klinik çalışmaların birinde hastaların alt üçüncü molar dişlerinden biri alınarak pulpasından diş pulpası kök hücreleri izole edilmiş ve kollajen süngerden oluşturulan yapı iskelesine ekilerek çekim boşluğuna yerleştirilmiştir. Karşı bölgedeki üçüncü molar diş de çekilerek, kontrol grubu olarak çekim boşluğuna herhangi bir işlem yapılmamıştır. Üç ay sonra diş pulpası kök hücrelerinin kollajen sünger ile kombine edilerek yerleştirildiği bölgede kemik rejenerasyonunun başladığı ve kontrol bölgesine göre kortikal kemik seviyesinin oldukça yüksek olduğu radyografilerde görülmüştür. Bir yıl sonraki radyografik, histolojik ve immunflorosans analizlerde de yine kontrol bölgesine göre uygulama bölgesinde oldukça iyi organize olmuş kemik yapısı tespit edilmiştir (109). Bizim çalışmamızda da 8. hafta sonundaki örneklerin histolojik kesitlerinde perforasyon alanının osteodentin yapı ile tamamen örtüldüğü gözlenmiştir.

Kemik morfojenetik proteini (BMP2) dozunun kollajen süngerden oluşturulmuş yapı iskeleleri ile ayarlandığı Kim ve ark. (110) tarafından yapılmış bir çalışmada, daha sık kullanılan farklı materyallerden meydana gelmiş yapı iskelelerine göre daha yavaş salınım yapması beklendiği için tip I kollajenden yapılmış yapı iskelesinin kullanıldığı bildirilmiştir. Ratlarda yeni kemik oluşumunun sistemik laktoferrin uygulaması ile incelendiği bir çalışmada da kemik defektlerinin

doldurulmasında kollajen süngerler yapı iskelesi olarak kullanılmış ve yeni kemik oluşumu gözlenmiştir (111). Kollajenin yapı iskeleleri için uygun ve sıkça kullanılan bir materyal olması nedeniyle bizim çalışmamızda da bu çalışmalara benzer şekilde yapı iskelesinin oluşturulmasında %90 gibi bir oranda kollajen materyali kullanıldı.

Qu ve ark. (112) yaptıkları çalışmada üç boyutlu, yüksek poroziteli, nanofibröz jelatin/magnezyum fosfat hibrit yapı iskelesi oluşturmuşlardır. Bu yapı iskelesi sadece doğal dentin matriksinin kimyasal yapısı ve nano yapıli tasarımını taklit etmemiş aynı zamanda Mg iyonları ile diş pulpası kök hücrelerinin (DPSC) çoğalması, farklılaşması ve biyomineralizasyonu için kimyasal sinyaller sağlamıştır. Sonuç olarak da yüksek ekstrasellüler matriks (ECM) sekresyonu ve sert doku oluşumu gözlenmiştir. Jelatin, kollajenin kısmi hidrolizi ile elde edilen çözünebilir bir protein bileşiktir (113). Bizim çalışmamız da da Kollajen ve BioAggregate materyalleri hem yapı iskelesi oluşturmak hem de bu çalışmaya benzer şekilde DPSC'lerin çoğalmasını ve farklılaşmasını sağlamak için kullanılmıştır.

Anatomik olarak şekillenmiş bütün bir diş oluşturma çalışmaları da yapılmış ve belirli ölçüde başarıya ulaşılmıştır. Bu çalışmaların birinde Young ve ark. (16) poliglikolat/poli-L-laktat (PGA/PLLA) ve poli-L-laktat-ko-glikolat (PLGA) materyallerinden insan kesici ve molar dişleri şeklinde yapı iskeleleri oluşturmuş ve kollajen ile kaplayarak domuzların üçüncü molar diş tomurcuklarından elde ettikleri hücreleri ekmişlerdir. Oluşturulan yapı iskelelerini ratların karın içerisine yerleştirmişlerdir. 20-30 hafta sonraki histolojik incelemelerde dentin, mine organı, odontoblastlar, iyi bir biçimde tanımlanabilen pulpa odası ve kabul edilebilir yapıda Hertwig kök epitel kımı ve sementoblastların olduğu görülmüştür. Bizim çalışmamızda da perforasyon alanına uygun büyüklükte yapı iskeleleri oluşturularak canlının kendi hücrelerinin yapı iskelesine yerleşip perforasyon alanında tamir dentin dokusu oluşturması sağlanmıştır.

Duailibi ve ark. (17, 18) yaptıkları çalışmalarda, Young ve ark.'nın yaptıkları bütün bir diş oluşturma çalışmasına benzer şekilde yapı iskelelerine rat diş tomurcuğu hücreleri ekerek bunu önce ratların karın içerisine, sonraki çalışmalarında da ratların çenelerine yerleştirmişlerdir. 12 haftalık bir gözlem süresi sonunda yaptıkları histolojik ve immunohistokimyasal incelemelerde dentin, mine ve pulpa dokularını içeren diş formunda yapıların meydana geldiğini raporlamışlardır. Bizim

çalışmamızda bu çalışmada kullanılan ve klasik doku mühendisliği yaklaşımı olan yapı iskelesine hücrelerin ekilmesiyle doku oluşturulması yöntemi yerine daha kolay, daha ucuz ve tavsiye edilen yeni bir doku mühendisliği yöntemi olan canlıların kendi hücrelerinin ilgili alana yerleştirilen yapı iskelesi içine yerleşmesi sağlanarak doku oluşturulması yaklaşımı (bu yöntem “cell homing” doku mühendisliği yaklaşımı olarak da adlandırılmaktadır) kullanılmıştır.

Literatürde “freze-drying” olarak da adlandırılan liyofilizasyon yöntemi biyomateryallerde porozitenin oluşturulmasında yaygın ve ortak bir biçimde kullanılan tekniklerden biridir (41). Bu çalışmada da solüsyon kollajenin lifli hale getirilmesinde ve süngerimsi yapıların oluşturulmasında liyofilizasyon yöntemi kullanılmıştır.

Yapı iskelelerindeki porların yoğunluğunu ve por büyüklüğünü tespit edebilmek için çok sayıda yöntem kullanılmıştır. Bu yöntemlerden biri civa porozimetresi yöntemidir (114, 115). Bir diğer kullanılan yöntem ise por yoğunluğu ve por boyutlarının SEM görüntülerinin çeşitli bilgisayar yazılımları ile analizidir (116, 117). Bizim çalışmamızda da civa porozimetresi sonuçlarına göre % 57 ve SEM sonuçlarına göre % 36 değerlerinde por yoğunluğu tespit edilmiştir. Aynı zamanda yapı iskelesinin SEM sonuçlarına göre ağırlıklı olarak 6-10 µm boyutta por hacmine sahip olduğu tespit edilmiştir. Yüksek porozitenin hücre bağlanmasını etkilemediği fakat hücre çoğalmasının artışı sağladığı ve oksijen ve besinlerin geçişini kolaylaştırdığı belirtilmiştir (118). Fakat porozitenin ve por büyüklüğünün artışı hücre çoğalmasını kolaylaştırırken yapı iskelesinin mekanik özelliklerini zayıflatarak yapısal bütünlüğünü riske atmaktadır (41). Aynı zamanda kollajen süngerin kabarma davranışı, yeterli por boşluğu oluşturarak hücrelerin büyümesi ve besinlerin teminine izin vermektedir (119). Bizim çalışmamızda da 8. hafta örneklerinin bazılarında perforasyon alanının dışına taşarak süngerimsi yapı içine doğru da gelişmiş osteodentin yapının görülmesi, kullandığımız yapı iskelesinin sahip olduğu por büyüklüğü ve por yoğunluğu ile tamir dentinini oluşturan odontoblast benzeri hücrelerin yerleşmesi, çoğalması ve farklılaşmasına uygun bir ortam sağlamış olduğunu göstermektedir.

Kim ve ark. (69) diş şeklinde ağırlıkça % 80 polikaprolakton (PCL) ve % 20 hidroksiapatit (HA)’ den oluşan ve diş şeklinde hazırlanmış yapı iskelelerinin

mikrokanallarına büyüme faktörü içeren ve içermeyen tip I kollajen solüsyonu akıtarak ratların sırt deri altına ve çekim soketine yerleştirmişlerdir. Dokuz hafta sonra yapılan incelemelerde özellikle büyüme faktörü içeren yapılarda mikrokanallar içinde bolca hücre ile birlikte yeni oluşan bir kemik, kan damarları ve ayrıca çekim soketi içine yerleştirilen yapı iskelesi etrafında periodontal dokuya benzer lifli bir yapı gözlemlenmiştir. Bu çalışma hücre transferi olmadan “cell homing” yaklaşımı ile sadece yapı iskelesi ve hücrelerin göç ederek yapı iskelesi içine yerleşmesini, orada çoğalmasını ve farklılaşmasını sağlayacak faktörlerin kullanılması ile anatomik olarak şekillenmiş diş benzeri bir yapının oluşturulduğu ilk *in vivo* çalışma niteliği taşımaktadır. Çalışmamızda, Kim ve ark.’nın yaptıkları bu örnek çalışmaya benzer şekilde dışarıdan bir hücre transferi yapılmadan sadece Kollajen ve BioAggregate materyalleri ile oluşturulmuş poröz yapı iskelesi ile canlının kendi hücrelerinin yapı iskelesi içine göç edip yerleşmesi, çoğalması ve doğal diş dokusuna farklılaşmasının sağlanması amaçlanmıştır. İncelenen 8. hafta örneklerinde süngerimsi yapı içine doğru da osteodentin yapıda bir doku oluşumunun meydana gelmesi, yapı iskelesinin diş pulpası kök hücrelerinin beklenen şekilde yapı iskelesi içine göç ederek yerleşip, çoğalıp, farklılaşabilmesine olanak sağladığını göstermektedir.

Ishizaki ve ark. (120) köpeklerde yaptıkları bir pulpa kuafajı çalışmasında mine matris türevlerine pulpanın verdiği tersiyer dentin oluşumu cevabını histopatolojik olarak incelemişlerdir. Uygulama yaptıkları dişlerin gözlem sürelerini 1, 4 ve 8. haftalar olarak belirlemişler ve 4. ve 8. haftada artmış tersiyer dentin oluşumu raporlamışlardır. MTA ve kalsiyum hidroksitin Accorinte ve ark. (121) tarafından insan dişleri üzerinde incelendiği ve bütün gruplarda da sert doku köprüsü oluşumunun gözlemlendiği bir direkt pulpa kuafajı çalışmasında da uygulama yapılmış dişlerin gözlem süreleri 30 ve 60 gün olarak belirlenmiştir. Ayrıca MTA materyali uygulanan gruplarda kalsiyum hidroksit uygulanmış gruplara göre daha hızlı bir pulpa iyileşmesi görülmüştür. Bir başka çalışmada da Moazzami ve ark. (122) MTA ile birlikte yeni bir pulpa kuafaj materyalinin rat dişlerindeki ekspoz pulpar üzerindeki etkisini 2 hafta ve 2 aylık gözlem süreleri sonunda histolojik olarak incelemişlerdir. Bütün gruplarda tamir dentini oluşumu gözlemlerken, MTA materyalinin uygulandığı gruplarda anlamlı bir şekilde enflamasyonda azalma görülmüştür. Bizim çalışmamızda da bu çalışmalara benzer şekilde gözlem süreleri 4

ve 8. haftalar olarak belirlenmiş ve 8. hafta da 4. haftaya göre daha homojen yapıda tamir dentini gözlenmiştir. Ayrıca tamir dokunun altındaki pulpa dokusunda kapiller hiperemi dışında yangısal bir yanıt gözlenmemiş, pulpa dokusunun canlılığını devam ettirdiği görülmüştür.

Oldukça güncel bir literatürde Han ve ark. β -kateninin tamir dentin oluşumu boyunca odontoblastik farklılaşmaya etkisini ratların dişlerinde *invivo* olarak incelemişlerdir. Ratların maksiller birinci molar dişlerinde oluşturdukları pulpa perforasyon alanının çapını 1mm olarak belirlemişlerdir (123). Bir başka çalışmada Li ve ark. (124) HtrA1 (High-temperature requirement protein A1) ve ilişkili olması muhtemel moleküllerin tamir dentin oluşumu üzerindeki etkilerini yine rat dişlerinin pulpalarında oluşturdukları 1 mm' lik çapa sahip perforasyon alanlarında yaptıkları uygulamalarla incelenmişlerdir. Bu iki çalışmada da perforasyon alanının boyutu ile ilgili deneylerin gidişatını etkilemiş bir olumsuzluk belirtilmemiştir. Bizim çalışmamızda da literatürlere uygun olarak dişlerde meydana getirdiğimiz perforasyon alanı 1 mm ile sınırlı tutulmuştur.

Dişlerde meydana getirilen perforasyonlardan sonra pulpa dokusundaki kanamayı durdurmak için çeşitli maddeler kullanılmaktadır. Silva ve ark. (125) serum fizyolojik, sodyum hipoklorit ve klorheksidin glukonatu, kalsiyum hidroksit ile yaptıkları direkt pulpa kuafajı tedavisinde kanamayı durdurmak için kullanmış ve diş pulpa dokusundaki iyileşmeye yönelik etkilerini gözlemlemişlerdir. Sonuç olarak üç ajanında yara iyileşmesini olumsuz etkilemediği ve tamir dentin oluştuğunu raporlamışlardır. Bizim çalışmamızda da pulpa perforasyonu sonucu meydana gelen kanamayı durdurmak için hemostatik ajan olarak serum fizyolojik kullanılmıştır.

Çalışmamızda süngerimsi yapıların üzerine Fuji IX geleneksel cam iyonomer siman yerleştirilmiştir. Farklı cam iyonomer simanların, ağız hastalıklarının gelişmesine neden olan *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Lactobacillus acidophilus* ve *Actinomyces viscosus* bakterilerine karşı gösterdikleri antibakteriyel etkilerin agar difüzyon testi kullanılarak incelendiği bir çalışmada Fuji IX en etkili antibakteriyel simanlardan biri olarak raporlanmıştır (126). Siman olarak kullanılan Fuji IX' un 5 farklı marka kompozitin mikrosertliğine olan etkisinin değerlendirildiği bir başka çalışmada Fuji IX'un bir marka hariç diğer tüm kompozitlerin mikrosertliğinde artışa neden olduğu raporlanmıştır. Ayrıca bu çalışmada Fuji IX' un

restoratif materyal olarak da birçok kompozitden daha yüksek yüzey sertliğine sahip olduğu belirtilmiştir (127). Geleneksel cam iyonomerlerin biyouyumlu olmaları nedeniyle pulpaya yakın yerlerde kullanılabileceği de belirtilmiştir (51). Şengün ve ark. (128) da cam iyonomer simanların pulpa hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerini inceledikleri çalışmalarında Fuji IX' un pulpa hücreleri üzerinde sitotoksik bir etkiye sahip olmadığını belirtmişlerdir.

Pulpa kuafajı çalışmaları için birçok çeşit hayvan kullanılmıştır. Ratlar deney hayvanı olarak birçok alanda kullanıldıkları gibi pulpa kuafajı çalışmalarında da sıklıkla kullanılmışlardır (82, 129, 130). Ayrıca köpekler (131, 132), domuzlar (133, 134) ve maymunlar (135) da direkt pulpa kuafajı çalışmalarında deney hayvanı olarak kullanılmışlardır. Tavşanlar ise dental rejenerasyonda sadece birkaç çalışmada kullanılmıştır çünkü pulpa, dentin ve periodontal dokuları insan diş dokusundakine benzerken kök apekslerinin açık olması, diş köklerinin de mine ile örtülü olması dolayısı ile kuron ve kök ayrımının olmaması ve dişlerinin sürekli uzaması özellikleri ile insan diş anatomisine göre farklılıklar göstermektedir (136).

Nyborg ve ark. (137) kalsiyum hidroksit ile yaptıkları direkt pulpa kuafajı çalışmasında köpek ve insan dişlerinin pulpal reaksiyonlarını karşılaştırmış ve insan dişlerinin köpek dişlerine göre pulpa kuafajında daha başarılı olduklarını görmüşlerdir. Brännström (135), maymunlardaki tamir dentin oluşumunun insanlardakinden farklı olması nedeniyle maymunları, direkt pulpa kuafajı çalışmaları için tavsiye etmemiştir. Jean ve ark. (138) ise kalsiyum hidroksit ile direkt pulpa kuafajı sonrası domuzlar, ratlar ve köpeklerde iyileşme sürecinde herhangi bir fark görmemişlerdir. Dammaschke (139) ise canlı diş pulpa dokusu ile temas edecek olan pulpa kuafaj materyallerinin biyouyumluluk testleri için maymunların ve gelişmiş hayvanların tercih edilmesini tavsiye etmiştir. Mine matris proteini ve kalsiyum hidroksit ile yapılan vital pulpa girişimlerinin karşılaştırmalı olarak incelendiği bir çalışmada Ertürk ve ark. (140) deney hayvanı olarak koyunları kullanmışlardır. Biz de çalışmamızda mandibular kesici dişlerinin anatomik olarak insan mandibular kesici dişlerine benzer olması sebebiyle Akkaraman cinsi koyunları deney hayvanı olarak kullandık. Koyunlar seçilirken bir ön muayeneden geçirilerek dişleri aşınmamış, ilk bakışta periodontal bir problem gözükmeyen sağlıklı hayvanlar seçilmiştir.

Örneklerin histolojik olarak incelenmesi aşamasında örneklere standart Hematoksilen-Eosin boyama yöntemi uygulanmıştır (141). Bu yöntem dentin oluşumunu ve kalitatif ve kantitatif doku cevaplarını incelemek için birçok çalışmada çok uzun süreden beri kullanılan bir preparat boyama yöntemidir (17, 122, 130).

Sonuç olarak bu çalışmada BioAggregate ve tip I kollajenden oluşturulan gözenekli yapı iskelesi koyun kesici dişlerinde meydana getirilen perforasyonlarda tamir dentini oluşumunu sağlamıştır. Sekizinci haftadaki örneklerde gözenekli yapı içine de gelişen doku, yapı iskelesinin hücreler için uyarıcı ve biyouyumlu bir malzeme olarak görev yaptığını göstermiştir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Kollajen ve BioAggregate materyallerinden oluşturulan gözenekli yapı iskelesinin perfore edilen koyun diş pulpalarında dördüncü ve sekizinci haftalar arasındaki yeni doğal diş dokusu oluşumuna katkısının histolojik incelemeler ve ölçümlerle değerlendirildiği bu çalışmanın sonuçlara göre;

Kollajen ve BioAggregate' den oluşturulmuş yapı iskeleleri perfore edilen diş dokusu alanında diş pulpası kökenli kök hücreleri uyarmış ve yeni doğal diş dokusu oluşumunu sağlamıştır.

Dört ve sekizinci hafta kesitlerinin histolojik gözlemlerinde perforasyon alanını tamamen örten osteodentin yapıda tamir doku oluşumu görülmüştür.

Sekizinci haftanın incelenen histolojik örneklerinin bazılarında, dördüncü haftadaki örneklerle göre oluşan tamir dokusunun miktarında artış görülmüştür. Ancak bu artış miktarı istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$).

İncelenen histolojik kesitlerde sekizinci haftada dördüncü haftaya göre daha kompakt yapıda doku oluşumu gözlenmiştir.

Sekizinci hafta kesitlerinde oluşan osteodentin yapıdaki tamir dokunun doğal dentin dokusuna benzer şekilde tübüler yapı kazandığı da görülmüştür.

Sekizinci haftanın diş örneklerinden bazılarında gözenekli yapıdaki yapı iskelesinin içine doğru da tamir dokunun geliştiği gözlenmiştir. Bu durum yapı iskelesinin diş pulpası kökenli hücrelerin yerleşmesi, çoğalması ve farklılaşarak doğal diş dokusunu oluşturmasına hem biyolojik hemde fiziksel olarak imkan sağladığını göstermiştir.

Hem dört hem de sekiz hafta sonunda pulpa da kapiller hiperemi dışında yangısal bir cevaba rastlanmamıştır.

Diş pulpasının açığa çıktığı durumlarda uygulanan direkt pulpa kuafajı tedavisinde biyouyumlu, yeni diş dokusu oluşumunu tetikleyecek, hücrelerin yerleşmesini, çoğalmasını ve farklılaşmasını sağlayacak yapı iskeleleri kullanılabilir.

7. KAYNAKLAR

1. Fuks, A. B. (2008). Vital pulp therapy with new materials for primary teeth: new directions and treatment perspectives. *Journal of endodontics*. 34 (7 Suppl). S18-24.
2. Dammaschke, T. (2008). The history of direct pulp capping. *Journal of the history of dentistry*. 56 (1). 9-23.
3. Modena, K. C., Casas-Apayco, L. C., Atta, M. T., Costa, C. A., Hebling, J., Sipert, C. R. ve diğeri. (2009). Cytotoxicity and biocompatibility of direct and indirect pulp capping materials. *Journal of applied oral science : revista FOB*. 17 (6). 544-554.
4. Pashley, D. H. (1996). Dynamics of the pulpo-dentin complex. *Critical reviews in oral biology and medicine : an official publication of the American Association of Oral Biologists*. 7 (2). 104-133.
5. Briso, A. L., Rahal, V., Mestrener, S. R., Dezan Junior, E. (2006). Biological response of pulps submitted to different capping materials. *Brazilian oral research*. 20 (3). 219-225.
6. Park, J. W., Hong, S. H., Kim, J. H., Lee, S. J., Shin, S. J. (2010). X-Ray diffraction analysis of white ProRoot MTA and Diadent BioAggregate. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics*. 109 (1). 155-158.
7. Scheller, E. L., Krebsbach, P. H., Kohn, D. H. (2009). Tissue engineering: state of the art in oral rehabilitation. *Journal of oral rehabilitation*. 36 (5). 368-389.
8. Rosa, V., Della Bona, A., Cavalcanti, B. N., Nor, J. E. (2012). Tissue engineering: from research to dental clinics. *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials*. 28 (4). 341-348.
9. Rodriguez-Lozano, F. J., Bueno, C., Insausti, C. L., Meseguer, L., Ramirez, M. C., Blanquer, M. ve diğeri. (2011). Mesenchymal stem cells derived from dental tissues. *International endodontic journal*. 44 (9). 800-806.

10. Gronthos, S., Mankani, M., Brahimi, J., Robey, P. G., Shi, S. (2000). Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 97 (25). 13625-13630.
11. Demarco, F. F., Conde, M. C., Cavalcanti, B. N., Casagrande, L., Sakai, V. T., Nor, J. E. (2011). Dental pulp tissue engineering. *Brazilian dental journal*. 22 (1). 3-13.
12. Freyman T.M., Y. I. V., Gibson L.J. (2001). Cellular materials as porous scaffolds for tissue engineering. *Prog. In Materials Science*. 46. 273-282.
13. Wallace, D. G., Rosenblatt, J. (2003). Collagen gel systems for sustained delivery and tissue engineering. *Advanced drug delivery reviews*. 55 (12). 1631-1649.
14. Ohara, T., Itaya, T., Usami, K., Ando, Y., Sakurai, H., Honda, M. J. ve diğ erleri. (2010). Evaluation of scaffold materials for tooth tissue engineering. *Journal of biomedical materials research. Part A*. 94 (3). 800-805.
15. Sumita, Y., Honda, M. J., Ohara, T., Tsuchiya, S., Sagara, H., Kagami, H. ve diğ erleri. (2006). Performance of collagen sponge as a 3-D scaffold for tooth-tissue engineering. *Biomaterials*. 27 (17). 3238-3248.
16. Young, C. S., Terada, S., Vacanti, J. P., Honda, M., Bartlett, J. D., Yelick, P. C. (2002). Tissue engineering of complex tooth structures on biodegradable polymer scaffolds. *Journal of dental research*. 81 (10). 695-700.
17. 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. *Journal of dental research*. 83 (7). 523-528.
18. Duailibi, S. E., Duailibi, M. T., Zhang, W., Asrican, R., Vacanti, J. P., Yelick, P. C. (2008). Bioengineered dental tissues grown in the rat jaw. *Journal of dental research*. 87 (8). 745-750.
19. Steindorff, M. M., Lehl, H., Winkel, A., Stiesch, M. (2014). Innovative approaches to regenerate teeth by tissue engineering. *Archives of oral biology*. 59 (2). 158-166.

20. Hargreaves, K. M., Cohen, S. (2011). *Cohen's Pathways Of The Pulp, Tenth Edition*. St. Louis: Mosby Company.
21. Ingle, J. I., Bakland, L. K., Baumgartner, J. C. (2008). *Ingle's Endodontics*. USA: 6PMPH.
22. Mjör, I. (2002). *Pulp-Dentin Biology in Restorative Dentistry*. USA: Quintessence Publishing.
23. Goldberg, M., Kulkarni, A. B., Young, M.Boskey, A. (2011). Dentin: structure, composition and mineralization. *Frontiers in bioscience*. 3. 711-735.
24. Torabinejad, M., Walton, R.E. (2011) *Endodonti Temel İlkeler ve Uygulamalar*. (R. Erişen, Çev.). İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri. (2009).
25. Alaçam, T. (2012). *Endodonti*. Ankara: Özyurt Matbaacılık.
26. Hargreaves, K. M., Goodis, H.E. (2002). *Seltzer and Benders's Dental Pulp*. USA: Quintessence Publishing.
27. Goldberg, M., Smith, A.J. (2004). Cells and extracellular matrices of dentin and pulp: a biological basis for repair and tissue engineering. *Crit Rev Oral Biol Med*. 15. 13-27.
28. Roberson, T. M., Heymann, H.O., Swift, E.J. (2011). *Sturdevant's Art and Science of Operative Dentistry*. (S. Gürkan, Çev.). Ankara: Güneş Tıp Kitabevleri. (2006).
29. Sangwan, P., Sangwan, A., Duhan, J.Rohilla, A. (2013). Tertiary dentinogenesis with calcium hydroxide: a review of proposed mechanisms. *International endodontic journal*. 46 (1). 3-19.
30. Fitzgerald, M., Chiego, D. J., Jr.Heys, D. R. (1990). Autoradiographic analysis of odontoblast replacement following pulp exposure in primate teeth. *Archives of oral biology*. 35 (9). 707-715.
31. Okiji, T.Yoshiba, K. (2009). Reparative dentinogenesis induced by mineral trioxide aggregate: a review from the biological and physicochemical points of view. *International journal of dentistry*. 2009. 464280.
32. Langer, R.Vacanti, J. P. (1993). Tissue engineering. *Science*. 260 (5110). 920-926.

33. Langer, R. Vacanti, J. P. (1995). Artificial organs. *Scientific American*. 273 (3). 130-133.
34. Park, S. J., Li, Z., Hwang, I. N., Huh, K. M. Min, K. S. (2013). Glycol chitin-based thermoresponsive hydrogel scaffold supplemented with enamel matrix derivative promotes odontogenic differentiation of human dental pulp cells. *Journal of endodontics*. 39 (8). 1001-1007.
35. Horst, O. V., Chavez, M. G., Jheon, A. H., Desai, T. Klein, O. D. (2012). Stem cell and biomaterials research in dental tissue engineering and regeneration. *Dental clinics of North America*. 56 (3). 495-520.
36. Rodriguez-Lozano, F. J., Insausti, C. L., Iniesta, F., Blanquer, M., Ramirez, M. D., Meseguer, L. ve diğeri. (2012). Mesenchymal dental stem cells in regenerative dentistry. *Medicina oral, patologia oral y cirugia bucal*. 17 (6). e1062-1067.
37. Miura, M., Gronthos, S., Zhao, M., Lu, B., Fisher, L. W., Robey, P. G. ve diğeri. (2003). SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 100 (10). 5807-5812.
38. Seo, B. M., Miura, M., Gronthos, S., Bartold, P. M., Batouli, S., Brahim, J. ve diğeri. (2004). Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet*. 364 (9429). 149-155.
39. Morsczeck, C., Gotz, W., Schierholz, J., Zeilhofer, F., Kuhn, U., Mohl, C. ve diğeri. (2005). Isolation of precursor cells (PCs) from human dental follicle of wisdom teeth. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*. 24 (2). 155-165.
40. Sonoyama, W., Liu, Y., Fang, D., Yamaza, T., Seo, B. M., Zhang, C. ve diğeri. (2006). Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in swine. *PloS one*. 1. e79.
41. Karageorgiou, V. Kaplan, D. (2005). Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials*. 26 (27). 5474-5491.
42. Chua, C.K., L. K. F., Cheah, C.M., Chua, S.M. (2003). Development of a Tissue Engineering Scaffold Structure Library for Rapid Prototyping. Part 1: Investigation and Classification. *Int. J. Adv. Manuf. Technol*. 21. 291-301.

43. Annibali, S., Cicconetti, A., Cristalli, M. P., Giordano, G., Trisi, P., Pilloni, A. ve diğeri. (2013). A comparative morphometric analysis of biodegradable scaffolds as carriers for dental pulp and periosteal stem cells in a model of bone regeneration. *The Journal of craniofacial surgery*. 24 (3). 866-871.
44. Nguyen, L. T., Liao, S., Chan, C. K., Ramakrishna, S. (2012). Enhanced osteogenic differentiation with 3D electrospun nanofibrous scaffolds. *Nanomedicine*. 7 (10). 1561-1575.
45. Meinel, L., Fajardo, R., Hofmann, S., Langer, R., Chen, J., Snyder, B. ve diğeri. (2005). Silk implants for the healing of critical size bone defects. *Bone*. 37 (5). 688-698.
46. Vrana, N. E. (2006). Collagen-Based Scaffolds For Cornea Tissue Engineering. Yüksek Lisans Tezi, ODTÜ, Ankara.
47. Çalışkan, M. K. (2006). Endodontide Tanı ve Tedaviler. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri.
48. Stanley, H. R. (1989). Pulp capping: conserving the dental pulp--can it be done? Is it worth it? *Oral surgery, oral medicine, and oral pathology*. 68 (5). 628-639.
49. Paranjpe, A., Smoot, T., Zhang, H., Johnson, J. D. (2011). Direct contact with mineral trioxide aggregate activates and differentiates human dental pulp cells. *Journal of endodontics*. 37 (12). 1691-1695.
50. Auschill, T. M., Arweiler, N. B., Hellwig, E., Zamani-Alaei, A., Sculean, A. (2003). [Success rate of direct pulp capping with calcium hydroxide]. *Schweizer Monatsschrift für Zahnmedizin = Revue mensuelle suisse d'odonto-stomatologie = Rivista mensile svizzera di odontologia e stomatologia / SSO*. 113 (9). 946-952.
51. Qureshi, A., E, S., Nandakumar, Pratap Kumar Sambashivarao. (2014). Recent advances in pulp capping materials: an overview. *Journal of clinical and diagnostic research : JCDR*. 8 (1). 316-321.
52. 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. *Journal of endodontics*. 35 (10). 1387-1390.
53. Tuna, E. B., Dincol, M. E., Gencay, K. Aktoren, O. (2011). Fracture resistance of immature teeth filled with BioAggregate, mineral trioxide aggregate and calcium hydroxide. *Dental traumatology : official publication of International Association for Dental Traumatology*. 27 (3). 174-178.
 54. Mukhtar-Fayyad, D. (2011). Cytocompatibility of new bioceramic-based materials on human fibroblast cells (MRC-5). *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics*. 112 (6). e137-142.
 55. Khalil, W. A. Eid, N. F. (2013). Biocompatibility of BioAggregate and mineral trioxide aggregate on the liver and kidney. *International endodontic journal*. 46 (8). 730-737.
 56. Celik, D., Er, K., Serper, A., Tasdemir, T. Ceyhanli, K. T. (2013). Push-out bond strength of three calcium silicate cements to root canal dentine after two different irrigation regimes. *Clinical oral investigations*.
 57. Aksoy, U., (2012). MTA (Mineral Trioksit Aggregate) ve Bioaggregate'in, Dentin Tübüllerinden Kök Yüzeyine Kalsiyum ve Hidroksil İyon Difüzyonlarının İn Vitro Olarak Araştırılması. Doktora Tezi, Yakın Doğu Üniversitesi, Lefkoşa.
 58. Bou-Gharios, G., de Crombrughe, B. . (2008). *Type I Collagen Structure, Synthesis and Regulation*. Principles of Bone Biology, 3rd Edition, ed. Bilezikian, J. P., Raisz, L. G., Martin, T. J. Elsevier.
 59. Gelse, K., Poschl, E. Aigner, T. (2003). Collagens--structure, function, and biosynthesis. *Advanced drug delivery reviews*. 55 (12). 1531-1546.
 60. Liu, S. H., Yang, R. S., al-Shaikh, R. Lane, J. M. (1995). Collagen in tendon, ligament, and bone healing. A current review. *Clinical orthopaedics and related research*. (318). 265-278.
 61. Huang, G. T., Yamaza, T., Shea, L. D., Djouad, F., Kuhn, N. Z., Tuan, R. S. ve diğerleri. (2010). Stem/progenitor cell-mediated de novo regeneration of dental pulp with newly deposited continuous layer of dentin in an in vivo model. *Tissue engineering. Part A*. 16 (2). 605-615.

62. Sakai, V. T., Cordeiro, M. M., Dong, Z., Zhang, Z., Zeitlin, B. D., Nor, J. E. (2011). Tooth slice/scaffold model of dental pulp tissue engineering. *Advances in dental research*. 23 (3). 325-332.
63. Arakaki, M., Ishikawa, M., Nakamura, T., Iwamoto, T., Yamada, A., Fukumoto, E. ve diğerleri. (2012). Role of epithelial-stem cell interactions during dental cell differentiation. *The Journal of biological chemistry*. 287 (13). 10590-10601.
64. Lee, J. H., Lee, D. S., Choung, H. W., Shon, W. J., Seo, B. M., Lee, E. H. ve diğerleri. (2011). Odontogenic differentiation of human dental pulp stem cells induced by preameloblast-derived factors. *Biomaterials*. 32 (36). 9696-9706.
65. Morotomi, T., Kawano, S., Toyono, T., Kitamura, C., Terashita, M., Uchida, T. ve diğerleri. (2005). In vitro differentiation of dental epithelial progenitor cells through epithelial-mesenchymal interactions. *Archives of oral biology*. 50 (8). 695-705.
66. Ikeda, E., Morita, R., Nakao, K., Ishida, K., Nakamura, T., Takano-Yamamoto, T. ve diğerleri. (2009). Fully functional bioengineered tooth replacement as an organ replacement therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 106 (32). 13475-13480.
67. Nakao, K., Morita, R., Saji, Y., Ishida, K., Tomita, Y., Ogawa, M. ve diğerleri. (2007). The development of a bioengineered organ germ method. *Nature methods*. 4 (3). 227-230.
68. Hu, B., Nadiri, A., Kuchler-Bopp, S., Perrin-Schmitt, F., Peters, H., Lesot, H. (2006). Tissue engineering of tooth crown, root, and periodontium. *Tissue engineering*. 12 (8). 2069-2075.
69. Kim, K., Lee, C. H., Kim, B. K., Mao, J. J. (2010). Anatomically shaped tooth and periodontal regeneration by cell homing. *Journal of dental research*. 89 (8). 842-847.
70. Kim, S. G., Zheng, Y., Zhou, J., Chen, M., Embree, M. C., Song, K. ve diğerleri. (2013). Dentin and dental pulp regeneration by the patient's endogenous cells. *Endodontic Topics*. 28. 106-117.
71. Kakarla, P., Avula, J. S., Mellela, G. M., Bandi, S., Anche, S. (2013). Dental pulp response to collagen and pulpotec cement as pulpotomy agents in

- primary dentition: A histological study. *Journal of conservative dentistry : JCD*. 16 (5). 434-438.
72. Bimstein, E.Shoshan, S. (1981). Enhanced healing of tooth-pulp wounds in the dog by enriched collagen solution as a capping agent. *Archives of oral biology*. 26 (2). 97-101.
 73. Marsan, T., Prpic-Mehicic, G., Karlovic, I., Sostaric, B., Anic, I., Karlovi, Z. . (2003). Pulpal response to direct pulp capping with collagen bio-resorbable membrane. . *Acta Stomat Croat*. 37. 59-62.
 74. Akkouch, A., Zhang, Z.Rouabhia, M. (2014). Engineering bone tissue using human dental pulp stem cells and an osteogenic collagen-hydroxyapatite-poly (L-lactide-co-epsilon-caprolactone) scaffold. *Journal of biomaterials applications*. 28 (6). 922-936.
 75. Kikuchi, M. (2013). Hydroxyapatite/collagen bone-like nanocomposite. *Biological & pharmaceutical bulletin*. 36 (11). 1666-1669.
 76. Malhotra, N.Mala, K. (2012). Regenerative endodontics as a tissue engineering approach: past, current and future. *Australian endodontic journal : the journal of the Australian Society of Endodontology Inc*. 38 (3). 137-148.
 77. Shibata, S., Suzuki, S., Tengan, T.Yamashita, Y. (1995). A histochemical study of apoptosis in the reduced ameloblasts of erupting mouse molars. *Archives of oral biology*. 40 (7). 677-680.
 78. Zhang, S., Yang, X.Fan, M. (2013). BioAggregate and iRoot BP Plus optimize the proliferation and mineralization ability of human dental pulp cells. *International endodontic journal*. 46 (10). 923-929.
 79. Saghiri, M. A., Asatourian, A., Garcia-Godoy, F., Gutmann, J. L.Sheibani, N. (2013). The impact of thermocycling process on the dislodgement force of different endodontic cements. *BioMed research international*. 2013. 317185.
 80. Ford, T. R., Torabinejad, M., Abedi, H. R., Bakland, L. K.Kariyawasam, S. P. (1996). Using mineral trioxide aggregate as a pulp-capping material. *Journal of the American Dental Association*. 127 (10). 1491-1494.
 81. Faraco Junior, I. M.Holland, R. (2004). Histomorphological response of dogs' dental pulp capped with white mineral trioxide aggregate. *Brazilian dental journal*. 15 (2). 104-108.

82. Kuratate, M., Yoshiba, K., Shigetani, Y., Yoshiba, N., Ohshima, H., Okiji, T. (2008). Immunohistochemical analysis of nestin, osteopontin, and proliferating cells in the reparative process of exposed dental pulp capped with mineral trioxide aggregate. *Journal of endodontics*. 34 (8). 970-974.
83. Yalçın, M., Kenar, H., Dayı, B., Karaöz, E. (2011). Farklı Yapıdaki Pulpa Kapaklama Ajanlarının, Diş Pulpası Kökenli Mezenşimal Kök Hücreleri Üzerinde Odontojenik Farklılaşma Açısından Etkisi. *110S584 Nolu TÛBİTAK Projesi*.
84. Gandolfi, M. G., Ciapetti, G., Taddei, P., Perut, F., Tinti, A., Cardoso, M. V. ve diğeri. (2010). Apatite formation on bioactive calcium-silicate cements for dentistry affects surface topography and human marrow stromal cells proliferation. *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials*. 26 (10). 974-992.
85. Min, K. S., Chang, H. S., Bae, J. M., Park, S. H., Hong, C. U., Kim, E. C. (2007). The induction of heme oxygenase-1 modulates bismuth oxide-induced cytotoxicity in human dental pulp cells. *Journal of endodontics*. 33 (11). 1342-1346.
86. Kim, E. C., Lee, B. C., Chang, H. S., Lee, W., Hong, C. U., Min, K. S. (2008). Evaluation of the radiopacity and cytotoxicity of Portland cements containing bismuth oxide. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics*. 105 (1). e54-57.
87. Yuan, Z., Peng, B., Jiang, H., Bian, Z., Yan, P. (2010). Effect of bioaggregate on mineral-associated gene expression in osteoblast cells. *Journal of endodontics*. 36 (7). 1145-1148.
88. Chang, S. W., Lee, S. Y., Kum, K. Y., Kim, E. C. (2014). Effects of ProRoot MTA, Bioaggregate, and Micromega MTA on odontoblastic differentiation in human dental pulp cells. *Journal of endodontics*. 40 (1). 113-118.
89. Cormier, C. (1995). Markers of bone metabolism. *Current opinion in rheumatology*. 7 (3). 243-248.
90. de Moraes, C. A., Bernardineli, N., Garcia, R. B., Duarte, M. A., Guerisoli, D. M. (2006). Evaluation of tissue response to MTA and Portland cement with

- iodoform. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics*. 102 (3). 417-421.
91. Parirokh, M., Mirsoltani, B., Raof, M., Tabrizchi, H., Haghdoost, A. A. (2011). Comparative study of subcutaneous tissue responses to a novel root-end filling material and white and grey mineral trioxide aggregate. *International endodontic journal*. 44 (4). 283-289.
 92. Antunes Bortoluzzi, E., Juarez Broon, N., Antonio Hungaro Duarte, M., de Oliveira Demarchi, A. C., Monteiro Bramante, C. (2006). The use of a setting accelerator and its effect on pH and calcium ion release of mineral trioxide aggregate and white Portland cement. *Journal of endodontics*. 32 (12). 1194-1197.
 93. Bortoluzzi, E. A., Broon, N. J., Bramante, C. M., Felipe, W. T., Tanomaru Filho, M., Esberard, R. M. (2009). The influence of calcium chloride on the setting time, solubility, disintegration, and pH of mineral trioxide aggregate and white Portland cement with a radiopacifier. *Journal of endodontics*. 35 (4). 550-554.
 94. Torabinejad, M., Hong, C. U., McDonald, F., Pitt Ford, T. R. (1995). Physical and chemical properties of a new root-end filling material. *Journal of endodontics*. 21 (7). 349-353.
 95. Mente, J., Geletneky, B., Ohle, M., Koch, M. J., Friedrich Ding, P. G., Wolff, D. ve diğeri. (2010). Mineral trioxide aggregate or calcium hydroxide direct pulp capping: an analysis of the clinical treatment outcome. *Journal of endodontics*. 36 (5). 806-813.
 96. Reston, E. G., de Souza Costa, C. A. (2009). Scanning electron microscopy evaluation of the hard tissue barrier after pulp capping with calcium hydroxide, mineral trioxide aggregate (MTA) or ProRoot MTA. *Australian endodontic journal : the journal of the Australian Society of Endodontology Inc*. 35 (2). 78-84.
 97. Torabinejad, M., Chivian, N. (1999). Clinical applications of mineral trioxide aggregate. *Journal of endodontics*. 25 (3). 197-205.
 98. Tani-Ishii, N., Hamada, N., Watanabe, K., Tujimoto, Y., Teranaka, T., Umemoto, T. (2007). Expression of bone extracellular matrix proteins on

- osteoblast cells in the presence of mineral trioxide. *Journal of endodontics*. 33 (7). 836-839.
99. Hakki, S. S., Bozkurt, S. B., Hakki, E. E. Belli, S. (2009). Effects of mineral trioxide aggregate on cell survival, gene expression associated with mineralized tissues, and biomineralization of cementoblasts. *Journal of endodontics*. 35 (4). 513-519.
100. Thomson, T. S., Berry, J. E., Somerman, M. J. Kirkwood, K. L. (2003). Cementoblasts maintain expression of osteocalcin in the presence of mineral trioxide aggregate. *Journal of endodontics*. 29 (6). 407-412.
101. Nair, P. N., Duncan, H. F., Pitt Ford, T. R. Luder, H. U. (2009). Histological, ultrastructural and quantitative investigations on the response of healthy human pulps to experimental capping with Mineral Trioxide Aggregate: a randomized controlled trial. 2008. *International endodontic journal*. 42 (5). 422-444.
102. Bal, C., Oztas, N., Cincik, M. Baris, E. (2011). Immunolocalization of fibronectin during reparative dentinogenesis in rat molar teeth after pulp capping with mineral trioxide aggregate or calcium hydroxide. *The New York state dental journal*. 77 (6). 36-42.
103. Wu, C. C., Huang, S. T., Lin, H. C., Tseng, T. W., Rao, Q. L. Chen, M. Y. (2010). Expression of osteopontin and type I collagen of hFOB 1.19 cells on sintered fluoridated hydroxyapatite composite bone graft materials. *Implant dentistry*. 19 (6). 487-497.
104. Postlethwaite, A. E., Snyderman, R. Kang, A. H. (1976). The chemotactic attraction of human fibroblasts to a lymphocyte-derived factor. *The Journal of experimental medicine*. 144 (5). 1188-1203.
105. Hatakeyama, W., Taira, M., Chosa, N., Kihara, H., Ishisaki, A. Kondo, H. (2013). Effects of apatite particle size in two apatite/collagen composites on the osteogenic differentiation profile of osteoblastic cells. *International journal of molecular medicine*. 32 (6). 1255-1261.
106. Bolhari, B., Nekoofar, M. H., Sharifian, M., Ghabrai, S., Meraji, N. Dummer, P. M. (2014). Acid and Microhardness of Mineral Trioxide Aggregate and

- Mineral Trioxide Aggregate-like Materials. *Journal of endodontics*. 40 (3). 432-435.
107. Doğan, A., Munkley, A., Thomas, S., Moran, J. (1992). Microscopic evaluation of biocompatibility of osteoblast impregnated human collagen sponges. *J. Dent. Res.* 71. 637.
108. Dick, H. M.Carmichael, D. J. (1980). Reconstituted antigen-poor collagen preparations as potential pulp-capping agents. *Journal of endodontics*. 6 (7). 641-644.
109. d'Aquino, R., De Rosa, A., Lanza, V., Tirino, V., Laino, L., Graziano, A. ve diğerleri. (2009). Human mandible bone defect repair by the grafting of dental pulp stem/progenitor cells and collagen sponge biocomplexes. *European cells & materials*. 18. 75-83.
110. Kim, R. Y., Oh, J. H., Lee, B. S., Seo, Y. K., Hwang, S. J.Kim, I. S. (2014). The effect of dose on rhBMP-2 signaling, delivered via collagen sponge, on osteoclast activation and in vivo bone resorption. *Biomaterials*. 35 (6). 1869-1881.
111. Yoshimaki, T., Sato, S., Tsunori, K., Shino, H., Iguchi, S., Arai, Y. ve diğerleri. (2013). Bone regeneration with systemic administration of lactoferrin in non-critical-sized rat calvarial bone defects. *Journal of oral science*. 55 (4). 343-348.
112. Qu, T., Jing, J., Jiang, Y., Taylor, R. J., Feng, J., Geiger, B. ve diğerleri. (2014). Magnesium-containing nano-structured hybrid scaffolds for enhanced dentin regeneration. *Tissue engineering. Part A*.
113. Gómez-Guillén, M. C., Giménez, B., López-Caballero, Montero, M.E. M.P. (2011). Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. *Food Hydrocolloids*. 25. 1813-1827.
114. Hu, Y., Grainger, D. W., Winn, S. R.Hollinger, J. O. (2002). Fabrication of poly(alpha-hydroxy acid) foam scaffolds using multiple solvent systems. *Journal of biomedical materials research*. 59 (3). 563-572.
115. Maspero, F. A., Ruffieux, K., Muller, B.Wintermantel, E. (2002). Resorbable defect analog PLGA scaffolds using CO2 as solvent: structural characterization. *Journal of biomedical materials research*. 62 (1). 89-98.

116. El-Ghannam, A. R. (2004). Advanced bioceramic composite for bone tissue engineering: design principles and structure-bioactivity relationship. *Journal of biomedical materials research. Part A.* 69 (3). 490-501.
117. Park, S. N., Park, J. C., Kim, H. O., Song, M. J.Suh, H. (2002). Characterization of porous collagen/hyaluronic acid scaffold modified by 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide cross-linking. *Biomaterials.* 23 (4). 1205-1212.
118. Takahashi, Y.Tabata, Y. (2004). Effect of the fiber diameter and porosity of non-woven PET fabrics on the osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Journal of biomaterials science. Polymer edition.* 15 (1). 41-57.
119. Kim, T. H., Eltohamy, M., Kim, M., Perez, R. A., Kim, J. H., Yun, Y. R. ve diğçerleri. (2014). Therapeutic foam scaffolds incorporating biopolymer-shelled mesoporous nanospheres with growth factors. *Acta biomaterialia.*
120. Ishizaki, N. T., Matsumoto, K., Kimura, Y., Wang, X.Yamashita, A. (2003). Histopathological study of dental pulp tissue capped with enamel matrix derivative. *Journal of endodontics.* 29 (3). 176-179.
121. Accorinte Mde, L., Holland, R., Reis, A., Bortoluzzi, M. C., Murata, S. S., Dezan, E., Jr. ve diğçerleri. (2008). Evaluation of mineral trioxide aggregate and calcium hydroxide cement as pulp-capping agents in human teeth. *Journal of endodontics.* 34 (1). 1-6.
122. 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. *Iranian endodontic journal.* 9 (1). 50-55.
123. Han, N., Zheng, Y., Li, R., Li, X., Zhou, M., Niu, Y. ve diğçerleri. (2014). beta-catenin enhances odontoblastic differentiation of dental pulp cells through activation of Runx2. *PloS one.* 9 (2). e88890.
124. Li, X., Zhou, M., Wang, X., Li, R., Han, N.Zhang, Q. (2012). Quantitative determination of high-temperature requirement protein A1 and its possible associated molecules during induced reparative dentin formation. *Journal of endodontics.* 38 (6). 814-820.

125. Silva, A. F., Tarquinio, S. B., Demarco, F. F., Piva, E., Rivero, E. R. (2006). The influence of haemostatic agents on healing of healthy human dental pulp tissue capped with calcium hydroxide. *International endodontic journal*. 39 (4). 309-316.
126. da Silva, R. C., Zuanon, A. C., Spolidorio, D. M., Campos, J. A. (2007). Antibacterial activity of four glass ionomer cements used in atraumatic restorative treatment. *Journal of materials science. Materials in medicine*. 18 (9). 1859-1862.
127. Itskovich, R., Lewinstein, I., Zilberman, U. (2014). The Influence of Zinc Oxide Eugenol (ZOE) and Glass Ionomer (GI) Base Materials on the Microhardness of Various Composite and GI Restorative Materials. *The open dentistry journal*. 8. 13-19.
128. Şengün, A., S.Hakkı, S., Ülker, E., Yalçın, M. (2008). Dentin Bariyer Testi ile Cam İyonomer Simanların Sitotoksisitelerinin Değerlendirilmesi. *106S189 Nolu TÜBİTAK Projesi*.
129. Tran, X. V., Gorin, C., Willig, C., Baroukh, B., Pellat, B., Decup, F. ve diğerleri. (2012). Effect of a calcium-silicate-based restorative cement on pulp repair. *Journal of dental research*. 91 (12). 1166-1171.
130. Gala-Garcia, A., Teixeira, K. I., Wykrota, F. H., Sinisterra, R. D., Cortes, M. E. (2010). Bioceramic/poly (glycolic)-poly (lactic acid) composite induces mineralized barrier after direct capping of rat tooth pulp tissue. *Brazilian oral research*. 24 (1). 8-14.
131. Mahmoud, S. H., Grawish Mel, A., Zaher, A. R., El-Embaby, A., Karrouf, G. I., Sobh, M. A. (2010). Influence of selective immunosuppressive drugs on the healing of exposed dogs' dental pulp capped with mineral trioxide aggregate. *Journal of endodontics*. 36 (1). 95-99.
132. Nammour, S., Tielemans, M., Heyselaer, D., Pilipili, C., De Moor, R., Nyssen-Behets, C. (2009). [Comparative study on dogs between CO2 laser and conventional technique in direct pulp capping]. *Revue belge de médecine dentaire*. 64 (2). 81-86.
133. Shayegan, A., Petain, M., Vanden Abbeele, A. (2009). The use of beta-tricalcium phosphate, white MTA, white Portland cement and calcium

- hydroxide for direct pulp capping of primary pig teeth. *Dental traumatology : official publication of International Association for Dental Traumatology*. 25 (4). 413-419.
134. Shayegan, A., Jurysta, C., Atash, R., Petein, M., Abbeele, A. V. (2012). Biodentine used as a pulp-capping agent in primary pig teeth. *Pediatric dentistry*. 34 (7). e202-208.
135. M., Brännström. (1981). Dentin and Pulp in Restorative Dentistry. *Nacka: Dental Therapeutics*. 81.
136. Michaeli, Y., Hirschfeld, Z., Weinrub, M. M. (1980). The cheek teeth of the rabbit: morphology, histology and development. *Acta anatomica*. 106 (2). 223-239.
137. Nyborg, H. (1955). Healing processes in the pulp on capping; a morphologic study; experiments on surgical lesions of the pulp in dog and man. *Acta odontologica Scandinavica*. 13 (suppl. 16). 1-130.
138. Jean, A. H., Poueizat, J.A., Daculsi, G. (1993). Pulpal response to calcium phosphate materials. In vivo study of calcium phosphate materials in endodontics. *Cell Mater*. 3. 193-200.
139. Dammaschke, T. (2010). Rat molar teeth as a study model for direct pulp capping research in dentistry. *Laboratory animals*. 44 (1). 1-6.
140. Ertürk, Ö. (2007). Mine matris proteini ve kalsiyum hidroksit ile yapılan vital pulpa girişimlerinin karşılaştırmalı olarak araştırılması. Doktora Tezi, Ege Üniversitesi. İzmir.
141. Luna, L. G. (1968). *Manuel of Histologic Staining Methods of Armed Forces Institute of Pathology*. McGraw-Hill Book Company. 222-226.

EK-1: Etik Kurul Onayı**ETİK KURULU KARARI**

TOPLANTI TARİHİ	TOPLANTI SAYISI	KARAR NO	ÖZÜ
09.04.2014	2014/9	96	Yrd. Doç. Dr. Muhammet YALÇIN

KARAR

“Perfore edilen diş pulpasının yerine yeni doğal diş dokusunu oluşturmak amacıyla liyofilizasyon işlemi ile elde edilmiş kollajen ve MTA dan oluşan kompozit süngerin kullanılması” başlıklı araştırma projenizdeki başlığı “Kollajen ve BioAggregate’ den Oluşan Yapı İskelesinin Perfore Diş Pulpası Üzerindeki Etkisinin incelenmesi” şeklinde değiştirme talebiniz uygun görülmüş projenizde kullanılacağınız 10 Adet Koyun üzerinde yapılacak girişimlerde hayvan kullanım etiği ilkelerine uyulacağı beyan edilmiştir. Bu çerçevede aşağıda ismi bulunan araştırmacıların bu projenin “Hayvan Deneyleti Etik Kurullarının Çalışma Usul ve Esaslarına Dair Yönetmelik” hükümleri yönünden uygun olduğuna oybirliği ile karar verilmiştir.

1. Yrd. Doç. Dr. Muhammet YALÇIN
2. Prof. Dr. Hatice ERÖKSÜZ
3. Arş Gör. Dt. Burak DAYI

GÖREVİ	ADI SOYADI	BÖLÜMÜ	İMZA
Başkan	Prof. Dr. Yesari ERÖKSÜZ	Veteriner Fakültesi	
Üye	Prof. Dr. Murat ÖGETÜRK	Tıp Fakültesi	
Üye	Prof. Dr. Gülsüm ÖKSÜZTEPE	Veteriner Fakültesi	
Üye	Doç. Dr. Sinan CANPOLAT	Veteriner Hekim	
Üye	Doç. Dr. Azize BEŞTAŞ	Tıp Fakültesi	
Üye	Doç. Dr. Mehmet Kaya ÖZER	Tıp Fakültesi	
Üye	Doç. Dr. Gaffari TÜRK	Veteriner Fakültesi	
Üye	Şahin KARA	Sivil Üye	Bulunmadı
Üye	Murat DAĞHAN	Sivil Üye	Bulunmadı

ÖZGEÇMİŞ

1983 yılında Elazığ' da doğdum. İlkokul öğrenimimi Bahçelievler İlköğretim Okulu' nda, orta ve lise öğrenimimi ise Elazığ Anadolu Lisesi' nde tamamladıktan sonra 2001 yılında İstanbul Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi' ni kazandım. 2006 yılında mezun olarak 4 yıl Elazığ' da serbest dişhekimisi olarak çalıştım. 2010 yılında İnönü Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Diş Hastalıkları ve Tedavisi Anabilim Dalı'nda doktora eğitimime başladım ve halen aynı Anabilim Dalı'nda Araştırma Görevlisi olarak devam etmekteyim. Evli ve bir çocuk babasıyım.